

ACTIVIDAD ESTROGENICA DE CUATRO VARIEDADES DE TREBOL (*Trifolium* sp.)
ASOCIADOS A GRAMINEAS Y RECONOCIMIENTO DE ISOFLAVONAS EN
T. repens var. LADINO¹ /

L. A. GIL*
J. RAMIREZ*
J. C. DIAZ*

Summary

Estrogen activity in four varieties of clover alone or in association with grasses in the Bogota Savannah in the Andean highlands at an altitude of 2 600 masl was measured by comparing radioactive estradiol by receivers. Estrogen levels increased dramatically with plant age for the two varieties of clover-Triel and Levezou. In white and red clover considered native, estrogen levels varied with age, but with no marked tendency to increase or decrease. The general average for the clovers was far below that of introduced varieties ($P < 0.01$). The average for red clover was greater ($P < 0.05$) than for white. There was no evident effect of the association with grasses ($P > 0.05$) for any variety.

*For white clover (*Trifolium repens* var. *Ladino*), the presence of isoflavonoides biochanine A, genistein, formononetin, daidzein and cumestrol was proven. This identification was made with the use of column and thin layer chromatography on silica gel, infrared and ultraviolet spectrophotometry, and liquid high pressure chromatography.*

Introducción

Estudios de este laboratorio (8) evidencian una mayor actividad estrogénica de trébol blanco en un altiplano andino de Colombia, que la mencionada en otros países.

Se determinó la actividad estrogénica de dos tréboles nativos: *Trifolium repens* var. *Ladino* (blanco) y *Trifolium subterraneum* var. indeterminada (rojo) y dos introducidos de Francia, *Trifolium subterraneum* var. *Triel* y var. *Levezou*, con el objeto de evaluar variedades que pudieran sustituirlo para vacas en reproducción sobre las cuales pudiera ser nocivo.

Los tréboles se cultivaron asociados con kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) tetrelite (*Lolium hybridum*) y manawa (*L. perenne* x *L. multiflorum* correspondiendo las dos últimas gramíneas a raygrasses de

crecimiento tan rápido como el de los tréboles introducidos.

En adición se pretendió evaluar el efecto que la demanda sobre los nutrientes del suelo tuviera sobre la estrogénicidad de los tréboles y la forma como ésta fluctuara con la edad de las plantas en diferentes estados de su desarrollo.

Ante la elevada estrogénicidad de los tréboles estudiados se hizo necesario averiguar si las sustancias causantes de este efecto fueran las mismas citadas por otros autores (1, 6, 13) o fueran otros compuestos aun no identificados. Con tal fin se analizó el trébol blanco.

Materiales y métodos

Determinación de la estrogénicidad

Se evaluó la actividad biológica de los fitoestrógenos *in vitro* mediante competencia del estradiol radiactivo (¹⁷B-estradiol³H New England Nuclear) contra los estrógenos extraídos del trébol por receptores uterinos aislados por ultracentrifugación, según el método de Corker y Exley (5).

¹ Recibido para publicación el 21 de mayo de 1984.
Se agradece al Organismo Internacional de Energía Atómica, OIEA, de Viena, por su apoyo financiero.

* Instituto de Asuntos Nucleares, IAN. Apartado Aéreo 8595, Bogotá, Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y el Departamento de Biología.

El cultivo de trébol y de tréboles asociado con pasto, se efectuó en un diseño de subparcelas divididas dispuestas como bloques al azar con tres repeticiones, de manera que la composición botánica final fuera de un 25% tréboles y 75% gramíneas.

Se efectuaron cinco recolecciones de hojas a intervalos de 15 días, iniciando la primera 30 días después de un corte de emparejamiento. Las muestras fueron secadas en aire forzado a 70°C por 48 horas, molidas y conservadas en recipientes herméticos. Los extractos acuosos fueron hechos por maceración del material seco durante 24 h lo cual activa la hidrólisis enzimática de los glucósidos. Los volúmenes fueron ajustados a 0.1 g/ml con buffer de McDougal (15).

Reconocimiento de isoflavonoides y cumestrol

Las hojas del trébol secas y molidas fueron maceradas en etanol durante 24 h, para lograr una extracción más completa. El filtrado se concentró por evaporación al vacío a 25°C y luego se redisolvió en agua hirviendo para precipitar clorofilas, las cuales fueron removidas por filtración. La solución acuosa resultante fue extraída sucesivamente con cloroformo y éter de petróleo para removerle lípidos. La fase acuosa se acidificó con HCl concentrado hasta pH 3 para hidrolizar los glucósidos isoflavonoides. Después de 12 h en acidez el extracto se neutralizó potenciométricamente con NaOH y por último los isoflavonoides se extrajeron con acetato de etilo.

