

## RESPUESTA DE TERNEROS A PULPA DE CAFE, CAFFEINA Y ACIDO TANICO EN LA RACION<sup>1</sup>

*Marco Tulio CABEZAS,<sup>2</sup> Eugenia ESTRADA,<sup>2</sup> Beatriz MURILLO,<sup>2</sup> Jorge Mario GONZALEZ<sup>3</sup> y Ricardo BRESANNI<sup>2</sup> Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala, Guatemala, C. A.*

### RESUMEN

Se realizaron tres experimentos con terneros Holstein de 90 a 200 kg de peso con miras a conocer los efectos de la cafeína (C) y del ácido tánico (AT) químicamente puros, administrados a niveles factibles de encontrar en raciones con más de 20% de pulpa de café deshidratada (PCD), sobre el crecimiento, el consumo y la eficiencia de conversión del alimento, así como la concentración de ciertos metabolitos del suero sanguíneo de animales rumiantes. Los efectos observados se compararon con los producidos por raciones que contenían 30% de pulpa de café (PDC), la que aportaba cantidades similares de cafeína y taninos.

Los tratamientos fueron los siguientes: Experimento No. 1: testigo 30% PCD, 0.12% C y 0.24% C; Experimento No. 2: testigo, 30% PCD, 0.75% AT y 1.50% AT, y Experimento No. 3: 0.75% AT, 0.75% AT + 0.12% C, 0.75% AT + 0.18% C y 0.75% AT + 0.24% C. La ración testigo contenía 48% de cascari-lla de algodón y fue formulada para producir un crecimiento rápido en los terneros (más de 1.0 kg/animal/día). En todos los casos la PCD y los compuestos

químicos fueron incluidos en substitución de cascari-lla de algodón, a excepción del primer experimento, en el que la cafeína fue agregada a las raciones. Aquéllas con PCD, contenían 0.12% C y 0.76% de taninos provenientes de la pulpa. La duración de los dos primeros experimentos fue de 14 semanas y la del tercero, de 12 semanas.

Los resultados muestran que 0.12% de C y los dos niveles de AT aplicados por sí solos no produjeron efectos adversos significativos en el comportamiento de los terneros; sin embargo, en los animales que recibieron 0.24% C y las tres combinaciones de C y AT, se observaron disminuciones significativas en ganancia de peso ( $P < 0.05$ ), así como en el consumo y la eficiencia de conversión del alimento, siendo más acentuados estos efectos a medida que la cantidad de C aumentaba. No se constataron diferencias significativas, atribuibles a tratamientos, en los metabolitos del suero sanguíneo determinados al inicio y al final de cada periodo experimental (proteína, albúmina, glucosa y ácidos grasos libres).

### SUMMARY

Three experiments were carried out with Holstein steers, to determine the effects of chemically pure caffeine (C)

and tannic acid (TA) administered at levels found in rations containing more than 20% dehydrated coffee pulp (DCP), on growth, feed intake, feed conversion efficiency, and concentration of certain metabolites in the blood serum of ruminant animals. Such effects were compared with those produced by rations containing 30% DCP that provided similar quantities of caffeine and tannins.

<sup>1</sup> Trabajo realizado con ayuda financiera del International Development Research Centre (IDRC) (Subvención INCAP No. 840).

<sup>2</sup> División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del Instituto.

<sup>3</sup> Administrador de la Finca Experimental de la misma División.

Recibido, Noviembre 1976.

The treatments were as follows: Experiment No. 1: control, 30% DCP, 0.12% C, and 0.24% C; Experiment No. 2: control, 30% DCP, 0.75% TA, and 1.50% TA, and Experiment No. 3: 0.75% TA, 0.75% TA + 0.12% C, 0.75% TA + 0.18 % C, and 0.75% TA + 0.24% C. The control ration contained 48% cottonseed hulls and was formulated to produce rapid growth in calves (more than 1.0 kg/animal/day). In all cases the DCP and chemical compounds were included in substitution of cottonseed hulls, except in the first experiment when C was added to the rations. Those rations with DCP contained 0.12% C and 0.76% TA provided by the pulp. The duration of the first two ex-

periments was 14 weeks and that of the third, 12 weeks.

