

ASPECTOS QUÍMICOS DO GÊNERO *LOTUS* L. COM ÊNFASE EM METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

CHEMISTRY ASPECTS OF *LOTUS* L. GENUS WITH EMPHASIS IN SECONDARY METABOLITES

G. V. MORO¹, S. M. SCHEFFER-BASSO^{2*}, A. L. ABDALLA³,
F. H. REGINATTO¹, M. R. PEÇANHA³, G. M. COSTA¹

RESUMO

Objetivou-se caracterizar *Lotus corniculatus* (cvs. São Gabriel e ARS 2620), *L. uliginosus* (cv. Maku) e *L. subbiflorus* (cv. El Rincón) quanto ao perfil fitoquímico, mediante a determinação dos teores de proteína bruta (PB), fibra em detergente ácido (FDA) e neutro (FDN), fenóis totais (FT), taninos totais (TT), taninos condensados (TC) e bioensaio. As espécies foram cultivadas em vasos com substrato fértil e colhidas aos 258 dias de idade. Apenas na cv. São Gabriel foi testada a presença de flavonóides, comparando com amostras coletadas no campo. Os teores de PB e FDN não variaram entre as espécies, e foram de 13,2 a 17,6% para PB e de 53,5 e 65,1% para FDN. Os teores de FDA variaram entre as espécies, com 34,7% (S. Gabriel), 31,4% (ARS 2620), 43,2% (Maku) e 41,7% (El Rincón). Foram identificados flavonóides do tipo rutina e vitexina na cv. São Gabriel. Os teores de TC e FT foram respectivamente: cv. São Gabriel: 1,99 e 2,88 g/kg; ARS 2620: 0,05 e 1,70 kg/kg; Maku: 0,34 e 2,50 g/kg; El Rincón: 1,67 e 1,27 g/kg. Na presença de polietilenoglicol (PEG) ocorreu maior produção de gás. O baixo teor de taninos indica a necessidade de investigação para verificar a interação genótipo x ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Fenóis. Flavonóides. *Lotus corniculatus*. *L. subbiflorus*. *L. uliginosus*. Taninos.

SUMMARY

Aimed to characterize *Lotus corniculatus* (cvs. São Gabriel and ARS 2620), *L. uliginosus* (cv. Maku) and *L. subbiflorus* (cv. El Rincón) on the phytochemical profile, by determining the levels of crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF) and neutral (NDF), total phenolics (FT), total tannins (TT), tannins condensed (TC) and bioassay. The species were grown in pots filled with fertile substrate and harvested at 258 days of age. In cv. São Gabriel was also evaluated the presence of flavonoids, with samples of plants harvested in the field. The CP and NDF did not differ between species, and were 13.2 to 17.6% for CP and 53.5 and 65.1% for NDF. The ADF varied among species, with 34.7% (São Gabriel), 31.4% (ARS 2620), 43.2% (Maku) and 41.7% (El Rincón). There were identified flavonoids like rutin and vitexin in cv. São Gabriel. The levels of CT and FT were: cv. São Gabriel: 1.99 and 2.88 g/kg; ARS 2620: 0.05 and 1.70 kg/kg; Maku 0.34 and 2.50 g/kg; El Rincón: 1.67 and 1.27 g/kg. In the presence of polyethylene glycol (PEG) was higher gas production. The low tannin content indicates the need for research to verify the genotype x environment.

KEY-WORDS: Flavonoids. *Lotus corniculatus*. *L. subbiflorus*. *L. uliginosus*. Phenol. Tannin.

¹ Universidade de Passo Fundo.

² Universidade de Passo Fundo. Campus I – Bairro São José, Passo Fundo, RS. Cep: 99.052-900. sbasso@upf.br

³ Centro de Energia Nuclear para Agricultura (CENA).

INTRODUÇÃO

As espécies de *Lotus* L. (Fabaceae) são excelentes forrageiras, destacando-se o cornichão (*L. corniculatus* L.), o cornichão-dos-banhados ou grande-trevo (*L. uliginosus* Schkuhr; *L. pedunculatus* Cav.) e o cornichão-anual ou cornichão-piloso (*L. subbiflorus* Lag). Entre seus vários aspectos positivos, destaca-se a sua qualidade quanto aos teores de proteína bruta (MONTEIRO & PAIM, 1982, SCHEFFER-BASSO et al., 2001), tolerância a solos ácidos (OLIVEIRA, 1987, IZAGUIRRE et al., 1998) e, principalmente, por não causarem timpanismo. No sul do Brasil, é comumente cultivada a cv. São Gabriel, desenvolvida no Rio Grande do Sul na década de 50.

