

COMUNICAÇÃO

PADRÕES ELETROFORÉTICOS DAS PROTEÍNAS DE RESERVA EM GRÃOS DE SORGO COM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE TANINO

Electrophoretic patterns of grain storage proteins of sorghum with presence and absence of tannin

Walter Alvarenga Rodrigues¹, Paulo César Magalhães², Edilson Paiva², Fredolino Giacomini dos Santos³

RESUMO

Muitos métodos para determinar a presença de taninos são descritos na literatura, mas nenhum deles é universalmente aceito como ideal ou utilizado de forma unânime. Alguns métodos colorimétricos não diferenciam taninos de outros compostos fenólicos, outros utilizam substâncias que não são adequadas como padrão. Métodos que utilizam a capacidade dos taninos de precipitar as proteínas podem causar resultados divergentes devido às diferenças na conformação dessas moléculas. Assim, objetivou-se, neste estudo, identificar a presença de taninos em 10 híbridos de sorgo através da análise de padrões proteicos obtidos por eletroforese. O método colorimétrico Azul da Prússia foi utilizado para quantificar os taninos nas amostras. A precipitação das proteínas pelos taninos permitiu identificar os genótipos de sorgo com tanino através dos padrões proteicos das frações albuminas, globulinas e prolaminas. A análise eletroforética das prolaminas mostrou que as bandas produzidas pelo polipeptídeo kafirina, podem ser utilizadas na identificação de sorgo sem tanino no grão.

Termos para indexação: Compostos fenólicos, método Azul da Prússia, precipitação de proteínas.

ABSTRACT

Several methods are described on the literature to determine the presence of tannin, however none of them is universally accepted as the ideal or even are used in a unanimous way. Some colorimetric methods do not differentiate tannins from others phenolic compounds, others use substances which are not appropriate to use as standard. Methods that use the capacity of tannins to precipitate proteins may end up with divergent results due to differences on the molecule conformation. Thus, the objective of this study was to identify the presence of tannin in 10 hybrids of sorghum throughout analysis of pattern proteins obtained by electrophoresis. The colored method Prussian Blue was used to quantify tannins on the samples. The protein precipitation by tannins permitted to identify the sorghum genotypes with grain tannin through protein standards of fractions of albumin, globulin and prolamins. The electrophoresis analysis of the prolamins showed that the bands produced by the kafirin polypeptide may be used in sorghum identification without the presence of tannin in grain.

Index terms: Phenolic compounds, Prussian Blue assay, protein precipitation.

(Recebido em 23 de julho de 2007 e aprovado em 10 de abril de 2008)

O sorgo diferentemente de outros cereais, produz relativamente grande quantidade de compostos fenólicos, entre os quais os taninos (HAHN et al., 1984).

Os taninos compreendem um grupo de compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas, ou seja, não são necessários ao seu crescimento e reprodução (BUTLER et al., 1984). São encontrados principalmente em frutos verdes e plantas da família *poaceae* (HAHN et al., 1984).

Existem duas classes de taninos: hidrolizáveis e condensados. Os taninos hidrolizáveis (ex. Ácido tânico)

são compostos de um açúcar e um ácido fenolcarboxílico e são hidrolizados por enzimas e ácidos. Ao contrário, os taninos condensados não são afetados por enzimas, mas decompõem-se quando tratados com ácidos formando pequena quantidade de antocianidina, sendo assim denominados proantocianidina (HAHN et al., 1984; HOSENEY et al., 1981).

Quando presentes nos grãos, os taninos protegem o sorgo contra o dano causado por pássaros (RODRIGUES et al., 1992), reduzem a germinação do grão na panícula (HARRIS & BURNS, 1970) e conferem resistência ao

¹Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Associado – Instituto de Ciências Biológicas/ICB – Departamento de Biologia Geral/DBG – Universidade Federal de Goiás/UFG – Cx. P. 131 – 74001-970 – Goiânia, GO – alva@icb.ufg.br

²Engenheiros Agrônomos, Ph.D, Pesquisadores – Embrapa Milho e Sorgo – Rodovia MG 424, Km 66 – Cx. P. 151 – 35701-970 – Sete Lagoas, MG – pcesar@cnpmc.embrapa.br; edilson@cnpmc.embrapa.br

³Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo – Embrapa Milho e Sorgo – Rodovia MG 424, Km 66 – Cx. P. 151 – 35701-970 – Sete Lagoas, MG – fred@cnpmc.embrapa.br

desenvolvimento de fungos causadores da podridão no grão antes da colheita (HARRIS & BURNS, 1973).