The results show that 0.12% C and the two TA levels by themselves did not produce significant adverse effects on calf behavior; however, in animals that received 0.24% C and the three combinations of C and TA, significant decreases in weight were observed ( $P < 0.05$ ), as well as in feed consumption and efficiency of food conversion. These effects were more marked as the quantity of C increased. No significant differences due to treatments were found in the concentration of blood serum metabolites (protein, albumin, glucose and free fatty acids) at the beginning nor at the end of each experimental period.

## INTRODUCCIÓN

La pulpa de café es un subproducto agrícola que abunda en América Latina. Sin embargo, por ser de utilización muy limitada, ocasiona graves problemas de contaminación ambiental. Análisis realizados por Bressani *et al.* (1972) muestran que las características químicas de este material permiten considerarlo como un alimento apropiado para animales rumiantes. No obstante, se ha podido comprobar que la inclusión de pulpa de café deshidratada en raciones para ganado de carne, en substitución de forrajes o cereales, induce un descenso en el consumo de alimento; que la tasa de crecimiento de los animales disminuye en relación directa a la proporción de pulpa en la ración, y que tales efectos son más severos cuando la proporción excede del 20% (Braham *et al.*, 1973; Jarquín *et al.*, 1973; Osegueda Jiménez *et al.*, 1970). Todavía no se conocen las causas de estos efectos adversos, pero se sospecha que una de ellas podría

ser la presencia de sustancias tóxicas en la pulpa. En vista de que se sabe que la pulpa contiene cafeína y taninos (Bressani *et al.*, 1972) y que ambas sustancias pueden ser tóxicas para animales monogástricos y rumiantes (Cameron *et al.*, 1943; Glick y Joslyn, 1970; Sollman, 1957; Vohra *et al.*, 1966), bien puede ser que estos compuestos contribuyan en forma aislada o conjunta, a producir los efectos adversos que se observan cuando los animales consumen dicho subproducto. El trabajo de que se informa seguidamente se llevó a cabo con el objeto de determinar los efectos de la cafeína y del ácido tánico químicamente puros sobre el crecimiento y la utilización del alimento por novillos estabulados. Un segundo propósito fue establecer su posible relación con el menor rendimiento de los animales alimentados con raciones que contienen pulpa de café a niveles de más de 20%.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo tres experimentos de alimentación con terneros de raza Holstein criados artificialmente mediante un sistema de destete precoz, cuya edad era de 100 días en el primero y el segundo experimento, y de 200 días en el tercero. La duración de los dos primeros estudios fue de 14 semanas y la del tercero, de 12 semanas. Los animales se alojaron en corrales con piso de cemento, provistos de un área techada, con libre acceso a las raciones de los tratamientos respectivos, a sal mineralizada y agua, llevándose además, un registro

semanal del alimento consumido. Los terneros fueron pesados después de 16 horas de ayuno cada 2 o 4 semanas. Además, al inicio y al final de cada período experimental a todos los animales se les tomó, en ayunas, muestras de sangre por punción yugular, determinándose en el suero sanguíneo proteína total (Weichselbaum, 1946), albúmina (Ness *et al.*, 1965), glucosa (Hoffman, 1925) y ácidos grasos libres (AGL) (Laurell y Tibbling, 1966).

*Experimento No. 1 — Efecto de la cafeína y de la pulpa de café*

Se aplicaron cuatro tratamientos a grupos de 6 terneros cada uno, utilizando las raciones cuya composición se detalla en el Cuadro 1. La ración

CUADRO 1. COMPOSICION DE LAS RACIONES UTILIZADAS EN EL EXPERIMENTO No. 1

Ingredientes, %	Tratamientos			
	1 Testigo	2 30% PCD <sup>1</sup>	3 0.12% C <sup>2</sup>	4 0.24% C
Harina de algodón	15.0	15.0	15.0	15.0
Afrecho de trigo	15.0	15.0	15.0	15.0
Melaza	20.0	20.0	20.0	20.0
Minerales <sup>3</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Urea	1.0	1.0	1.0	1.0
Cascarilla de algodón	48.0	18.0	48.0	48.0
Pulpa de café deshidratada	—	30.0	—	—
Cafeína, U.S.P. <sup>4</sup>	—	—	0.12	0.24
	100.00	100.00	100.12	100.24

Composición proximal, % de materia seca.

