

O pH do solo e sua relação com a concentração de taninos condensados em *Lotus* spp.⁽¹⁾.

Sílvia Ortiz Chini⁽²⁾; Simone Meredith Scheffer-Basso⁽³⁾; Pedro A.V. Escosteguy⁽³⁾; Charise Dalazen Bertol⁽⁴⁾; Andrea Michel Sobottka⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Fapergs e CNPq.

⁽²⁾ Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia (PPGAgr); UPF; Passo Fundo, Rio Grande do Sul; sissichini@hotmail.com; ⁽³⁾ Professor do PPGAgr; UPF; ⁽⁴⁾ Professor da UPF, Curso de Farmácia.

RESUMO: O presente trabalho teve por objetivo principal investigar e quantificar taninos condensados (TC) em *Lotus* spp. e sua relação com fatores edáficos e genéticos em duas cultivares (cv. São Gabriel e cv. Ganador) e da população UFRGS de *L. corniculatus*, uma cultivar de *L. uliginosus* (cv. Serrano) e uma cultivar de *L. subbiflorus* (cv. El Rincón), cultivadas em vasos e submetidas a duas condições de acidez do solo (pH 4,7 e 6,4). A metodologia utilizada para quantificação de taninos condensados foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando catequina e epicatequina como padrões de referência. Houve efeito da interação genótipo x solo para concentração de TC mostrando a variabilidade intra e interespecífica. A maior amplitude de variação de TC foi verificada em solo ácido. Os resultados do estudo indicam a importância da avaliação dos TC nos programas de melhoramento de *Lotus* spp. e da relação destes compostos com as condições de acidez do solo.

Termos de indexação: acidez, metabolismo secundário, proantocianidinas.

INTRODUÇÃO

Em espécies forrageiras os taninos condensados (TC) podem ter efeitos negativos ou positivos no valor nutritivo dependendo da concentração em que se encontram. Altas concentrações (0,6-1,0 g kg⁻¹) reduzem o consumo voluntário pelos ruminantes, a palatabilidade, a eficiência digestiva e, conseqüentemente, há baixo desempenho produtivo dos animais. Altas concentrações também estão relacionadas com elevados níveis de lignina, proteína bruta e baixa digestibilidade *in vitro* de massa seca (DIVMS). Em moderadas e baixas concentrações (0,2-0,4 g kg⁻¹) seus efeitos em ruminantes são benéficos, prevenindo infecções e o timpanismo, aumentando a absorção protéica e a distribuição de nitrogênio dos aminoácidos essenciais (Gebrehiwot et al., 2002; Piñedo, 2008). Contudo, a concentração de taninos em leguminosas varia com fatores genéticos, edáficos ou fenológicos (Anuraga et al.,

1993; Roberts et al., 1993; Gebrehiwot et al., 2002; Kraus et al., 2004; Escaray et al., 2007). O conhecimento da interrelação destes fatores é, então, importante para o manejo do cultivo destas espécies, como as do gênero *Lotus*, pois possibilitará melhorar a concentração de taninos e, conseqüentemente, o potencial forrageiro.

Em trabalho realizado na Universidade de Passo Fundo, por Moro et al. (2010), foram verificadas baixas concentrações de taninos em espécies de *Lotus* L., aquém do esperado. Uma das possíveis causas para as baixas concentrações de taninos obtidas no estudo de Moro et al. (2010) é ausência de restrição ao crescimento das plantas, nas condições experimentais utilizadas por estes autores. No trabalho de Moro et al. (2010), as plantas foram cultivadas sem estresse hídrico, térmico e nutricional, o que pode ter reduzido a síntese de metabólitos secundários, como os flavonoides.

A acidez do solo foi escolhida como um dos fatores a ser estudado, pois a maior parte das pastagens naturais do sul do Brasil encontram-se em regiões de solos ácidos, com elevada saturação por Alumínio (Al) (Rheinheimer et al., 2001; Souza et al., 2007; Raji, 2011). Além disso, as espécies de *Lotus* L. se destacam entre as leguminosas temperadas tolerantes a essa condição edáfica (Janke et al., 2010).

