

Artículo científico

Evaluación de los metabolitos secundarios en la harina de forraje de *Stizolobium aterrimum* (mucuna), para su uso en la alimentación animal

Evaluation of secondary metabolites in the meal of *Stizolobium aterrimum* forage, for its use in animal feeding

Idania Scull-Rodríguez¹, Lourdes Lucila Savón-Váldes¹ y Josefa Victoria Hormaza-Montenegro²

¹Instituto de Ciencia Animal. Carretera Central km 47 ½, CP 32700, apdo. postal 24

San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras, La Habana, Cuba

Correo electrónico: idascull@ica.co.cu

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar los metabolitos secundarios presentes en la harina de forraje de *Stizolobium aterrimum* (mucuna), para su uso en la alimentación animal; esta se elaboró a partir de las hojas y los tallos tiernos de plantas que fueron cultivadas en un suelo Ferralítico Rojo, y los metabolitos secundarios se evaluaron mediante un tamizaje fitoquímico. Para determinar el perfil de compuestos fenólicos se cuantificó el contenido de polifenoles totales (PT), el de taninos condensados libres (TCL), el de taninos condensados acomplejados con la proteína (TCP) y el de taninos condensados acomplejados con la fibra (TCF). El contenido de oligosacáridos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y estos se expresaron como equivalentes de rafinosacáridos. Se encontraron en mayor cuantía los taninos, los alcaloides y las sustancias reductoras; mientras los flavonoides, las saponinas, los aminoácidos, las antocianidinas y los triterpenos/esteroides se hallaron en cantidades moderadas y leves. La concentración de PT fue de 2,32 %. Hubo diferencias ($p < 0,001$) entre las fracciones de TCL (0,25 %), TCP (0,22 %) y TCF (0,08 %). En la fracción de los carbohidratos solo se encontró fructosa (0,006 mg/kg MS) en una baja concentración. La presencia cualitativa de diferentes metabolitos secundarios en la harina de forraje de *S. aterrimum*, en concentraciones apropiadas, permite considerarla una planta con potencialidades de uso para la alimentación animal.

Palabras clave: flavonoides, polifenoles, saponinas, taninos.

Abstract

The objective of the study was to evaluate the secondary metabolites present in the meal of *Stizolobium aterrimum* forage, for its use in animal feeding; the meal was elaborated from the leaves and fresh stems of plants which were cultivated on a Ferralitic Red soil, and the secondary metabolites were evaluated through phytochemical sieving. To determine the profile of phenolic compounds the content of total polyphenols (TP), free condensed tannins (FCT), protein-bound condensed tannins (PCT) and fiber-bound condensed tannins (FBCT), was quantified. The content of oligosaccharides was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), and they were expressed as raffinose equivalent. Tannins, alkaloids and reducing substances were found in higher quantity; while flavonoids, saponins, aminoacids, anthocyanidins and triterpenes/steroids were found in moderate and low quantities. The concentration of TP was 2,32 %. There were differences ($p < 0,001$) among the fractions of FCT (0,25 %), PCT (0,22 %) and FBCT (0,08 %). In the carbohydrate fraction only fructose was found (0,006 mg/kg DM) in low concentration. The qualitative presence of different secondary metabolites in the meal of *S. aterrimum* forage, in appropriate concentrations, allows to consider it a plant with potential to be used in animal feeding.

Keywords: flavonoids, polyphenols, saponins, tannins

Introducción

Stizolobium aterrimum (mucuna) es una leguminosa que se puede producir en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades alimenticias de los animales y los humanos (Castillo *et al.*, 2015). Según Savón *et al.* (2004), como fuente nutricional se destaca por su alto contenido de proteína (21,7 ± 0,7 % MS).