Extracto etéreo	2.8	2.9	2.7	2.8
Fibra cruda	30.0	21.1	30.5	29.7
Proteína cruda	13.4	15.3	14.9	15.3
Cenizas	5.6	7.0	5.6	5.7
Extracto libre de nitrógeno	48.2	53.7	46.3	46.5

<sup>1</sup> PCD = Pulpa de café deshidratada.

<sup>2</sup> C = Cafeína.

<sup>3</sup> Composición de la mezcla de minerales: hueso molido, 28.6%; carbonato de calcio, 28.0%; sal, 28.0%; azufre, 13.0% y minerales menores, 1.8%.

<sup>4</sup> U.S.P. = The United States Pharmacopeia.

testigo ya ha sido utilizada en estudios previos con el mismo tipo de animales, obteniéndose ganancias de peso mayores de un kg/ternero/día (Braham *et al.*, 1973). Los dos niveles de cafeína pura monohidratada (0.12 y 0.24%) agregados a la ración testigo en los tratamientos No. 3 y No. 4, fueron seleccionados por ser representativos de las cantidades de cafeína que la pulpa de café deshidratada (PCD) aporta al ser incorporada a la ración en proporciones que sobrepasan de 20%. El tratamiento No. 2 se incluyó con el fin de comparar los efectos de los dos niveles de cafeína pura con los producidos por 30% de pulpa de café, usada

en substitución de cascarilla de algodón, y que suministró aproximadamente 0.12% de cafeína y 0.76% de taninos a la ración. Se utilizó pulpa de café deshidratada al sol durante tres días, tanto en éste como en el experimento 2 (Cuadro 2.).

CUADRO 2. COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE EMPLEADA EN LOS EXPERIMENTOS No. 1 Y No. 2

Componente químico	g/100 g de materia seca
Humedad	13.1
Extracto etéreo	2.9
Fibra cruda	30.7
Proteína cruda	13.5
Cenizas	9.3
Extracto de nitrógeno	43.6
Cafeína	0.34
Taninos	2.58

CUADRO 3. COMPOSICION DE LAS RACIONES EN EL EXPERIMENTO No. 2

Ingredientes, %	1 Testigo	Tratamientos		
		2 30%	3 0.75%	4 1.50%
Harina de algodón	15.0	15.0	15.0	15.0
Afrecho de trigo	15.0	15.0	15.0	15.0
Melaza	20.0	20.0	20.0	20.0
Minerales <sup>3</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Urea	1.0	1.0	1.0	1.0
Cascarilla de algodón	48.0	18.0	47.25	46.50
Pulpa de café deshidratada	—	30.0	—	—
Acido tánico, U.S.P.	—	—	0.75	1.50
	100.0	100.0	100.00	100.00

Composición proximal, % de materia seca.

Extracto etéreo	2.6	2.8	2.1	1.8
Fibra cruda	30.8	21.1	29.6	29.7
Proteína cruda	16.3	18.0	15.6	13.9
Cenizas	5.0	7.1	5.2	5.1
Extracto libre de nitrógeno	45.3	51.1	47.5	49.5

<sup>1</sup> PCD = Pulpa de café deshidratada.

<sup>2</sup> AT = Acido tánico.

<sup>3</sup> Véase Cuadro 1.

## Experimento No. 2 — Efecto del ácido tánico y de la pulpa de café

En este caso se usó el mismo diseño que el del Experimento No. 1, pero los tratamientos se aplicaron a dos bloques de 4 animales cada uno. La composición de las raciones, en términos de ingredientes, se muestra en el Cuadro 2. La selección de los niveles de ácido tánico se hizo en base al mismo criterio, ya expresado, a que se ciñó la cafeína.

## Experimento No. 3 — Efecto de la combinación de cafeína y ácido tánico

Para el diseño de este experimento se tomaron en cuenta los resultados obtenidos en los dos primeros, utilizándose 2 bloques de 3 terneros en cada uno de los cuatro tratamientos sometidos a estudio. Estos consistieron en agregar a la ración

control de los experimentos anteriores, las siguientes cantidades de cafeína + y/o ácido tánico en sustitución de cascarilla de algodón: tratamiento No. 1: 0.75% de ácido tánico; tratamiento No. 2: 0.75% de ácido tánico + 0.12% de cafeína; tratamiento No. 3: 0.75% de ácido tánico + 0.18% de cafeína y tratamiento No. 4: 0.75% de ácido tánico + 0.24% de cafeína. La composición química de las raciones fue similar a la de los experimentos anteriores.

