



Foto: Rafael Réyno

Ensayo de Lotus puro sembrado en 2017.

# AVANCES EN LOS ESTUDIOS DE CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS EN LEGUMINOSAS DEL GÉNERO LOTUS

Ing. Agr. PhD. Rafael Reyno<sup>1</sup>, Téc. Agr. Fernando Silveira<sup>1</sup>, Zoot. Denise Steinhorst<sup>1</sup>, Aux. Inv. Yovana Martínez<sup>1</sup>, Lic. Clín. Guillermo de Souza<sup>1</sup>, Q. F. Dra. Cristina Olivaro<sup>2</sup>, DMTV MSc. PhD. América Mederos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INIA

<sup>2</sup>Cenur Noreste, Sede Tacuarembó - Udelar

El presente trabajo se focaliza en la descripción de los taninos condensados presentes en ocho especies del género Lotus. Estos compuestos pueden tener diferentes efectos a nivel nutricional, sanitario y ambiental, por lo que su mayor conocimiento aportará a la toma de decisiones sobre su inclusión y manejo.

## INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 90 en INIA Tacuarembó se ha estado investigando en el uso de plantas forrajeras que además de sus propiedades nutricionales, poseen metabolitos secundarios como son los taninos condensados (TC). Estas leguminosas consideradas "forrajes bioactivos" o "nutraceúticos", tienen un efecto benéfico en la producción animal, ya sea por su acción

como proteína baipás en el rumen o por su potencial efecto en la salud animal en el control de los nematodos gastrointestinales de rumiantes. Últimamente, se ha vinculado a los TC como potenciales agentes de reducción de las emisiones de metano. Uno de los géneros de leguminosas reconocido por estas características es el género Lotus. En Uruguay se han utilizado varias especies sembradas en mezclas con otras forrajeras o introducidas en el campo natural.

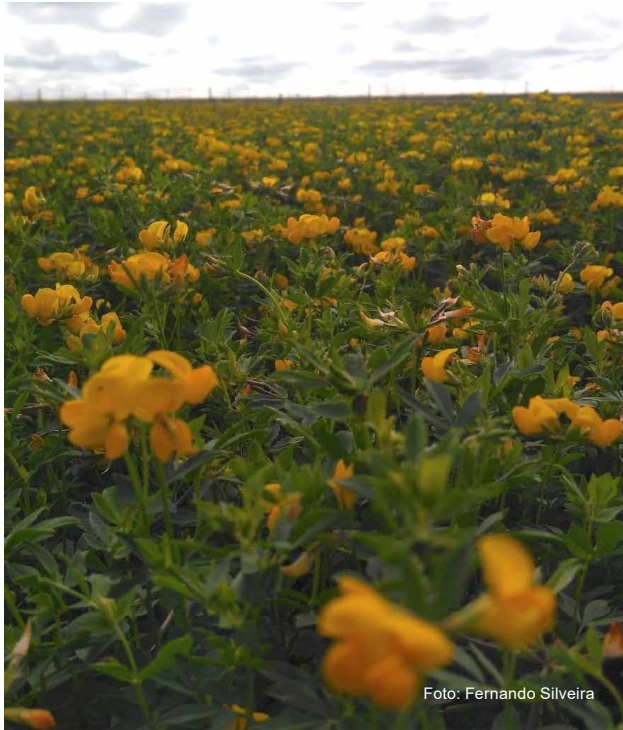


Figura 1 - Ensayo de Lotus puro sembrado en 2016.

Cinco especies de Lotus han sido domesticadas y mejoradas a través del fitomejoramiento: *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. tenuis*, *L. angustissimus* y *L. subbiflorus*.

Recientemente, las investigaciones resaltan la necesidad de conocer, además de la concentración, la estructura molecular de los TC presentes en las plantas forrajeras. Los taninos son clasificados en forma amplia como taninos condensados (proantocianidinas, PA) y taninos hidrolizables (TH). A su vez los TH se subclasifican en derivados del ácido gálico, elagitaninos y galotaninos. Los TC se encuentran bajo la forma de polímeros y oligómeros derivados de flavan-3-oles, catequinas y epicatequina (procianidinas, PCs) y galocatequina y epigalocatequina (prodelfinidinas, PDs). Esto es importante pues la presencia y concentración de los mencionados compuestos varían con la especie forrajera y no todos poseen los mismos efectos en los animales.