El follaje de esta planta puede ser incorporado en forma de harina hasta un 20 % en las dietas para conejos, con buenos resultados en el comportamiento productivo (Dihigo *et al.*, 2010; Caro *et al.*, 2011). No obstante, se le atribuyen algunas implicaciones negativas relacionadas con la presencia y concentración de metabolitos secundarios, tales como alcaloides, taninos, terpenos, flavonoides y

saponinas (Scull, 2004; Tavares *et al.*, 2015). Estos compuestos pueden alterar la utilización eficiente de los nutrientes y, por lo tanto, disminuir las potencialidades productivas de los animales (Erlwanger *et al.*, 2001; Chaparro *et al.*, 2009).

Es por ello que el objetivo de este estudio fue evaluar los metabolitos secundarios presentes en la harina de forraje de *S. aterrimum*, para su uso en la alimentación animal.

Materiales y Métodos

Material vegetal y elaboración de la harina.

Las plantas de mucuna se sembraron en un suelo Ferralítico Rojo del área experimental de la finca Zaldívar, en el Instituto de Ciencia Animal –Mayabeque, Cuba.

El corte se realizó de forma manual a 5 cm sobre el nivel del suelo, cuando el 100 % de las plantas estaban florecidas (Díaz *et al.*, 2003). El muestreo se efectuó a partir de cinco puntos, de forma aleatoria, en los cuales se recogió aproximadamente 1 kg de forraje

El material cortado se secó al sol durante 2-3 días, y se determinó la materia seca en diferentes momentos del proceso de secado hasta lograr eliminar el 20 % de humedad. Con posterioridad se molió en un molino de martillo, con un tamiz de 1 mm; y la harina se guardó en frascos de color ámbar, en un lugar oscuro y seco hasta su análisis.

Análisis fitoquímico. Se pesaron 5 g de la harina de forraje por triplicado, se añadieron 100 mL de etanol 90 % v/v y se reflujo durante 4 h. Con este extracto alcohólico se realizaron los ensayos del tamizaje fitoquímico, según la metodología propuesta por Miranda y Cuellar (2000), con la cual se determinó la presencia de doce grupos funcionales: alcaloides, saponinas, triterpenos/esteroides, taninos, flavonoides, proantocianidinas, cumarinas, quinonas, azúcares reductores, grupos amino, resinas y cardenólidos (esteroides cardiotónicos).

En la descripción de los ensayos se utilizó el sistema no paramétrico de cruces, para especificar la presencia o ausencia de los metabolitos (presencia abundante ++++, presencia moderada ++, presencia leve +, ausencia -).

Análisis químico

Determinación de compuestos fenólicos. La concentración de polifenoles totales en las muestras ($n = 5$) se determinó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, y se expresó en equivalente de ácido tánico, según el método de Makkar (2003). La extracción de

taninos se realizó según la técnica propuesta por Terrill *et al.* (1992).

La concentración de taninos condensados (TC) en las fracciones se cuantificó con el reactivo butanol/HCl (95 % de butanol y 5 % de HCl concentrado 36 %). Los resultados se expresaron en equivalente de catequina, por lo que se realizaron las curvas de calibración de catequina en agua para los taninos condensados libres (TCL) y en solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) para los taninos condensados acomplejados con la proteína (TCP) y los taninos condensados acomplejados con la fibra (TCF).

Determinación de oligosacáridos. El contenido de oligosacáridos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se utilizó un sistema isocrático, con una bomba LKB 2150; la detección se realizó con un detector de índice de refracción (IR, Knauer). Se empleó la columna Aminex HPX-87N de 300 x 7,8 mm (Bio-Rad). Como fase móvil se usó una solución de sulfato de sodio 0,01 M, a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min y una temperatura de horno de 85 °C.

Análisis estadístico. Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico Infostat versión 1 (2001). Se realizó análisis descriptivo, y se empleó la dócima de Duncan (1955) en los casos necesarios.

Resultados y Discusión

Los resultados del tamizaje fitoquímico en la harina de forraje de mucuna se muestran en la tabla 1. De los 12 grupos funcionales, hubo presencia de taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas, grupos aminos, terpenos, antocianidinas y azúcares reductores. Estos grupos son de importancia para la nutrición de los animales, por su actividad biológica y por los efectos que pueden provocar (Stewart *et al.*, 2000).