Las raciones como la pulpa de café fueron analizadas para determinar su composición siguiendo los métodos del AOAC (1970). En la pulpa de café se efectuaron también análisis de cafeína (Ishler *et al.*, 1948) y taninos (Schanderl, 1970).

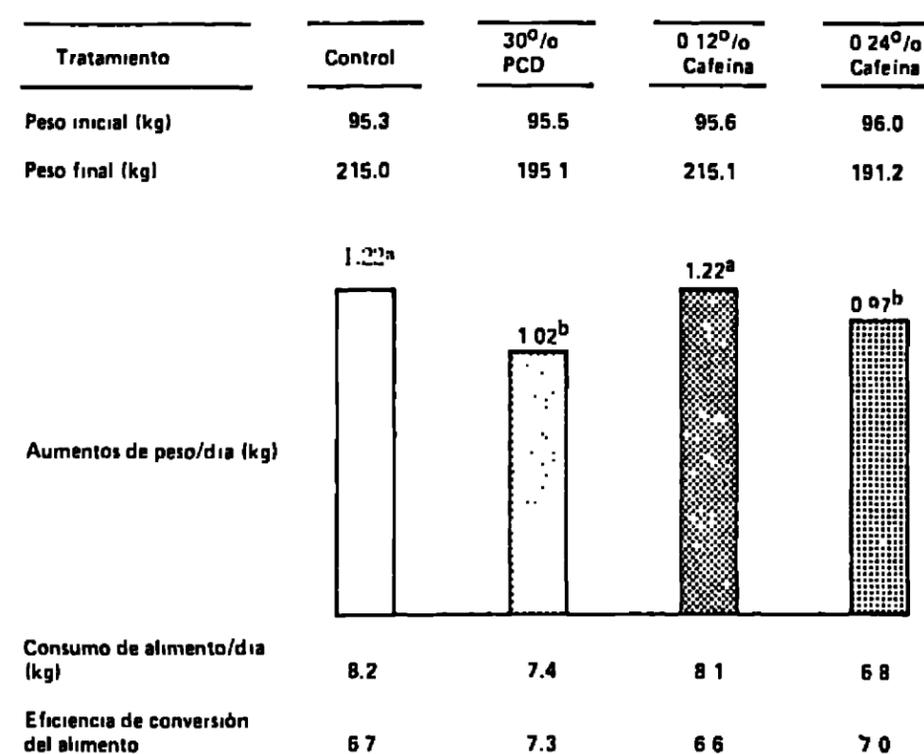
Los aumentos de peso fueron evaluados estadísticamente como un diseño de bloques al azar mediante el análisis de varianza y la prueba múltiple de Duncan (Le Cregg, 1957).

## RESULTADOS

### Experimento No. 1 — Efecto de la cafeína y de la pulpa de café

El comportamiento de los terneros sometidos a los diferentes tratamientos se presenta en la Figura 1. Según se observa, la substitución parcial de cascarilla de algodón por pulpa de café indujo disminuciones en el consumo de alimento y en los aumentos de peso de los animales ( $P < 0.05$ ), con respecto a los alimentados con la ración testigo. El incremento de peso de los terneros que consumieron la ración con 0.12% de cafeína fue similar al de los grupo testigo, lo que no sucedió a aquellos cuya ración contenía 0.24% de cafeína. En éstos la respuesta fue similar a la del grupo que recibió pulpa de café en la ración. Además, estos dos últimos tratamientos obtuvieron una menor eficiencia en la conversión del alimento.

Los resultados de las determinaciones bioquímicas en suero sanguíneo al inicio y al final del periodo experimental se aprecian en el Cuadro 4. Los valores de proteína y albúmina permanecieron casi constantes, mientras que los de glucosa aumentaron al final en todos los tratamientos. El nivel de AGL disminuyó en el grupo testigo y en los que consumieron pulpa de café o 0.12% de cafeína, pero aumentó ligeramente en el grupo cuya ración contenía 0.24% de cafeína.



a, b Cifras con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Incap 76 1377

Fig. 1. Efecto de la pulpa de café deshidratada y de la cafeína sobre el comportamiento de terneros.

