

## Variaciones estacionales del contenido de Ca, P, Mg, S, Fe, Zn y Cu de Alfalfa, Trébol rojo y Lotus y de su bioaccesibilidad por un método rápido *in vitro*.

\*Ramos, A<sup>1</sup>; Cabrera, MC<sup>1,2</sup>; Astigarraga, L<sup>2</sup>; Saadoun, A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Igúa 4225. Montevideo. Uruguay. [aramos@fcien.edu.uy](mailto:aramos@fcien.edu.uy)

<sup>2</sup> Depto. Producción Animal & Pasturas, GD Nutrición, Laboratorio Calidad de Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Garzón 809. Montevideo. Uruguay. [mcab@fagro.edu.uy](mailto:mcab@fagro.edu.uy).

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la variación estacional del contenido de materia seca, ceniza, Ca, P, Mg, S, Fe, Zn y Cu de 3 forrajes (alfalfa, trébol rojo y lotus) y de la bioaccesibilidad a través de un método *in vitro* rápido (incubación en agua). Se estudió si había diferencias entre los forrajes. Los minerales se midieron por EAA en llama, excepto el P que se midió por colorimetría. Las estaciones influyen en el contenido y bioaccesibilidad de la materia seca, ceniza, P, Fe y Zn. No hay variación estacional en el contenido de Ca y Mg pero si en la bioaccesibilidad del Ca. El contenido de S varía estacionalmente sólo en el trébol rojo y el de Cu en los tres forrajes pero la bioaccesibilidad de S y Cu es independiente de la estación. No hay diferencias en el contenido de MS, ceniza, Ca, P, Mg, Fe y Zn entre alfalfa, trébol rojo y lotus, el contenido de S es mayor en el trébol y el de Cu es menor en la alfalfa. La bioaccesibilidad de la materia seca, ceniza y Ca es igual en los tres forrajes. El P del lotus es el más bioaccesible y el Cu del lotus es el menos bioaccesible. En el trébol rojo el Mg y el Zn son menos bioaccesibles que en la alfalfa y el lotus; para el Fe es lo opuesto.

**Palabras clave:** variaciones estacionales, bioaccesibilidad, minerales.

### ABSTRACT

The objective of this work was study the seasonal variations of the content in dry matter, ashes, Ca, P, Mg, S, Fe, Zn and Cu of 3 forages (alfalfa, red clover, lotus) and the seasonal variations of it bioaccessibility through an *in vitro* fast method (water incubation). We study if there were differences between the forages. The minerals were analyzed by AAS, except the P which was analyzed by colorimetry method. The seasons influence the content and bioaccessibility of DM, ash, P, Fe and Zn. There is not seasonal variation in the Ca and Mg content but affect the Ca bioaccessibility. The content of S varies seasonally only in the red clover. The content of Cu varies seasonally. The bioaccessibility of S and Cu are independent of the season. There are not differences in the contents of DM, ash, Ca, P, Mg, Fe and Zn of the alfalfa, red clover and the lotus; the S content is greater in the red clover and the content of Cu is smaller in the alfalfa. The bioaccessibility of the DM, ash and Ca is the same in the three forages. The P of the lotus is the most bioaccessibly and the Cu of the lotus is the less bioaccessibly. In the red clover the Mg and the Zn are less bioaccessibly than in the alfalfa and the lotus; for the Fe is the opposite case.