Ao contrário dos benefícios no campo, os taninos causam efeitos indesejáveis na dieta. Eles podem formar complexos com as proteínas e assim diminuírem a digestibilidade e a palatabilidade dos alimentos, causando em consequência, o menor ganho de peso aos animais (BUTLER, 1989). Experimentos conduzidos por Cabral Filho (2004) mostraram que a presença de tanino condensado na dieta resultou em menor aproveitamento do nitrogênio pelos animais.

Analisando o efeito do ácido tânico sobre a hidrólise “in vitro” de algumas proteínas, Martinez & Moyano (2003) verificaram que a adição de ácido tânico reduziu a hidrólise da proteína albumina de soro bovino. No entanto, a hidrólise enzimática das proteínas caseína encontrada na ervilha e na soja e a hemoglobina foi aumentada. Este estudo permitiu concluir que, quando simulamos o ambiente gastrointestinal dos animais, o efeito negativo do ácido tânico na redução da hidrólise de proteínas depende da classe de polipeptídeo analisada.

A disponibilidade de aminoácidos após a alimentação de aves com dieta contendo diferentes teores de tanino no grão foi avaliada por Ebadi et al. (2005). Os resultados mostraram que a disponibilidade foi reduzida quando foram utilizadas na dieta variedades de sorgo com tanino no grão. Dentre os aminoácidos avaliados, o aminoácido prolina foi o mais afetado pela presença de tanino na dieta.

Compostos fenólicos podem interagir e formar complexos com proteínas de reserva dos grãos de sorgo. Emmambux & Taylor (2003) mostraram que o ácido tânico e o tanino condensado ligam fortemente a kafirina, uma proteína de reserva do grupo das prolaminas encontrada no sorgo. Esse fato explica a redução da digestibilidade da proteína do sorgo com tanino no grão.

Os métodos disponíveis para quantificar taninos podem ser divididos em duas classes: a) métodos que utilizam as propriedades químicas, ou seja, a capacidade dos compostos fenólicos reagirem com outras substâncias e desenvolverem cor. b) métodos que utilizam as propriedades físicas, isto é, a capacidade dos compostos fenólicos se associarem e precipitarem as proteínas (MAKKAR, 1989).

Métodos colorimétricos são amplamente utilizados, principalmente devido à sua simplicidade e sensibilidade. Entre esses métodos, o Azul da Prússia é o mais comum para quantificar compostos fenólicos totais por ser simples, rápido e tem pouca interferência de compostos que não são fenólicos, no entanto, é um método que promove a

formação de precipitados e aumenta a densidade de cor rapidamente durante a reação de quantificação dos compostos fenólicos, além disso é muito influenciado pelo pH e temperatura da reação (SCHOFIELD et al., 2001).

Métodos para quantificar taninos utilizando sua propriedade de formar complexos e precipitar as proteínas são apresentados na literatura. Segundo Makkar (1989), os procedimentos mais comuns são descritos por Bate-Smith (1973) e Hagerman & Butler (1978).

A maior dificuldade em quantificar taninos nas plantas se deve à grande diversidade de estruturas desse grupo de substâncias (SCHOFIELD et al., 2001). Os métodos colorimétricos por exemplo, geralmente não diferem tanino de outros compostos fenólicos. Outro problema é a dificuldade de obtenção de substâncias adequadas para serem utilizadas como padrão para esses métodos (HOSENEY et al., 1981). Segundo revisão de Schofield et al. (2001), diferentes substâncias utilizadas como padrão para quantificar taninos pelos métodos colorimétricos, podem resultar em valores que diferem em até 30 vezes. Métodos que utilizam a precipitação de proteínas pelos taninos para a sua determinação podem também apresentar erros, principalmente devido às diferenças na conformação dessas moléculas que podem influenciar a interação entre taninos e proteínas (HOSENEY et al., 1981).

Assim, objetivou-se, neste estudo, mostrar que a presença de taninos no sorgo pode ser detectada através da análise eletroforética das proteínas de reserva do grão.

Foram analisados 10 materiais genéticos de sorgo, sendo 3 híbridos experimentais (CMSXS), 4 híbridos comerciais (BR e BRS) e o cultivar de milho BR 106 utilizado como referência para comparações na análise eletroforética do fracionamento proteico. Esses materiais foram fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas-MG. Outros 3 híbridos comerciais de sorgo de instituições privadas também foram analisados (Tabela 1).