Cada una de las fracciones anteriores se analizó cualitativamente mediante la reacción descrita por Bryant (4) para comprobar la presencia de isoflavonoides por enrojecimiento de la solución en ácido clorhídrico y limaduras de magnesio. Las fracciones de reactividad negativa fueron descartadas.

La solución de acetato de etilo se analizó por cromatografía a través de una columna de 76 cm de largo y 3 cm de diámetro empacada con sílica gel 60 (70-230 mesh) y eluida con cloroformo-metanol en proporciones de creciente polaridad. Se recogieron 5 200 alícuotas de 7 ml cada una con un colector de fracciones LKB que funcionó continuamente por 55 días recogiendo 2.5 ml/h. Cada alícuota se analizó por cromatografía de capa delgada sobre sílica gel 60G con cloroformo-metanol 95:5 (v:v) y los compuestos revelados bajo luz ultravioleta (UV), en presencia de vapores de amoníaco bajo luz UV, y por su reacción al fumigarlos con una mezcla de iguales volúmenes de cloruro férrico al 2% y ferricianuro de potasio al 1%. Aquellas alícuotas que contuvieran sustancias cuyo R_f y reactividades correspondieran a las de los isoflavonoides, fueron reunidas para constituir una fracción.

A cada fracción le fue establecido su espectro de absorción al infrarrojo y al UV y finalmente fue resuelta por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) a través de una columna de Sephadex LH-20 por elución con metanol-agua 70:30 (v:v) y con un detector ultravioleta.

Resultados y discusión

Actividad estrogénica de las cuatro variedades de trébol

Se encontraron amplias diferencias en la estrogénicidad promedio de cada variedad. El trébol blanco tuvo la menor estrogénicidad, equivalente a 55.7 ng de 17β-estradiol (E₂)/g de M.S., valor aproximado a las dos terceras partes del promedio para el trébol rojo (74 ng E₂/g de M.S.).

Los tréboles Levezou y Triel presentaron respectivamente actividades equivalentes a 118.2 y 114.3 ng E₂/g de M.S. en promedio, no siendo significativas estas diferencias entre sí.

Estos resultados concuerdan con los de Francis *et al.* (7), quienes citan diferencias en el contenido de sustancias estrogénicas de 14 especies de trébol y aun entre variedades de la misma especie. El trébol blanco ha sido reconocido como medianamente o poco estrogénico (3) aunque Gil *et al.* (1), han demostrado que existen variaciones estacionales en su actividad estrogénica, la cual se incrementa a niveles peligrosos cuando la leguminosa es fermentada con fluido ruminal *in vitro*.

La estrogénicidad de los tréboles rojos se ha reconocido como superior a la del trébol blanco debido a que contienen altas concentraciones de formononetina (14) la cual se convierte en el rumen a eouol que es más persistente en su acción biológica sobre animales poligástricos. Tratándose de la misma especie, es posible que las variedades Triel y Levezou compartan esta propiedad y que las condiciones del altiplano andino las estén potencializando.

Efecto de la edad de las plantas sobre su actividad estrogénica

La actividad estrogénica (Y) de las variedades introducidas tuvo una tendencia progresiva al aumento a medida que avanzó la edad (X) de las plantas (Figura 1), de acuerdo a las regresiones $Y = 96.079 - 1.348x + 0.025x^2$ ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.76$) para Triel, y $Y = 114.198x + 0.029x^2$ ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.709$) para Levezou. Las variedades nativas en cambio exhibieron fluctuaciones sin tendencia definida y no presentaron regresiones significativas (Figura 1).

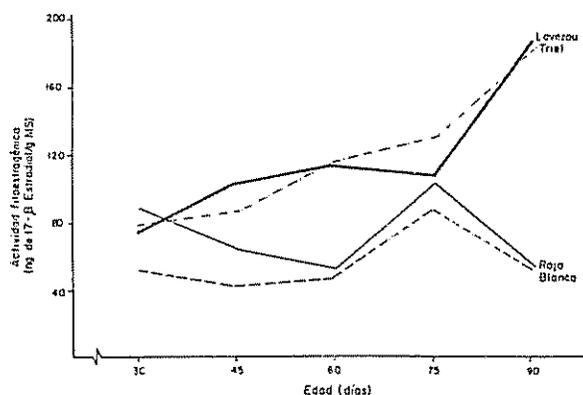


Fig. 1. Estrogenicidad de tréboles a diferente edad (Promedio para 4 parcelas por 3 repeticiones por variedad).