O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da acidez do solo sobre os taninos condensados em *Lotus* spp..

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas as concentrações de TC de duas cultivares (cv. São Gabriel e cv. Ganador) e da população UFRGS de *L. corniculatus*, de uma cultivar de *L. uliginosus* (cv. Serrano) e uma cultivar de *L. subbiflorus* (cv. El Rincón). O material foi cultivado em vasos, em ambiente semi protegido, foi submetido a duas condições de acidez do solo (pH 4,7 e 6,4), em fatorial 5 x 2. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, totalizando quarenta unidades experimentais.

A semeadura foi realizada em 21/11/2011 e durante o cultivo as plantas foram irrigadas manualmente e o controle de pragas e doenças foi feito quando necessário. No decorrer do período experimental, as plantas foram submetidas a quatro cortes, a partir do 157º dia da semeadura, a fim de obter-se material vegetal para o preparo dos extratos e evitar a senescência. Os cortes foram feitos com tesoura, a 5 cm da base das plantas, em: 25/04, 17/07, 02/09 e 24/10/2012.

O material vegetal foi seco à 30 °C, por 72 horas e triturados em moinho tipo Willie. O material colhido em cada corte e repetição foi reunido em uma amostra múltipla, devido à quantidade de matéria seca (MS) não ter sido suficiente, para possibilitar que as repetições de cada tratamento fossem analisadas em separado. Esse procedimento é comum em estudos farmacognósticos, sendo utilizadas replicatas em análise química de extratos obtidos de plantas (Kelman & Tanner, 1990; Acuña et al., 2008).

O material vegetal foi submetido à extração com metanol 50% na proporção 1:10 (planta:solvente), em temperatura ambiente (± 20 °C) por sete dias. Após o período de maceração os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 60 °C até a obtenção de extratos moles. Os extratos concentrados foram então pesados para o cálculo de rendimento de extrato seco por massa seca de planta. Foi feita a perda por dessecação em balança de infravermelho para a retirada de substâncias voláteis e água residual. A partir dos valores obtidos na perda por dessecação, calculou-se o percentual de extrato seco (Queiroz et al., 2002). Os extratos hidrometanólicos foram ressuspensos na concentração de 10 mg/mL de extrato seco e filtrados em membrana de nylon de 0,45 μ m.

Para quantificação dos TC foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a partir de métodos desenvolvidos e validados para detecção de TC em equivalentes das substâncias químicas de referência (SQR) catequina e epicatequina (Chini et al., 2012). As análises foram realizadas em CLAE equipado com coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Os picos de cada SQR foram eluídos em fase móvel constituída por água acidificada com ácido fosfórico a pH 3 e acetonitrila em diferentes proporções. Uma alíquota de 20 μ L foi injetada nas condições cromatográficas condizentes aos métodos desenvolvidos para cada SQR. A área de pico de cada SQR foi integralizada e utilizada para a quantificação de cada padrão presentes no extrato. Os TC foram calculados como equivalentes de catequina+epicatequina.

Os dados obtidos no CLAE, transformados em percentual de MS (Makkar, 2003), foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de TC, também denominados de proantocianidinas, estimada neste estudo em equivalentes de catequina (EC) e de epicatequina (EE), variou de 2,3 a 23,1 g ECE kg⁻¹ MS, dependendo do genótipo e da acidez do solo (**Tabela 1**). Esta faixa de concentração pode ser considerada baixa, já que entre 20 a 40 g kg⁻¹ TC são comumente observadas em *Lotus* spp., enquanto que concentrações maiores que 60 g kg⁻¹ são incomuns (Kelman & Tanner, 1990).

