

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

OBTENCION Y VALORACION DE CAROTENOIDES FLORALES DE PLANTAS  
QUE CRECEN EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES . SEPARACION  
DE FRACCIONES DE DIFERENTE GRADO DE OXIDACION Y SU  
RELACION CON LA CAPACIDAD PIGMENTANTE

TESIS

CLAUDIA LUISA NATALUCCI

1981

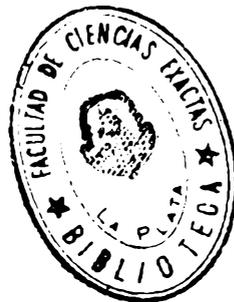
Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Biblioteca  
50 y 115 1º subsuelo  
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar  
Tel 0221 422-697779 int. 129



DEX-56173

Y15

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



OBTENCION Y VALORACION DE CAROTENOIDES FLORALES DE PLANTAS  
QUE CRECEN EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES . SEPARACION  
DE FRACCIONES DE DIFERENTE GRADO DE OXIDACION Y SU  
RELACION CON LA CAPACIDAD PIGMENTANTE

TESIS

72515  
20

CLAUDIA LUISA NATALUCCI

1981

**DONACION**.....  
A.....  
Fecha 25-6-99.....  
Inv. E.....Inv.....B. 56.143


El presente Trabajo de Tesis fue realizado en la Cátedra de Botánica, bajo la dirección del Profesor Dr. Néstor Oscar Caffini, con el apoyo de subsidios de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires. Durante su ejecución la autora se desempeñó como becaria de dicha institución.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor Dr. Néstor Oscar Caffini quien me ha brindado la guía y el apoyo científico necesarios para la realización de un trabajo de esta naturaleza y -lo que reconozco como más importante- la comprensión y el aliento que se requieren para proseguir el camino iniciado; a los Profesores Marta T. Nájera y Dr. Manuel G. Escalante por su calidad humana y sus siempre oportunos consejos; a mis compañeros de labor, a la vez mis amigos, por la ayuda desinteresada y el respaldo moral con que me han gratificado permanentemente; a todos aquéllos que, directa o indirectamente, han contribuido a este propósito.

# INDICE GENERAL

PANORAMA ACTUAL DE LOS CAROTENOIDES	
NATURALEZA DE LOS CAROTENOIDES	1
Estructura y nomenclatura	2
Propiedades generales	5
Ensayos físicos	9
Ensayos químicos	10
Estereoquímica	13
AISLAMIENTO DE CAROTENOIDES	14
Extracción	15
Saponificación	17
Separación	18
IDENTIFICACION Y VALORACION DE CAROTENOIDES	20
Identificación	20
Características de adsorción	20
Características de partición	24
Métodos espectroscópicos	25
Reacciones químicas	27
Valoración	28
DISTRIBUCION DE LOS CAROTENOIDES	30
Tejidos fotosintéticos	30
Plantas superiores	30
Briófitas y Pteridófitas	32
Algas	32
Bacterias	35
Tejidos no fotosintéticos de plantas superiores	35
Flores	35
Semillas	41
Frutos	41
Raíces	42
Hongos	43
FUNCIONES DE LOS CAROTENOIDES	44
Funciones fotosintéticas	44
Funciones no fotosintéticas	45
Fotoprotección	46
Fototropismo y fototaxis	47
Reproducción	48

BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES	49
Esquema general	49
Formación de fitoeno	52
Desaturación	53
Ciclación	54
Hidroxilación en C <sub>3</sub>	55
APLICACIONES DE LOS CAROTENOIDES	56
Colorantes directos de productos alimenticios	56
Colorantes indirectos de productos alimenticios	59
Acción provitamínica	61
MATERIAL	
DESCRIPCION BOTANICA, PROCEDENCIA Y EPOCA DE RECOLECCION	64
ACONDICIONAMIENTO Y CONSERVACION DEL MATERIAL	73
METODOS	
ELECCION DEL METODO DE EXTRACCION Y SAPONIFICACION	74
Método en frío	75
Método en caliente	75
FRACCIONAMIENTO CROMATOGRAFICO	76
VALORACION	78
RESULTADOS	79
DISCUSION Y CONCLUSIONES	82
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88

INDICE DE NOMBRES TRIVIALES DE CAROTENOIDES EN EL QUE SE INDICAN  
EL NUMERO ATRIBUIDO Y LA PAGINA DONDE FIGURA CADA FORMULA

ácido $\beta$ -apo-8'-carotenoico (LVIII)	57	dinoxantina (XLI)	34
ácido trispórico (LIII)	49	5,6- $\epsilon$ poxi- $\beta$ -caroteno (XXVIII)	22
actinioeritrina (II)	4	5,8- $\epsilon$ poxi- $\beta$ -caroteno (XXX)	23
aleuriaxantina (LII)	44	eschschoitzxantina (XXII)	12
alloxantina (XLIV)	35	escualeno (LIV)	52
anteraxantina (VIII)	7	espiriloxantina (XVII)	8
$\beta$ -apo-8'-carotenal (LVII)	57	fitoeno (XVI)	8, 53
astaceno (XIII)	8	fitoeno (isómero 15-cis) (XXIV)	13
astaxantina (VI)	6	fitoflueno (XXV)	21, 53
auroxantina (XXI)	11	fucoxantina (IX)	7
bis-dehidro- $\beta$ -caroteno (XX)	9	isocriptoxantina (LX)	62
bixina (IV)	4	licopeno (XIV)	8
cantaxantina (LIX)	57	licoperseno (LV)	52
capsantina (XLVI)	42	loroxantina (XXXVIII)	33
capsorubina (XLVII)	42	luteína (XXXIII)	30
$\alpha$ -caroteno (XXXV)	31	myxoxantofila (XLV)	35
$\beta$ -caroteno (XII)	7	neoxantina (XXXIV)	30
$\gamma$ -caroteno (I)	4	neurosporeno (XXVI)	21, 53
$\epsilon$ -caroteno (XXVII)	21	peridinina (X)	7
$\zeta$ -caroteno (XV)	8, 53	phillipsiaxantina (L)	44
$\alpha$ -criptoxantina (XL)	33	plectaniaxantina (LI)	44
$\beta$ -criptoxantina (XXXVI)	31	semi- $\alpha$ -carotenona (III)	4
crocetina (V)	5	sifonoxantina (XXXIX)	33
crocentindial (XI)	7	7,8,11,12-tetrahidro- $\psi$ , $\psi$ - caroteno (LVI)	53
3,4-dehidro- $\beta$ -caroteno (LXI)	62	toruleno (XLVIII)	43
diadinoxantina (XLII)	34	violaxantina (VII)	6
diatoxantina (XLIII)	34	violeritrina (XXIII)	12
5,6,5',6'-diepoxi- $\beta$ - caroteno (XXIX)	22	vitamina A <sub>1</sub> (XIX)	9
5,6,5',8'-diepoxi- $\beta$ - caroteno (XXXI)	23	vitamina A <sub>2</sub> (XVIII)	9
5,8,5',8'-diepoxi- $\beta$ - caroteno (XXXII)	23	zeaxantina (XXXVII)	31
3,4-dihidrolicopeno (IL)	43		

# PANORAMA ACTUAL DE LOS CAROTENOIDES

## NATURALEZA DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides constituyen un importante grupo de pigmentos naturales, de amplia distribución a través de todos los organismos vivos. Sin embargo los vegetales son los únicos capacitados para efectuar su síntesis *de novo*, ya que los aislados de tejidos animales provienen en última instancia de precursores de origen vegetal.

Aún cuando la presencia en la naturaleza de pigmentos rojos o amarillos -ahora conocidos como carotenoides- fue reportada hace más de un siglo (Moss y Weedon, 1976), para la mayoría de los propósitos prácticos la química de estas sustancias comenzó a avanzar recién a fines de la tercera década de este siglo, en base principalmente a los trabajos de la escuela de Karrer. Pero de todos modos no es sino hasta 1950 en que se sintetizan los primeros carotenoides:  $\beta$ -caroteno y licopeno (Inhoffen *et al.*, 1950 a y b; Karrer y Eugster, 1950; Milas *et al.*, 1950).