De acordo com Escary et al. (2007), essas leguminosas apresentam entre 1-5 mg de taninos condensados/g de matéria seca, o que evita a formação de espuma no rúmen. Os taninos são classificados em taninos hidrolisáveis (TH) e taninos condensados (TC), o qual pode beneficiar os ruminantes, tanto pela prevenção do timpanismo e controle sobre endoparasitas, como pela melhoria no aproveitamento das proteínas (OTERO & HIDALGO, 2004). As espécies de *Lotus* L. são, por isso, candidatas promissoras ao controle de parasitas gastrointestinais (HARING et al., 2007).

Segundo Nozella (2001), os efeitos dos taninos na fermentação ruminal podem ser acessados por meio de técnicas in vitro de produção de gases. A fermentação do substrato com adição de polietileno glicol (PEG) em amostras de leguminosas taníferas evidencia o efeito dos taninos na degradação das proteínas, pois o PEG é um polímero que complexa esses compostos, reduzindo sua atividade e promovendo um aumento no volume total de gases (BUENO et al., 2008).

Além dessas substâncias, flavonóides também são encontrados em leguminosas, agindo como agentes antimicrobianos e como sinalizadores químicos na fixação simbiótica de nitrogênio. Essas substâncias possuem interessantes atividades biológicas em humanos (AOKI et al., 2000), o que justifica os estudos com espécies comercialmente disponíveis, pois possibilita sua utilização para essa finalidade. Recentemente, Koelzer et al. (2009) mostrou que o extrato bruto, as frações e os compostos isolados da cv. São Gabriel exerceram importante atividade antiinflamatória e antibacteriana.

Apesar das espécies de *Lotus* L. serem cultivadas no sul do Brasil, ainda há poucas referências sobre o seu perfil fitoquímico, em especial, quanto aos metabólitos secundários. Sempre foi assumido que os níveis de taninos do cornichão cultivado no país, a cv. São Gabriel, são similares aos relatados em cultivares de outros países e, por isso, não haveria risco de timpanismo. Além dessa questão, a caracterização do germoplasma de *Lotus* no Brasil não tem abordado aspectos fitoquímicos, apesar de sua implicação na absorção de proteína na alimentação de ruminantes, no evitamento do timpanismo e no seu potencial uso como fitoterápico para fins veterinários.

O presente trabalho teve por objetivo investigar o perfil químico de espécies e cultivares de *Lotus* spp.,

com ênfase em metabólitos secundários, a fim de subsidiar os programas de melhoramento genético do gênero e estudos fitoterápicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho constou de quatro tratamentos, constituídos de duas cultivares de cornichão (São Gabriel, Brasil; ARS 2620, EUA), uma cultivar do cornichão-dos-banhados (Maku, Nova Zelândia) e uma do cornichão-anual (El Rincón, Uruguai). O delineamento experimental foi completamente casualizado, com seis repetições, constituídas de plantas individuais. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, entre março/2006 e janeiro/2007, no município de Passo Fundo, Rio Grande do Sul. (28°15'S e 52°24'W). Adicionalmente, foram colhidas plantas espontâneas e florescidas do cornichão cv. São Gabriel presentes numa área externa à casa-de-vegetação, com caráter exploratório e apenas para avaliação de flavonóides.

O clima da região é subtropical úmido (Cfa), com temperatura média anual de 22°C (MORENO, 1961). Na Figura 1 estão apresentadas as temperaturas mensais ocorridas no município durante o período experimental. As plantas foram cultivadas em vasos contendo 5 kg de substrato orgânico com as seguintes características: 21% de argila; pH= 5,8; P= 10 mg/dm³; K= 239 mg/dm³; M.O= 6,7%; Al= 0,0 cmol_c/dm³; Ca= 9,1 cmol_c/dm³ and Mg= 3,2 cmol_c/dm³. As plantas foram mantidas sem restrição hídrica. A colheita foi efetuada em novembro de 2006, quando as plantas estavam com sete meses de idade e em aparente estágio vegetativo. Para fins de caracterizar as plantas quanto ao tamanho, foram medidas a altura, número de hastes da coroa (consideradas aquelas oriundas da porção da coroa rente à superfície do solo) e hábito de crescimento (ereto, semi-ereto, prostrado). A parte aérea foi seca em estufa a 37°C e moídas finamente. As análises químicas foram realizadas, primeiramente, no Centro de Pesquisa em Alimentos (CEPA), da Universidade de Passo Fundo, e, posteriormente, no Centro de Energia Nuclear para Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, São Paulo.