**Key words:** seasonal variations, bioaccessibility, minerals.

### INTRODUCCIÓN

Los factores que determinan el contenido y disponibilidad biológica mineral de las pasturas y forrajes, son los que limitan la capacidad de dichos alimentos para aportar las cantidades apropiadas ó no de minerales y son la base para la corrección por suplementación. Los datos nacionales y regionales existentes sobre los contenidos y la biodisponibilidad de los minerales de interés en las pasturas son escasos e incompletos. Los mismos refieren principalmente a valores de composición mineral de las pasturas naturales (Guerrero y Colucci, 1987; Corbellini, 1998) más que a la biodisponibilidad de minerales del campo natural del país (Piaggio y Uriarte, 2005). Esto repercute a nivel de la formulación de la dieta y se traduce en una alimentación mineral deficiente ó por exceso del ganado (van Eys y Reid, 1987). Esto es particularmente importante en el caso de los sistemas productivos del Uruguay basados mayormente en pasturas. Las deficiencias provocadas por la falta de microelementos (I, Zn, Se, Cu, Mo) son muchas veces de tipo subclínico, repercuten en la producción y en los índices reproductivos, y son de difícil diagnóstico en relación a un elemento en particular. En Uruguay en los rumiantes a pastoreo se presentan deficiencias en P y en Cu (McDowell, 1992; Torre *et al.*, 2005). La bioaccesibilidad puede definirse como la fracción del mineral que es soluble en el ambiente gastrointestinal y está disponible para la absorción; representa la cantidad solubilizada antes de llegar a las mucosas gastrointestinales (Paustenbach, 2000). La solubilidad en distintos solventes tales como agua, HCl 0,4%, ácido cítrico 2%, citrato de amonio neutro, fluido ruminal, fluido ruminal artificial y fluido abomasal se ha utilizado para estimar la bioaccesibilidad de minerales (Ammerman *et al.*, 1995). El objetivo de este trabajo fue estudiar la variación estacional del contenido de materia seca,

ceniza, Ca, P, Mg, S, Fe, Zn y Cu de 3 forrajes utilizados comúnmente para alimentar ganado vacuno y la variación estacional de su bioaccesibilidad a través de un método *in vitro* rápido (incubación en agua). Se estudió asimismo si había diferencias entre los forrajes: alfalfa, trébol rojo y lotus.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los forrajes estudiados fueron alfalfa (*Medicago sativa*, cv Estanzuela Chaná), trébol rojo (*Trifolium pratense*) y lotus (*Lotus spp.*) provenientes del Centro Regional Sur (CRS) de Facultad de Agronomía, Uruguay, cortados en cada una de las 4 estaciones del año, durante 3 años, a una altura de corte de 4,1 cm del suelo. Las muestras se secaron a 60°C en estufa de aire forzado y se molieron hasta obtener una partícula que pase por un tamiz de 2 mm. Se prepararon bolsas de nylon de 6x7 cm, tamaño de poro 50 µm, se numeraron, se lavaron con agua desionizada y se secaron a 60 °C. Se pesó la bolsa seca y vacía agregándole 1,5 g de la muestra secada a 60 °C y molida. Se pesó la bolsa y se cosió. Se evaluó la solubilidad en agua de acuerdo al siguiente método: se incubaron bolsas conteniendo las muestras en matraces Erlenmeyers con 33ml de agua desionizada por bolsa en Baño de agua (Giratory Bath Water Shaker, New Brunswick, Co; Modelo G 76), a 39 °C (Brown y Zeringue, 1994), 1 hora, 120 rpm de agitación, n=5. Luego de la incubación las bolsas se escurrieron, se secaron a 105 °C hasta peso constante y su contenido se llevó a mufla (Thermolyne) a 550 °C, para determinar cenizas. Las cenizas se solubilizaron con HNO<sub>3</sub>/HCl, se filtraron con papel de filtro Whatman 40 y se llevó a volumen en matraces aforados de 25 ml. El contenido en Ca, Mg, S, Fe, Zn, y Cu se determinó por EAA en llama (AAAnalyst 300 Perkin-Elmer) y de P por Fiske y Subarrow (1927) con espectrofotómetro Shimadzu UV-visible modelo 160<sup>a</sup> para las muestras originales y para los residuos de incubación. Se calculó la solubilidad como porcentaje del mineral inicial que desapareció en el agua.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa NCSS 2004, Statistical Systems, Kaysville, Utah (Estados Unidos). Los valores se expresaron como la media ± SEM. Se realizó una ANOVA de 2 vías comparando los resultados por forraje y por estación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Wilson et al., (1991), Hardt et al., (1991), Huhtanen y Jaakkola (1994), Coblenz et al., (1998) y Ammar et al., (2004) encontraron una relación entre la madurez de las leguminosas, el aumento de su pared celular. Esto ha sido asociado con la deposición de polisacáridos conteniendo lignina y xilosa fundamentalmente en los tallos maduros de la planta (Deetz et al., 1996). Esto explicaría que la MS y la ceniza de los forrajes sean mayores en verano y otoño y sus solubilidades en agua sean menores en estas estaciones en las que los forrajes se hallan en estado de madurez avanzada. La solubilidad en agua de MS del trébol es mayor en otoño (Fig. 1).