No se puede afirmar categóricamente que los metabolitos no identificados no existan, pues como se realizaron ensayos específicos, es posible que estuvieran presentes en otras variantes estructurales que no responden a tales pruebas. Además, pueden ocurrir interferencias por el método de secado, la solubilidad de otros compuestos en el disolvente, la concentración de los metabolitos y la sensibilidad del ensayo (García, 2010). No obstante, la ausencia de cumarinas y cardenólidos es considerada como ventajosa, porque cuando estos se encuentran en concentraciones apreciables en la dieta, causan trastornos nutricionales y poca palatabilidad del alimento.

Tabla 1. Composición química cualitativa de la harina de forraje de mucuna

| Compuesto secundario | Presencia/ausencia |
|----------------------|--------------------|
| Taninos | +++ |
| Alcaloides | +++ |
| Flavonoides | + |
| Saponinas | ++ |
| Triterpenos | ++ |
| Antocianidinas | + |
| Azúcares reductores | ++ |
| Cumarinas | - |
| Quinonas | - |
| Grupo α amino | +++ |
| Resinas | - |
| Cardenólidos | - |

Presencia abundante +++, presencia moderada ++, presencia leve +, ausencia -

Los resultados de los ensayos químicos mostraron niveles elevados de alcaloides. El principal efecto de estos compuestos es la disminución del consumo, por el sabor amargo que les confieren a los alimentos (Ramos *et al.*, 1998). También pueden ser tóxicos para el aparato digestivo, al provocar irritaciones en las mucosas gástricas, con manifestaciones típicas como diarreas y vómitos.

El extracto alcohólico de la harina de forraje desarrolló una coloración verde intensa frente al cloruro férrico, lo que sugiere abundante presencia de estos compuestos, resultados que coinciden con los obtenidos por Delgado *et al.* (2010) y Scull *et al.* (2011).

La alta concentración de grupos funcionales α amino está relacionada con la presencia de L Dopa, que es el compuesto secundario mayoritario en la mucuna (Sathiyarayanan y Arulmozhi, 2007; Pulkalpuram *et al.*, 2015).

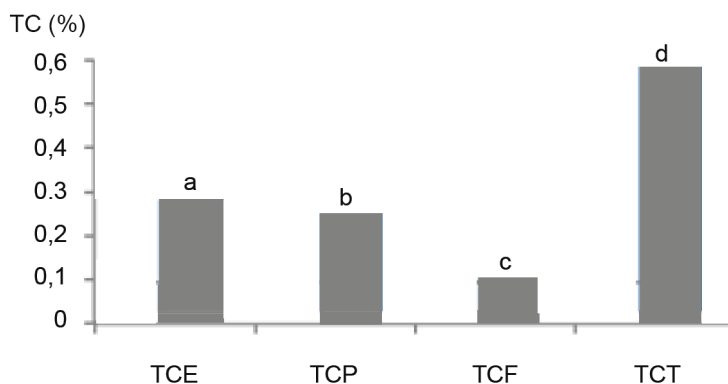
Los resultados de la composición fitoquímica de la harina son elementos fundamentales a tener en cuenta para su incorporación a los sistemas alternativos de alimentación. Muchos de estos compuestos, cuando se encuentran presentes en la dieta, tienden a originar problemas de tipo digestivo y a disminuir el consumo de alimento.

Los PT se consideran uno de los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas tropicales. En la concentración de PT influye el estado fenológico, las condiciones climáticas y geográficas, la variedad y el método analítico, por lo que se hace difícil el cotejo de los resultados, aunque los valores obtenidos (2,32 %) se pueden comparar con los informados por Scull *et al.* (2015).

En la figura 1 aparecen los valores de los taninos condensados libres y acoplados con la proteína y a la fibra, los cuales mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las fracciones.

Como para la determinación del contenido de TCT se tuvo en cuenta la fracción de taninos que se encuentra libre y la unión con otras macromoléculas, las cantidades estimadas estuvieron en correspondencia con los valores que presenta la leguminosa.