CUADRO 4. CONCENTRACION DE METABOLITOS EN EL SUERO SANGUINEO

Experimento	Tratamiento	Metabolitos							
		Proteína g%		Albumina g%		Glucosa mg/100 ml		AGL mEq/lt	
		i <sup>1</sup>	f <sup>1</sup>	i	f	i	f	i	f
No. 1	Testigo	6.3	6.7	2.9	3.0	58.0	82.0	465.0	334.0
	30% PCD <sup>2</sup>	6.3	6.7	3.0	2.8	63.0	73.0	394.0	284.0
	0.12% C <sup>3</sup>	6.5	6.6	3.0	3.1	63.0	75.0	483.0	285.0
	0.24% C	6.5	6.2	3.0	2.8	65.0	79.0	315.0	329.0
No. 2	Testigo	6.1	6.6	3.0	3.2	45.0	88.0	395.0	308.0
	30% PCD	6.1	6.6	3.2	3.0	57.0	90.0	354.0	315.0
	0.75% AT <sup>4</sup>	6.5	6.6	3.0	3.1	49.0	97.0	392.0	232.0
	1.50% AT	6.4	6.6	3.2	3.0	54.0	89.0	313.0	253.0
No. 3	0.75% AT	6.6	6.5	3.0	3.1	70.0	86.0	559.0	668.0
	0.75% AT + 0.12% C	6.6	6.4	3.1	3.0	75.0	83.0	712.0	832.0
	0.75% AT + 0.18% C	6.8	6.9	3.2	3.3	74.0	87.0	659.0	728.0
	0.75% AT + 0.24% C	6.7	6.9	2.7	3.0	66.0	82.0	550.0	800.0

<sup>1</sup> i = Valores iniciales; f = valores finales.

<sup>2</sup> PCD = Pulpa de café deshidratada.

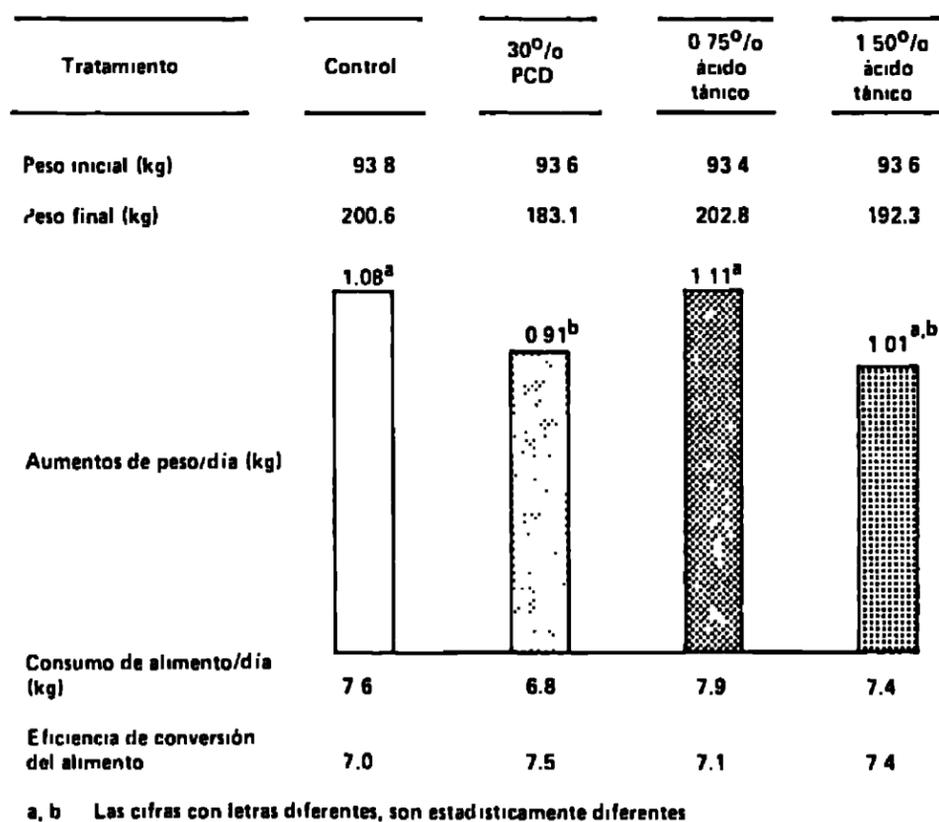
<sup>3</sup> C = Cafeína.