Los contenidos de minerales de la alfalfa, del trébol y del lotus son similares a los presentados por Ledoux y Martz (1991) para heno de alfalfa. Estos resultados están dentro de los valores referidos en la Tabla FEDNA (De Blas et al., 2003) para heno de alfalfa y en la Tabla de Composición de Alimentos de América Latina (McDowell et al., 1974) para henos de alfalfa cortados en distintos estados fenológicos, trébol y lotus. No hay variación estacional para la concentración de Ca, el contenido de Ca del lotus es menor que en la alfalfa y en el trébol. No se observan diferencias en la solubilidad de Ca entre los tres forrajes, el mínimo para la alfalfa es en invierno y para el trébol en otoño, mientras que para el lotus la solubilidad del Ca es independiente de la estación y constante (Fig. 2). No hay variación estacional para la concentración de Mg, ni diferencias entre los forrajes. Tampoco hay variaciones estacionales en la solubilidad del Mg; pero el trébol tiene menos Mg soluble que la alfalfa y el lotus en todas las estaciones. El contenido de P es menor en verano en los tres casos, esto podría deberse a que en esta estación hay menos lluvias lo que disminuye su absorción radicular y su contenido en los forrajes. En esta estación también se presenta el mínimo de solubilidad de P en la alfalfa y el trébol, mientras que para el lotus la solubilidad del P se mantiene constante e independientemente de la estación de corte del forraje. El porcentaje de P soluble del lotus es mayor que el del trébol. El P en las plantas se encuentra en forma inorgánica como ortofosfatos, solubles o no, los que pueden llegar a ser entre 40 y 80% del P total; el P inorgánico aumenta a medida que aumenta la concentración del P en la planta (Playne et al., 1978). Según Whitehead et al., (1985) el P está asociado principalmente al contenido celular en las forrajeras templadas; lo cual explicaría la alta solubilidad en agua del P. Su menor solubilidad en verano podría deberse a que tiene un menor contenido de P y por tanto el P inorgánico sería menor y disminuiría su fracción soluble (Fig. 2).