En los últimos quince años la progresiva aparición y adopción de sofisticadas técnicas espectroscópicas, especialmente la resonancia nuclear magnética (n.m.r.) y la espectrometría de

masa (m.s.) han revolucionado los estudios estructurales en este campo. Otras técnicas espectroscópicas, como la dispersión óptica rotatoria (o.r.d.) y el dicroísmo circular (c.d.), así como la cristalografía con rayos X han permitido la elucidación de la configuración absoluta de numerosos carotenoides naturales.

## ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA

La estructura básica de los carotenoides refleja claramente su biosíntesis y está constituida por ocho unidades isoprenoides, en tanto que una serie de dobles enlaces conjugados constituyen el cromóforo característico. La estructura acíclica básica  $C_{40}$  puede ser modificada por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación u oxidación.

Químicamente se acostumbra a separarlos en dos grandes grupos: carotenos, de estructura hidrocarbonada y oxicarotenoides o xantofilas, con oxígeno en su molécula.

Recientemente la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada<sup>\*</sup> ha establecido un nuevo sistema para la nomenclatura de carotenoides.

El nombre semisistemático formal para cada carotenoide está basado en el nombre principal *caroteno*; la designación específica correspondiente a los grupos terminales ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\phi$ ,  $\chi$  y  $\psi$ ) se presenta en la figura 1 junto a la numeración correspondiente a cada átomo de carbono. Los prefijos que se emplean para nombrarlos tienen que ser citados en orden alfabético, así el  $\gamma$ -caroteno (I) debe ser designado como  $\beta, \psi$ -caroteno.

\* Comm. Biochem. Nomenclature (1971) *Biochemistry*, 10: 4827-37

Comm. Biochem. Nomenclature (1975) *Biochemistry*, 14: 1803-4

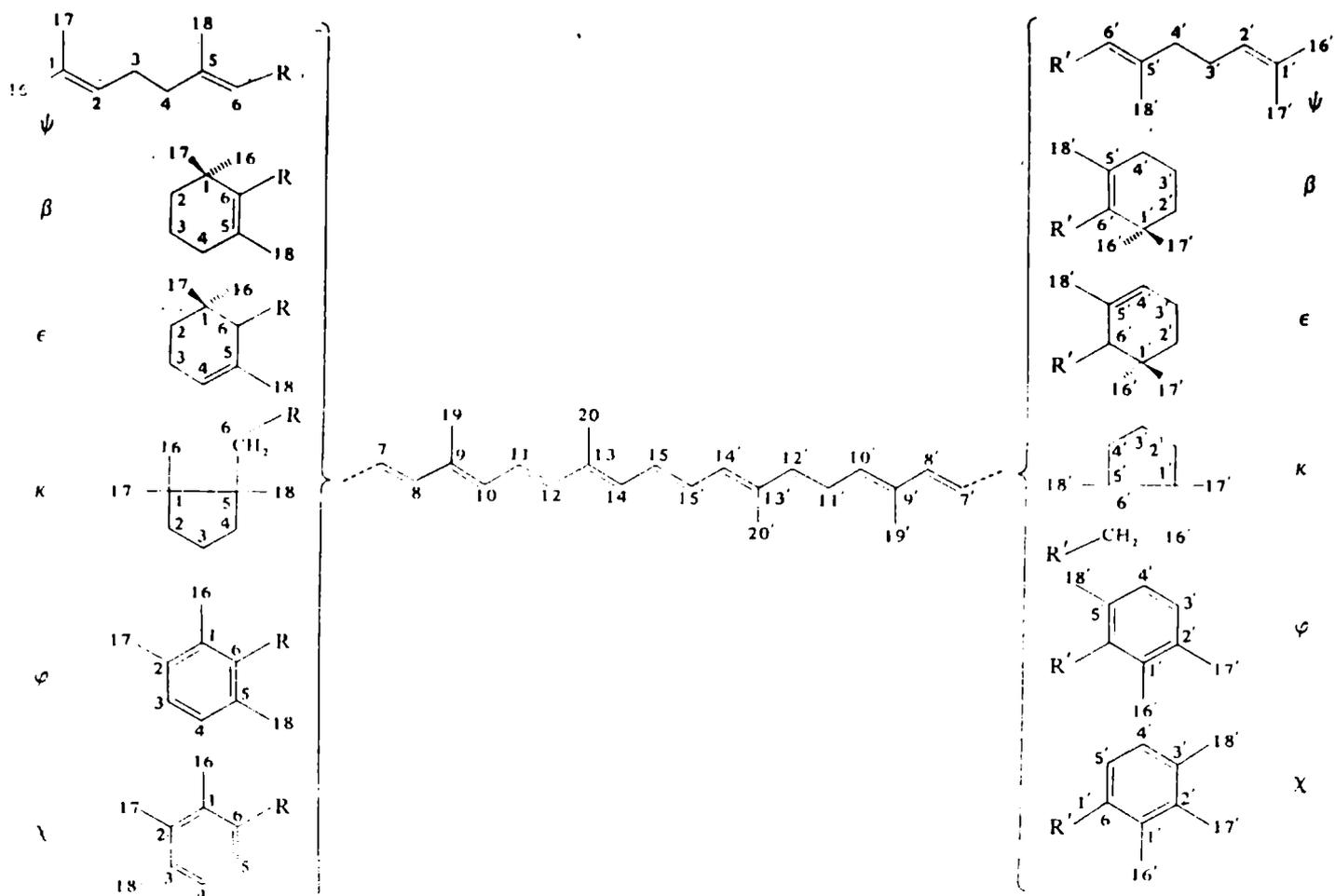
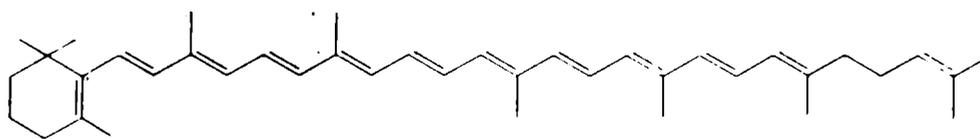


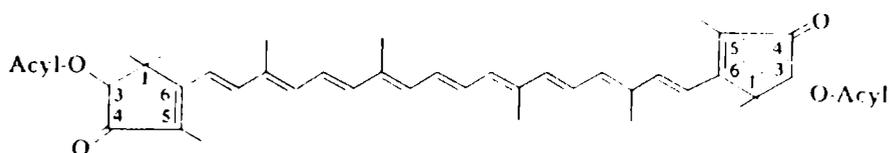
Figura 1. Denominación de los grupos terminales y numeración de los átomos de carbono en las moléculas de carotenoides

El esqueleto carbonado básico de un carotenoide puede ser modificado de diferentes maneras: los *nor*-carotenoides son aquellos en los cuales un cierto átomo de carbono es eliminado (como en la *actinioeritrina* (II), donde se han suprimido los carbonos 2 y 2'), los *seco*-carotenoides resultan de la ruptura de un enlace C-C que no sea la unión C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de un grupo cíclico y de la adición de un número apropiado de átomos de hidrógeno a cada grupo terminal así creado, como ocurre en la *semi-α-carotenona* (III), donde la ruptura se ha producido entre los carbonos 5 y 6, mientras que los *apo*-carotenoides son aquellos en los que la cadena ha sido reducida por la remoción de uno o -como en el caso de la *bixina* (IV)- de ambos extremos.