Este conocimiento podrá orientar el uso de las diferentes leguminosas o especies arbustivas ricas en TC ya sea por su potencial efecto en nutrición, propiedades antihelmínticas o cuidado ambiental.

En este trabajo se describe la concentración de taninos condensados en ocho especies del género Lotus y la composición química de *Lotus uliginosus* INIA E-Tanin.

## METODOLOGÍA

### Leguminosas

En este trabajo se evaluaron cinco cultivares de Lotus y tres líneas experimentales. Los cultivares evaluados fueron: San Gabriel, INIA Draco e INIA Rigel de *Lotus corniculatus*; INIA Gemma e INIA E-Tanin de *Lotus uliginosus*; y tres líneas experimentales, LE304-C1-24 de *Lotus corniculatus* (del programa de mejoramiento genético de INIA-Gentos) y dos líneas experimentales de Lotus híbridos (G1 y G5) producto de los cruzamientos recíprocos entre *Lotus corniculatus* y *Lotus uliginosus*.

Los Lotus fueron sembrados en los años 2016 y 2017 en la unidad experimental Glencoe de INIA Tacuarembó, sembrando dos tipos de experimentos en cada año, una siembra pura de Lotus y una siembra sobre campo natural (mejoramiento de campo). Cada uno de estos cuatro ensayos fue evaluado durante tres años consecutivos (2017 a 2019) para determinar su productividad, valor nutritivo, cobertura de Lotus y contenido de taninos condensados. En este artículo se presenta la información del contenido estacional de taninos condensados y cobertura de Lotus (en el caso de los experimentos como mejoramientos de campo) para cada una de las ocho variedades evaluadas.

### Análisis de laboratorio

La cuantificación de taninos condensados en el material vegetal seco y tamizado fue realizada en INIA Tacuarembó, mediante la técnica colorimétrica de Butanol-HCl descrita por Porter *et al.* (1986). La determinación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrita por Makkar *et al.* (1993).

Por otro lado, se preparó un extracto de *Lotus uliginosus* INIA E-Tanin enriquecido de compuestos fenólicos y purificado mediante cromatografía líquida en columna usando Sephadex LH-20. Con el mismo se analizó la composición química mediante espectrometría de masa por infusión directa (ESI-IT-MSn) y acoplada a cromatografía líquida (LC-ESI-IT-MS/MS) usando un espectrómetro LTQ XL™ con trampa de iones lineal (Thermo Scientific™). Este trabajo se realizó en el laboratorio del Espacio de Ciencia y Tecnología Química, Cenur Noreste, Udelar.

La presencia y concentración de taninos condensados varía con la especie forrajera y no todos tienen los mismos efectos sobre los animales.



**Cuadro 1** - Concentración de taninos condensados según cultivar y estación para dos ensayos sembrados puros y evaluados durante tres años cada uno (2017-2019).

Especie	Cultivar	Otoño (%)	Invierno (%)	Primavera (%)	Verano (%)	Promedio general (%)
<i>L. corniculatus</i>	San Gabriel	1,73	3,42	2,48	2,34	2,49
	INIA Draco	1,49	2,98	1,85	1,50	1,96
	INIA Rigel	1,97	3,47	2,63	1,69	2,44
	LE304-C1-24	1,59	3,04	2,59	2,15	2,34
Promedio estacional <i>L. corniculatus</i>		1,69	3,23	2,39	1,92	2,31
<i>L. corniculatus</i> x <i>L. uliginosus</i>	G5	1,33	2,60	2,75	2,64	2,33
<i>L. uliginosus</i> x <i>L. corniculatus</i>	G1	3,33	7,06	6,20	7,05	5,91
Promedio estacional híbridos		2,33	4,83	4,47	4,84	4,12
<i>L. uliginosus</i>	INIA Gemma	4,86	6,42	4,73	7,44	5,86
	INIA E-Tanin	3,92	5,84	4,83	4,70	4,82
Promedio estacional <i>L. uliginosus</i>		4,39	6,13	4,78	6,07	5,34

## RESULTADOS

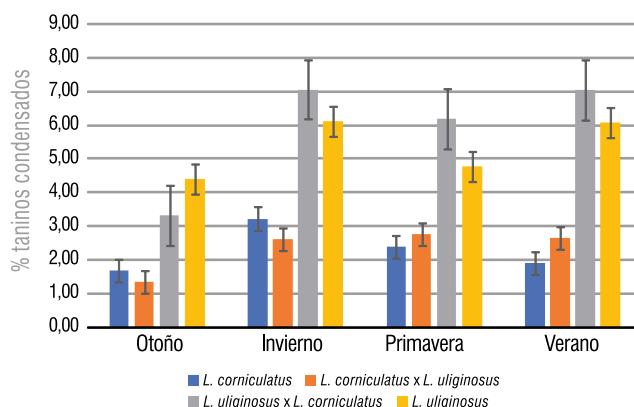
En el Cuadro 1 se presentan los resultados promedio de los contenidos de taninos condensados de las leguminosas evaluadas por estación del año y durante un período de tres años consecutivos (2017-2019).