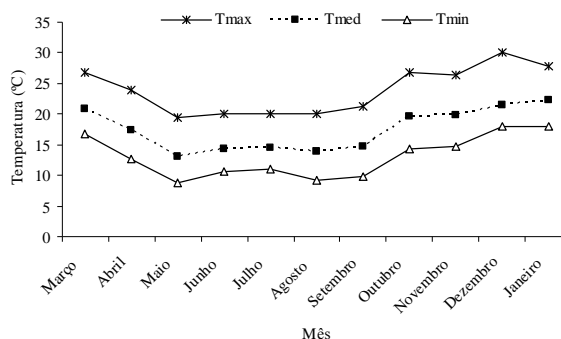


Figura 1 - Temperaturas máxima (Tmax), médias (Tmed) e mínimas (Tmin) mensais durante o período experimental. Fonte: www.cnpt.embrapa.br.

Devido ao elevado custo laboratorial, as análises para identificação de flavonóides foram realizadas apenas com as amostras da cv. São Gabriel, em razão de ser a espécie mais importante do gênero. Nesse caso, foram utilizadas amostras das plantas cultivadas em casa-de-vegetação e daquelas coletadas na área externa. Para as primeiras, os testes foram realizados com extratos secos e para as plantas da área externa foram utilizados extratos frescos. Nas últimas, as amostras foram divididas em extrato da planta inteira (a1), das flores (a4) e das folhas (a5). O extrato das plantas da casa-de-vegetação foi dividido em extrato hidroalcolico 40°GL (a2), solução aquosa (a3), solução com metanol 70% (a6) e acetona 70% (a7).

Para a identificação de taninos e saponinas foram realizados ensaios fitoquímicos clássicos e por cromatografia em camada delgada. A técnica empregada para a preparação do material vegetal foi a extração com solventes polares (MeOH, EtOH, acetona), visando a extração de compostos, como flavonóides e taninos. A identificação de flavonóides foi realizada pelas reações da cianidina e com cloreto de alumínio (AlCl₃) e de saponinas, pelo teste de formação de espuma resistente a ácido fraco.

No CEPA/UPF foi realizada a triagem fitoquímica (COSTA, 2002) de acordo com o esquema apresentado na Figura 2. Para a verificação dos taninos foram utilizados os ensaios de precipitação com gelatina e alcalóides e reação com cloreto férrico (FeCl₃). Na identificação de alcalóides foram empregados ensaios de precipitação com os reagentes de Mayer e de Dragendorff. Para confirmação dos resultados obtidos foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatofolhas de sílica F₂₅₄ MERCK[®] tendo como substâncias de referência epicatequina, catequina, ácido gálico, cafeína, ácido caféico, rutina, quercetina, vitexina e isovitexina. Após a migração em diferentes fases móveis, as placas foram reveladas com reagente natural para flavonóides, anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento para saponinas e compostos fenólicos e cloreto férrico 5% para taninos, posteriormente visualizadas no ultravioleta (366 nm). As fases móveis testadas foram: butanol:ácido acético: água (5:1:3 v/v), butanol:ácido acético:água:etanol (5:1:3:1 v/v); (5:1:2:1 v/v); (7:1:1:1 v/v), CHCl₃: acetona:ácido acético (5:2:0,3 v/v), hexano:acetona:ácido acético (5:2:0,3 v/v), CHCl₃: acetona:ácido fórmico (40:16:8 v/v) e CHCl₃: acetona:ácido acético (10:2:0,3 v/v).

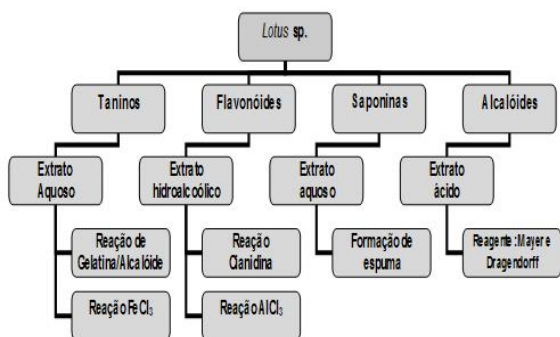


Figura 2 - Metodologia da triagem fitoquímica.