A extração dos taninos nas amostras de sorgo foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Price et al. (1978). Para tanto, em tubos de ensaio contendo 500 mg do grão moído, foram adicionados 10 ml de HCl 1% em metanol. As amostras foram agitadas levemente por 20 minutos e a seguir centrifugadas por 8 minutos a 1000 rpm, guardando o sobrenadante que se constituiu no extrato.

A determinação da presença de taninos nas amostras de sorgo foi realizada com 4 repetições, utilizando o método Azul da Prússia, proposto por Price & Butler (1977), conforme procedimento descrito a seguir.

Tabela 1 – Relação de materiais genéticos analisados.

| Materiais Genéticos | Instituição de Origem |
|---------------------|-----------------------|
| BR 300 | Embrapa Milho e Sorgo |
| BR 304 | Embrapa Milho e Sorgo |
| BR 600 | Embrapa Milho e Sorgo |
| CMSXS 356 | Embrapa Milho e Sorgo |
| CMSXS 359 | Embrapa Milho e Sorgo |
| CMSXS 375 | Embrapa Milho e Sorgo |
| BRS 305 | Embrapa Milho e Sorgo |
| AG 3001 | Agrocerec |
| A 9902 | Asgrow |
| CS 111 | Zeneca |
| BR 106 (Milho) | Embrapa Milho e Sorgo |

Em erlemeyer de 125 ml foi adicionado 50 ml de água destilada e 0,2 ml do extrato. O controle foi constituído de 0,2 ml da solução de HCl 1% em metanol. A seguir adicionou-se 3 ml de cloreto férrico (FeCl_3) 0,05M em HCl 0,1N. Após 3 minutos adicionou-se também 3 ml de ferrocianeto de potássio [$\text{FeK}_3(\text{CN})_6$] 0,008M. A leitura de absorbância foi em espectrofotômetro a 720 nm.

Uma curva padrão foi obtida a partir de diferentes concentrações de ácido tânico para quantificar os taninos nas amostras conforme procedimento descrito a seguir: Em balão volumétrico de 100 ml adicionou-se 100 mg de ácido tânico completando-se o volume com uma solução de HCl 1% em metanol. Alíquotas de 0 a 1,0 ml com diferenças de 0,1 ml foram pipetadas em tubo de ensaio completando-se o volume para 10 ml com a solução de HCl 1% em metanol.

A seguir, em erlemeyer contendo 50 ml de água bidestilada, pipetou-se 0,1 ml da solução de 10 ml preparada anteriormente. Para o controle utilizou-se 0,1 ml da solução de HCl 1% em metanol. Foram adicionados 3 ml de cloreto férrico e após 3 minutos, 3 ml de ferrocianeto de potássio. A curva padrão foi construída com leituras em espectrofotômetro a 720 nm.

Os dez cultivares de sorgo e o cultivar de milho foram submetidos à análise eletroforética das proteínas de reserva do endosperma, em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). O fracionamento das proteínas foi realizado de acordo com o método de Landry & Moreaux (1970) com algumas modificações, conforme descrição a seguir: uma amostra de 50mg do endosperma moído foi suspensa por 10 minutos em 500 μL de uma solução 0,5M de NaCl sob agitação e submetida a uma centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos para extração das albuminas e globulinas (fração

I). Para a extração das prolaminas, o precipitado da fração I foi lavado com água, centrifugado e suspenso em solução de álcool isopropílico 70% e 3% de 2-mercaptoetanol e centrifugado (fração II). Para a extração das glutelinas, o precipitado da fração II foi suspenso em uma solução de borato de sódio 0,0125M, pH 10, 3% de 2-mercaptoetanol e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e a seguir centrifugado (fração III). A proporção 1:10 entre o peso da amostra e o volume da solução extratora, tempo de incubação de 10 minutos com agitação e a centrifugação de 3000 rpm por 10 minutos, utilizados no preparo da fração I, foram mantidos no preparo das demais frações.

Para obtenção dos padrões eletroforéticos das proteínas presentes nas diferentes frações, foram misturados 30 μL dos sobrenadantes com 30 μL de uma solução tampão contendo 62,5 mM de tris-HCl pH 6,8, 2,3% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol e 5 μL de uma solução 0,1% de azul de bromofenol e 10% de glicerol. A mistura foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e 30 μL foram aplicados no gel.