Entre todos los polifenoles, los TC se consideran como los principales antinutrientes, porque forman complejos con las proteínas, el almidón y las enzimas digestivas, con la consiguiente reducción



abcd letras diferentes, difiere a $p \leq 0,05$
(Duncan, 1955)

Figura 1. Contenido de taninos condensados en harina de forraje de mucuna.

del valor nutricional de los alimentos, así como efectos en el fisiologismo digestivo de los animales (Stewart *et al.*, 2000).

La distribución de los taninos condensados en la harina de forraje de mucuna, en las tres fracciones analíticas, se muestra en la figura 2. El mayor porcentaje fue el de taninos condensados libres, similar a lo obtenido por Cano *et al.* (1994) en otras leguminosas.

La inclusión de cantidades permisibles de TC en las dietas de los monogástricos es un aspecto a tener en cuenta, porque ellos son los más susceptibles a los efectos tóxicos de estos metabolitos.

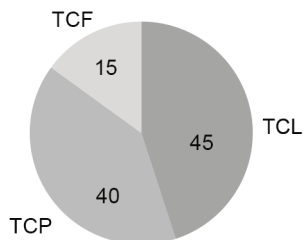


Figura 2. Distribución de las fracciones de taninos condensados (%) en la harina.

Savón *et al.* (2004) encontraron lesiones en las células de la mucosa intestinal de cerdos que consumían dietas de miel B/soya más 20 % de harina de forraje de dolichos y canavalia, las cuales se atribuyeron a la presencia de factores antinutricionales. Sin embargo, la inclusión de un 20 % de la harina de mucuna no ocasionó estos efectos adversos y produjo resultados productivos similares a los del control.

Por su parte, Mora *et al.* (2005) señalaron que con la inclusión de 25 % de harina de mucuna en dietas para cerdos se obtuvieron resultados similares a los del tratamiento control. Martínez *et al.* (2007), cuando incluyeron hasta un 10 % de otra especie de mucuna (*Stizolobium deeringiana*) en las raciones de aves en sustitución de maíz-soya, hallaron que la digestibilidad de los nutrientes se afectó.

En los sistemas biológicos, los efectos de los compuestos fenólicos están influenciados tanto por la composición antinutricional como por la especie, sin desconocer que existe un umbral por encima del cual cada especie los manifiesta (Addisu, 2016).

No se detectaron concentraciones de oligosacáridos, expresados como equivalentes de rafinosacáridos, y de los azúcares solo se obtuvieron valores de fructosa (0,006 mg/kg de MS). La no identificación de oligosacáridos en la harina de esta leguminosa es de gran importancia, porque estos

carbohidratos se consideran la causa de flatulencia en los animales que consumen alimentos que los contengan en cantidades apreciables.

Se considera que estos resultados están vinculados con la variedad evaluada, ya que no coinciden con lo reportado por Vijayakumari *et al.* (2002) para *Mucuna pruriens* en la que se halló la verbascosa como principal oligosacárido. También, difieren de lo obtenido por Kala y Mohan (2012) en semillas de *M. pruriens* var. *utilis*, en las cuales la rafinosa se encontró en concentraciones de 1,06 %.

Es importante señalar que la no detección de sacarosa y glucosa pudo estar influenciada por el proceso de extracción, por lo que es recomendable emplear otros métodos y disolventes.

La concentración de fructosa fue baja (0,006 mg/kg MS de fructuosa), comparada con la de otras especies, como *Gliricidia sepium* (Fonte *et al.*, 2013). La concentración de azúcares en las plantas puede influir en el consumo voluntario y en la aceptación del alimento por los animales (Castro y Martínez, 2015).

Los resultados del estudio mostraron la presencia de metabolitos secundarios con diferente naturaleza química en la harina de forraje de *S. aterrimum*. Esta harina se puede considerar un alimento con potencialidades de uso para la alimentación animal, si se compara con otras especies que se utilizan para tales fines. Se propone continuar los estudios que cuantifiquen los compuestos secundarios identificados en esta planta.