Al comparar los resultados obtenidos con trébol blanco y rojo con los de Rossiter y Beck (12), sobre las fluctuaciones de los fitoestrógenos de acuerdo al desarrollo ontogénico, del trébol subterráneo, variedades Yarloop y Dwalganup, se encuentra un comportamiento semejante. Así, los isoflavonoides de la variedad Dwalganup presentan una tendencia a disminuir entre los 14 y 28 días, desapareciendo toda la formononetina y la biochanina A hacia los 56 días cuando se incrementó la daidzeína para descender hacia los 70 días.

La daidzeína, producto de la desmetilación de la formononetina (10) aunque presente en menor concentración tiene mayor afinidad por receptores estrogénicos y por ende una mayor potencia fisiológica; la transformación de la formononetina en daidzeína podría explicar la actividad fluctuante de los tréboles rojo y blanco durante etapas tardías de su desarrollo.

Efecto de gramíneas asociadas con tréboles, sobre la actividad estrogénica

Estadísticamente los promedios para cada pasto no indicaron ($P > 0.05$) ningún efecto de las gramíneas sobre la actividad estrogénica de los tréboles durante el período de establecimiento y por lo tanto reflejan un efecto a corto plazo. Podría esperarse que a largo plazo las demandas nutricionales sobre el suelo impuestas por cada pasto, incidieran sobre los niveles fitoestrogénicos de los tréboles ya que Rossiter y Beck (11) han demostrado que la deficiencia en fósforo incrementa la concentración de isoflavonoides en los tréboles.

Actividad estrogénica de los tréboles según su edad y la gramínea asociada

La Figura 2 ilustra la actividad estrogénica de cada trébol a diferentes edades, asociados al pasto manawa.

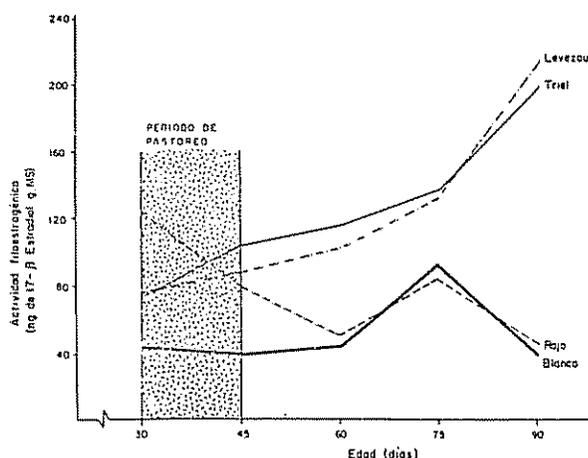


Fig. 2. Estrogenicidad de tréboles asociados al pasto Manawa (promedio de 3 repeticiones)

Este pasto se caracteriza por un rápido crecimiento que lo capacita para el corte o pastoreo entre los 30-45 días, edad a la cual el trébol blanco asociado presenta la más baja estrogénica (43 y 48 ng E_2 /g de M S), sin embargo su escaso desarrollo a esta edad le impide competir con la gramínea.

El trébol rojo no sólo es pequeño a esta edad sino que su actividad estrogénica de 122 y 77 ng E_2 /g de M S es similar o más alta que la de los tréboles Triel y Levezou. De lo anterior se deduce que la asociación más apropiada del pasto manawa sería con Levezou o Triel.

La Figura 3 ilustra las fluctuaciones entre los mismos parámetros anteriores con el pasto tetralite, el cual posee condiciones de rendimiento y precocidad similares a las del manawa, por lo tanto los criterios de selección del trébol para asociación son los ya anotados.