<sup>4</sup> AT = Acido tánico.

*Experimento No. 2 — Efecto del ácido tánico y de la pulpa de café*

Como se muestra en la Figura 2, el rendimiento de los animales del grupo testigo fue inferior al obtenido en el Experimento No. 1; sin embargo, persiste la diferencia con el incremento de los que recibieron pulpa de café, de manera que el efecto adverso de este material sobre los aumentos de peso y la utilización del alimento continúa apreciándose. Ninguno de los dos niveles de ácido tánico afectó en forma significativa el comportamiento de los terneros, aun cuando los que recibieron 1.5% de esa sustancia rindieron menos eficientemente en los tres parámetros medidos, que los que consumieron la mitad de ese porcentaje, o sea 0.75%. En este sentido, cabe mencionar que la pulpa de café utilizada en este experimento contenía 2.58% de taninos, lo que significa que al incluirse en la ración, aportó 0.76% de esos compuestos.

La influencia de los tratamientos sobre la concentración de metabolitos en el suero sanguíneo fue similar a la observada en el Experimento No. 1 (Cuadro 4).



Incap 75 1378

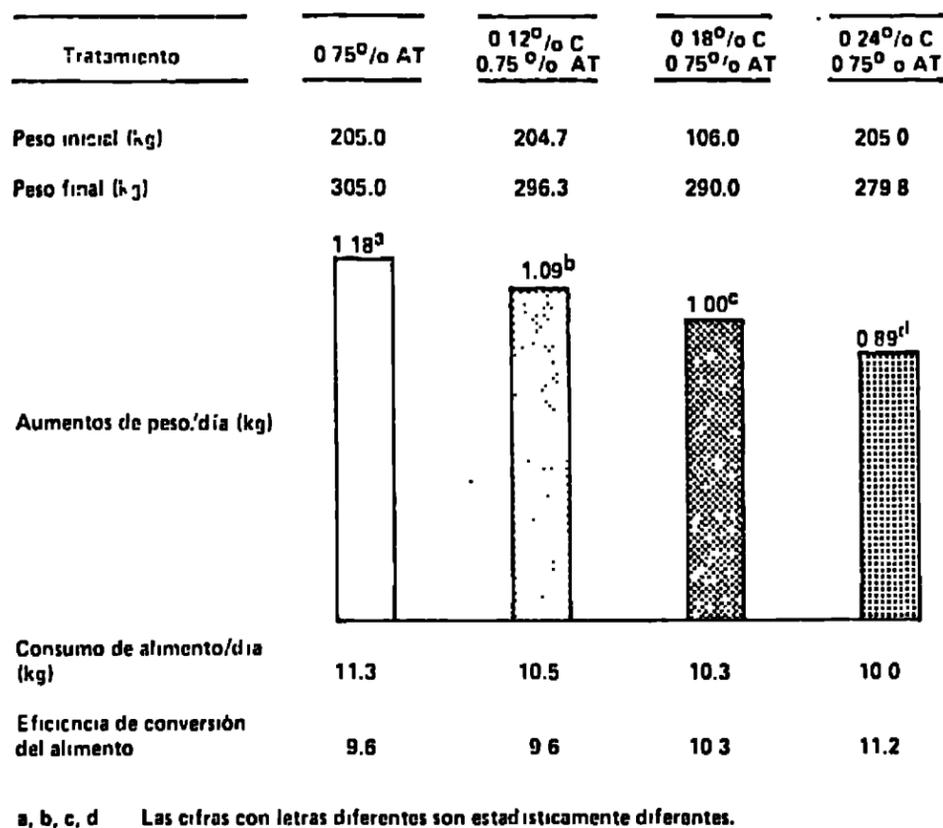
Fig. 2. Efecto de la pulpa de café deshidratada y del ácido tánico sobre el comportamiento de terneros.