Os géis foram preparados com 5% de acrilamida para a região de empilhamento (“Staking gel”) e 12,5% de acrilamida, na região de separação das proteínas (“Running gel”). A corrida foi desenvolvida à temperatura ambiente, aplicando-se uma corrente constante de 12 mA por uma hora, seguida de um período de três horas a 24 mA. Para a coloração das bandas proteicas, foi utilizada uma solução de coomassie azul brilhante R-250 a 0,1%, diluída em etanol/ácido acético/água (50:10:40 v/v) por 12 horas. Para lavagem do gel, foi utilizado metanol/ácido acético/água (5:10:85 v/v).

O teor de tanino no grão em equivalente ácido tânico para os 10 híbridos avaliados observa-se na Tabela

2. O coeficiente de variação entre as médias dos híbridos foi de 71,72%, mostrando que houve variabilidade genética, permitindo assim reuni-los em dois grupos distintos: Aqueles com baixo teor de tanino no grão, considerados sem tanino, representados pelos híbridos BR 300 (0,257), BR 304 (0,513), CMSXS 356 (0,218) e CMSXS 359 (0,215) e aqueles com alto teor de tanino no grão representados pelos híbridos BR 600 (2,185), CMSXS 375 (2,895), BRS 305 (2,003), AG 3001 (1,863), A9902 (1,935), e CS 111 (1,565).

A escolha dos híbridos experimentais CMSXS baseou-se principalmente no parentesco entre esses materiais visando fornecer informações adicionais ao programa de melhoramento genético de sorgo da Embrapa Milho e Sorgo. Assim os híbridos CMSXS 356 e 359, que são considerados materiais sem tanino no grão como indica-se na Tabela 2, possuem o genitor masculino em comum, a linhagem CMSXS 180R. Portanto, essa é uma linhagem com boa capacidade de combinação para a obtenção de híbridos sem tanino no grão. Por outro lado, os híbridos CMSXS 375 e BRS 305 com 2,895 e 2,003 equivalente ácido tânico respectivamente, possuem a mesma linhagem genitora (CMSXS 210B), assim pôde-se concluir que o genitor masculino do híbrido BRS 305 apresentou melhor combinação com essa linhagem para obtenção de sorgo com tanino, resistente a pássaros e com boas qualidades nutritivas.

Os padrões obtidos por eletroforese da fração I (albuminas e globulinas) e fração II (prolaminas) são apresentados nas figuras 1 e 2, respectivamente. Nota-se que é possível discriminar os híbridos de sorgo quanto à presença de taninos no grão, analisando os

padrões eletroforéticos desses polipeptídeos. Observa-se que os materiais com tanino (números ímpares nas colunas) apresentaram menor quantidade de proteína no gel que os materiais sem tanino. Esse resultado deve-se à capacidade dos taninos de se associar e precipitar as proteínas (BUTLER, 1982). Esse fato ocorreu durante o procedimento de centrifugação após as amostras serem agitadas para a extração das proteínas. A alteração de forma quantitativa no fracionamento das albuminas, globulinas e prolaminas também foi observada por Guiragossian et al. (1978) e Jambunathan & Mertz (1973).

Na Figura 1, observa-se também o padrão proteico das proteínas classificadas como albuminas e globulinas para a variedade de milho BR 106 (coluna 2). Nota-se uma maior quantidade de proteína presente no gel em relação aos cultivares de sorgo com ausência de tanino no grão. Isso ocorreu porque uma pequena quantidade de proteína presente nos híbridos de sorgo foi precipitada pelos taninos. Esse resultado pode explicar um dos motivos pelo qual o sorgo sem tanino no grão, possui qualidade nutricional inferior ao milho.

Padrões proteicos de polipeptídeos do grupo das zeínas para a variedade de milho, são apresentados na figura 2 (coluna 10). Esses polipeptídeos possuem pesos moleculares de 27, 22 e 19 kD (PAIVA et al., 1992). Em sorgo esses polipeptídeos são denominados kafirina, Butler (1982). Podem ser identificados pelas colunas correspondentes aos números pares. Percebe-se que os híbridos de sorgo sem tanino, apresentaram maior quantidade desse polipeptídeo no gel em relação àqueles com tanino no grão.

