

ISOFLAVONAS ESTROGENICAS EN ESPECIES ESPONTANEAS
DEL GENERO TRIFOLIUM.

(OESTROGENIC ISOFLAVONES OF SPONTANEOUS SPECIES OF THE TRIFOLIUM GENUS).

por

M. Medina Blanco*, E. peinado Lucena** y A.G. Gómez Castro*

* Cátedra de agricultura. Facultad de veterinaria. Córdoba. España.

** Instituto de zootecnia, C.S.I.C. Córdoba. España.

Palabras clave: Pastos. Alimentación animal. Esterilidad. Biocanina A. Formononetina. Genisteína. Pratenseína.

Keywords: Pastures. Animal nutrition. Sterility. Biochanin A. Formononetin. Genistein. Pratensein.

Summary

The level of oestrogenic isoflavones (biochanin A, formononetin, genistein and pratensein) are determined on twenty species of the Trifolium genus. These samples have been taken from the natural pasture growing in the northern part of the province of Córdoba.

Isoflavones levels are generally low, only in the case of I. bocconeii, I. lappaceum and I. scabrum the averages reached are higher than in I. subterraneum. Nevertheless maximum levels are thrown in spring at flowering time when they come levelled with I. subterraneum without meaning any danger unless the pasture is overridden by the latter.

Resumen

Se determinan los niveles de isoflavonas estrogénicas (biochanina A, formononetina, genisteína y pratenseína) en veinte especies del género Trifolium en pastos naturales del norte de la provincia de Córdoba.

Recibido para publicación el 16-2-1982.

MEDINA ET AL.: ISOFLAVONAS ESTROGENICAS EN ESPECIES DE TRIFOLIUM.

Los niveles de isoflavonas son en general bajos, solamente I. bocconeii, I. lappaceum y I. scabrum tienen valores medios más altos que los de I. subterraneum; sin embargo, los valores máximos que se alcanzan en primavera, al principio de la floración, corresponden a I. subterraneum, pero no representan ningún peligro a menos que dicho trébol se haga dominante en el pasto.

En trabajos anteriores se ha estudiado el nivel de fitoestrógenos en pastos naturales de la provincia de Córdoba (15) y la influencia que los factores estacionales (16) o de suelo (11) podrían determinar sobre la concentración de isoflavonas estrogénicas en las mencionadas superficies herbáceas. La conclusión de aquellos trabajos, acerca de que la composición botánica era uno de los principales factores determinantes de la estrogénicidad, ha sido la causa de que en el presente trabajo se aborde el análisis de los niveles de fitoestrógenos existentes en diversas especies del género Trifolium, como más característico, que junto con el género Medicago constituyen las principales leguminosas de la imagen florística del pastizal natural de la zona, y puesto que el último presenta en su dotación estrogénica fundamentalmente sustancias derivadas del cumestano, parece conveniente considerar exclusivamente el primero.

Material y métodos

Se estudian 254 muestras pertenecientes a veinte especies del género Trifolium (tabla I) presentes en los pastos naturales de la parte norte de la provincia de Córdoba.

El material obtenido por separación manual, ha sido desecado en estufa de aire a 60° C y extraído según la técnica de Beck (1) modificada por Dedio y Clark (8), para la dosificación espectrofotométrica de isoflavonas.

Resultados y discusión

En la tabla I se expone la proporción de muestras positivas y valores alcanzados para cada isoflavona en las distintas especies de Trifolium estudiadas.