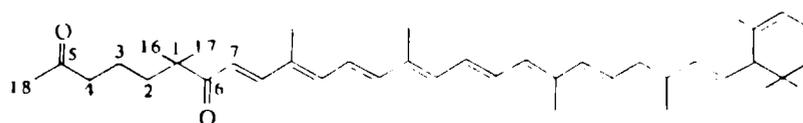
$\gamma$ -caroteno (I)

$\beta, \psi$ -caroteno



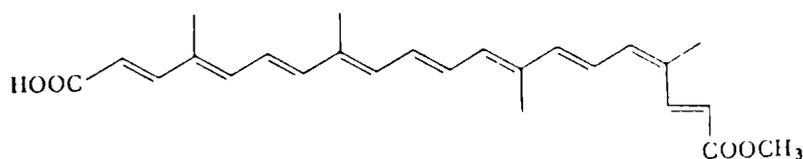
actinioeritrina (II)

3,3'-diacilato de 3,3'-dihidroxí-  
2,2'-dinor- $\beta, \beta$ -caroten-4,4'-diona



semi- $\alpha$ -carotenona (III)

5,6-seco- $\beta, \epsilon$ -caroten-5,6-diona



bixina (IV)

6'-metil éster del ácido 9'-cis-6,6'-diapocarotendioico

Los cambios en el nivel de hidrogenación se indican por medio de los prefijos *hidro* o *dehidro*, mientras que el prefijo *re-* deja constancia del desplazamiento en una posición de todas las uniones simples y dobles del sistema conjugado.

Por un mecanismo de sustitución con la función oxigenada adecuada, los carotenoides pueden convertirse en ácidos carboxílicos (*ácidos carotenoicos*), aldehidos (*carotenales*), cetonas (*carotenonas*), alcoholes (*carotenoles*) o sus ésteres, que pueden ser denominados mediante los prefijos y sufijos apropiados; el nombre semisistemático puede contener solamente un sufijo formal

(el que corresponde a la función principal) y las otras funciones ser designadas como prefijos.

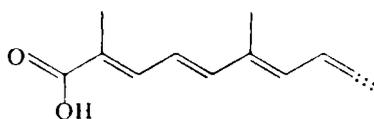
Los puentes de oxígeno, comúnmente entre los carbonos 5-6, 5-8 ó 1-2 (este último en el caso del grupo acíclico  $\psi$  terminal), se designan aplicando el prefijo *epoxi* al nombre de la cadena principal, consignando la hidrogenación teórica sufrida por el doble enlace.

Con respecto a la configuración geométrica, de no mediar aclaración se interpreta que la configuración del carotenoide es todo-*trans*; la disposición *cis* en un doble enlace determinado debe ser consignada específicamente.

La citada Comisión de Nomenclatura Bioquímica reconoce y permite retener un gran número de nombres triviales de uso corriente, en tanto estén acompañados de los nombres semisistemáticos aprobados.

## PROPIEDADES GENERALES

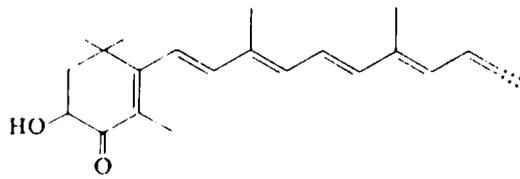
Con la excepción de algunos glucósidos como *crocina*, el digenciobiósido de la *crocetina* (V), y de algunos complejos proteicos como la *ovoverdina*, un derivado de *astaxantina* (VI), los carotenoides son pigmentos liposolubles que pueden aislarse por extracción con solventes orgánicos apropiados (benceno, éter de petróleo, éter etílico, disulfuro de carbono, etanol, metanol, cloroforno, etc.).



crocetina\* (V)

ácido 8,8'-apo-caroten-8,8'-dioico

\* En el caso de carotenoides simétricos, en algunas oportunidades sólo se representa la hemifórmula, hecho que se indica con un asterisco al lado del nombre trivial



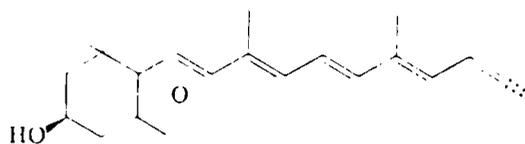
astaxantina\* (VI)

3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroten-4,4'-diona

Ocasionalmente la evaporación del extractivo de un producto crudo produce directamente por cristalización el carotenoide (como ocurre con el licopeno extraído de tomates), pero en la mayoría de los casos resulta necesaria una purificación, previa saponificación de los lípidos y de los ésteres de los carotenoides hidroxilados. Los métodos de purificación generalmente se inician por partición del extractivo en una mezcla de solventes inmiscibles.

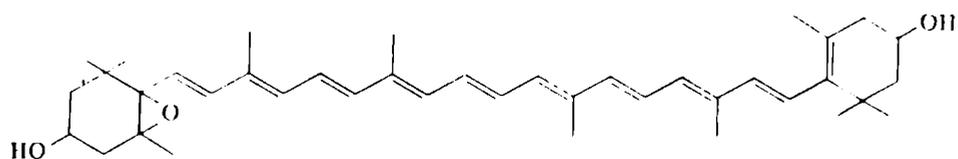
Aunque muchos carotenoides parecen tener puntos de fusión definidos, éstos pueden variar considerablemente con la velocidad de calentamiento y con el método con el que se realiza la determinación. En la práctica, los espectros visible, infrarrojo, de resonancia nuclear magnética y de masa proporcionan los mejores medios de caracterización, así como la co-cromatografía resulta una prueba de identidad más valiosa que el clásico punto de fusión mezcla.

Algunos carotenoides, en especial los epóxidos como *violaxantina* (VII) y *anteraxantina* (VIII), son muy sensibles a los ácidos, aún a las trazas de cloruro de hidrógeno presentes en el cloroformo "envejecido", mientras que *fucoxantina* (IX) y *peridina* (X) son lábiles en álcalis diluídos.

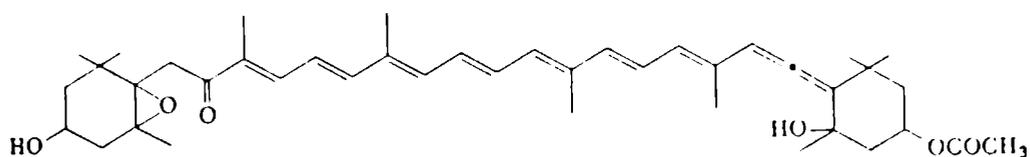


violaxantina\* (VII)

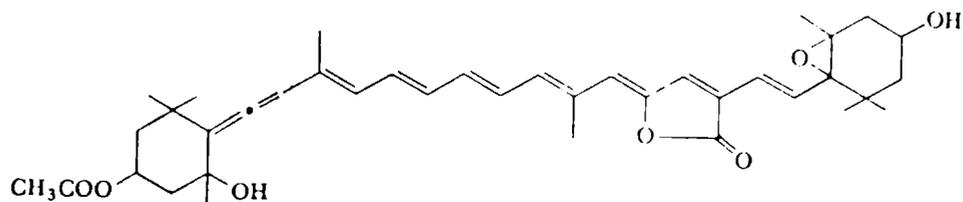
5,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro- $\beta,\beta$ -caroten-3,3'-diol



anteraxantina (VIII)

5,6-epoxi-5,6-dihidro- $\beta,\beta$ -caroten-3,3'-diol

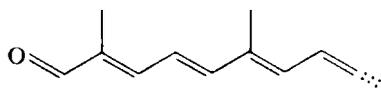
fucoxantina (IX)

3'-acetato de 5,6-epoxi-3,3',5'-trihidroxi-6',7'-didehidro-5,6,7,8,5',6'-hexahidro- $\beta,\beta$ -caroten-8-ona

peridinina (X)

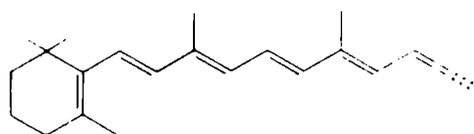
3-acetato de 5',6'-epoxi-3,5,3'-trihidroxi-6,7-didehidro-5,6,5',6'-tetrahidro-10,11,20-trinor- $\beta,\beta$ -caroten-19',11'-ólido