Tabela 2 – Equivalente ácido tânico para os genótipos avaliados. Média de quatro repetições.

| Híbridos | Equivalente ácido tânico (%) |
|-----------|------------------------------|
| BR 300 | 0,257 |
| BR 304 | 0,513 |
| BR 600 | 2,185 |
| CMSXS 356 | 0,218 |
| CMSXS 359 | 0,215 |
| CMSXS 375 | 2,895 |
| BRS 305 | 2,003 |
| AG 3001 | 1,863 |
| A 9902 | 1,935 |
| CS 111 | 1,565 |

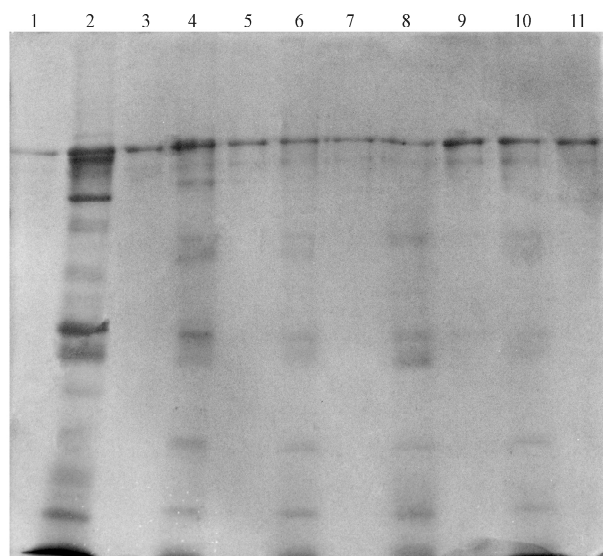


Figura 1 – Padrões de eletroforese das proteínas presentes na Fração I (albuminas e globulinas) extraídas de endosperma do sorgo ou milho. 1. BR 600; 2. BR 106 (milho); 3. CMSXS 375; 4. BR 300; 5. AG 3001; 6. CMSXS 356; 7. A 9902; 8. BR 304; 9. BRS 305; 10. CMSXS 359; 11. CS 111.

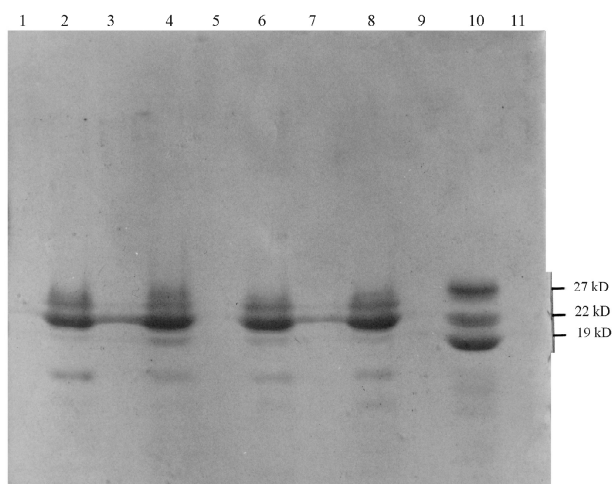


Figura 2 – Padrões de eletroforese das proteínas presentes na Fração II (Prolaminas) extraídas de endosperma do sorgo ou milho. 1. CS 111; 2. CMSXS 359; 3. BRS 305; 4. BR 304; 5. A 9902; 6. CMSXS 356; 7. AG 3001; 8. BR 300; 9. CMSXS 375; 10. BR 106 (milho); 11. BR 600.

As proteínas diferem em sua afinidade pelos taninos. Butler (1982) relaciona algumas características dos polipeptídeos como a kafirina, que são importantes para a

sua associação com os taninos. Proteínas com alto peso molecular, mais abertas e flexíveis tem maior afinidade pelos taninos. Por outro lado, proteínas globulares que são mais compactas possuem menor afinidade pelos compostos fenólicos. A afinidade das proteínas pelos taninos é maior no ponto isoelétrico da proteína, embora algumas proteínas se associam aos taninos em um amplo limite de pH. Outro fator que interfere na associação entre taninos e proteínas é a quantidade de prolina no polipeptídeo. As proteínas ricas em prolina, como as zeínas no milho ou kafirina no sorgo, são lineares, uma vez que esse aminoácido não se insere em uma estrutura em α -hélice, assim, aumenta-se a superfície de contato do polipeptídeo. Essa afinidade das proteínas ricas em prolina pelo tanino condensado foi comprovada por Emmambux & Taylor (2003).

Quanto à fração III (glutelinas), os padrões eletroforéticos desses oligopeptídeos não permitiram essa diferenciação entre os materiais quanto à presença de taninos no grão, isso porque as proteínas dessa fração não diferiram quanto à sua afinidade pelos taninos.