Son parámetros a considerar la ausencia y presencia de aquellos compuestos en las especies estudiadas y los niveles que alcanzan en las mismas, así como la existencia de las citadas isoflavonas en su totalidad o parcialmente; circunstancias de las que en conjunto depende su clasificación específica en cuanto a actividad estrogénica. En relación con ello, debe destacarse la ausencia de muestras positivas, aun a nivel de trazas, para T. angustifolium y T. strictum; por el contrario, sobresalen tanto por el nivel de isoflavonas como por la frecuencia de hallazgos positivos T. subterraneum, T. lappaceum, T. scabrum y T. bocconeii, y aunque las máximas concentraciones registradas corresponden claramente a T. subterraneum si se consideran los valores medios para el conjunto de las muestras de cada especie, son más notorios los que alcanzan T. bocconeii, T. scabrum y T. lappaceum (figura 1); especies que presentan cifras que suponen respectivamente el 321, 186,5 y 165,4 p.100 de los valores correspondientes para T. subterraneum. Esta especie es la que con mayor frecuencia se cita en la bibliografía como causante de los trastornos tóxicos y por ello se ha elegido como índice 109. En este sentido, no se dispone de datos respecto a T. bocconeii y T. scabrum, pero hay que señalar que entre un centenar de especies australianas de Trifolium, Francis, Millington y Bailey (9) destacan a T. lappaceum como poseedora de altas concentraciones de isoflavonas, que pueden suponer hasta el 1 p.100 de la materia seca, para formononetina; 3 p.100, para genisteína; y 1,2 p.100 para biochanina A; cifras que hacen a esta especie comparable a T. subterraneum.

Quizás lo más notable de los resultados obtenidos es la pequeña concentración de isoflavonas en la mayoría de las especies estudiadas, como se desprende de la figura 1 y de la tabla I. Los valores máximos alcanzados por la formononetina (la isoflavona más activa desde el punto de vista estrogénico) no exceden de 0,060 p.100 en las especies consideradas, a excepción de las cuatro últimamente mencionadas; lo que concuerda con lo observado por Francis, Millington y Bailey (9), quienes pusieron de manifiesto contenidos de isoflavonas despreciables en tréboles espontáneos australianos, entre los que se pueden citar T. hirtum,

MEDINA ET AL.: ISOFLAVONAS ESTROGENICAS EN ESPECIES DE TRIFOLIUM.

T. cherleri, T. campestre, T. angustifolium, T. tomentosum, T. glomeratum y T. cernuum, también considerados en este trabajo, lo que naturalmente resta peligrosidad a los pastizales en que dominan. En este sentido debe señalarse que Curnow y Rossiter (6) no encuentran genisteína en T. angustifolium, T. arvense, T. cernuum, T. glomeratum, T. hirtum, T. spumosum y T. tomentosum, en coincidencia con lo aquí registrado, aunque los resultados de estos autores presentan cierta contradicción con las pequeñas cantidades de genisteína que junto a la formononetina se han apreciado en algunas muestras de T. repens, que confirman los hallazgos de Medina Blanco y Niño Larrú (17); y parcialmente, los de Bickoff (2) y Wong (21), quienes encontraron formononetina, genisteína y daidzeína pero no biochanina A, que tampoco pudo detectar Chury (4) en este trébol. De otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con los de Curnow y Rossiter (6), quienes hallaron genisteína en T. campestre, aunque a niveles mucho más elevados que las mínimas concentraciones registradas aquí en algunas pocas muestras.

Hay que señalar que las cuatro isoflavonas dosificadas en este trabajo sólo aparecen de forma sistemática en T. subterraneum y T. lappaceum, mientras que en el resto de las especies el denominador común es la formononetina, que va acompañada, en algunos casos, de biochanina A y genisteína, pero siempre en proporciones muy escasas.