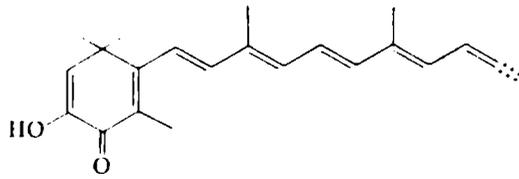
Unos pocos carotenoides como la bixina (IV) y el *crocetinindial* (XI) son sorprendentemente estables al aire, en tanto que algunos otros como el  $\beta$ -caroteno (XII) y el *astaceno* (XIII) también lo son en la medida en que sean compuestos puros y bien cristalizados.



crocetinindial\* (XI)

8,8'-diapocaroten-8,8'-dial

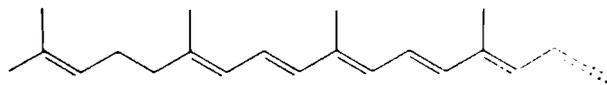
 $\beta$ -caroteno\* (XII) $\beta,\beta$ -caroteno



astaceno\* (XIII)

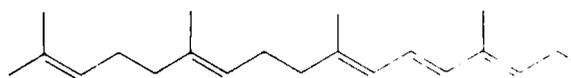
3,3'-dihidroxi-2,3,2',3'-tetrahidro- $\beta,\beta$ -caroten-4,4'-diona

El *licopeno* (XIV) es decididamente más inestable que el  $\beta$ -caroteno (XII). El  $\zeta$ -caroteno (XV) es notoriamente inestable al aire, pero sin embargo el *fitoeno* (XVI) es comparativamente estable. Compuestos como la *espiriloxantina* (XVII), que carece de un doble enlace 1-2 pero posee una doble ligadura adicional en posición 3-4 son mucho menos estables que el licopeno.



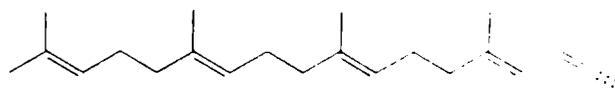
licopeno\* (XIV)

$\psi,\psi$ -caroteno



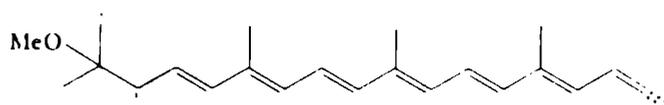
$\zeta$ -caroteno\* (XV)

7,8,7',8'-tetrahidro- $\psi,\psi$ -caroteno



fitoeno\* (XVI)

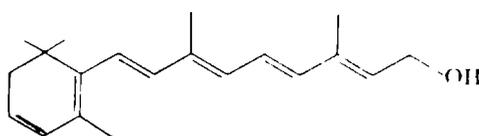
7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- $\psi,\psi$ -caroteno



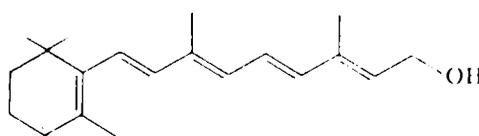
espiriloxantina\* (XVII)

1,2,1',2'-tetrahidro-3,4,3',4'-tetrahidro-1,1'-dimetoxi- $\psi,\psi$ -caroteno

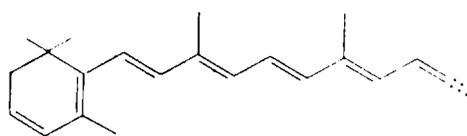
Los compuestos que contienen una doble ligadura conjugada adicional en el grupo cíclico terminal exhiben una estabilidad disminuída: así la *vitamina A<sub>2</sub>* (XVIII) es mucho menos estable que la *vitamina A<sub>1</sub>* (XIX) y el *bis-dehidro-β-caroteno* (XX) que es el β-caroteno (XII). La astaxantina (VI) que es una bis-acilofina, en solución alcalina es rápidamente oxidada por el aire al bis-diciclofenol astaceno (XIII).



vitamina A<sub>2</sub> (XVIII)  
3,4-dehidro-15-apo-β-caroten-15-ol



vitamina A<sub>1</sub> (XIX)  
15-apo-β-caroten-15-ol



bis-dehidro-β-caroteno\* (XX)  
3,4,3',4'-tetradehidro-β,β-caroteno

A raíz de la inestabilidad de muchos carotenoides y de su tendencia a la estereomutación, todas las operaciones a las que sean sometidos estos compuestos deberían, en lo posible, ser llevadas a cabo en una atmósfera inerte (v.g. nitrógeno), con solventes recientemente purificados y evitando tanto calentamientos innecesarios como su exposición a la luz directa.

#### ENSAYOS FISICOS

Resultan de la aplicación de una serie de técnicas no

destructivas , junto con la espectrometría de masa. La mayor parte de la información estructural proviene de dos o más de ellas. Así, del espectro de masa puede obtenerse la fórmula molecular y a partir del modelo de fragmentación probablemente algunas características estructurales. El número de dobles enlaces equivalentes puede ser entonces deducido de la fórmula molecular. Las propiedades de absorción de la luz visible o ultravioleta de un polieno, manifestadas a través de su espectro electrónico, constituyen la mejor indicación del tipo de sistemas cromóforos presentes. La naturaleza de los sustituyentes oxigenados puede deducirse del espectro infrarrojo, mientras que el espectro de resonancia protónica magnética caracterizará por lo menos los sustituyentes metilados. Después que haya sido deducida la estructura principal se pueden utilizar técnicas quirópticas y/o el análisis con rayos X para determinar la configuración absoluta de las unidades asimétricas.

#### ENSAYOS QUÍMICOS

Complementan estudios estructurales y se llevan a cabo "en escala espectroscópica", es decir que no requieren más material que el necesario para realizar el espectro de absorción.

Aquellos ensayos químicos que anteriormente jugaban un importante papel en la elucidación estructural del carotenoide pero que ahora han sido reemplazados con ventaja por los métodos físicos antes mencionados, serán simplemente citados. A esta categoría pertenecen procedimientos tales como la microhidrogenación cuantitativa para determinar el número de dobles enlaces, el método de Kuhn-Roth para estimar los grupos C-metilos, la ozonólisis para detectar grupos isopropilidenos y estructuras 1,5-diénicas, la detección de grupos  $\alpha$  y  $\beta$  terminales por oxidación a ácidos isogerónico y gerónico, respectivamente, y la localización de un sustituyente hidroxilado en uno de estos grupos terminales por análi-

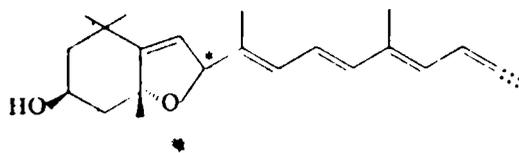
sis de los ácidos dicarboxílicos formados luego de una oxidación drástica (Liaaen-Jensen, 1971).

Uno de los ensayos químicos más utilizado actualmente es la reducción con hidruros. La presencia de un grupo carbonilo en un carotenoide puede ser detectada tratando una solución del mismo en éter o tetrahidrofurano con hidruro de aluminio y litio, que produce un desplazamiento del espectro de absorción (20-30 nm) hacia longitudes de onda más cortas, así como el incremento de la estructura fina.

El reemplazo del hidruro de aluminio y litio por el borohidruro de sodio en metanol o etanol tiene la ventaja de poder distinguir a los aldehidos y cetonas de los ácidos carotenoides, ya que sólo los primeros son reducidos.

El hidruro de aluminio y litio reacciona de diferentes modos frente a carotenoides epoxídicos: el grupo epóxido puede quedar inalterado, formar un derivado hidroxilado o desaparecer dando lugar a un nuevo doble enlace.