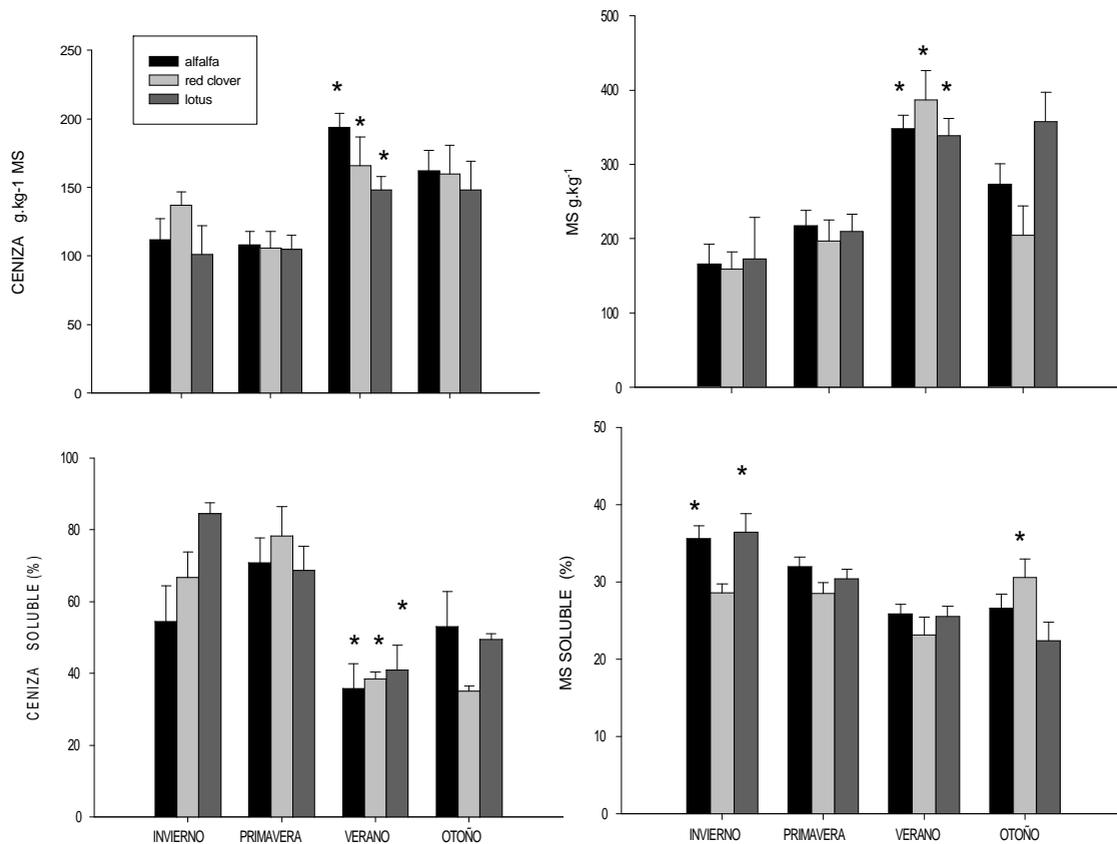


Figura 1: Variación estacional del contenido y solubilidad de la materia seca y ceniza de la alfalfa, trébol rojo y lotus. \*  $p < 0.05$

El contenido de S es mayor en el trébol, le sigue la alfalfa y es menor en el lotus; no se observa efecto estacional en la alfalfa ni en el lotus pero para el trébol hay mayor contenido en verano. De acuerdo a Whitehead *et al.*, (1985) la mayor parte del S está en el contenido celular en las forrajeras templadas lo que explicaría su alta solubilidad en agua. Según Torre *et al.* (2005) hay una correlación negativa entre los contenidos de P y el S; esto se observa en este caso, únicamente en el trébol en verano. No se detectó S en los residuos de la incubación, por lo que se consideró 100% soluble. Los contenidos de Fe son mayores en verano y otoño y no hay diferencias entre los forrajes. Se observa una mayor solubilidad del Fe del trébol que de los otros dos forrajes y que para los tres la solubilidad disminuye en verano y otoño. Estos resultados concuerdan con los de Galdámez-Cabrera *et al.* (2004) quienes encontraron una mayor desaparición de Fe en el pasto bermuda en la época de mayor fotosíntesis y crecimiento de la planta que en épocas frías. Esto parece reflejar que el Fe solubilizado en agua está en forma soluble en las plantas y no unido a estructuras de la pared celular. Este Fe soluble podría ser parte del Fe de la fitoferritina, una proteína en la que se acumula y está relacionada a un mayor desarrollo del aparato fotosintético. Los contenidos de Zn son iguales en los tres forrajes y son significativamente mayores en invierno y primavera. El Zn del trébol es menos soluble que el de los otros dos forrajes. La solubilidad del Zn es menor en verano para la alfalfa y el trébol y en otoño para el lotus. De acuerdo a Spears (2003) una gran proporción del Zn del forraje se halla asociado con la pared celular, lo cual concuerda con que su solubilidad sea menor en verano y otoño cuando hay mayor contenido de materia seca y de pared celular (Fig. 3). El contenido de Cu de la alfalfa es menor que el del trébol y el del lotus. Hay un efecto estacional en el contenido de Cu, en la alfalfa y el trébol es menor en verano y en el lotus en primavera y verano. Los bajos niveles de Cu en estos forrajes están acorde con los datos provenientes del norte de nuestro país donde se han encontrado bajos contenidos de este mineral en las pasturas naturales (Torre *et al.*, 2005). El lotus presenta menos Cu soluble que en la alfalfa y en el trébol pero no se observa efecto estacional en la solubilidad del Cu (Fig. 3).