Referencias bibliográficas

- Addisu, S. Effect of dietary tannin source feeds on ruminal fermentation and production of cattle; a review. *Online J. Anim. Feed Res.* 6 (2):45-56. <http://OnlineJ.Anim.FeedRes.6245-562016.pdf>, [02/02/2017], 2016.
- Balzarini, Mónica G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Casanoves, F.; Di Rienzo, J. A. & Robledo, C. W. *InfoStat. Manual del usuario*. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas, 2008.
- Cano, R.; Carulla, J. & Lascano, C. E. Método de conservación de muestras de forraje de leguminosa tropicales y su efecto en el nivel y en la actividad biológica de los taninos. *Pasturas Tropicales*. 16 (1):2-7, 1994.
- Caro, Y.; Dihigo, L. E.; Hernández, Y. & Domínguez, M. *Comportamiento productivo en conejos que consumen dietas con 20 % de harinas integrales de Lablab purpureus (dolicho) y Stizolobium niveum (mucuna)*. VII Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias. La Habana: Asociación Consejo Científico Veterinario de Cuba, Instituto de Medicina Veterinaria, 2011.

- Castillo-Yam, Evelin; Betancur-Ancona, D. A. & Segura-Campos, Maira R. Proteínas de *Mucuna pruriens* con potencial de inhibir el sistema Renina-Angiotensina. *Rev. Latinoam. Hipertensión*. 10 (1):123-131, 2015.
- Castro, M. & Martínez, Mayuly. Pig feeding with nontraditional products: fifty years of research at the Instituto de Ciencia Animal. *Cuban J. Agric. Sci.* 46 (2):189-196, 2015.
- Chaparro-Acuña, Sandra P.; Aristizábal-Torres, I. D. & Gil-González, J. H. Composición y factores antinutricionales de las semillas del género *Mucuna*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 62 (1):4843-4853, 2009.
- Delgado, Denia; Galindo, Juana; González, R.; Savón, Lourdes; Scull, Idania; González, Niurca *et al.* Potential of tropical plants to exert defaunating effects on the rumen and to reduce methane production. In: N. E. Odongo, M. Garcia and G. J. Viljoen, eds. *Sustainable improvement of animal production and health*. Rome: FAO, IAEA. p. 49-54, 2010.
- Díaz, María F.; González, Acela; Padilla, C. & Curbelo, F. Comportamiento de la producción de forrajes y granos de *Canavalia ensiformes*, *Lablab purpureus* y *Stizolobium niveum* en siembras de septiembre. *Rev. cubana Cienc. agric.* 37 (1):65-71, 2003.
- Dihigo, L. E.; Savón, Lourdes; Sierra, F.; Martínez, M.; Hernández, Y.; Domínguez, M. *et al.* Estudios de los coeficientes de digestibilidad de nutrientes in vitro e in vivo de harinas de forrajes tropicales para la alimentación de los conejos. *III Congreso de Producción Animal Tropical*. La Habana, 2010.
- Duncan, D. B. Multiple range and multiple F test. *Biometrics*. 11 (1):1-55, 1955.
- Erlwanger, K. H.; Umaphy, E.; Musura, C.; Kandiwa, E.; Kruszewska, Danuta; Mattsson, I. *et al.* The effects of cowpea (*Vigna unguiculata*) feeding on basal, exogenous cholecystokinin (CCK33) and secretin stimulated pancreatic secretions of the anaesthetized rat. *J. Anim. Feed Sci.* 10 (3):525-534, 2001.
- Fonte, Leydi; Machado, R.; Díaz, Maykelis & Blanco, D. Caracterización morfológica de *Gliricidia sepium*, composición bromatológica y proporción de azúcares en sus flores. *Pastos y Forrajes*. 36 (4):423-428, 2013.
- García, T. H. *Estudio fitoquímico y de actividad alelopática de Ageratina havanensis (H.B.K)*. Tesis presentada en opción al título de Máster en Ciencias Químicas. La Habana: Universidad de La Habana, 2010.
