

Cuantificación de taninos condensados en especies forrajeras comparando el secado en estufa vs. el liofilizado de las muestras para la metodología Butanol-HCl

Quantification of condensed tannins in forage species comparing oven dryings vs. lyophilized samples for the Butanol-HCl methodology

Gabriela L. González, Alberto A. De Magistris, Enrique De Loof, Carlos Rossi

galgonzalez@yahoo.com.ar, albertodemagistris6@gmail.com, ingdeloof@yahoo.com.ar, carossi2000@yahoo.com

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, 1832 Lomas de Zamora, IIPAAS-CIC, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Recibido: 31/05/2022; Aceptado: 20/06/2022

Resumen: El presente trabajo se desarrolló sobre el pastizal natural de un sistema silvopastoril del Bajo Delta del Paraná y tuvo como objetivos: a) Cuantificar la presencia de Taninos Condensados (TC) en la materia seca (MS) en las principales especies forrajeras y, b) Comparar en esta cuantificación de TC los métodos de secado en estufa vs. el liofilizado de las muestras para la metodología Butanol-HCl, y evaluar si existen diferencias significativas en los resultados entre los métodos de secado. Las especies analizadas se distribuyen en la EEA INTA Delta del Paraná, localidad de Otamendi, Provincia de Buenos Aires. Se seleccionaron nueve herbáceas: *Alternanthera philoxeroides* (lagunilla), *Echinochloa polystachya* (pasto laguna), *Glyceria multiflora* (cebadilla de agua), *Leersia hexandra* (arrocillo), *Cinnagrostis viridiflavescens* (pasto plateado), *Paspalum urvillei* (pasto macho), *Bromus catharticus* (cebadilla), *Carex chilensis* (pajilla), *Lotus tenuis* (lotus) y cuatro leñosas: *Amorpha fruticosa* (falso índigo), *Gleditsia triacanthos* (acacia negra), *Populus* sp.(álamo) y *Salix* sp.(sauce), éstas dos últimas cultivadas. Para las hojas de *Populus* y *Salix* las submuestras se dividieron en 2 categorías: hojas jóvenes y hojas adultas. Los resultados muestran que los TC se detectaron solamente en tres especies y solo en las muestras liofilizadas: *Salix* spp. (Sauce hoja joven) 6,38% /MS, (Sauce hoja adulta) 4,34% MS; *Amorpha fruticosa* 6,12% /MS (Falso índigo) y *Gleditsia triacanthos* 6,71% /MS (Acacia negra).

Palabras-clave: Sistema silvopastoril, metabolitos secundarios, pastizal natural, Delta del Paraná

Abstract: The present work was developed on the natural grassland of a silvopastoral system of the Lower Paraná Delta and had as objectives: a) To quantify the presence of Condensed Tannins (TC) in the dry matter (DM) in the

main forage species and, b) Compare in this TC quantification the methods of oven drying vs. the lyophilization of the samples for the Butanol-HCl methodology, and to evaluate if there are significant differences in the results between the drying methods. The analyzed species are distributed in the EEA INTA Delta del Paraná, locality of Otamendi, Province of Buenos Aires. Nine herbaceous plants were selected: *Alternanthera philoxeroides* (lagunilla), *Echinochloa polystachya* (lagoon grass), *Glyceria multiflora* (water grass), *Leersia hexandra* (arrocillo), *Cinnagrostis viridiflavescens* (silver grass), *Paspalum urvillei* (male grass), *Bromus catharticus* (grass), *Carex chilensis* (straw), *Lotus tenuis* (lotus) and four woody species: *Amorpha fruticosa* (false indigo), *Gleditsia triacanthos* (black acacia), *Populus* sp. (poplar) and *Salix* sp. (willow), the latter two cultivated. For *Populus* and *Salix* leaves, the subsamples were divided into 2 categories: young leaves and adult leaves. The results show that TCs were detected only in three species and only in the freeze-dried samples: *Salix* spp. (Young willow leaf) 6.38% /DM, (Adult leaf willow) 4.34% DM; *Amorpha fruticosa* 6.12% /DM (False indigo) and *Gleditsia triacanthos* 6.71% /DM (Black Acacia).