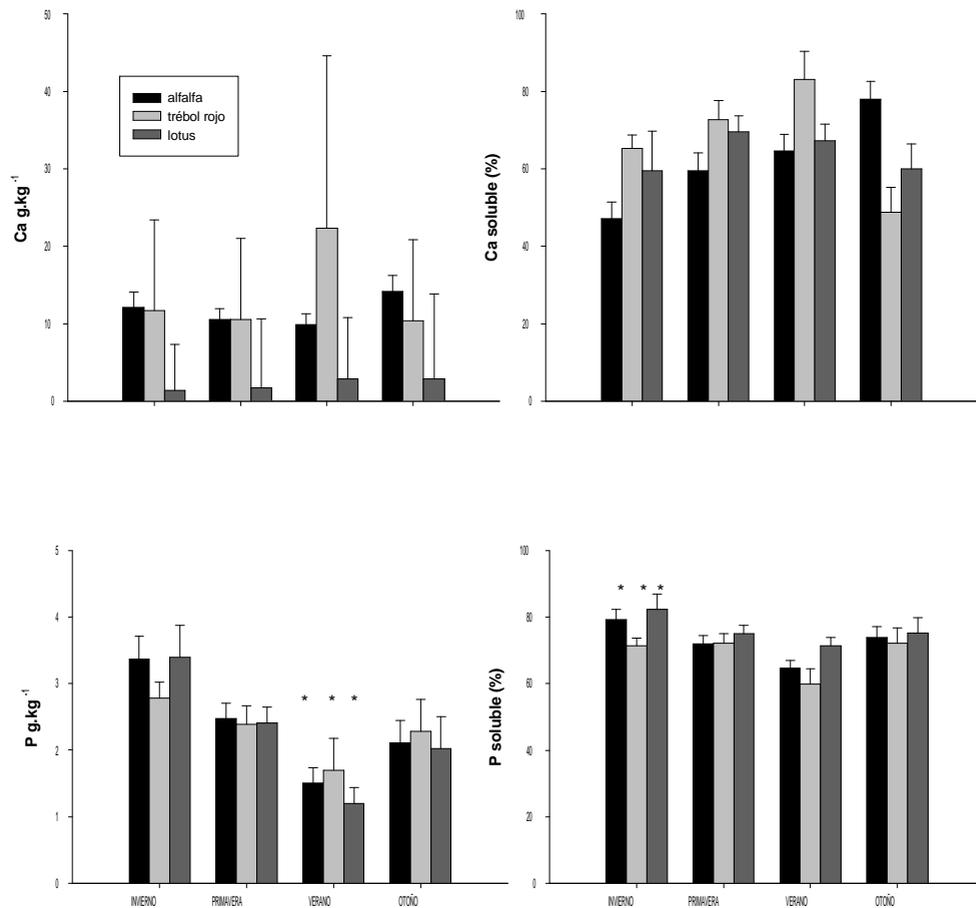


Figura 2. Variación estacional del contenido y solubilidad del Ca y el P de la alfalfa, trébol rojo y lotus

## CONCLUSIONES

Se concluye que las estaciones influyen en el contenido y en la bioaccesibilidad de materia seca, ceniza, P, S, Fe, Zn y Cu. No hay diferencias en los contenidos de MS, ceniza, Ca, P, Mg, Fe, Zn de la alfalfa, el trébol rojo y el lotus estudiados; en cambio el S es mayor en el trébol y el Cu es menor en la alfalfa. La bioaccesibilidad de la materia seca, ceniza y Ca es igual en los tres forrajes. Sin embargo el P del lotus es más bioaccesible y su Cu es menos bioaccesible que el del trébol rojo y el del lotus. En el trébol rojo el Mg y el Zn son menos bioaccesibles que en la alfalfa y el lotus aunque su Fe es más bioaccesible.