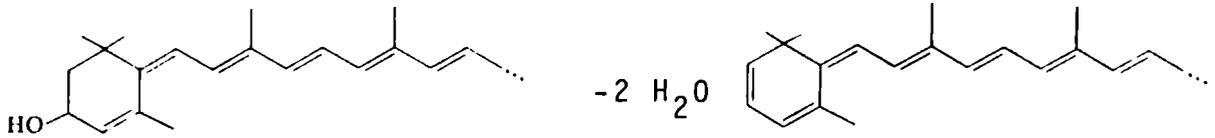
Las reacciones promovidas por ácidos son también de frecuente utilización. Los 5,6-epóxidos son rápidamente convertidos en un par de 5,8-epóxidos (los así llamados "óxidos furanoides") que difieren en la configuración del C<sub>8</sub>. Un ejemplo de ello es la violaxantina (VII), que luego del tratamiento con ácidos origina una mezcla de *auroxantinas* (XXI). Habitualmente se observan coloraciones azules luego del tratamiento con ácido, tanto de los 5,6- como de los 5,8-epóxidos.



auroxantina\* (XXI)

5,8,5',8'-diepoxi-5,8,5',8'-tetrahidro  
-β,β-caroten-3,3'-diol

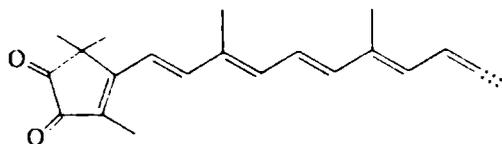
Muchos alcoholes aliflicos en las series poliénicas se deshidratan rápidamente por tratamiento con cloruro de hidrógeno clorofórmico, como la *eschsoltzxantina* (XXII), que origina el bis-anhidro derivado respectivo.



*eschsoltzxantina*\* (XXII)  
ε,ε-caroten-3,3'-diol

bis-anhidro derivado\*  
2,3,2',3'-tetradehidro-  
ε,ε-caroteno

En presencia de una base muchos carotenoides son oxidados rápidamente si se exponen al aire, como ocurre con la oxidación de *astaxantina* (VI) a *astaceno* (XIII). Un efecto similar se logra durante la hidrólisis alcalina de algunos ésteres como la *actinioeritrina* (II), que produce la bis-α-dicetona *violeritrina* (XXIII). Tanto los ésteres carotenoides como los carotenólicos se pueden hidrolizar por tratamiento con hidróxido de potasio metanólico (1-5%) a temperatura ambiente. La conversión de un ácido carotenico al correspondiente carboxilato, producida por la adición de un álcali a una solución alcohólica, origina un desplazamiento típico del espectro que es reversible ante el agregado de un exceso de ácido mineral.



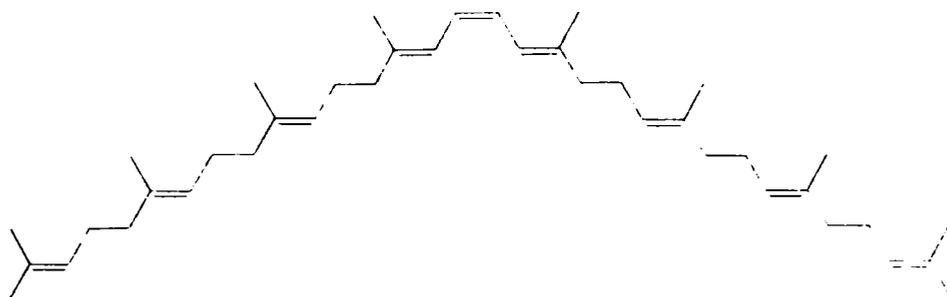
*violeritrina*\* (XXIII)  
2,2'-dinor-β,β-caroten-3,4,3',4'-tetrona

Se han descripto algunas otras reacciones para poner en evidencia funciones oxigenadas, entre las que puede mencionarse la acetilación de grupos hidroxilo primarios y secundarios (los terciarios no reaccionan) con anhídrido acético en piridina a tempe-

ratura ambiente. La subsiguiente determinación de la composición del producto por espectrometría de masa revela el número de grupos hidroxilo primarios y secundarios existentes en la sustancia de partida. Otras reacciones frecuentemente utilizadas incluyen la metilación con yoduro de metilo de grupos hidroxilos para obtener los éteres correspondientes y la de los ácidos carotenoides con diazometano, que proporciona los respectivos ésteres metílicos. Los hidroxilos alílicos pueden ser convenientemente oxidados por tratamiento con bióxido de níquel o de manganeso.

### ESTEREOQUIMICA

Está demostrado que bajo condiciones apropiadas todos los carotenoides pueden ser convertidos en mezclas de estereoisómeros. Aún cuando en la naturaleza predominan las formas *trans*, ya se ha aislado un buen número de isómeros *cis* y *poli-cis* (el *fitoeno* (XXIV) es un carotenoide natural *15-cis*). Esto, sumado a la comprobación de que la isomerización *cis-trans* que experimenta el retinal (la forma aldehídica de la vitamina A<sub>1</sub>) juega un papel decisivo en la química del proceso visual, enfatiza la necesidad de una cuidadosa consideración de los aspectos estereoquímicos cuando se analizan tanto la biosíntesis como la función de los carotenoides.



15-*cis*-fitoeno (XXIV)

15-*cis*-7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- $\psi,\psi$ -caroteno

Cuando están disueltos, los carotenoides pueden isomerizarse ("estereomutación") bajo el imperio de variadas circunstancias. En solución la estereomutación comienza casi inmediatamente, siendo usualmente lenta a temperatura ambiente, pero se ve decididamente favorecida por el aumento de la temperatura. Lo propio ocurre cuando se irradia una solución del carotenoide, en especial si se utiliza luz cuya longitud de onda coincida con la banda de máxima absorción (el proceso es acelerado por la presencia de cantidades catalíticas de iodo).

Con respecto a las propiedades generales, los isómeros *todo-trans* suelen exhibir menores valores de solubilidad y mayores puntos de fusión. Las formas *cis* de los carotenoides ópticamente activos por lo común difieren en la magnitud de la desviación polarimétrica y a menudo en el signo de la misma. Por otra parte la configuración geométrica ejerce una profunda influencia sobre la afinidad de adsorción, hecho que permite resolver mezclas complejas de isómeros por medio de técnicas cromatográficas apropiadas. Finalmente la formación de *cis*-isómeros se traduce en modificaciones espectroscópicas más o menos notables, siendo quizás la más destacable la que registra el espectro electrónico, donde los isómeros *meno-cis* provocan la aparición de un nuevo pico de absorción en el ultravioleta cercano ("pico *cis*") que muestra una notable constancia de desplazamiento, ya que está ubicado a  $-142 \pm 2$  nm del pico de máxima absorción del isómero *todo-trans* respectivo.

## AISLAMIENTO DE CAROTENOIDES

La inestabilidad de los carotenoides frente a factores externos tales como la luz, el calor, el oxígeno, los ácidos y en algún caso (v.g. astaxantina) los álcalis, obligan a adoptar una

serie de precauciones especiales cuando se trabaja con estos pigmentos.

La exposición a la luz (sobre todo la luz solar directa y la luz ultravioleta) debe ser evitada en la medida de lo posible, ya que induce la fotoisomerización *cis-trans* y favorece la destrucción de los carotenoides.

Del mismo modo debe prescindirse de todo calentamiento innecesario, debido a la termolabilidad que exhiben muchas de estas sustancias, especialmente las xantofilas; en favor de ello conviene elegir solventes de bajo punto de ebullición, así como evaporarlos a presión reducida, preferentemente en evaporadores rotatorios.

La oxidación de los carotenoides por el oxígeno atmosférico o por peróxidos plantea en algunos casos la necesidad de asegurar un ambiente inerte ( $N_2$ ) o el uso de antioxidantes tales como la etoxiquina, el pirogalol o el quinol; la principal fuente de peróxidos es el éter dietílico, por lo que este solvente no debe usarse si no es recientemente preparado.

Salvo en algunos casos excepcionales donde su uso resulta inevitable (aislamiento de ácidos carotenoides después de la saponificación), es necesario impedir el contacto de los pigmentos con reactivos ácidos o con solventes que puedan contenerlos, como el cloroformo, ya que en ese medio se producen descomposiciones oxidativas, isomerizaciones *cis-trans* y la transformación de los 5,6-epóxidos a sus isómeros furanoides 5,8.

Todo solvente a utilizar en el análisis de carotenoides debe ser rigurosamente purificado por medio de técnicas apropiadas.