Para a quantificação dos compostos químicos, as amostras das plantas oriundas da casa-de-vegetação foram analisadas no CENA/SP. Para as análises de proteína bruta (PB) e fibra em detergente ácido (FDA) e neutro (FDN) foi seguida a metodologia de Van Soest & Wine (1967). Para a determinação de fenóis totais, os substratos foram analisados pelo método Folin-Ciocalteu e os taninos condensados, pelo método de Porter et al. (1986), após extração com solução de acetona (80%) e sonicação. A avaliação do efeito biológico dos taninos foi medida pela produção in vitro de gás, na presença de polietileno glicol (PEG), utilizando líquido ruminal de ovino adulto como inóculo. O líquido foi coletado e homogeneizado com a fração sólida na mesma proporção (1:1) e o material foi mantido sob atmosfera de dióxido de carbono. Aproximadamente 1 g da amostra foi acondicionado em quatro garrafas de 160 ml e em duas garrafas foi adicionado 1 g de PEG, sendo posteriormente adicionados em todas as garrafas, 90 ml de solução nutritiva e 10 ml de inoculo (BUENO et al., 2005). As garrafas foram fechadas, homogeneizadas e colocadas em incubadora a 39°C durante 24 h. Os gases produzidos durante os diferentes períodos de fermentação (12 e 24 horas) foram medidos com um transducer-medidor de pressão (THEODOROU et al., 1994) e o volume de gás estimado pela fórmula $V = 0,0112p^2 + 7,3358p$, onde: V é o volume de gases (ml) e p é a pressão medida (psi). De acordo com Makkar et al. (2007), o incremento na produção de gases na presença de PEG foi considerado como medida para avaliar o efeito do tanino sobre a fermentação ruminal.

Os resultados foram submetidos à análise da variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por ocasião da imposição dos tratamentos, a maioria das hastes das cultivares estava em estágio vegetativo aparente. As plantas evidenciaram hábitos variados, representados pelos extremos em altura (Tabela 1) entre as cultivares São Gabriel e El Rincón, sendo que esta última mostrou pequena dimensão em altura, mas com ramificação similar às demais.

Tabela 1 - Características da parte aérea das plantas de *Lotus* spp. cultivadas em casa-de-vegetação à época da colheita

Cultivar	Altura (cm)	Hastes da coroa	Hábito de crescimento
São Gabriel	34,1 a	14,5 ab	Ereto
ARS 2620	22,8 b	15,8 a	Semi-ereto
Maku	25,3 b	10,5 b	Semi-ereto
El Rincón	6,6 c	10,3 b	Prostrado

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As análises de flavonóides efetuadas por CCD na cv. S. Gabriel indicaram a presença de dois compostos majoritários com características flavonoídicas frente ao reagente natural, rutina e vitexina (Figura 3),

independentemente de serem oriundos de plantas cultivadas em casa-de-vegetação (CV) ou coletadas no campo (CA). As amostras a1 (CA), a5 (CA), a6 (CV) e a7 (CV) evidenciaram compostos do padrão rutina. Nas amostras a1 (CA), a4 (CA), a5 (CA) e a6 (CV) foi detectada a presença de vitexina-2-O-ramnosídeo e as amostras a2 (CV) e a3 (CV) não apresentaram substâncias com comportameto cromatográfico semelhante aos padrões utilizados. Essas substâncias não haviam ainda sido relatadas para *Lotus* spp., o que evidencia a importância do estudo.

De acordo com Reynaud & Lussignol (2005), há indícios de que o cornichão possui riqueza e diversidade de flavonóides e que o estudo de tais substâncias pode ser utilizado em investigações sobre a especiação do complexo *L. corniculatus* ou da variação de flavonóides em função da altitude. Os autores verificaram que as plantas tetraplóides mostraram maior diversificação quanto ao conteúdo de polifenóis. Além disso, em maiores altitudes, com condições climáticas normalmente mais instáveis, foram encontrados dois tipos diplóides da espécie, com perfil homogêneo e pouca quantidade de polifenóis. Foo et al. (1996) encontraram epicatequina (67%) e epigalocatequina (30%), com menores quantidades de catequina, na espécie. Basualdo et al. (2003) identificaram caenferol, quercetina e isorametina em populações de *L. glaber* Mill., sendo que a população oriunda de San Vicente, Argentina, não mostrou quercetina, mas apresentou as maiores concentrações de isorametina. Essa população mostrou maior resposta à fertilização fosfatada, o que sugeriu um possível controle genético sobre tal fator.

Neste trabalho, não foi detectada a presença de saponinas e alcalóides nas amostras analisadas, tanto nos ensaios colorimétricos clássicos, como nas análises por CCD. No entanto, Walter (1961) apontou a existência de saponinas em cornichão. Segundo Tiemann et al. (2006), a concentração das saponinas pode ser afetada por fatores do meio ambiente, tais como a fertilidade dos solos. Isso remete à necessidade de serem testados materiais oriundos de distintas condições de cultivo.