## LITERATURA CITADA

- Ammar, H; López, S; González, J.S. y Ranilla, M. J. 2004. Seasonal variations in the chemical composition and in vitro digestibility of some Spanish leguminous shrub species. *Anim. Feed Sci.Tech.* 115(3-4): 327-340.
- Brown, T.F. y Zeringue, L.K. 1994. Laboratory evaluations of solubility and structural integrity of complexed and chelated trace mineral supplements. *J. Dairy Sci.* 77: 181-189.
- Coblentz, W.K.; Fritz, J.O.; Fick, W.H.; Cochran, R.C. y Shirley, J.E. 1998. In situ dry matter, nitrogen, and fiber degradation of alfalfa, red clover, and eastern gamagrass at four maturities. *J. Dairy Sci.* 81: 150-161.
- Corbellini, C. 1998. La suplementación mineral de las vacas lecheras. En: *Curso Internacional de Producción Lechera. XVIII Tomo 2. Rafaela. INTA EEA.* p 23-44.
- De Blas, C.; Mateos, G.G. y Rebollar, P.G. 2003. *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos. 2<sup>da</sup> ed.* Madrid: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Deetz, D.A.; Jung, H.G. y Buxton, D.R. 1996. Water-deficit effects on cell-wall composition and in vitro degradability of structural polysaccharides from alfalfa stems. *Crop Sci.* 36: 383-388.

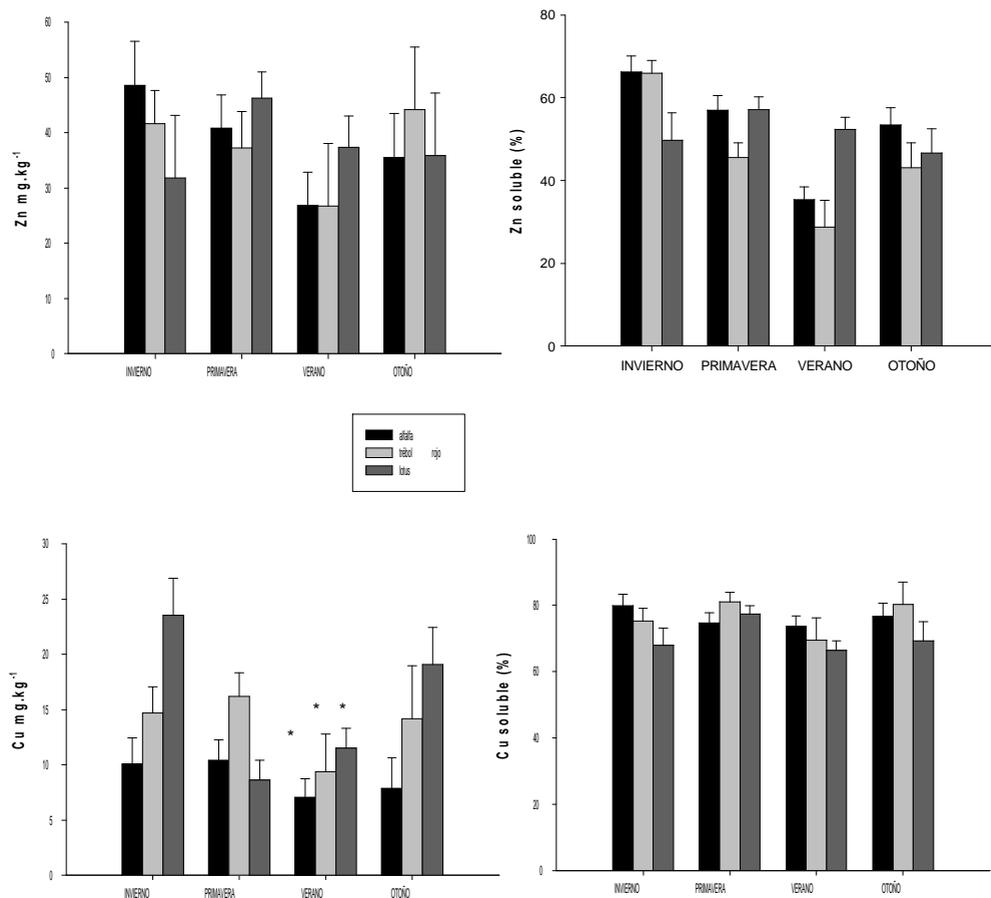


Figura 3. Variación estacional del contenido y solubilidad del Zn y Cu en alfalfa, trébol rojo y lotus.