Concretando, a la vista de lo anterior, las consideraciones sobre el espectro isoflavónico a T. subterraneum y T. lappaceum, hay que indicar que en el primero la isoflavona registrada en mayores concentraciones, salvo en un par de zonas, es la pratenseína, mientras que en T. lappaceum las dominantes son alternativamente aquella o la biochanina A. Observación importante, ya que la pratenseína no ha sido mencionada habitualmente como isoflavona presente en la dotación de los distintos cultivares de T. subterraneum. Son prácticamente los trabajos de Wong (21 y 22) los únicos que han puesto de manifiesto su presencia, apuntando Bickoff (2) que formononetina, biochanina A, y genisteína y daidzeína son las cuatro isoflavonas estrogénicas de este trébol, y Beck (1) manifiesta la escasa significación de la pratenseína y de la daidzeína, lo que hace pensar que el hecho aquí registrado podría interpretarse conectado de alguna forma con la menor estrogenicidad de las muestras de variedades indígenas y espontáneas de T. subterraneum que se estudian en este trabajo.

MEDINA ET AL.: ISOFLAVONAS ESTROGENICAS EN ESPECIES DE TRIFOLIUM.

No se han encontrado diferencias acentuadas entre las zonas, que no puedan explicarse bien como consecuencia de la evolución estacional, ya estudiada en un trabajo anterior (16). Así, en T. subterraneum se aprecia que las muestras correspondientes al Valle de los Pedroches presentan valores más elevados que las de las restantes zonas, pero aquéllas corresponden al muestreo del mes de abril, mientras que las muestras de las otras zonas se obtienen en el mes de mayo, y probablemente esta distancia en el tiempo puede justificar esos diferentes niveles. Además, debe tenerse en cuenta que Cunnigham y Hogan (5) no detectaron diferencias de estrogenicidad con respecto a la localización geográfica de cepas de T. subterraneum, y el hecho de que la posible influencia de factores nutricionales, por lo menos dentro de ciertos rangos, se debe más que a una acción directa sobre las concentraciones de sustancias fitoestrogénicas, al efecto sobre las modificaciones en la composición botánica del conjunto del pastizal (11), que no deben tenerse en cuenta en este caso por haberse realizado las determinaciones sobre plantas exclusivamente de cada una de las especies consideradas.

De todos modos, debería tenerse presente que los niveles de isoflavonas en T. subterraneum, en la mayoría de las zonas, son notablemente bajos, lo que daría lugar a su menor peligrosidad frente a cepas importadas, apuntada en otras ocasiones (14). Incide en esta afirmación el hecho de que aproximadamente en las mismas fechas de muestreo (mayo) otras especies del género Trifolium (lappaceum, scabrum y bocconeii) presentan valores considerablemente más elevados; especies que, de otro lado, no significan una proporción importante en los pastizales en que se han obtenido y que por tanto son de escasa trascendencia en cuanto a posibles efectos sobre el ganado, pero sirven para justificar que los bajos valores registrados en esta época para las muestras de T. subterraneum no se deben exclusivamente a condiciones ambientales.

Por lo que se refiere a la evolución del contenido isoflavónico, deben considerarse dos aspectos: uno, la evolución estrictamente por fechas, en las que, con las irregularidades del muestreo realizado en zonas diferentes, se manifiestan claramente los máximos primaverales ya señalados en otra ocasión (16) y la disminución de estos valores a medida que el tiempo pasa (figura 2); lo que corresponde a la observación de Rossiter y Beck (20) de que el envejecimiento de las hojas produce declinación del nivel de isoflavonas (salvo diadzeína, no dosificada aquí, y que puede considerarse como un indicador de senectud foliar).