Quanto aos taninos, na maioria dos extratos não houve formação de precipitados, sugerindo a ausência dessa substância ou quantidades insuficientes para confirmar sua presença pelos métodos qualitativos e por CCD realizados no CEPAR/RS. Isso se confirmou quando das análises quantitativa de taninos e compostos fenólicos realizadas com outra metodologia (PORTER et al., 1986) no CENA/SP. O teor de taninos variou entre as cultivares (Tabela 2), mas em concentrações inferiores em relação às citadas na literatura. Em cornichão, Haring et al. (2007) apontaram para valores entre 2,5 e 5,4%. Acuña et al. (2008) obtiveram entre 4,7 e 7,6% e Ramirez-Restrepo et al. (2004, 2006), entre 0,83 e 2,87%. Segundo Carter et al. (1999), o conteúdo de taninos é, também, distinto em folhas, flores e caules.

Em *Lotus*, a literatura é unânime quanto à presença de taninos (HEDQVIST et al., 2000), o que indica a importância de estudos dessa natureza no Brasil e em distintas condições de cultivo. Se desconhece a

caracterização das espécies estudadas em trabalhos realizados para as condições brasileiras, evidenciando a importância e a continuidade dos trabalhos dessa natureza. Pelos resultados, não se pode afirmar, portanto, que as espécies de *Lotus* L. sempre possuam elevadas concentrações, sugerindo haver interações com o ambiente, pois neste trabalho, apenas as plantas oriundas do cultivo em casa-de-vegetação foram analisadas quanto ao teor de taninos.

Tabela 2 - Taninos condensados e fenóis totais em cultivares de *Lotus* spp. cultivadas em casa-de-vegetação

Cultivar	Componente (Equivalente g/kg)	
	Taninos condensados*	Fenóis totais**
São Gabriel	1,99 a	2,88 a
ARS 2620	0,05 d	2,89 a
El Rincón	1,67 b	2,50 b
Maku	0,34 c	1,27 c

* Em equivalente g de leucocianidina; ** em equivalente grama de ácido tânico.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As baixas quantidades de taninos podem ser decorrentes do modo de cultivo, pois as plantas não foram submetidas a estresses hídricos, nutricionais e à herbivoria. Normalmente, os metabólitos secundários são produzidos com mais intensidade em condições de estresse para a planta, como condições adversas de clima e solo. No estudo de Ehike & Legare (1993) com cornichão, houve interação genótipo x ambiente para a concentração de taninos, em que elevadas temperaturas reduziram os teores de TC na maioria dos acessos, demonstrando que a produção desses metabólitos não é previsível para plantas testadas em somente um ambiente, principalmente no caso de programas de melhoramento genético. Os autores encontraram valores extremos, aproximadamente de 10 a 100 g/kg de MS em genótipos da espécie. No presente estudo, as temperaturas médias (Figura 1) estiveram dentro do aceitável e desejável para *Lotus* spp., com exceção das máximas obtidas em dezembro, registradas em aproximadamente 30°C.

Taninos condensados são polifenóis que em altas concentrações (>4%) são considerados impróprios para a nutrição de ruminantes, em virtude de reduzirem a palatabilidade e o valor nutritivo das forrageiras (ROBBINS et al., 1998). Contudo, em níveis moderados (2 a 4%) podem evitar o timpanismo e exercer o controle de endoparasitas. A prevenção do timpanismo se deve à conjugação tanino-proteína no rúmen, que evita a degradação da proteína à amônia, promovendo seu aproveitamento no intestino (WAGPHORN et al., 1987), onde é mais bem absorvida. Reis et al. (2006) destacaram que a síntese de proteína microbiana geralmente é aumentada na presença de taninos e que um decréscimo na taxa de digestão ruminal acarretada pelos taninos pode contribuir para uma melhor sincronização da liberação dos nutrientes e, conseqüentemente, um aumento na

eficiência da síntese de proteína microbiana. Na Austrália, Kelman (2006) verificou grande variação no teor de TC em cornichão, com populações apresentando valores abaixo de 4% e, em contrapartida, com teores de digestibilidade acima de 70%. No seu trabalho, os teores de TC e de N foram negativamente correlacionados, o que implica que na seleção de germoplasma para menores teores de TC poderia ocorrer a limitação na quantidade de N complexado e reduzir, assim, a quantidade de proteína absorvida no intestino.