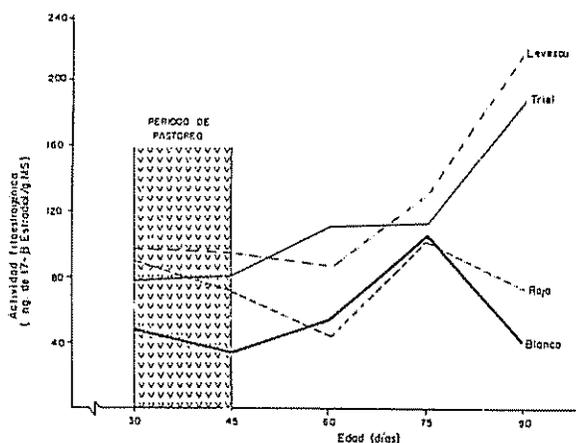


Fig. 3. Estrogenicidad de tréboles asociados al pasto tetralite (promedio de 3 repeticiones)

La situación con el pasto kikuyo se ilustra en la Figura 4. Puesto que el período de pastoreo para este pasto está entre los 75 y 90 días, el trébol deseable para establecimiento de praderas mixtas sería el rojo y/o blanco que a esta edad tienen un desarrollo competitivo con el kikuyo y además presentan la más baja estrogenicidad.

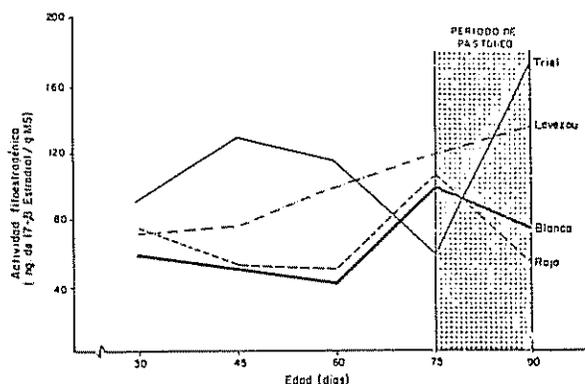


Fig. 4. Estrogenicidad de tréboles asociados al pasto kikuyo. (Promedio de 3 replicaciones)

La estrogenicidad promedio para el trébol blanco fue de 36.8 ng E₂/g de M S para todo el período y coincide con el promedio general para esta variedad, sin fermentar y durante el tiempo lluvioso, o de crecimiento activo, reportado por Gil *et al* (8). Las condiciones de no fermentación y riego periódico fueron las observadas en el presente trabajo, e indican que la actividad estrogénica para las variedades estudiadas puede ser entre 8 y 15 veces superiores después de la fermentación ruminal.

Reconocimiento de isoflavonoides en el trébol blanco

De 1380 g de hojas secas y molidas se obtuvo por evaporación del extracto en acetato de etilo 1.05 g de fitoestrógenos parcialmente purificados, rendimiento comparable al logrado por Bickoff *et al* (2).

El extracto en acetato de etilo se fraccionó por cromatografía en columna sobre sílica gel en 5 200 alícuotas. Aquellas que según su R_f en capa delgada y reacciones de conocimiento se comportaron como isoflavonoides o cumestrol se agruparon en las fracciones 4, 10, 15 y 18 (Cuadro 1). Las demás fracciones se descartaron.

Cuadro 1. Características cromatográficas sobre capa delgada de los compuestos presentes en cada serie (fracción) de alícuotas¹ eluidas de una columna con sílica gel.

Fracción	Alícuotas tubo No.	Eluyente	Número de compuestos y visualización en capa delgada ²				
			Visible	Ultravioleta	Vap de NH ₃	Revelado	R _f
1	1-275	Cloroformo	—	—	—	—	—
2	276-459	"	Verde	—	—	—	0.90
3	460-668	"	Rojo	—	—	+/-	0.95
	—		—	Azul tenue	+	—	0.73
	—		—	Azul tenue	+	—	0.60
4	669-857	"	Amarillo suave	Azul intenso	+	+	0.88
	—		—	Azul tenue	+	—	0.78
	—		—	Azul muy tenue	+	—	0.60
10	1995-2095	90:10	—	Azul violeta	—	—	—
	—	Cloroformo:	—	intenso	+	+	0.69
	—	Metanol	—	Azul tenue	+	—	0.60
	—	—	—	Azul intenso	+	—	0.52
15	3037-3690	90:15	Amarillo tenue	Azul tenue	—	—	0.60
	—	—	—	Azul violeta	—	—	—
	—		—	intenso	Verde-amarillo	+	0.47
	—		—	—	+	—	0.34
18	4811-4930	80:20	—	Azul intenso	+	+	0.42
	—	—	—	Violeta suave	+	—	0.35
21	5116-5200	75:25	—	Azul tenue	—	—	0.26
	—	—	Amarillo	Azul intenso	—	—	0.04

1 Alícuotas de 7 ml, eluidas de la columna y recogidas en tubos que se numeraron de 1 a 5 200

2 El número de alícuotas integrantes de cada fracción fue determinado por los cambios en el cromatograma sobre C.D. cuyas manchas se visualizaron al visible, al ultravioleta, con vapores de NH₃ o por revelado con cloruro férrico y ferricianuro de potasio.