A análise da variância mostrou efeito da interação genótipo x acidez do solo na concentração de TC (**Tabela 1**). Em ambos os níveis de acidez, observou-se diferença entre os genótipos, com maior amplitude (17,5 g ECE kg⁻¹ MS) de variação no solo mais ácido, em relação ao solo com maior pH (5,2 g ECE kg⁻¹ MS).

Em solo com maior acidez, destacou-se a população UFRGS, pelo maior teor de TC; e o cv. Serrano, pelo menor teor desses metabólitos. Na Nova Zelândia, em ensaio de campo e utilizando vanilina acidificada como método de determinação de TC, Lowther et al. (1987) verificaram concentração de 0,29 g kg⁻¹ MS na cv. S. Gabriel, e entre 0,58 e 0,97 g kg⁻¹ na cv. Maku (*L. uliginosus*). As diferentes condições de cultivo e de metodologia podem explicar, em parte, as divergências nos resultados dos trabalhos.

Os três representantes de cornichão (*L. corniculatus*) mostraram diferenças significativas na concentração de TC em ambos tratamentos de solo. Dentre todos os genótipos, o menor teor de TC foi evidenciado na cv. El Rincón. No estudo de Kelman & Tanner (1990), essa cultivar apresentou valor muito superior (31,5 g kg⁻¹) em relação aos obtidos no presente trabalho, o que pode ser atribuído aos distintos métodos de quantificação de taninos, métodos de cultivo e manejo. No trabalho desses pesquisadores, o cultivo foi a campo, com duração de um ano, em solo com maior acidez com pH 4,3 e com teor de Al de 14,2 μ g/g e solo corrigido com pH 5,2 e alumínio solúvel 0,3 μ g/g.

Com exceção do cv. Serrano, todos os genótipos mostraram maior concentração de TC em solo com maior acidez, como era esperado. Nessa cultivar houve aumento de 25% na concentração de TC em solo corrigido, ao passo que nos demais genótipos a concentração de TC ficou entre 39,6% (cv. São Gabriel) e 77% (UFRGS).

Tabela 1. Concentração de taninos condensados, expressa em equivalente de catequina e de epicatequina (ECE), na matéria seca da parte aérea (folha + caule) de *Lotus* spp. cultivados em dois níveis de acidez do solo

Espécie	Genótipo	pH _(áqua)	
		4,7	6,4
		----- g ECE kg ⁻¹ MS-----	
	São Gabriel	11,6 cA	7,0 bB
<i>L. corniculatus</i>	UFRGS	23,1 aA	5,3 cB
	Ganador	15,0 bA	7,5 aB
<i>L. uliginosus</i>	Serrano	5,6 eB	7,0 bA
<i>L. subbiflorus</i>	El Rincón	9,0 dA	2,3 dB
Média		12,9	5,8
C.V. (%)		2,16	3,85

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Em diversos trabalhos há indicação de uma maior tolerância ao alumínio da população UFRGS quando relacionada a outros genótipos de cornichão (Pavlovkin et al., 2009; Janke et al., 2010; Pal'ove-Balang et al., 2012), resultados pertinentes ao que foi encontrado no presente trabalho, em que esta população apresentou-se capaz de produzir maiores quantidade de TC em solo com maior acidez, do que os outros genótipos testados.

Há unanimidade na literatura que condições restritivas ao crescimento das plantas induzem à elevação na síntese de TC. Neste trabalho, pode-se considerar que o principal fator de estresse foi o maior teor de Al do solo que não recebeu calcário. Nesse tratamento, a saturação por Al foi 20 %, enquanto que no solo que recebeu calcário o valor deste atributo foi de 0%. Segundo Chen et al. (2011), a exposição a elevadas concentrações de Al aumenta a quantidade de compostos fenólicos em plantas. Uma vez que estes compostos podem reduzir o efeito tóxico de algumas substâncias químicas através da complexação com metais e da própria exsudação radicial, os taninos protegem as plantas contra a toxicidade do Al.