Apesar dos baixos teores de taninos, a presença de PEG aumentou o incremento de gás (Figura 3) o que sugere que mesmo nessas quantidades esses compostos exerceriam alguma inibição na degradabilidade das proteínas. Na cv. El Rincón, com concentração similar em TC ao São Gabriel, o incremento de gás foi superior, o que sugere maior atividade dos taninos nesta espécie. Em análises feitas por Cabral Filho et al. (2005) também foi observada uma composição similar de sorgo (*Sorghum L.*) em termos de conteúdo de TC, e em que na presença de PEG ocorreu maior produção de gás e na medida em que aumentou a concentração de TC, aumentou o incremento de gás, indicando haver um efeito maior sobre a fermentação ruminal.

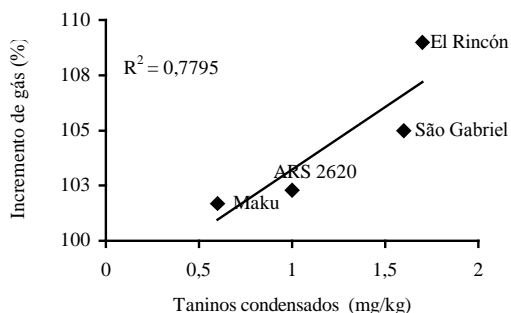


Figura 3 - Relação entre o teor de taninos condensados e o incremento de gás na presença de polietilenoglicol (PEG) em cultivares de *Lotus* spp. cultivadas em casa-de-vegetação.

As diferenças entre as espécies de *Lotus* obtidas neste trabalho, especialmente entre cornichão e cornichão-dos-banhados, tanto na quantidade de TC, como na produção de gás, sugere que as espécies tenham distinto valor nutritivo. De acordo com Foo et al. (1982), também observaram diferenças no tamanho e na composição de polímeros dessas duas espécies, ao avaliarem os taninos condensados. Tanner et al. (1994), igualmente, mostraram que no cornichão esses compostos foram mais inibitórios na degradação da proteína em relação aos encontrados no cornichão-dos-banhados. Costa et al. (2008) ressaltaram a diferença de taninos entre espécies de um mesmo gênero vegetal, de forma que essa diferença influi na atividade biológica dos taninos. Isso foi bem observado quando caprinos tratados com *Acacia nilotica* (L.) Delile e *A. karoo* (L.) apresentaram diferentes resultados entre as duas espécies.

As concentrações de PB e FDN não variaram entre as cultivares (Tabela 3), estando de acordo com a literatura sobre as espécies (SOSTER et al., 2004). Forragens de alta qualidade são caracterizadas por teores de FDA e FDN relativamente baixos, 30 e 60%, respectivamente (PATERSON et al., 1994). Neste trabalho, as duas cultivares de cornichão, S. Gabriel e ARS 2620, mostraram os menores valores de FDA, sugerindo melhor aproveitamento da matéria seca em relação às demais (Tabela 3).

Tabela 3- Teor de proteína bruta, fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro em cultivares de *Lotus* spp. cultivadas em casa-de-vegetação

Cultivar	PB	FDA	FDN
-----%-----			
São Gabriel	17,6 a	34,7 b	42,2 a
ARS 2620	14,9 a	31,4 b	52,0 a
Maku	12,0 a	43,2 a	59,4 a
El Rincón	13,2 a	41,7 a	62,7 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Apesar de serem dados preliminares, dado o cultivo em ambiente semi-protégido e ocorrido em única ocasião, os dados são inéditos para o Brasil, especialmente quanto à presença de flavonóides e aos teores de taninos condensados, contribuindo para as pesquisas na área de zootecnia e veterinária, dada a importância do gênero *Lotus* L. para a América do Sul. Essas espécies são valorizadas pela sua versatilidade e maior tolerância a solos com acidez e média fertilidade (DALL'AGNOL & SCHEFFER-BASSO, 2007). Além disso, as espécies do gênero têm recebido atenção como plantas medicinais, destacando-se o trabalho de Koelzer (2009), em que foram evidenciados os compostos canferitrin, ácido oleanólico e β -sitosterol na cv. São Gabriel, no qual ficou comprovada a sua atividade antiinflamatória e antibacteriana.

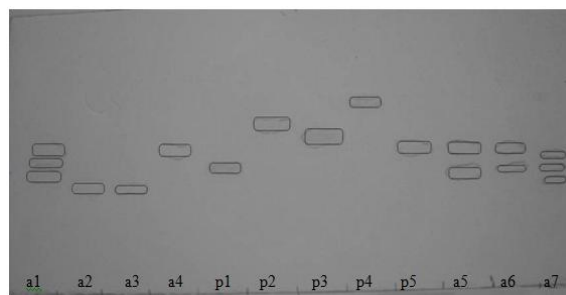


Figura 4- Cromatografia de camada delgada realizada com extratos frescos de plantas de cornichão cultivadas em casa-de-vegetação (estádio vegetativo) e colhidas no campo (estádio de florescimento): plantas inteiras (a1), hidroalcóolico (a2), aquoso (a3), das flores (a4), padrões rutina (p1), vitexina (p2), isovitexina (p3), quercetina (p4) e vitexina 2-O-ramnosídeo (p5), extrato puro das folhas (a5), extrato metanólico (a6) e extrato acetônico (a7). A fase móvel utilizada foi butanol: ácido acético: água: etanol (5:1:3:1) e com agente de detecção reagente natural/UV 366nm.