Las diferentes especies de Lotus y sus variedades muestran importantes diferencias estacionales en los contenidos de taninos condensados. Los *Lotus corniculatus* son los que poseen menores contenidos de taninos condensados a lo largo de todo el año, siendo el cultivar INIA Draco el de menor valor.

En contraposición, los *Lotus uliginosus* presentan los contenidos más altos de taninos, siendo INIA Gemma el cultivar de mayor contenido en esta especie.

Los Lotus híbridos tienen promedialmente un comportamiento intermedio entre los *Lotus corniculatus* y los *uliginosus* (Cuadro 1 y Figura 2); sin embargo, existen diferencias importantes en el contenido de taninos dependiendo del tipo de cruzamiento (madre *corniculatus* o *uliginosus*).

En las estaciones de invierno y verano se observan las mayores concentraciones de taninos en los diferentes Lotus. Esta tendencia cambia un poco para los *Lotus corniculatus*, siendo invierno y primavera las estaciones de mayor concentración. En términos generales, factores de estrés ambiental (bajas temperaturas o déficit hídrico) suelen provocar aumentos en la concentración de taninos.



**Figura 2** - Contenido estacional de taninos condensados (%) según especie.

En los mejoramientos de campo, el Lotus es un integrante más en la comunidad vegetal. Dicha comunidad de campo natural está dominada frecuentemente por especies de gramíneas perennes estivales. La tecnología de mejoramientos de campo busca mejorar la cantidad y calidad del forraje ofrecido cuidando el recurso campo natural. El rol de los Lotus es contribuir a ese objetivo de aumento de cantidad de forraje y valor nutritivo de la dieta, pero al mismo tiempo incorpora una dosis de taninos. Por lo tanto, el aporte de taninos a la dieta será una combinación de la concentración de taninos en cada Lotus y el aporte del Lotus en cada mejoramiento de campo.

En los tres años de evaluación de estos mejoramientos los *Lotus corniculatus* mostraron los mayores aportes porcentuales a la materia seca ofrecida (53 %) en

**Cuadro 2** - Concentración de taninos condensados (% TC) y porcentaje de Lotus en el mejoramiento de campo (% Lotus) según cultivar y estación del año, para dos ensayos sembrados en cobertura sobre un suelo de basalto profundo y evaluados durante tres años cada uno.

Especie	Cultivar	Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Promedio general	
		TC	%Lotus	TC	%Lotus	TC	%Lotus	TC	%Lotus	TC	%Lotus
<i>L. corniculatus</i>	San Gabriel	1,34	43	1,81	42	1,95	58	1,58	50	1,67	48
	INIA Draco	1,32	42	1,60	57	1,88	60	1,52	57	1,58	54
	INIA Rigel	1,23	46	1,19	46	2,02	56	1,78	54	1,56	51
	LE304-C1-24	1,22	58	1,31	51	2,19	64	2,19	65	1,73	60
Promedio estacional <i>L. corniculatus</i>		1,28	47	1,48	49	2,01	60	1,77	57	1,63	53
<i>L. corniculatus</i> x <i>L. uliginosus</i>	G5	1,15	18	0,97	33	1,59	36	1,03	25	1,19	28
<i>L. uliginosus</i> x <i>L. corniculatus</i>	G1	1,04	14	1,69	20	2,31	19	1,40	18	1,61	18
Promedio estacional híbridos		1,10	16	1,33	27	1,95	28	1,21	22	1,40	23
<i>L. uliginosus</i>	INIA Gemma	2,20	33	1,94	47	3,06	34	2,47	37	2,41	38
	INIA E-Tanin	1,61	18	1,43	41	1,99	23	1,83	18	1,71	25
Promedio estacional <i>L. uliginosus</i>		1,90	26	1,68	44	2,52	29	2,15	28	2,06	31