Keywords: Silvopastoral system, secondary metabolites, grassland, Paraná River Delta.

1. Introducción

La presencia de taninos condensados (TC) en especies forrajeras y su cuantificación, es motivo de interés por los efectos positivos y/o negativos que pueden generar estos metabolitos secundarios en la nutrición animal. Khanbabaee y van Ree (2001), basándose en sus propiedades estructurales, clasifican a los taninos en: Galotaninos, Elagitaninos, Complejo de Taninos y Taninos Condensados. Aunque el término TC es usado ampliamente, hoy se prefiere el término proantocianidinas, más descriptivo y preciso. Es abundante la bibliografía donde se describen diversos efectos y propiedades de los TC sobre los rumiantes: a) Presentan astringencia a nivel bucal, que actúa deprimiendo el consumo voluntario, b) Reducen la digestibilidad del forraje en el rúmen cuando se lo encuentra en concentraciones superiores a 6 % de la materia seca (MS), c) Ligan y precipitan proteínas, con efectos + o - sobre la digestibilidad de la Materia Seca y actúan aumentando la proteína *by passen* los procesos digestivos, d) Poseen efectos antiparasitarios, ejerciendo acciones inhibitorias sobre diferentes estadios de parásitos gastrointestinales, e) Impacto positivo en la producción de leche y aumentando la concentración de antioxidantes, f) Reducción de las emisiones de metano (C4) de vacunos y otros rumiantes, y g) Influyen sobre el ciclo de los nutrientes del suelo, afectando la degradación de la materia orgánica, como así también las tasas de mineralización, la disponibilidad de Nitrógeno (N) y la formación de humus.

Es importante establecer la presencia y porcentual de TC en las plantas forrajeras, debido a todos los efectos manifestados precedentemente, pero en particular por las propiedades antinutricionales que pueden ocasionar cuando los mismos se

encuentran en una proporción superior al 6% de la MS. (Malechek and Provenza, 1983; Makkar 2000, 2003;)

En este trabajo, se focalizó el estudio de TC sobre especies forrajeras presentes en el pastizal natural de un sistema silvopastoril en el Bajo Delta del Paraná, donde se incluyen especies leñosas de ramoneo. Con los objetivos de: a) Cuantificar la presencia de Taninos Condensados en la MS en especies forrajeras; y b) Comparar en esta cuantificación los métodos de secado en estufa vs. liofilizado de las muestras para la metodología Butanol-HCl y evaluar si existen diferencias significativas en los resultados entre los métodos de secado.

2. Materiales y Métodos

Localización

Los trabajos se desarrollaron en la Unidad Experimental Silvopastoril del INTA–FCA UNLZ, ubicada en la EEA INTA Delta del Paraná, localidad de Otamendi, Partido de Campana, Provincia de Buenos Aires, Argentina. La localización geográfica con GPS es 34° 10' S y 58° 10' O (Figura 1).