- Fiske, C. H. y Subarrow, Y. 1927. The colourimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375-400.
- Galdámez-Cabrera, N.W.; Coffey, K.P.; Coblenz, W.K.; Scarbrough, D.W.; Turner, J.E.; Kegley, E.B.; Johnson, Z.B.; Kellog, D.W.; Gunsaulis, J.L. y Daniels, M.B. 2004. Sulphur concentrations and in situ solubility of selected microminerals from common bermudagrass fertilized with different nitrogen rates and harvested on two dates. *Anim. Feed Sci. Tech.* 111: 223-237.
- Guerrero J. y Colucci, P. 1997. Situación actual y perspectivas de la nutrición mineral de bovinos en el Uruguay. *Diálogo XXX.* IICA.
- Hardt, P.F.; Ocumpaugh, W.R. y Greene, L.W. 1991. Forage mineral concentration, animal performance, and mineral status of heifers grazing cereal pastures fertilized with sulfur. *J. Anim. Sci.* 69: 2310-2320.
- Huhtanen, P. y Jaakkola, S. 1994. Influence of grass maturity and diet on ruminal dry matter and neutral detergent fibre digestion kinetics. *Arch. Tierernahr.* 47(2): 153-167.
- Ledoux, D.R. y Martz, F.A. 1991. Ruminal solubilization of selected macrominerals from forages and diets. *J. Dairy Sci.* 74: 1654-1661.
- Mc Dowell, L.R. 1992. Mineral in animal and human nutrition. San Diego: Academic Press. 524 p.
- McDowell, L.R.; Conrad, J.H; Thomas, J.E & Harris, L.E. 1974. Tabla de composición de alimentos de América Latina. Departamento de Ciencia Animal. Universidad de Florida.
- Paustenbach, D.J. 2000. The practice of exposure assessment: A state-of-the-art review. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 3: 179-291.
- Piaggio, L.; Uriarte, G. 2005. Nutrición mineral de los ovinos en pastoreo en el Uruguay. *Producción Ovina.* 17: 5-20.
- Playne, M.J; Echevarría, M.G. y Megarrity, R.G. 1978. Release of nitrogen, sulphur, phosphorus, calcium, magnesium, potassium and sodium from four tropical hays during their digestion in nylon bags in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 29: 520-526.
- Spears, J.W. 2003. Trace mineral bioavailability in Ruminants. *J. Nutr.* 133: 1506S-1509S.

- Torre, M.H.; Viera, I.; Facchin, G.; Kremer, E.; Baran, E.J.; Porochin, T.; Di Donato, V.; Irigoyen, C.; Irigoyen, J.; Saldanha, S.; Bussi, J.; Ohanian, M. y Fuentes, J. 2005. Incidente of hypocupraemia in cattle in northern Uruguay and its alleviation with an injected Cu-Phenylalanine complex. *Livestock Prod. Sci.* 95: 49-56.
- van Eys, J. y Reid, R. 1987. Ruminant solubility of nitrogen and minerals from fescue and fescue-red clover herbage. *J. Anim. Sci.* 65: 1101.
- Whitehead, D.C.; Goulden, K.M. y Hartley, R.D. 1985. The distribution of nutrient elements in the cell wall and other fractions of the herbage of some grasses and legumes. *J. Sci. Food Agric.* 36: 311.
- Wilson, J.R.; Deinum, B. y Engels, F.M. 1991. Effect of temperature on anatomical structure, rate of digestion of different cell types, and dry matter digestibility of leaf and stem of some tropical and temperate forage species. *Nether. J. Agric. Sci.* 39: 31- 48.