comparación con los *Lotus uliginosus* que aportaron en promedio un 31 % de la materia seca (Cuadro 2). Sin embargo, a pesar del mayor aporte de los *corniculatus* en la mezcla, los *Lotus uliginosus* mostraron un mayor contenido de taninos de la dieta ofrecida. Para casi todos los casos, la primavera y el verano fueron las estaciones de mayor aporte de taninos a la dieta, siguiendo la curva de crecimiento primavera-estival de estos Lotus. Los Lotus híbridos buscan combinar características agronómicas deseables de ambas especies, tolerancia

al déficit hídrico, presencia de rizomas, producción de semilla, entre otras; pero también brindan una gran oportunidad para seleccionar por contenido de taninos, ya que en algunos casos la concentración es superior a la observada en los *Lotus uliginosus* (Figura 2).

En el Cuadro 3 se presenta el resultado de la concentración de fenoles totales, taninos totales y taninos condensados de las ocho leguminosas que se están estudiando.

**Cuadro 3** - Concentración de compuestos fenólicos totales, taninos totales y taninos condensados de cultivares de *Lotus corniculatus* y *uliginosus* y sus híbridos en cortes de marzo de 2019.

	Cultivar	Fenoles totales <sup>1</sup>	Taninos totales <sup>1</sup>	Taninos condensados <sup>2</sup>
<i>L. corniculatus</i>	San Gabriel	4,19	1,99	0,70
	INIA Draco	4,62	2,77	0,40
	INIA Rigel	4,94	3,76	2,30
	LE304-C1-24	6,50	5,18	2,20
<i>L. corniculatus</i> x <i>L. uliginosus</i>	G5 <sup>4</sup>	5,84	4,65	1,70
<i>L. uliginosus</i> x <i>L. corniculatus</i>	G1 <sup>3</sup>	9,09	7,99	6,20
<i>L. uliginosus</i>	INIA Gemma	9,22	8,18	5,90
	INIA E-Tanin	7,49	6,36	4,40

<sup>1</sup>Equivalentes g de Ácido Tánico/100 g de materia seca; <sup>2</sup>Equivalentes g de Leucocianidina/100 g de materia seca; <sup>3</sup>Híbrido de madre *Lotus uliginosus*; <sup>4</sup>Híbrido de madre *Lotus corniculatus*.

### Composición química de *Lotus uliginosus* INIA E-TANIN

Fueron identificados (epi) catequina, quercetina, (epi) galocatequina libres y muchos glicósidos de flavonoles siendo las agliconas detectadas quercetina y kaempferol. En adición, se encontraron TC homogéneos formados exclusivamente por monómeros de (epi) catequina (procianidinas) y por monómeros de (epi) galocatequina (prodelfinidinas), también TC heterogéneos formados por unidades de (epi) catequina y (epi) galocatequina. Estos compuestos fueron identificados de acuerdo con su espectro de masa (MS2 y MS3 del ion [M-H]<sup>-</sup>) y tiempo de retención.

### CONCLUSIONES

Este trabajo aporta información necesaria para entender la dinámica estacional de los taninos condensados en las diferentes especies de Lotus, además de su comportamiento en mejoramientos de campo. Además, constituye el primer análisis fitoquímico de un cultivar de *Lotus uliginosus*. Se continuarán analizando diferentes cultivares de esta especie, de *L. corniculatus* y de los híbridos con el objetivo de determinar las diferencias en estructuras entre especies y diferentes cultivares de una misma especie. Profundizar en estos temas nos permitirá

El aporte de taninos a la dieta será una combinación de la concentración de taninos en cada Lotus y el aporte del Lotus en cada mejoramiento de campo.

comprender el rol de la inclusión de los diferentes Lotus en nuestros sistemas y, en particular, identificar la función y/o actividad de cada compuesto químico.

### REFERENCIAS

Engström, M.T. *et al.*, 2014. Rapid Qualitative and Quantitative Analyses of Proanthocyanidin Oligomers and Polymers by UPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 3390-3399.

Makkar *et al.*, Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J.Sci.Food Agric.* 61, 161-165.

Porter *et al.*, 1986. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin ad delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230.

Muller-Harvey, I. *et al.*, 2018. Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: Importance of structure, concentration, and diet composition. *Crop Sci.* 59:1–25.



Figura 3 - Ensayo de mejoramiento de campo sembrado en 2016.