Muitos laboratórios de biologia molecular não têm uma metodologia para quantificar taninos em sorgo, mas fazem análise eletroforética de segmentos de DNA como rotina. Assim, esses laboratórios podem realizar o procedimento descrito nesse estudo para identificar de forma qualitativa a presença de taninos em sorgo, a partir da análise eletroforética das proteínas de reserva dos grãos.

Os resultados obtidos permitiram concluir que os padrões proteicos obtidos através da técnica de eletroforese de proteínas de reserva dos grãos de sorgo, podem ser utilizados para detectar a presença de taninos, sendo que as frações proteicas representadas pelas albuminas, globulinas e prolaminas diferenciaram os genótipos de sorgo quanto à presença de taninos. Entre as prolaminas, as bandas produzidas pelo polipeptídeo kafirina podem ser utilizadas na identificação de sorgo sem tanino no grão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATE-SMITH, E. C. Haemalysis of tannins: the concept of relative astringency. **Phytochemistry**, Oxford, v. 21, p. 907-912, 1973.
- BUTLER, L. G. Polyphenols and their effects on sorghum quality. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SORGHUM GRAIN QUALITY, 1981, Patancheru, India. **Proceedings...** Patancheru: ICRISAT, 1982. p. 294-311.

- BUTLER, L. G. Sorghum polyphenols. In: CHEEKE, P. R. (Ed.). **Toxicants of plant origin**. Boca Raton: CRC, 1989. v. 4, cap. 5, p. 95-121.
- BUTLER, L. G.; RIEDL, D. J.; LEBRYK, D. G.; BLYTT, H. J. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. **Journal American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 61, n. 5, p. 916-920, 1984.
- CABRAL FILHO, S. L. S. **Efeito do teor de tanino do sorgo sobre a fermentação ruminal e parâmetros nutricionais de ovinos**. 2004. 77 f. Tese (Doutorado em zootecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.
- EBADI, M. R.; POURREZA, J.; JAMALIAN, J.; EDRISS, M. A.; SAMIE, A. H.; MIRHADI, S. A. Amino acid content and availability in low, medium and high tannin sorghum grain for poultry. **International Journal of Poultry Science**, Pakistan, v. 4, n. 1, p. 27-31, 2005.
- EMMAMBUX, N. M.; TAYLOR, J. R. Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n. 5, p. 402-407, 2003.
- GUIRAGOSSIAN, V.; CHIBBER, B. A. K.; SCOYOC, S. V.; JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E. T.; AXTELL, J. D. Characteristics of proteins from normal, high lysine, and high tannin sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 1, p. 219-223, 1978.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, p. 809-812, 1978.
- HAHN, D. H.; ROONEY, L. W.; EARP, C. F. Tannins and phenols of sorghum. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v. 29, n. 12, p. 776-779, 1984.
- HARRIS, H. B.; BURNS, R. E. Influence of tannin content on preharvest seed germination in sorghum. **Agronomy Journal**, Madison, v. 62, p. 835-836, 1970.
- HARRIS, H. B.; BURNS, R. E. Relationship between tannin content of sorghum grain and preharvest seed molding. **Agronomy Journal**, Madison, v. 65, p. 957-959, 1973.
- HOSENEY, R. C.; VARRIANO-MARSTON, E.; DENDY, D. A. V. Sorghum and millets. **Advances in Cereal Science and Technology**, Saint Paul, v. 4, p. 71-144, 1981.
- JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E. Relationship between tannin levels, rat growth, and distribution of proteins in sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 21, n. 4, p. 692-696, 1973.
- LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity of the glutelins of the grain of corn, selective extraction and composition in amino acids of the insoluble fractions. **Bulletin de la Société Chimie Biologique**, Paris, v. 52, p. 1021-1037, 1970.
- MAKKAR, H. P. S. Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 37, n. 4, p. 1197-1202, 1989.
- MARTINEZ, T. F.; MOYANO, F. J. Effect of tannic acid on in vitro enzymatic hydrolysis of some protein sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n. 5, p. 456-464, 2003.
- PAIVA, E.; VASCONCELOS, M. J. V.; PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G. e; MAGNAVACA, R. Seleção de progênies de milho doce de alto valor nutritivo com auxílio de técnicas eletroforéticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 8, p. 1213-1218, 1992.
- PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.
- PRICE, M. L.; SCOYOC, A. V.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.
- RODRIGUES, W. A.; PAIVA, E.; SANTOS, F. G.; RODRIGUES, J. A. S. Variabilidade para teor de tanino em sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e sua associação com a resistência a pássaros. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 16, n. 1, p. 74-77, 1992.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v. 91, p. 21-40, 2001.