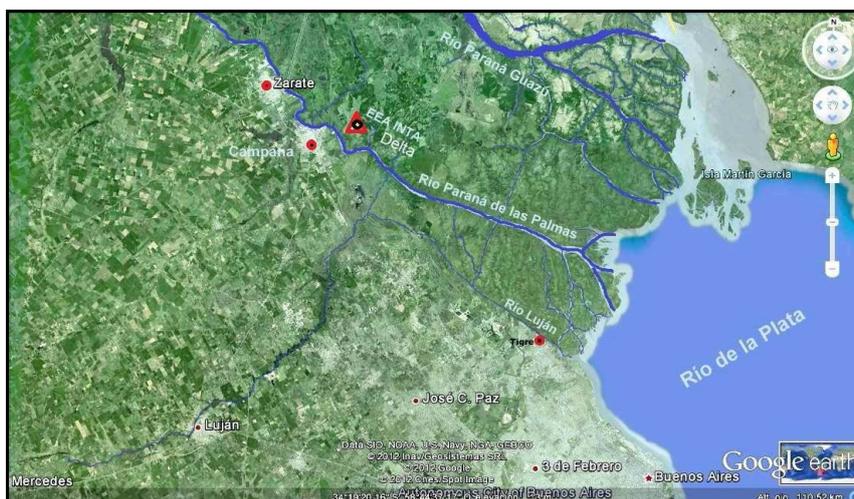


Figura 1. Ubicación relativa de la EEA INTA Delta del Paraná dentro del Bajo Delta. Fuente: Google earth, 2021.

Clima

El clima de la región del Bajo Delta es templado. La temperatura media de enero (mes más cálido) es superior a los 22°C y la media de julio (mes más frío) es de 6°C.

La temperatura media anual en el área es de 16,7°C a 18°C. Presenta relativamente bajas amplitudes térmicas diarias y frecuencia de días con heladas, que se producen como consecuencia de la acción moderadora de las grandes masas de agua circundantes (Brown *et al.* 2006) Se caracteriza por la ausencia de temperaturas extremas. El régimen de precipitaciones es de tipo isohigro, con un

promedio anual ubicado entre los 1.000 y 1.100 mm. La humedad relativa media anual es de 79% (Servicio Meteorológico Nacional, 1980)

Pastizal Natural

El estudio se realizó sobre 13 especies forrajeras de mayor constancia y abundancia en un pastizal natural, con herbáceas y leñosas, en el sistema silvopastoril (SSP) de la Unidad Experimental del INTA– FCA UNLZ.

La elección de las especies se realizó con base en estudios previos (De Magistris *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008 y 2015; Rossi *et al.*, 2006 y 2015) basados en la técnica de Braun Blanquet (1972). En la Tabla 1 se muestran las características de cada una de las forrajeras seleccionadas en función de su constancia y rango de abundancia en el pastizal.

Tabla 1. Clasificación y caracterización de las especies evaluadas para presencia de TC¹

Nombre Científico	Nombre vulgar	Familia	Constancia	Rango de abundancia
<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Lagunilla	Amaranteáceas	I	2 a +
<i>Echinochloa polystachya</i>	Pasto laguna	Poáceas C4	I	3 a +
<i>Glyceria multiflora</i>	Cebadilla de agua	Poáceas C3	I	2 a +
<i>Leersia hexandra</i>	Arrocillo	Poáceas C3	I	1 a +
<i>Cinnagrostis viridiflavescens</i>	Pasto plateado	Poáceas C4	II	3 a +
<i>Paspalum urvillei</i>	Pasto macho	Poáceas C4	II	2 a +
<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla criolla	Poáceas C3	II	2 a +
<i>Carex chilensis</i>	Pajilla	Ciperáceas	IV	5 a +
<i>Lotus tenuis</i>	Lotus	Fabáceas	I	+
<i>Amorpha fruticosa</i>	Falso índigo	Fabáceas	I	3 a 2
<i>Gleditsia triacanthos</i>	Acacia negra	Fabáceas	I	+
<i>Populus spp</i>	Álamo	Salicáceas	Cultivo	Cultivo
<i>Salix spp</i>	Sauce	Salicáceas	Cultivo	Cultivo

¹ Adaptado de Rossi *et al.* (2015)