## EXTRACCION

Lo más conveniente es procesar el material vegetal objeto del análisis inmediatamente después de su recolección; de no ser

ello posible, las muestras deben almacenarse a  $-10^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser usadas o, mejor aún, liofilizarse. La liofilización es el procedimiento más recomendable, ya que asegura la inalterabilidad de los pigmentos; el secado al aire o la deshidratación con metanol acuoso suele provocar descomposición y pérdida parcial de los carotenoides.

Dado que los tejidos vegetales frescos contienen un alto porcentaje de agua y en razón del carácter liposoluble de los carotenoides, el solvente orgánico usado en la extracción debe ser miscible con el agua (acetona, metanol, etanol); después de uno o dos tratamientos previos, el material ya está lo suficientemente deshidratado como para poder ser extraído con un solvente orgánico inmisible.

En caso de utilizar acetona, este solvente debe ser totalmente eliminado antes de proceder a la saponificación, con el objeto de evitar la formación de artefactos de técnica. Tal es el caso de las  $\text{C}_{43}$ -metilcetonas provenientes de la condensación aldólica de carotenales con acetona (Schmidt *et al.*, 1971).

En la elección del método de extracción debe tenerse en cuenta esencialmente el contenido de agua del material. Si se trata de material fresco, por lo común se extrae el mismo con acetona, que cumple la doble función de extraer los carotenoides y al mismo tiempo deshidratar la muestra.

El extractivo acetónico, diluido con agua y solución de cloruro de sodio, es colocado entonces en una ampolla de decantación conteniendo un solvente menos polar (hexano, éter), con lo que los pigmentos pasan a esta última fase.

En caso de muestras deshidratadas o con bajo contenido de agua se utilizan mezclas extractantes de menor polaridad.

## SAPONIFICACION

La saponificación resulta generalmente necesaria en el análisis de carotenoides para remover el material lipídico indeseable que podría interferir con la cromatografía de adsorción; el proceso es especialmente útil cuando se trabaja con tejidos fotosintéticos, ya que asegura la eliminación de las clorofilas. Es obvio que si se desea analizar ésteres de carotenoides esta etapa debe evitarse, así como en el análisis de extractivos que contengan carotenoides sensibles a la acción de los álcalis, como la astaxantina (VI), la fucoxantina (IX) y la peridinina (X).

Normalmente la técnica consiste en disolver el extractivo etéreo concentrado en etanol o metanol e incorporarle luego solución acuosa de hidróxido de potasio, calentando la mezcla alcalina en baño maría durante 5 a 10 minutos en la oscuridad bajo ambiente de nitrógeno, o manteniéndola a temperatura ambiente o a 5°C durante 12 a 16 horas, en las mismas condiciones.

La elección de uno u otro método de saponificación ha sido objeto de no pocas controversias: las aparentes ventajas del método "en frío" (Arpin, 1968; Liaaen-Jensen, 1971) fueron desvirtuadas por algunos investigadores (Quackenbush y Miller, 1972), quienes sostienen que el procedimiento no asegura la hidrólisis total de los carotenoides esterificados. Ultimamente se ha propuesto un método de extracción y saponificación simultáneas (Quackenbush, 1973) que consiste en calentar la mezcla alcalina durante 20 minutos a 56°C.

Independientemente de la técnica de saponificación adoptada, la solución alcalina fría se extrae con éter u otro solvente poco polar. Los carotenoides ácidos -en caso de estar presentes- permanecen en forma de sales en la fase acuosa, de donde pueden ser separados por el agregado de ácido acético hasta pH 4 y extracción con éter o hexano de la manera usual (Aasen y Liaaen-Jensen, 1965).

Además de los carotenoides, la fracción insaponificable contiene otros componentes, tales como esteroides, que pueden ser separados por precipitación de una solución de éter de petróleo por el simple hecho de dejar la solución toda la noche a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

## SEPARACION

La partición líquido-líquido entre éter de petróleo y metanol acuoso ha sido utilizada tanto en la purificación de los carotenoides como en la caracterización de los mismos, pero el advenimiento de la cromatografía redujo considerablemente su uso; sin embargo puede resultar ventajosa como método de fraccionamiento previo a la separación cromatográfica (Mercer *et al.*, 1963).

La técnica más importante en el aislamiento de carotenoides individuales es la cromatografía en columna y es aún el único método satisfactorio para la separación, aislamiento e identificación de grandes cantidades de pigmentos, si bien en cuanto a la identificación de estas sustancias ha sido superada por la cromatografía en capa fina y la cromatografía en papel. Esta tendencia está siendo en parte revertida por el desarrollo de la cromatografía de alta presión (h.p.l.c.).

Básicamente existen dos variantes para la separación de carotenoides por cromatografía en columna: la cromatografía de zona y la cromatografía de elución. En el primer caso, luego de desarrollado el cromatograma, el cilindro de adsorbente es expulsado fuera de la columna, seccionado y los segmentos que contienen cada una de las zonas coloreadas eluidos con un solvente apropiado. En la cromatografía de elución se permite que los carotenoides abandonen la columna, recogién dose separadamente las distintas fracciones donde se encuentran los pigmentos; en este caso puede irse variando periódicamente la composición del solvente de elución, o aplicar un gradiente continuo.

La eficiencia de una columna cromatográfica depende de la relación largo/ancho de la misma; valores entre 8:1 y 20:1 son los más satisfactorios. El adsorbente debería ocupar una tercera parte del volumen total de la columna, mientras que la relación entre la cantidad en peso de la muestra a cromatografiar y la cantidad de adsorbente es aconsejable que sea cercana a 1:100 (Davies, 1976).

Para la separación de carotenoides en pequeña escala se utiliza frecuentemente la cromatografía en capa fina y la cromatografía de adsorción en papel. La recuperación de los carotenoides puede ser mayor en el caso de la cromatografía en papel y los valores de  $R_f$  obtenidos suelen ser más reproducibles, pero la cromatografía en capa fina tiene la ventaja de permitir considerable variación de los adsorbentes.

En la elección del adsorbente debe tenerse en cuenta la fuerza de adsorción del mismo. Los carotenos son bien separados en columnas de hidróxido de calcio o alúmina activada, mientras que las mezclas de monohidroxicarotenoides pueden ser bien resueltas con alúmina de menor grado de activación y los dihidroxicarotenoides con carbonato de calcio y óxido de magnesio. Las xantofilas más polares requieren adsorbentes de menor fuerza de adsorción tales como celulosa o sacarosa.

Sin embargo la fuerza de adsorción no es la única condición exigible a la fase estacionaria, sino que también es importante la selectividad de la misma en relación a las características estructurales de los carotenoides. Así, mientras tanto alúmina como sílica-gel son buenos adsorbentes en el caso de separaciones preliminares de mezclas de compuestos de diferente polaridad, las separaciones que se logran con el uso de óxido de magnesio, hidróxido de calcio o carbonato de cinc dependen principalmente del número y posición de dobles enlaces (Britton y Goodwin, 1971).

En lo que se refiere a los solventes, el criterio prima-

rio para su elección es su poder de elución. Dentro de los más utilizados, el hexano es el que presenta el menor poder de elución, seguido en orden creciente por tetracloruro de carbono, éter, acetona, diclorometano, alcoholes de bajo peso molecular y piridina.

## IDENTIFICACION Y VALORACION DE CAROTENOIDES

### IDENTIFICACION

Una de las características más salientes de un carotenoide es el espectro de absorción electrónico y su determinación en distintos solventes constituye uno de los procedimientos usuales en la identificación del mismo. Del mismo modo las características estructurales de un carotenoide se reflejan en su afinidad de adsorción relativa, que varía tanto con la naturaleza del esqueleto carbonado como con el número y tipo de sustituyentes oxigenados y que puede ser puesta en evidencia por cromatografía en columna, papel o capa fina.