Debe tenerse en cuenta que la producción de nuevas hojas en los momentos en que se obtiene la mayoría de las muestras, prácticamente se ha limitado al mínimo; aspecto que ha sido considerado por Beck (1), quien afirma que la concentración de isoflavonas en las hojas de T. subterraneum declina a partir del momento de la floración, y que podría completarse con el hecho de que la proporción de hojas, más ricas en isoflavonas, con respecto a los tallos y peciolo, disminuye (20). Desde el otro criterio, paralelo al meramente cronológico, cual es el estudio del grado de desarrollo vegetativo en relación con el contenido de isoflavonas de las muestras correspondientes, se puede deducir que, en general, el momento del comienzo de la floración coincide con la máxima carga estrogénica, que después se hace menor a medida que se completa el citado desarrollo y, finalmente, se alcanza la maduración del fruto y semillas; lo que coincide con lo generalmente admitido de que la floración es un momento importante en relación con la concentración de fitoestrógenos (13, 18, 19 y 3). Krause (12) y Francis Quinlivan (10) han encontrado las cifras máximas de concentración antes o al comienzo de esta etapa, como consecuencia, al parecer, de que las isoflavonas se degradan en el momento de la floración de forma que sus metabolitos puedan ser utilizados en el proceso (7). Debe destacarse de todos modos que, normalmente, es durante los periodos en que aún hay crecimiento vegetativo activo, al menos en las muestras de T. subterraneum, y que las modificaciones correspondientes al período reproductivo final son casi siempre referentes a concentraciones más bajas. Lo que dicho de otro modo significa que el descenso de concentraciones que se inicia a partir de los picos primaverales se mantiene y coincide con la avolución de la planta hacia su total madurez; momento en que las concentraciones suelen hacerse mínimas.

De todas las consideraciones anteriores debe deducirse, en primer lugar, que los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con las deducciones anteriores, de que las diferencias en la cifra de fitoestrógenos en las distintas zonas, más que al efecto directo de los factores del suelo sobre su concentración, deben atribuirse a la posible influencia que de ellos pudiera derivarse sobre la presencia más o menos abundante de una determinada especie en el conjunto florístico. En segundo lugar, se confirma que las épocas primaverales, en el comienzo de la floración, son las que comportan mayor carga estrogénica en los tréboles espontáneos; lo que se evidencia naturalmente en el conjunto del

MEDINA ET AL.: ISOFLAVONAS ESTROGENICAS EN ESPECIES DE TRIFOLIUM.Tabla I. Porcentaje de muestras positivas y valores máximos y medios de las isoflavonas estrogénicas en distintas especies del género Trifolium.

Especie	Bochanina			Formononetina		
	% de positivas	Valor medio	Valor máximo	% de positivas	Valor medio	Valor máximo
<u>Campestre</u>	0	-	-	9	0.006	0.006
<u>Angustifolium</u>	0	-	-	-	-	-
<u>Arvense</u>	0	-	-	93	0.011	0.026
<u>Boccanei</u>	0	-	-	100	0.167	0.275
<u>Cernuum</u>	0	-	-	42	0.006	0.007
<u>Cherleri</u>	0	-	-	50	0.022	0.047
<u>Cemellum</u>	0	-	-	66	0.009	0.024
<u>Glomeratum</u>	0	-	-	65	0.006	0.009
<u>Hirtum</u>	0	-	-	26	0.007	0.011
<u>Lappaceum</u>	100	0.125	0.208	100	0.086	0.173
<u>Repens</u>	0	-	-	20	0.012	0.012
<u>Resupinatum</u>	15	0.039	0.066	54	0.018	0.033
<u>Scabrum</u>	30	0.030	0.045	100	0.093	0.145
<u>Spumosum</u>	0	-	-	33	0.011	0.011
<u>Squarrosom</u>	0	-	-	100	0.011	0.011
<u>Stellatum</u>	0	-	-	73	0.007	0.011
<u>Striatum</u>	0	-	-	86	0.006	0.013
<u>Strictum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Subterraneum</u>	34	0.080	0.401	100	0.052	0.354
<u>Tomentosum</u>	0	-	-	100	0.027	0.060

Tabla I. (Continuación).