Quanto ao comportamento divergente do cv. Serrano ao ser submetido a solo com maior acidez, não há explicação plausível para o resultado com base nas variáveis analisadas, uma vez que todos os genótipos foram cultivados e colhidos simultaneamente, sempre no estágio vegetativo. Uma das possíveis causas a serem investigadas em futuros estudos é que, de acordo com Meagher et al. (2004), *L. uliginosus* possui maior proporção de prodelfinidina (PD= galocatequina e epigalocatequina) em relação a procianidina (PC= catequina e epicatequina). Nessa espécie, a relação

de PC:PD foi estimada em 19:81, ao passo que para *L. corniculatus* foi de 84:16. O mesmo foi verificado por Sivakumaran et al. (2006), que verificaram predominância de PD em *L. uliginosus* e PC em *L. corniculatus*. Neste trabalho foi feita a análise de procianidina, o que pode ter subestimado os níveis de taninos condensados na cv. Serrano.

Na média de genótipo, a concentração de TC foi maior em solo ácido, com elevação de 122%, em relação ao verificado em solo que recebeu calagem (**Tabela 1**). Ao contrário do que foi observado neste trabalho, Kelman & Tanner (1990) não verificaram efeito do pH do solo na concentração de TC em *Lotus* spp., mas houve expressiva variação entre genótipos. Foram obtidos valores médios de 20,9 g TC kg⁻¹ (cornichão), 31,6 g TC kg⁻¹ (*L. subbiflorus*) e 59,9 g TC kg⁻¹ (*L. uliginosus*). Segundo os autores, a origem do genótipo e as diferenças na duração das fases fenológicas das espécies de *Lotus* spp. têm influência sobre os níveis de TC, sugerindo controle genético sobre o teor de taninos. É possível, no entanto, que no trabalho destes autores os níveis de pH não tenham sido suficientemente distintos (pH 4,3 e 5,2) para promover alteração nos níveis de taninos.

CONCLUSÕES

A concentração de TC é diferente entre genótipos e é afetada pelo pH do solo.

Os materiais avaliados mostram variabilidade intra e inter específica do germoplasma para o conteúdo de TC, o que permite a identificação de genótipos para programas de melhoramento genético.

As cultivares de *L. corniculatus* foram superiores em relação ao conteúdo de TC. A população UFRGS se destacou em solo ácido, com o maior teor de TC.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante os anos do curso e pela aprovação do projeto 479283/2011-7 e à Fapergs pela aprovação do projeto 1014579.

REFERÊNCIAS

ACUÑA, H.; CONCHA, A.; FIGUEROA, M. Condensed tannin concentrations of three *Lotus* species grown in different environments. *Chilean Journal of Agricultural Research*, Santiago do Chile, 68:31-41, 2008.