Por comparación de los Rf (Cuadro 2) en capa delgada de isoflavonoides (biochanina A, formononetina y genisteína) puros, y cumestrol donados por el Dr. B. Tam, University of Western Australia, se dedujo que la fracción 4 contenía biochanina A, la 10 formononetina, y la 15 cumestrol y/o genisteína cuyos Rf son idénticos, y la 18 posiblemente (carencia de estándar) daidzeína.

Espectrofotometría al infrarrojo

Los espectros de absorción de las sustancias recuperadas de cromatogramas preparados sobre capa delgada, fueron prácticamente indistinguibles (Figura 5) y en consecuencia sólo útiles para revelar la naturaleza isoflavonóidea de los compuestos. Las bandas comunes más notorias fueron: a $3\ 600\text{ cm}^{-1}$ atribuible

Cuadro 2. Rf's sobre capa delgada de sustancias estándar y valores de la literatura en atmósferas a diferente saturación.

	Rf Literatura			Rf Estándares ¹		
	3	2	3	3	3	3
Saturación cámara						
Solventes desarrollo cloroformo: metanol	89:11	89:11	90:10	95:5		89:11
Biochanina - A	0.85	0.65	0.93	0.88		0.87
Formononetina	0.75	0.60	0.72	0.69		0.80
Genisteína	0.55	0.50	0.60	0.47		0.67
Cumestrol	-	-	0.60	0.47		0.67

1 Cada número es el promedio de 3 determinaciones.

2 Cámara totalmente saturada

3 Cámara parcialmente saturada.

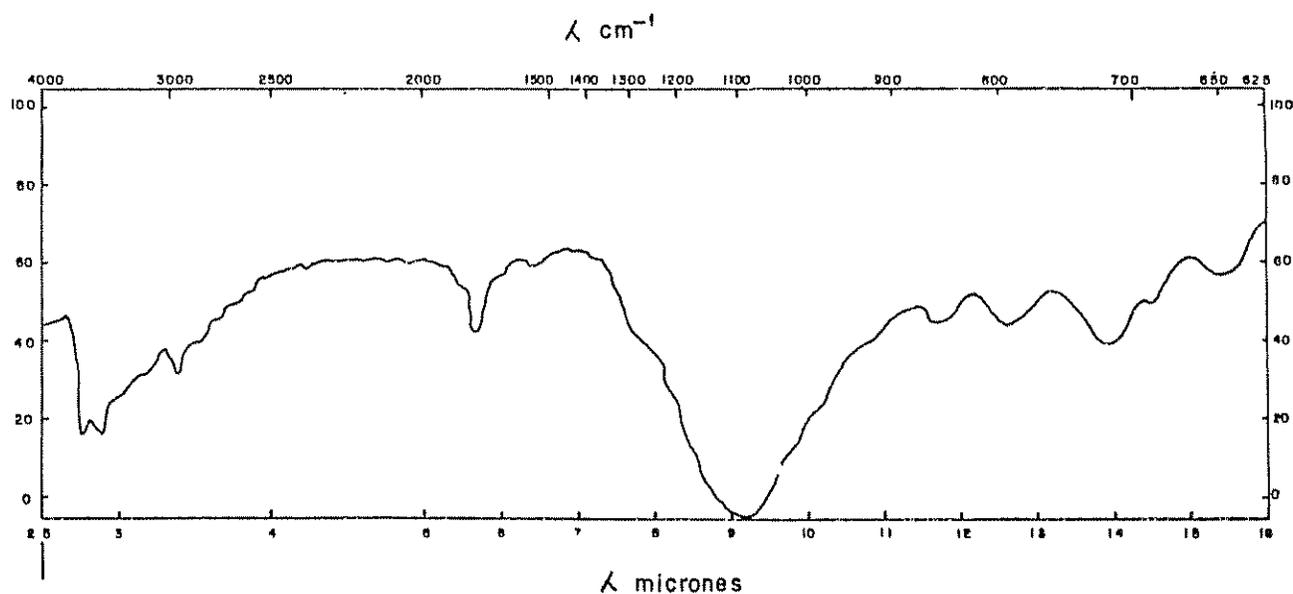


Fig 5 Espectro de absorción I.R. de la Biochanina A

a tensiones de los hidroxilos, a $3\ 400\text{ cm}^{-1}$ asociadas a tensiones C-O, a 2920 cm^{-1} atribuible a tensiones C-H y a 2850 cm^{-1} relacionada al grupo metoxilo