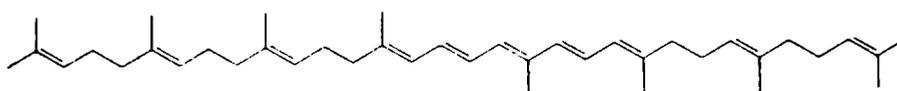
Hasta hace unos años, la co-cromatografía en dos o más sistemas de adsorción, junto a la determinación del espectro de absorción en una serie de solventes eran considerados un criterio adecuado para la identificación de carotenoides. El incremento en el número de carotenoides conocidos y la accesibilidad de la espectrometría de masa han hecho que se considere a esta técnica un elemento indispensable en la identificación de carotenoides.

#### Características de adsorción

La fuerza con que un carotenoide es adsorbido sobre un soporte dado está en relación con su estructura química. En

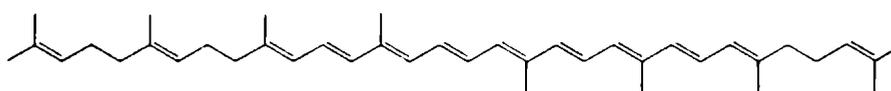
los carotenos la magnitud de la adsorción está determinada por el número de dobles ligaduras, la naturaleza de los grupos terminales y el tamaño de la molécula, mientras que en las xantofilas su efecto se ve disminuído frente a la influencia que ejercen los sustituyentes oxigenados.

La influencia del número de dobles ligaduras puede ejemplificarse a través del comportamiento de la serie de precursores del licopeno, donde el grado de adsorción aumenta con la deshidrogenación de la molécula: fitoeno (XVI), fitoflueno (XXV),  $\zeta$ -caroteno (XV), *neurosporeno* (XXVI), licopeno (XIV).



fitoflueno (XXV)

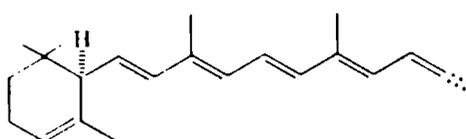
7,8,11,12,7',8'-hexahidro- $\psi,\psi$ -caroteno



neurosporeno (XXVI)

7,8-dihidro- $\psi,\psi$ -caroteno

Con respecto a la influencia de los grupos terminales, la aparición de una estructura cíclica produce una disminución en la afinidad de adsorción. Se ha podido determinar que la adsorción decrece en el siguiente orden:  $\psi > \chi > \phi > \beta > \epsilon$ . Así el licopeno (XIV) y el  $\epsilon$ -caroteno (XXVII) son los que tienen el mayor y menor valor de adsorción, respectivamente.

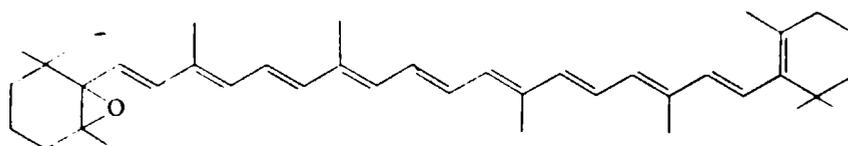


$\epsilon$ -caroteno\* (XXVII)

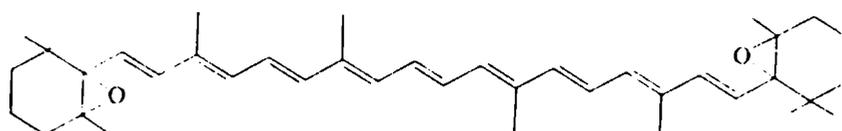
$\epsilon,\epsilon$ -caroteno

En relación al tamaño de la molécula, en general puede establecerse que un incremento en el número de átomos de carbono determina un aumento en la fuerza de adsorción.

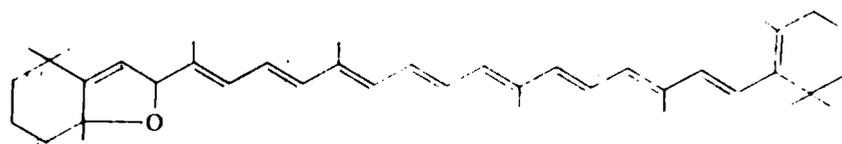
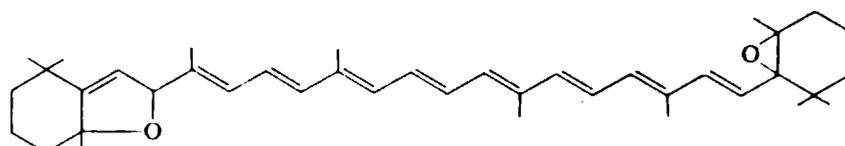
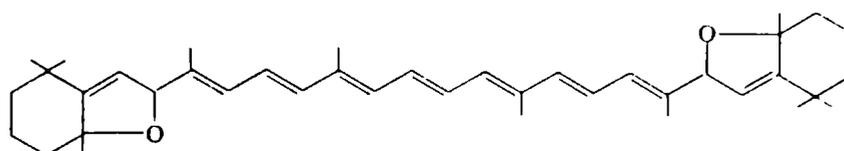
La presencia de una función oxigenada incrementa la afinidad de adsorción de un carotenoide, dependiendo no sólo del tipo y número de funciones sino también de la posición de los sustituyentes: el 3,3'-dihidroxi- $\beta$ -caroteno es más fuertemente adsorbido sobre la alúmina que su isómero 4,4'-dihidroxi- $\beta$ -caroteno. El grupo hidroxilo es el que presenta mayor influencia, pero la misma se reduce notoriamente por metilación, esterificación o sililación. El efecto del grupo carbonilo es también menor que el de un hidroxilo sin sustituir. Los 5,8-epóxidos tienen una afinidad mucho mayor por los adsorbentes que los epóxidos 5,6-correspondientes, lo que determina que la secuencia de las adsorptividades del  $\beta$ -caroteno y sus epóxidos sea:  $\beta$ -caroteno (XII) < 5,6-epoxi- $\beta$ -caroteno (XXVIII) < 5,6,5',6'-diepoxi- $\beta$ -caroteno (XXIX) < 5,8-epoxi- $\beta$ -caroteno (XXX) < 5,6,5',8'-diepoxi- $\beta$ -caroteno (XXXI) < 5,8,5',8'-diepoxi- $\beta$ -caroteno (XXXII). El efecto de los sustituyentes oxigenados no es aditivo; una segunda sustitución en un mismo grupo terminal tiene menor efecto que la primera (El-Tiney y Chichester, 1970).



5,6-epoxi- $\beta$ -caroteno (XXVIII)  
5,6-epoxi-5,6-dihidro- $\beta$ , $\beta$ -caroteno



5,6,5',6'-diepoxi- $\beta$ -caroteno (XXIX)  
5,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro- $\beta$ , $\beta$ -caroteno

5,8-epoxi- $\beta$ -caroteno (XXX)5,8-epoxi-5,8-dihidro- $\beta$ , $\beta$ -caroteno5,6,5',8'-diepoxi- $\beta$ -caroteno (XXXI)5,6,5',8'-diepoxi-5,6,5',8'-tetrahidro- $\beta$ , $\beta$ -caroteno5,8,5',8'- diepoxi- $\beta$ -caroteno (XXXII)5,8,5',8'-diepoxi-5,8,5',8'-tetrahidro- $\beta$ , $\beta$ -caroteno

Aprovechando las diferentes características de adsorción de los carotenoides, éstos pueden ser identificados mediante cromatografía en papel y en capa fina. En este último caso debe advertirse que si bien los valores de  $R_f$  dependen de la naturaleza del carotenoide, son marcadamente influenciados por otros factores (concentración y posible contaminación de los pigmentos, grado de saturación de las cubas cromatográficas, espesor de las placas y contenido de humedad de las mismas), por lo que el dato de  $R_f$  *per se* es de poco valor en la caracterización de un carotenoide individual. En cromatografía en capa fina el único criterio de identificación aceptable es la co-cromatografía con patrones, en un número de diferentes combinaciones adsorbente-solvente. La situación es algo mejor en el caso de cromatografía sobre papeles impregnados con distintos adsorbentes, donde se ha conseguido una alta reproducibi-

lidad de los resultados (Jensen y Liaaen-Jensen, 1959). De todos modos, también aquí la co-cromatografía es la única prueba satisfactoria para la identificación de un carotenoide.