- ANURAGA, M.; DUARSA, P.; HILL, M.J.; LOVETT, J.V. Soil moisture and temperature affect condensed tannin concentrations and growth in *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus*. *Australian Journal of Agricultural Research*, Sidney, 44: 1667-1681, 1993.
- CHEN Y. M.; TSAO, T.M.; LIU, C.C.; LIN, K.C.; WANG, M.K. Aluminium and nutrients induce changes in the profiles of phenolic substances in tea plants (*Camellia sinensis* CV TTES), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 91(6):1111-1117, 2011.
- CHINI, S.O.; PASA, M. STANGUERLIN, Q.; SOBBOTKA, A.; BERTOL, C. Simone SCHEFFER-BASSO, S.M. Taninos: Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de por CLAE. In: XVI FARMAPÓLIS, Florianópolis, 2012. Anais. Florianópolis: Farmapolis, 2012. n.128.
- ESCARAY, F.; ESTRELLA, J.; PESQUEIRA, J.; PIECKENSTAIN, F.; DAMIANI, F.; PAOLOCCI, F.; RUIZ, O. R. Taninos condensados em leguminosas del género *Lotus*. *Lotus Newsletter*, Montevideo, 37:34-35, 2007.
- GEBREHIWOT, L.; BEUSELINCK, P.R.; ROBERTS, C.A. Seasonal variations in condensed tannin concentration of three *Lotus* species. *Agronomy Journal*, Madison, 94:1059-1065, 2002.
- JANKE, A.; DALL'AGNOL, M.; SANTOS, A.M.; BISSANI, C.A. Seleção de populações de *Lotus corniculatus* L. com maior tolerância ao alumínio em solução nutritiva, *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 39(11):2366-2370, 2010.
- KELMAN, W.M.; TANNER, G. J. Foliar condensed tannin levels in *Lotus* species growing on limed and unlimed soils in south- eastern Australia. *Proceedings New Zealand Grassland Association*, New Plymouth, 52:51-54, 1990.
- KRAUS, T. E. C.; ZASOSKI, R. J.; DAHLGREN, R. A. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil*, 262(1-2):95-109, 2004.
- LOWTHER, W. L.; MANLEY, T. R.; BARRY, T. N. Condensed tannin concentrations in *Lotus corniculatus* and *L. pedunculatus* cultivars grown under low soil fertility conditions. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 30: 23-25, 1987.
- MAKKAR, H. P. S. *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual*. Springer, New York, 2003.
- MEAGHER, L.P.; LANE, G.; SIVAKUMARAN, S.; TAVENDALE, M.H.; FRASER, K. Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 11(1):151-163, 2004.
- MORO, G.V.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; ABDALLA, A.L.; REGINATTO, F.H.; PEÇANHA, M.R.; COSTA, G.M. Aspectos químicos do gênero *Lotus* L. com ênfase em metabólitos secundários. *ARS Veterinaria*, Jaboticabal, 26:113-119, 2010.
- PAL'OVE-BALANG, P.; ČIAMPOROVÁ, M.; ZELINOVÁ, V.; PAVLOVKIN, J.; GURINOVÁ, E.; MISTRÍK, I. Cellular responses of two Latin-American cultivars of *Lotus corniculatus* to low Ph and Al stress. *Central European Journal of Biology*, Louisville, 7(6): 1046-1054, 2012.
- PAVLOVKIN, J.; PAL'OVE-BALANG, P.; KOLAROVIC, L. ET AL. Growth and functional responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress. *Journal of Plant Physiology*, Irvine, 166(14):1479-1487, 2009.
- PIÑEDO, L.A. Taninos condensados em espécies forrajeras y sus efectos em la productividad animal. *Revista Nutritime*, Viçosa, 5(3):584-591, 2008.
- QUEIROZ, C. R. A. D. A.; MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D. Characterization of arceira-preta (*Myracrodruon urundeuva*) wood tannins. *Revista Árvore*, Viçosa, 26(4):493-497, 2002.
- RAIJ, B.V. *Fertilidade do solo e manejo de nutrientes*. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011.
- RHEINHEIMER, D.S.; GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J. et al. 2001. *Situação da fertilidade dos solos no Estado do Rio Grande do Sul*. Santa Maria: Departamento de solos da UFSM, 2001. 41p. (Boletim técnico, 2).
- ROBERTS, C.A.; P.R. BEUSELINCK; M.R. ELLERSIECK; D.K. DAVIS; R.L. MCGRAW. Quantification of tannins in birdsfoot trefoil germplasm. *Crop Science*, Madison, 33:675-679, 1993.
- SOUZA, D. M. G.; MIRANDA, L. N.; OLIVEIRA, S. A. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F. et al., (Eds) *Fertilidade do solo*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.205-274, 2007.
- SIVAKUMARAN, S.; RUMBALL, W.; LANE, G.A.; FRASER, K.; FOO, L.Y.; YU, M.; MEAGHER, L.P. Variation of proanthocyanidins in *Lotus* species. *Journal of Chemical Ecology*, Florida, 32:1797-1816, 2006.