### Experimento No. 3 — Efecto de la combinación de cafeína y ácido tánico

El nivel de ácido tánico aplicado en los cuatro tratamientos de este Experimento (0.75%) se seleccionó considerando las cantidades de taninos aportadas por la pulpa de café en los ensayos anteriores, y el hecho de que tal nivel por sí solo no produjo efectos adversos en el comportamiento de los terneros. Esta evidencia la confirma el examen de los resultados de este último Experimento (Figura 3). Según se observa, las ganancias ponderales del grupo que recibió sólo 0.75% de ácido tánico fueron del mismo orden que las obtenidas con la ración testigo en los primeros experimentos, aunque la eficiencia de conversión del alimento fue más baja por ser los animales en este caso, de más edad y peso. Al administrar el mismo porcentaje de ácido tánico en combinación con 0.12% de cafeína, que por sí sola tampoco produjo efectos negativos en los animales a tal nivel, la tasa de crecimiento disminuyó en forma significativa ( $P < 0.05$ ), como resultado de un menor consumo y eficiencia de conversión del alimento. Estos efectos fueron acentuándose a medida que el porcentaje de cafeína se aumentaba a 0.18 y a 0.24%, observándose diferencias significativas entre todos los tratamientos ( $P < 0.05$ ) en cuanto a ganancia de peso.

Como se muestra en el Cuadro 4, las concentraciones de proteína, albúmina y glucosa en el suero sanguíneo no presentan diferencias importantes

con respecto a las de los dos primeros experimentos. A pesar de que las concentraciones iniciales fueron más altas que en los experimentos anteriores, en todos los tratamientos se produjeron aumentos de los AGL al final del período de alimentación, notándose un mayor incremento en los animales que recibieron 0.24% de cafeína más 0.75% de ácido tánico.



Incap 76 1376

Fig. 3. Efecto de la cafeína y del ácido tánico sobre el comportamiento de terneros.

### DISCUSIÓN

La composición química de principios inmediatos de la pulpa de café empleada en el presente estudio fue similar a la encontrada por Bressani *et al.* (1972), con la diferencia de que el porcentaje de fibra cruda fue un tanto más alto en este caso. Los niveles de cafeína fueron inferiores a los determinados por los autores ya citados (Bressani *et al.*, 1972), mientras que los de taninos fueron representativos de los determinados en las diferentes muestras de Guatemala analizadas hasta el momento en nuestro laboratorio.

La pulpa de café causó disminuciones en el consumo y en la utilización del alimento así como en el crecimiento de los animales, similares a los publicados por Jarquín *et al.* (1973) y por Braham *et al.* (1973) utilizando raciones de igual formulación a las empleadas en este

estudio. En los estudios en referencia no se presentan datos sobre el contenido de cafeína en la pulpa, pero el hecho que la inclusión de 0.24% de cafeína pura en la ración produjera la mayor reducción en el rendimiento de todos los grupos de terneros del Experimento No. 1 de esta investigación, indica que la cafeína por sí sola puede constituir un factor adverso para los animales. Lo mismo aplica si se incorporan cantidades que excedan del 30% de café en la ración de pulpa con bajos niveles de cafeína como la que se empleó en esta oportunidad. Por otro lado, la inclusión de 0.12% de cafeína no causó los efectos negativos inducidos por la ración que contenía una cantidad similar de cafeína proveniente de pulpa de café. Esto indica que los descensos en el consumo de alimento y en los aumentos de peso producidos por el

consumo de pulpa en los dos primeros experimentos, no pueden atribuirse exclusivamente a la cafeína, sino también a otros factores que actúan aisladamente, o bien asociados a la cafeína. Los resultados del Experimento No. 3 muestran que uno de esos factores pueden ser los taninos, pues se observa una clara interacción entre ambos compuestos en su efecto sobre los parámetros físicos medidos.

En los corrales donde se mantuvo a los grupos de animales que consumieron pulpa de café o cafeína a niveles de 0.18 y 0.24%, se observó mayor excreción de orina que en los otros grupos, hallazgo que concuerda con lo encontrado por Cabezas y colaboradores (1974), quienes encontraron que ese fenómeno se acompañaba de una disminución significativa en el porcentaje de nitrógeno retenido

por terneros alimentados con raciones que contenían 24% de pulpa deshidratada. Es reconocido el efecto diurético de la cafeína (Sollman, 1957). Tales efectos no ocurrieron cuando a la ración se le agregó 0.12% de cafeína.