	% de po sitivas	Valor medio	Valor máximo	% de po sitivas	Valor medio	Valor máximo
Especie	Bochanina			Formononetina		
<u>Campestre</u>	9	0.006	0.006	0	-	-
<u>Angustifolium</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Arvense</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Bocconeii</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Cernuum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Cherleri</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Cemellum</u>	11	0.031	0.031	0	-	-
<u>Glomeratum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Hirtum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Lappaceum</u>	100	0.070	0.198	100	0.130	0.259
<u>Repens</u>	20	0.043	0.057	0	-	-
<u>Resupinatum</u>	14	0,045	0.045	0	-	-
<u>Scabrum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Spumosum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Squarrosum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Stellatum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Striatum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Strictum</u>	0	-	-	0	-	-
<u>Subterraneum</u>	84	0,058	0,139	77	0.118	0.320
<u>Tomentosum</u>	0	-	-	0	-	-

pastizal, como efectivamente ha sido comprobado con anterioridad y, además, se registra que el avance en el estado de desarrollo se traduce en disminución del nivel de isoflavonas en la mayoría de las especies; fenómeno que también coincide con lo habitualmente detectado. Por último, y esta conclusión debe ser especialmente considerada, que el nivel de isoflavonas en muestras de T. subterraneum espontáneo y, en general, de la mayoría de las especies estudiadas, es lo suficientemente bajo como para no provocar ningún tipo de trastorno en los animales de pastoreo, particularmente por el hecho de que su proporción habitual en el pastizal no es en exceso alta.

Agradecimiento

A D^a Antonia Escobar de la Torre, ayudante de investigación del C.S.I.C., por su valiosa ayuda en la parte experimental de este trabajo.

Bibliografía

1. Beck, A.B. Aust. J. Agric. Res. 15, 223 (1964).
2. Bickoff, E.M. Proc. 22th Biol. Coll. Physiol. Repr. p. 93. Oregon State Univ. Press Publ. (1961).
3. Bickoff, E.M. y col. J. Anim. Sci. 19, 745 (1960).
4. Chury, J. Acta Univ. Agric. Brno. 14, 279 (1966).
5. Cunnigham, I.J. y K.G. Hogan. N. Z. Vet. J. 2, 128 (1954).
6. Curnow, D.H. y R.C. Rossiter. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 33, 243 (1955).
7. Dedio, W. y K.W. Clark. Can. J. Plant Sci. 48, 175 (1968).
8. Dedio, W. y K.W. Clark. Can. J. Plant Sci. 49, 185 (1969).
9. Francis, C.M., A.J. Millington y E.T. Bailey. Aust. J. Agric. Res. 18, 47 (1967).

10. Francis, C.M. y B.J. Quinlivan. Proc. 12th Int. Grassld. Congr. Moscow Vol. III. pt II, p. 754 (1974).
11. Gómez Castro, A.G., M. Medina Blanco y E. Peinado Lucena. Arch. zootec. (en prensa).
12. Krause, E. Acta Vet. Brno. 39, 279 (1970).
13. Legg, S.P., D.H. Curnow y S.A. Simpson. Biochem. J. 46, 19 (1950).
14. Medina Blanco, M. Consideraciones sobre aspectos tóxicos de los pastizales españoles. II Ciclo Conf. Técnicas Minist. Agric., Direc. Gen. Ganad. Madrid (1965).
15. Medina Blanco, M. y col. XX Reun. Cient. S.E.E.P. VI-12 (1980).
16. Medina Blanco, M., A.G. Gómez Castro y E. Peinado Lucena. XXI Reun. Cient. S.E.E.P., León (1981).
17. Medina Blanco, M. y F. Niño Larrú. Arch. Zootec. 7, 215 (1958).
18. Pope, M.J., G.S. Mcnaughton y H.E. Jones. J. Dairy Sci. 26, 196 (1959).
19. Rankin, J.E.F. Brit. Vet. J. 119, 30 (1963).
20. Rossiter, R.C. y A.B. Beck. Aust. J. Agric. Res. 18, 561 (1967).
21. Wong, E.J. J. Sci. Fd. Agric. 14, 376 (1963).
22. Wong, E. J. Org. Chem. 28, 2336 (1963).