Espectrofotometría ultravioleta

Se obtuvo tres tipos de espectros para las sustancias analizadas, que coinciden con los citados por Markham (9): un tipo para la biochanina A y la genisteína (λ/max :261), otro para la formononetina y la daidzeína (λ/max :248-249) y otro para el cumestrol con un pico (λ/max 243) ancho que incluye parte de los anteriores.

A pesar de pequeñas desviaciones, tal vez causadas por impurezas, sobre los λ/max para las fracciones 4, 10, 15 y 18, esta información (Cuadro 3) sirvió para corroborar los postulados basados en los valores R_f obtenidos sobre capa delgada, y para decidir que la fracción 15 contiene cumestrol y genisteína mezclados.

Cromatografía líquida de alta presión

Esta técnica reveló, además de las sustancias ya identificadas por los procedimientos anteriores, alguna impureza, tal vez causante de las desviaciones en

Cuadro 3. Características espectrales al ultravioleta. Valores de λ/max . para estándares, fracciones cromatográficas y de la literatura.

Sustancia	$(\lambda/\text{max. nm})$	
	Tomado de Markham (9)	Compuestos aislados ó estándares
Biochanina-A	261	-
Genisteina	261	-
Formononetina	248	-
Daidzeina	249	-
Estándares (mezcla)	-	245, 261
Cumestrol (estándar)	243, 343	244, 340
De la fracción 4	-	256
De la fracción 10	-	248
De la fracción 15	-	248, 260, 339
De la fracción 18	-	247

los λ/max al UV, tales como pequeños picos a 84 y 216 seg (Cuadro 4) para el solvente o metanol (supuestamente grado cromatográfico) y un pico adicional a 144 seg para el eluato en metanol de la sílica usada en las cromatografías y sometida al proceso cromatográfico con los solventes puros. Estos tres pequeños picos aparecieron en casi todos los cromatogramas y fueron descartados como criterio de identificación

La mezcla de estándares se fraccionó a tres picos que en orden de polaridad corresponden a la biochanina A (192 seg), a la formononetina (252 seg) y a la genisteína (372 seg) Estos tiempos de retención para los estándares permitieron concluir que la fracción 4 contenía biochanina A (192 seg) y la impureza a 120 seg. La fracción 10 contenía formononetina (252 seg) y la misma impureza a 120 seg. La fracción 15 contenía genisteína (372 seg) y cumestrol (288 seg) más las impurezas mencionadas. La fracción 18 contenía un isoflavonoide (420 seg) no identificado por carencia de estándar, pero que basados en los datos espectrofotométricos y su R_f , corresponde a la daidzeína (Cuadro 1)

Conclusiones

La actividad estrogénica depende de la variedad de trébol y a temprana edad de la planta no se ve modificada apreciablemente por la gramínea con que se asocia. En cambio la actividad aumenta con la edad de algunos tréboles, lo cual hace que el periodo de pastoreo deba seleccionarse según el animal que lo utilice; con hembras en reproducción, el trébol deberá usarse joven y asociado a un pasto de crecimiento rápido.

El otro criterio de selección de plantas forrajeras asociadas, será la similitud en la velocidad de crecimiento entre las gramíneas y la leguminosa.

Las sustancias causantes de la estrogénicidad medida por competencia contra el estradiol por receptores estrogénicos "*in vitro*", son los isoflavonoides y el cumestrol presentes en el trébol blanco

Resumen

La actividad estrogénica de cuatro variedades de trébol asociado y sin asociar a gramíneas en la Sabana de Bogotá, altiplano andino a 2 600 msnm, se determinó por una técnica de competencia del estradiol radioactivo por receptores. La estrogénicidad aumentó drásticamente con la edad de las plantas, para las variedades de tréboles introducidos Triel y Levezou. En los tréboles blanco y rojo considerados nativos, la estrogénicidad varió con la edad pero sin una tendencia

Cuadro 4. Tiempos de retención (Picos) en cromatografía líquida de alta presión para estándares y sustancias aisladas (fracciones).