- Kala, B. K. & Mohan, V. R. Effect of microwave treatment on the antinutritional factors of two accessions of velvet bean, *Mucuna pruriens* (L) DC var. utilis (Wall. ex Wight) Bak. Ex Burck. *Int. Food Res. J.* 19 (3):961-969, 2012.
- Makkar, H. P. S. *Quantification of tannins in tree and shrub foliage. A laboratory manual*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003.
- Martínez, Madeleidy; Sarmiento, L.; Savón, Lourdes; Santos, R. & Ku, J. Digestibilidad aparente de la proteína y la energía en pollos de ceba que consumen harina de follaje de *Stizolobium deeringiana*. *Rev. cubana Cienc. agric.* 41 (1):67-70, 2007.
- Miranda, M. & Cuellar, A. *Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Facultad de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, 2000.
- Mora-Aguirre, A.; Belmar-Casso, R. & Armendáriz-Yáñez, I. R. Comportamiento productivo y retención de nitrógeno de cerdos mantenidos en pastoreo y alimentados con una dieta a base de sorgo-frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*). *VIII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos*. Guanare, Venezuela: UNELLEZ, 2005.
- Pulikkalpara, H.; Kurup, R.; Mathew, P J. & Baby, S. Levodopa in *Mucuna pruriens* and its degradation. *Sci. Rep.* 5:1-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4460905/pdf/srep11078.pdf>. [02/02/2017], 2015.
- Ramos, G.; Frutos, P.; Giráldez, F. J. & Mantecón, A. R. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Arch. Zootecn.* 47:597-620, 1998.
- Sathiyarayanan, L. & Arulmozhi, S. *Mucuna pruriens* Linn. A comprehensive review. *Pharmacogn. Rev.* 1 (1):157-162, 2007.
- Savón, Lourdes; Scull, Idania; Orta, Mayelín & Torres, Verena. Caracterización físico-química de la fracción fibrosa de cinco harinas de follaje tropicales para especies monogástricas. *Rev. cubana Cienc. agric.* 38 (3):291-296, 2004.
- Scull, Idania. *Metodología para la determinación de taninos en forrajes de plantas tropicales con potencialidades de uso en la alimentación animal*. Tesis presentada en opción al título de Máster en Química Analítica. La Habana: Universidad de La Habana, 2004.
- Scull, Idania; Savón, Lourdes; Martín, O. & Morales, M. *Potencialidades antioxidantes de un extracto alcohólico de harina de forraje de mucuna*. VII Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias. La Habana: Asociación Consejo Científico Veterinario de Cuba, Instituto de Medicina Veterinaria, 2011.
- Scull, Idania; Savón, Lourdes; Valiño, Elaine & Ramos, Yasmely. Composición fitoquímica de la harina de forraje de mucuna (*Stizolobium aterrimum*) fermentada con el hongo *Trichoderma viride*. *Multiciencias*. 15 (3):265-270, 2015.

- Stewart, Janet L.; Mould, F. & Mueller-Harvey, I. The effect of drying treatment on the fodder quality and tannin content of two provenances of *Calliandra calothyrsus* Meissner. *J. Sci. Food Agric.* 80 (10):1461-1468, 2000.
- Tavares, Renata L.; Silva, A. S.; Campos, A. R. N.; Schuler, Ana R. P. & Aquino, Jailane de S. Nutritional composition, phytochemicals and microbiological quality of the legume *Mucuna pruriens*. *Afr. J. Biotechnol.* 14 (8):676-682, 2015.
- Terrill, T. H.; Rowan, M. A.; Douglas, B. G. & Barry, N. T. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meal and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58 (3):321-329, 1992.
- Vijayakumari, K.; Smitha, K. B. & Janardhanan, K. Biochemical characterization of the tribal pulse, *Mucuna utilis* Wall ex. Wight seeds. *J. Food Sci. Technol.* 39 (6):650-653, 2002.

Recibido el 20 de diciembre del 2016

Aceptado el 25 de septiembre del 2017