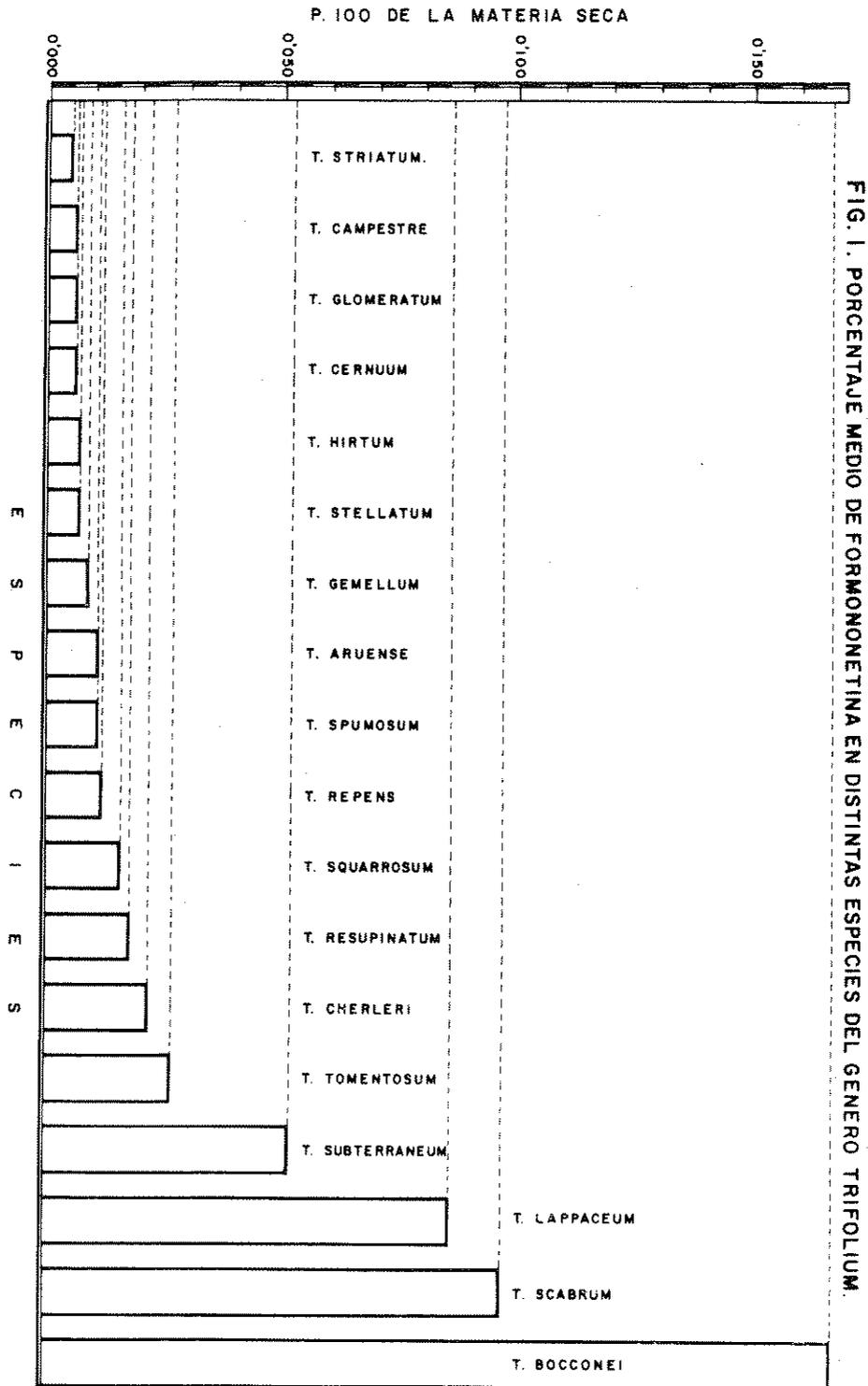


Figura 1. Porcentaje medio de formononetina en distintas especies del género Trifolium.