Las especies analizadas se distribuyen de la siguiente manera: 9 herbáceas: *Alternanthera philoxeroides* (lagunilla), *Echinochloa polystachya* (pasto laguna), *Glyceria multiflora* (cebadilla de agua), *Leersia hexandra* (arrocillo), *Cinnagrostis viridiflavescens* (pasto plateado), *Paspalum urvillei* (pasto macho), *Bromus catharticus* (cebadilla), *Carex chilensis* (pajilla), *Lotus tenuis* (lotus); una leñosa arbustiva: *Amorpha fruticosa* (falso índigo); una leñosa naturalizada: *Gleditsia triacanthos* (acacia negra) y dos leñosas arbóreas cultivadas: *Populus sp.* (álamo), *Salix sp.* (Sauce). Estas dos últimas son las especies implantadas en la unidad experimental, y cuyas hojas también son ramoneadas por el ganado de manera directa, o bien durante las podas de primavera. Para estas últimas dos especies se dividieron las muestras en dos categorías de submuestras: hojas jóvenes y hojas adultas. Figuras 2 y 3.



Figura 2. Vista panorámica del SSP y de lotes de vaquillonas en pastoreo y de ramoneo de hojas de álamo durante una poda de primavera. Foto: Carlos Rossi.



Figura 3. Pastizal natural de gran diversidad florística en el Sistema Silvopastoril. Foto Gabriela González.

Métodos

Recolección de muestras

Se procedió a cosechar forrajimasa de 30 plantas para cada especie integrando un “pool”. Cada “pool” de cada especie, fue dividido en 30 submuestras de 100 gr.

de material fresco, usando 15 submuestras para cada tipo de secado (liofilizado y secado en estufa). Para *Populus* y *Salix* se realizaron 60 submuestras para cada una de estas especies, contemplando que se categorizaron 30 submuestras de hojas jóvenes y 30 submuestras de hoja adulta.

Metodologías de secado

Las submuestras para liofilizado se colocaron en un freezer -80°C, posteriormente se molieron en molino de cuchillas y se colocaron en el liofilizador hasta que alcanzaron una temperatura de -52°C a -58°C y hasta alcanzar los 12 Pa. Finalmente se molieron nuevamente y tamizaron a 1mm.

Las submuestras secadas a estufa se dejaron hasta obtener peso constante, se molieron en un molino de cuchillas y posteriormente se pasaron por un tamiz de 1 mm, volviéndose a estufa por 1 día más. Ambas submuestras (liofilizado y secado en estufa) fueron sometidas al método de Butanol-HCl, utilizando como patrón Indusol ATO de Quebracho colorado y realizando la lectura espectrofotométrica con un espectrofotómetro UV- Shimadzu. Los resultados se trataron estadísticamente con el Test de Tukey.

3. Resultados y Discusión

Los resultados revelaron que al someter a las submuestras de las especies forrajeras secadas en estufa al método de cuantificación de TC por Butanol-HCl, en ningún caso se registró la presencia de TC, lo cual marca claramente que este método de secado no permitió detectar TC mediante el método de Butanol-HCl.

Estos resultados son concordantes con lo expuesto en diversas investigaciones similares. El método de secado en estufa con temperaturas por encima de los 50°C para deshidratar las muestras está considerado como inconveniente y poco seguro por varios autores cuando se quiere detectar TC. En los mismos se indica que la temperatura elevada es el principal factor que afecta la estabilidad de estos metabolitos secundarios, dificultando su correcta cuantificación por el método de Butanol-HCl, tornándolos no detectables por medio de esta metodología. (Porter *et al.*, 1986; Horigome *et al.*, 1988; Hagerman y Butler, 1989; Terril *et al.*, 1989 y 1992; Barahona, 1999; Makkar, 2003).

Los TC solo fueron detectados en las submuestras tratadas con el método de liofilizado y solo se registraron en 3 especies (Figura 4 y Tabla 2).