Entre las determinaciones bioquímicas en suero sanguíneo, resalta la ausencia de efectos significativos de la pulpa de café sobre la concentración de AGL, a diferencia de los resultados obtenidos por Braham *et al.* (1973), quienes observaron un aumento significativo de esos metabolitos en el suero de terneros alimentados con raciones que contenían 30% o 48% de pulpa deshidratada. Los valores medios de AGL en el presente estudio se encuentran dentro de los límites considerados como normales en animales rumiantes sometidos a periodos cortos de ayuno (Annison, 1960).

#### LITERATURA CITADA

- ANNISON, E. F. 1960. Plasma non-esterified fatty acids in sheep. *Austr. J. Agric. Res.* 11: 58-64.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST. 1970. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 11th ed. The Association, Washington, D. C. p. 957.
- BRAHAM, J. E., R. JARQUÍN, J. M. GONZÁLEZ y R. BRESSANI. 1973. Pulpa y pergamino de café. III. Utilización de la pulpa en forma de ensilaje. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 23: 379-388.
- BRESSANI, R., E. ESTRADA y R. JARQUÍN. 1972. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos. *Turrialba*. 22: 299-304.
- CABEZAS, M. T., J. M. GONZÁLEZ y R. BRESSANI. 1974. Pulpa y pergamino de café. V. Absorción y retención de nitrógeno en terneros alimentados con raciones elaboradas con pulpa de café. *Turrialba*. 24: 90-94.
- CAMERON, G. R., F. R. MILTON and J. W. ALLEN. 1943. Toxicity of tannic acid. *Lancet*. 215: 179-186.
- GLICK, Z. and M. A. JOSLYN. 1970. Effect of tannic acid and related compounds on the absorption and utilization of proteins in the rat. *J. Nutr.* 100: 516-520.
- HOFFMAN, W. S. 1925. A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine. *J. Biol. Chem.* 66: 375.
- ISHLER, N. H., T. P. FINUCANE and E. BORKER. 1948. Rapid spectrophotometric determination of caffeine. *Anal. Chem.* 20: 1162-1166.
- JARQUÍN, R., J. M. GONZÁLEZ, J. E. BRAHAM y R. BRESSANI. 1973. Pulpa y pergamino de café. II. Utilización de pulpa de café en rumiantes. *Turrialba*. 23: 41-47.
- LAURELL, S. and G. TIBBLING. 1966. Colorimetric micro-determination of free fatty acids in plasma. *Clin. Chem. Acta.* 16 (1): 57-62.
- LE CREER, E. L. 1957. Mean separation by the functional analysis of variance and multiple comparisons. *Agricultural Research Service, U. S. D. A. Washington, D. C.*, pp. 23-29. (ARS-20-30.)
- NESS, A. T., H. C. DICKERSON and J. V. PASTEWKA. 1965. The determination of human serum albumin by its specific binding of the anionic dye, 2-(4'-hydroxybenzeneazo)-benzoic acid. *Clin. Chem. Acta* 12: 532-541.
- OSEGUEDA JIMÉNEZ, F. L., R. A. QUTEÑO, R. A. MARTÍNEZ y M. RODRÍGUEZ. 1970. Uso de la pulpa de café seca en el engorde de novillos en confinamiento. *Agricultura de El Salvador*. 10: 3-9.
- SCHANDLER, S. H. 1970. Tannins and related phenolics (Chapter 22). In: M. A. JOSLYN (Ed.), *Methods of Food Analysis*. 2nd ed. Academic Press, New York, pp. 701-725.
- SOLLMAN, R. 1957. *A Manual of Pharmacology*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, p. 1237.
- VOHRA, P., F. H. KRATZER and M. A. JOSLYN. 1966. The growth depressing and toxic effects of tannins to chicks. *Poultry Sci.* 45: 135-142.
- WEICHELBAUM, T. E. 1916. An accurate and rapid method for the determination of protein in small amounts of blood serum and plasma. *Amer. J. Clin. Pathol.* 10: 40-49.

A.L.P.A. Mem. 12:15-21. 1977