CONCLUSÕES

Lotus corniculatus cv. São Gabriel apresenta flavonóides do tipo rutina e vitexina.

L. corniculatus, *L. uliginosus* e *L. subbiflorus* cultivados em casa-de-vegetação, sem estresse hídrico, térmico e nutricional, podem apresentar valores muito baixos de taninos condensados, o que indica cautela na extrapolação de resultados obtidos em outras condições ambientais.

Os teores de FDA, FDN e PB obtidos nessas espécies confirmam seu valor como plantas forrageiras em relação ao consumo e aproveitamento de sua matéria seca.

A variabilidade no perfil fitoquímico inter e intraespecífico de *Lotus* spp. indica a importância dessas análises para programas de melhoramento genético e na interpretação de resultados obtidos em ensaios de produção animal.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, H., CONCHA, A., FIGUEROA, M. Condensed tannin concentrations of three *Lotus* species grown in different environments. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.68, p.31-41, 2008.
- AOKI, T., AKASHI, T., AYABE, S. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. **Journal of Plant Research**, v.113, p.475-488, 2000.
- BASUALDO, N., QUINTANA, E., MENDOZA, R. DEL PERO MARTÍNEZ, M. A. Quimiosistemática en ecotipos de *Lotus glaber* (Fabaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v.38, p.204, 2003.
- BUENO, I. C. S., VITTI, D. M. S. S., LOUVANDINI, H., ABDALLA, A. L. A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v.141, p.153-170, 2008.
- BUENO, I. C. S., CABRAL FILHO, S. L. S., GOBBO, S. P., LOUVANDINI, H., VITTI, D. M. S. S., ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p.95-105, 2005.
- CABRAL FILHO, S. L. S., ABDALLA, A. L., BUENO, I. C. S., NOZELLA, E., RODRIGUES, J. Ruminal fermentation and degradability of sorghum cultivar whole crop, and grains, using an *in vitro* gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p.329-339, 2005.
- CARTER, E., THEODOROU, M., MORRIS, P. Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change. 2. Effect of elevated CO₂, temperature and drought on tissue digestion in relation to condensate tannin and carbohydrate accumulation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1431-1440, 1999.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 6 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1031p.
- COSTA, C. T., BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.1; VIEIRA, L. S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.108-116, 2008.
- DALL'AGNOL, M., SCHEFFER-BASSO, S. M. Utilização de leguminosas em sistemas pastoris do sul do Brasil. **Lotus Newsletter**, v.37, p.59-61, 2007.
- EHIKE, N. J., LEGARE, D. G. **The effects of temperature and soil stresses on the production of tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.)**. Lotus Newsletter, v.24. Disponível em: <http://plantsci.missouri.edu>. 1993. Acessado em 25 de agosto de 2009.
- ESCARAY, F., ESTRELLA, J., PESQUEIRA, J., PIECKENSTAIN, F., DAMIANI, F., PAOLOCCI, F., RUIZ, O. R. **Taninos condensados em leguminosas del género *Lotus***. Lotus Newsletter, v.37, p.34-35, 2007.
- FOO, L. Y., JONES, W. T., PORTER, L. J., WILLIAMS, V. M. Proanthocyanidin polymers of fodder legumes. **Phytochemistry**, v.21, p.933-935, 1982.
- FOO, L. Y., NEWMAN, R., WAGHORN, G., McNABB, W. C., ULYATT, M. J. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. **Phytochemistry**, v.41, p.617-624, 1996.
- HARING, D. A., SUTER, D., AMRHEIN, N., LUSHERM, A. Biomass allocation is an important determinant of the tannin concentration in growing plants. **Annals of Botany**, v.99, p.111-120, 2007.
- HEDQVIST, H., MUELLER, I. H., REED, J. D., KRUEGER, C. G., MURPHY, M. Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, p.41-56, 2000.
- IZAGUIRRE, P., BEYHAUT, R. **Las Leguminosas en Uruguay y regiones vecinas**. Montevideo: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, 1998. 549p.
- KELMAN, W. M. Germplasm sources for improvement of forage quality in *Lotus corniculatus* L. and *L. uliginosus* Schkuhr (Fabaceae). **Genetic Resources and Crop Evaluation**, v.53, p.1707-1713, 2006.
- KOELZER, J., PEREIRA, D. A., DALMARCO, J. B., PIZOLATTI, M., PEREIRA, D., FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. **Food Chemistry**, v.117, p.444-450, 2009.