Cuantificación de taninos condensados en especies forrajeras comparando el secado en estufa vs. el liofilizado de las muestras para la metodología Butanol-HCl - RCYTAAA – ISSN 2796-9142 – VOLUMEN 9 – NÚMERO 2

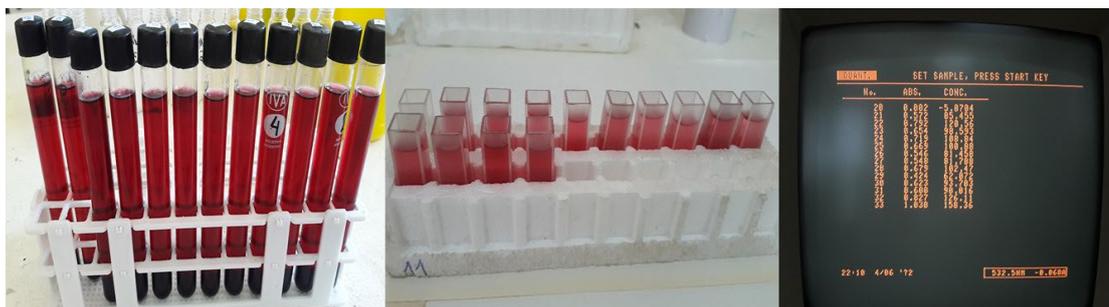


Figura 4. Submuestras liofilizadas y preparadas, listas para la lectura de TC y los resultados de absorbancia en el espectrofotómetro. Foto: Gabriela González

Tabla 2. Porcentaje del contenido de taninos condensados

Especies	% de TC sobre MS ²	DS Promedio	EE Promedio
<i>Gleditsia triacanthos</i>	6,71 a	0,8888	0,2810
<i>Salix spp.</i> (hoja joven)	6,38 a	0,4066	0,1173
<i>Amorpha fruticosa</i>	6,12 a	0,6129	0,1848
<i>Salix spp.</i> (hoja adulta)	4,34 b	0,3479	0,1004

² Las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ($P > 0,05$)

Para comparar las medias del contenido de TC (en porcentaje) de *Gleditsia triacanthos*, *Amorpha fruticosa* y *Salix spp.* hoja adulta y *Salix spp.* hoja joven, se realizó el análisis de varianza. Debido a que se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$), se utilizó la prueba de Tukey para detectar cuales presentaron diferencias entre sí. A partir del análisis de varianza, se detectó que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre dos grupos. Uno conformado por *Gleditsia triacanthos*, *Salix spp.* hoja joven y *Amorpha fruticosa*, cuyos porcentajes no difieren significativamente entre sí (6,71%, 6,38% y 6,12% respectivamente) y el otro grupo corresponde a *Salix spp.* hoja adulta (4,34%)

Los porcentajes de estas 3 especies (letra a) están cercanos al 6% MS, valores que son considerados potencialmente limitantes del consumo voluntario (Makkar 2000, 2003). Si del estudio de los antecedentes se desprenden controversias al respecto, varios autores coinciden en que los TC, como otros metabolitos secundarios, tendrían una función primaria ligada a actuar como mecanismo de defensa frente al pastoreo, protegiendo a los tejidos más sensibles. Esto podría ser la explicación de los valores hallados en hojas jóvenes y adultas de *Salix*.

Los taninos en mayor concentración son depresores de la palatabilidad (alta astringencia en el nivel bucal) y su consumo elevado pueden causar cierta toxicidad en los animales. Sin embargo, esta limitante no se observó sobre estas especies en el potrero donde se efectuó el muestreo, donde se ingresó un lote de

vaquillonas de recría posterior a la recolección de las muestras para realizar una evaluación de preferencia animal de estas mismas especies (Figura 5).



Figura 5. Vaquillonas en pastoreo en el pastizal del SSP

4. Conclusiones

De acuerdo a los resultados aquí obtenidos, la metodología de liofilizado sería la adecuada para secar las muestras de las especies con el objetivo de detectar taninos condensados por medio de Butanol-HCl. El tratamiento de secado en estufa debería ser considerado poco exacto como tratamiento de las muestras, puesto que las temperaturas ubicadas por encima de los 50°C alteran la estructura de los metabolitos y se torna muy insegura su detección.