Sustancia	Tiempo de retención (segundos)				
Metanol	84	216	(Impurezas)	-	-
Eluato de sílica en metanol	84	144	216	(Impurezas)	
Estándares (mezcla)	84	192 (B)	216	252 (F)	372 (G)
Cumestrol (estándar)	84	216	288	-	-
Fracción 4	84	120 (I)	144	192 (B)	216
Fracción 10	84	120 (I)	144	216	252 (F)
Fracción 15	84	144	216	288 (C)	372 (G)
Fracción 18	84	144	216	420 (D)	-

I Impureza B Biochanina A F Formononetina
 G. Genisteína D Daidzeína C Cumestrol

definida de aumento o disminución. El promedio general para los tréboles nativos fue muy inferior al de los introducidos ($P < 0.01$); el promedio para el trébol rojo fue mayor ($P < 0.05$) que para el blanco. No fue evidente el efecto de la asociación con gramíneas ($P > 0.05$) para ninguna variedad.

Para el trébol blanco (*Trifolium repens* var. Ladino) se corroboró la presencia de los isoflavonoides biochanina A, genisteína, formononetina, daidzeína y del cumestrol. El reconocimiento se hizo mediante cromatografía en columna y capa delgada sobre sílica gel, espectrofotometría infrarroja y ultravioleta y por cromatografía líquida de alta presión.

Literatura citada

- ADAMS, N. R. Cervical mucus in infertile ewes previously exposed to estrogenic subterranean clover. *Research in Veterinary Science* 21(1):59. 1976.
- BICKOFF, E. M., BOOTH, A. N., LYMAN, R. L., LIVINGSTON, A. L., THOMPSON, C. R. y KOHLER, G. O. Isolation of a new estrogen from Ladino clover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16:536. 1958.
- BICKOFF, E. M., LIVINGSTON, A. L., BOOTH, A. N., THOMPSON, C. R., HOLLOWELL, E. A. y BEINHART, E. G. Some variation in estrogenic activity in fresh and dried white clover and Ladino variety. *Journal of Animal Science* 19(4):1143. 1960.
- BRYANT, E. F. A note on the differentiation between flavonoid glycosides and their aglucones. *Journal American of Pharmacy Assistance Science* 39:480. 1950.
- CORKER, C. S., EXLEY, D. y NAFTOLIN, F. Assay of 17 β -oestradiol by competitive protein binding methods. *Acta Endocrinologica, suppl* 147, 1970. 305 p.
- FOLMAN, Y. y POPE, G. S. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other vaginotrophic compound of low potency. *The Journal of Endocrinology* 34(2):215. 1966.
- FRANCIS, C. M., MILLINGTON, A. J. y BAILEY, F. T. The distribution of oestrogenic isoflavones in the Genus *Trifolium*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 18(2):47. 1967.
- GIL, P., L. A., DIAZ, M. C., RAMIREZ, J. y MAYORGA, M. Actividad fitoestrogénica

- del trébol blanco *in vitro e in vivo*, sus fluctuaciones en relación a variables climáticas, estado metabólico y la fermentación ruminal. Turrialba 34(2):147-156 1984
9. MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press U S A 1982
10. NILSON, A. Demethylation of the plant oestrogen formononetin to Daidzein in rumen fluid Arkiv for Kemi 19(39):549 1962
11. ROSSITER, R. C y BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*T. subterraneum* L.) II. Effects of phosphate supply. Australian Journal of Agricultural Research 17(4):447 1966
12. ROSSITER, R. C. y BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*T. subterraneum* L.) V. Ontogenic changes. Australian Journal of Agricultural Research 18(4):561 1967
13. SHUTT, D. A. Interaction of genistein with oestradiol in the reproduction tract of the ovariectomized mouse. The Journal of Endocrinology 37(2):231 1967.
14. SHUTT, D. A., WESTON, R. H y HOGAN, J. P. Quantitative aspects of phyto-oestrogen metabolism in sheep feed on subterranean clover (*Trifolium subterraneum* cultivar Clare) or red clover (*Trifolium pratense*). Australian Journal of Agricultural Research 21(5):713 1970
15. TILLEY, J. M. A y TERRY, R. A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. Journal of British Grassland Society 18:104 1963