- MAKKAR, H. P., SIDDHURAJU, P., BECKER, K. Plant secondary metabolites. **Methods in Molecular Biology**, v.393, p.1-122, 2007.
- MONTEIRO, I. D., PAIM, N. R. Teste de progênies de policruzamento de *Lotus uliginosus*. I. Em mistura com azevém anual. II. Em linhas individuais e com a cultivar Maku. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.1483-1489, 1982.
- MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961. p.42.
- NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade São Paulo, 2001. 72p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2001.
- OLIVEIRA, J. C. P. **Avaliação de plantas e progênies de *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1987. 157p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1987.
- OTERO, M. J., HIDALGO, L. G. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de ruminantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). **Livestock Research for Rural Development**, v.16, n.2, p.1-9, 2004.
- PATERSON, J. A., BELYEA, R. L., BOWMAN, J. P., KERLEY, M. S., WILLIAMS, J. E. **The impact of forage quality and supplementation regimen on ruminant animal intake and performance**. In: FAHEY Jr. G. C. (Ed.). Forage quality, evaluation, and utilization. Madison: ASA, 1994. p.59-114.
- PORTER, L. J., HRSTICH, L. N., CHAN, B. G. The conversion of proanthocyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v.25, p.223-230, 1986.
- RAMIREZ-RESTREPO, C. A., BARRY, T. N., LOPEZ-VILLALOBOS, N., KEMP, P. D., McNABB, W. C. *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase lamb and wool production under commercial dryland farming conditions without the use of anthelmintics. **Animal Feed Science and Technology**, v.117, p.85-105, 2004.
- RAMIREZ-RESTREPO, C. A., BARRY, T. N., LOPEZ-VILLALOBOS, N. Organic matter digestibility of condensed tannin-containing *Lotus corniculatus* and its prediction *in vitro* using cellulose/hemicellulase enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, v.125, p.61-71, 2006.
- REIS, R. A., MORAIS, J. A. da S., SIQUEIRA, G. R. Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. **Anais...**São Paulo: CBNA [2006]. Disponível em <http://www.unb.br/posgraduacao/stricto_sensu> Acesso em: 20/8/09.
- REYNAUD, D., LUSSIGNOL, M. The flavonoids of *Lotus corniculatus*. **Lotus Newsletter**, v.35, p.75-82, 2005.
- ROBBINS, M. P., BAVAGE, A. D., STRUDWICKE, C., MORRIS, P. Genetic manipulation of condensed tannins in higher plants. **Plant Physiology**, v.116, p.1133-1144, 1998.
- SCHEFFER-BASSO, S. M., VOSS, M., JACQUES, A. V. A. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em vasos de Leonard. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.687-693, 2001.
- SOSTER, M. T. B., SCHEFFER-BASSO, S. M., DALL'AGNOL, M., BRUSTOLIN, R., FONTANELI, R. S. Caracterização agrônômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1654-1661, 2004.
- TANNER, G. J., MOORE, A. E., LARKIN, P. J. Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v.71, p.947-958, 1994.
- THEODOROU, M., WILLIAMS, B., DHANOA, M., McALLAN, A. B., FRANCE, J. A. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics to ruminant feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.
- TIEMANN, T. T., FRANCO, L. H., PLAZAS, C. H., AVILA V. P., RAMÍREZ G. G., HESS, H. D., LASCANO, C. E. **Efecto de la localidad y nivel de fertilización en la producción de biomasa de leguminosas arbustivas**. In: HESS, H. D., GÓMEZ, J., LASCANO, C.E. (eds.). Taller Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia (2, 2006, Cali, Colombia). Memorias. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, p.4-6. (Publicación CIAT no. 352).
- VAN SOEST, P. J., WINE, R. H. Use of detergent in the analysis farmers feed. IV. Determination of plant cell wall constituents. **Journal of AOAC**, v.50, p.50-55, 1967.
- WAGHORN, G., ULYATH, M., JOHN, A., FISHER, M. T. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and others nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus*. **British Journal of Nutrition**, v.57, p.115-126, 1987.
- WALTER, E. D. Isolation of oleanolic acid and saponin from trefoil (*Lotus corniculatus* var. Viking). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.50, p.173, 196