En el presente trabajo, sobre las muestras liofilizadas de 13 especies forrajeras, solo se detectaron TC en 3 especies: *Salix* spp., *Amorpha fruticosa* y *Gleditsia triacanthos*.

5. Bibliografía

Barahona, R. (1999). Condensed tannis in tropical forage legumes: their characterization and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. (Ph.D. Dissertation). The University of Reading, United Kingdom.

- Braun Blanquet, J.J. (1972). *Plant Sociology, the study of plant communities*. Revisión y edición de Fuller, G.D. y Conrad, H.S. Hafner New York: Pub. Co. New York. 439 pg.
- Brown A., Martínez Ortiz, U., Acerbi, M. y Corcuera J. (2006). *La situación ambiental argentina 2005*. Buenos Aires: Fundación Vida Silvestre Argentina. 587 pp.
- De Magistris, A.A., Rossi, C.A., Torr , E., Medina, J.B. y González, G. (2006). Diversidad florística en parcelas forestales con salic ceas en el Delta del Paraná, a partir de la sistematización para su reconversión y aprovechamiento silvopastoril. *II Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad*, Buenos Aires.
- González, G., Rossi, C.A., Pereyra, A.M., De Magistris, A.A., Lacarra, H. y Varela, E. (2008). Determinación de la calidad forrajera en un pastizal de la región del delta bonaerense argentino. *Revista Zootecnia Tropical*, 26 (3), 223-227.
- González, G.L., Rossi, C.A., De Magistris, A. y De Loof, E. (2015). Composición y evaluación forrajera del pastizal en un sistema silvopastoril con  lamos (*Populus deltoides*) en el Bajo Delta del río Paraná, Argentina. *Publicación Investigación Forestal, 2011-2015*. UCAR, Ministerio de Agroindustria. Edit. Carolina I. Llavallol, 2016: 329-332.
- Hagerman, A.E. y Butler, L.G. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 1795-1810.
- Horigome, T., Kumar, R. y Okamoto, K. (1988). Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, 60, 275-285.
- Khanbabaee, K. y van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 641–649.
- Makkar, H.P.S. (2000). *Quantification of tannins in tree foliage – A laboratory manual*. Viena: FAO/IAEA Working Document.
- Makkar, H.P.S. (2003). *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage – A laboratory Manual*. Alphen aan den Rijn: Kluwer Academic Publishers. 102 pp.
- Malechek, J.C. y Provenza, F.D. (1983). Comportamiento Alimentario y Nutrici n del Ganado Caprino en Pastizales. *Revista Mundial de Zootecnia*, 47, 38-48.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 1, 223-230.
- Rossi, C.A., De Magistris, A.A., Torr , E., Medina, J.B. y González, G.L. (2006). Evaluación de la presencia de especies forrajeras y malezas para el aprovechamiento silvopastoril de parcelas con Salicáceas en el Delta del Paraná (Pcia. de Buenos Aires). *Actas Jornadas de Salicáceas, FAUBA*, Buenos Aires. Pág.303-308.
- Rossi, C. A., De Magistris, A. A., González, G. L., Carou, N. y De Loof, E. (2015). *Plantas de interés ganadero de la región del bajo Delta del Paraná (Argentina): Plantas forrajeras herbáceas y leñosas; valor nutritivo del forraje natural; malezas y plantas tóxicas para el ganado. Biodiversidad y otros aspectos*. Lomas de Zamora: Editorial UNLZ. Facultad de Ciencias Agrarias.

Servicio Meteorológico Nacional. (1980). Estadísticas del Servicio Meteorológico Nacional de la República Argentina.

Terril, T. H., Windhan, H. R., Hoveland, C. S., and Hamos, H. E. (1989). Forage preservation methods influences of tannin concentration, intake and digestibility of *Sericea lespedeza* by sheep. *Agronomy Journal*, 81, 435-439.

Terril, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B. and Barry, T. N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants. Protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 321-329.