La cromatografía en columna también puede resultar un método idóneo para identificar carotenoides en base a sus características de adsorción, desde que Davies (1967) propuso el uso de los "volúmenes relativos de retención" ( $V_{\text{carotenoide}} - V_{\beta\text{-caroteno}} / V_{\text{neoxantina o luteína}} - V_{\beta\text{-caroteno}}$ ) como parámetro equivalente al  $R_f$  y por lo tanto característico de la sustancia e independiente de la presencia de otros compuestos.

Finalmente debe consignarse la utilidad potencial de la cromatografía líquida de alta presión (h.p.l.c.), como quedó demostrado en la separación de carotenoides en *Citrus* (Stewart y Wheaton, 1971).

#### Características de partición

Las referencias sobre la partición cromatográfica en columna de los carotenoides son escasas; por otra parte la cromatografía de partición sobre papel ha demostrado tener un poder de resolución mucho menor que la cromatografía de partición sobre capa fina, por lo que en la práctica es a esta técnica a la que se recurre preferentemente cuando se desea identificar a los carotenoides por sus características de partición.

Los carotenoides pueden ser satisfactoriamente separados en capas de kieselgur impregnadas en parafina o triglicéridos (Egger, 1962; Randerath, 1963), donde estas sustancias actúan como fase estacionaria ("cromatografía de fase revertida"). Las capas impregnadas con parafina son adecuadas para la separación de carotenos y oxicarotenoides no hidroxílicos, mientras que las mezclas de carotenoides oxigenados son mejor resueltas cuando se utilizan triglicéridos. La sílica-gel también puede ser usada como soporte de la parafina líquida (Winterstein *et al.*, 1960). En trabajos más recientes se han uti-

lizado capas de celulosa (MN 300) impregnadas de igual forma (Klaining y Nitsche, 1968; Egger, 1964).

Los coeficientes de partición entre dos solventes inmiscibles (n-hexano y metanol acuoso, éter de petróleo y metanol acuoso) también han sido empleados en la identificación de carotenoides (Foppen, 1971). La mayor desventaja de esta técnica reside en la necesidad de que el pigmento sea puro; esta limitación no afecta a la distribución en contracorriente, donde la partición es cuantitativamente expresada a través del parámetro  $N_{100}$ , que es el número del tubo que contiene la mayor concentración de un carotenoide dado luego de cien transferencias (Curl, 1953).

La termolabilidad de los carotenoides excluye la posibilidad del examen directo por cromatografía gaseosa, pero sus productos de perhidrogenación han podido ser separados por este método, incluyendo algunos derivados acetilados y silylados (Taylor y Davies, 1975).

#### Métodos espectroscópicos

Los espectros de absorción electrónica de los carotenos se determinan habitualmente en éter de petróleo o hexano, mientras que los de las xantofilas pueden ser determinados en etanol; para ambos tipos de carotenoides también pueden usarse acetona, cloroformo, benceno, disulfuro de carbono, y -menos comunmente- éter, metanol, piridina y tolueno. Cuando interesa la configuración geométrica de los carotenoides, no sólo el espectro visible debe ser tenido en cuenta, sino también el U.V. La posición de los máximos de absorción de estas sustancias, generalmente tres, dependen de una serie de características propias del pigmento, así como del solvente empleado.

El aumento en el número de dobles enlaces conjugados en la molécula provoca el desplazamiento de los picos de absor-

ción máxima hacia valores de longitud de onda mayores (efecto batocrómico). El coeficiente de extinción específico también aumenta pero hasta un máximo de 11 dobles ligaduras conjugadas, disminuyendo por encima de este número. Por el contrario, cuando un grupo  $\psi$ -terminal de un carotenoide acíclico se cierra para formar un anillo  $\beta$  hay un desplazamiento de los máximos de absorción hacia valores menores de longitud de onda (efecto hipsocrómico).

El reemplazo en una cadena poliénica de una unión olefínica por una acetilénica provoca una insignificante disminución de las posiciones de los máximos de absorción; la introducción de un grupo alénico es equivalente a la presencia de un nuevo doble enlace (Weedon, 1969).

El efecto de la introducción de grupos carbonilos en conjugación con la cadena poliénica provoca una desviación del espectro hacia mayores longitudes de onda, junto con una pérdida de la estructura fina, a tal punto que el típico espectro de tres bandas es reemplazado por una curva redondeada casi simétrica.

La incorporación de uno o más grupos hidroxilo a la molécula prácticamente no origina cambios espectrales.

La formación de epóxidos en anillos desplaza el espectro hacia valores menores de longitud de onda: los 5,6- y 5,6,5', 6'-epóxidos producen una disminución de 3 y 7 nm, respectivamente, mientras que los 5,8- y 5,8,5',8'-epóxidos los modifican en 20-25 y 50 nm, respectivamente; esta circunstancia es aprovechada para la identificación de grupos epóxidos.

El espectro de absorción de los carotenoides depende marcadamente del solvente utilizado; los valores mínimos se obtienen con éter de petróleo y los máximos con disulfuro de carbono, existiendo una diferencia de 30-40 nm entre ambos.

A los efectos de comparar los resultados del análisis es-

pectroscópico de diferentes carotenoides, deben ser tenidos en cuenta tanto las posiciones de los máximos de absorción como la forma del espectro en sí. A menos que los espectros se presenten como diagramas, el mejor método para describir las características espectrales es consignar los valores de los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) o específico ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) para cada máximo y mínimo. Si esto no es posible pueden usarse parámetros tales como el  $III/II$  (Liaaen-Jensen, 1962), donde la altura ( $III$ ) de la banda de absorción de mayor longitud de onda se expresa como porcentaje de la altura ( $II$ ) de la banda del medio, debiendo tomarse como línea de base el punto de mínima absorción entre ambas bandas. Las características espectrales de la mayoría de los carotenoides son conocidas y han sido objeto de recientes revisiones (Foppen, 1971; Davies, 1976).

Si bien el espectro de absorción electrónico provee uno de los métodos más convenientes y de ejecución más sencilla para la identificación de un carotenoide dado, cuando se pretende un análisis estructural o configuracional más profundo se recurre a otros métodos espectroscópicos más sofisticados, tales como la espectrometría de masa, la espectroscopía infrarroja, la espectroscopía de resonancia nuclear magnética y la espectroscopía de resonancia protón magnética, entre otros (Moss y Weedon, 1976).

#### Reacciones químicas

Hay un número de pruebas químicas simples que resultan útiles para la determinación de la estructura de los carotenoides (Hager y Stransky, 1970).

Los grupos hidroxilos primarios y secundarios, pero no los terciarios, pueden ser acetilados a temperatura ambiente (Aasen y Liaaen-Jensen, 1966); los grupos hidroxilos terciarios, así como los primarios y secundarios, pueden ser transformados en sus trimetilsilil ésteres (Mc Cormick y Liaaen-

Jensen, 1966); del mismo modo estos grupos funcionales pueden metilarse por el uso de diferentes reactivos (Liaaen-Jensen, 1971). Los hidroxilos alílicos pueden ser oxidados a cetonas (Warren y Weedon, 1958) o deshidratados por tratamiento con cloroformo ácido (Entschel y Karrer, 1958). En todos los casos los productos obtenidos pueden ser identificados por métodos cromatográficos o espectroscópicos.

Una de las reacciones más frecuentemente empleada es la que permite detectar la presencia de grupos epóxidos como consecuencia de su reacción frente a ácidos: los 5,6-monoepóxidos se caracterizan por presentar una desviación hipsocrómica de 22 nm, mientras que en los 5,6,5',6'-diepóxidos es de 40 nm (Karrer y Jucker, 1950).

Curl y Bailey (1961) desarrollaron una reacción de color que permite diferenciar los mono- de los diepóxidos. La misma reacción puede ser utilizada para la identificación de estas sustancias por cromatografía en capa fina (Davies *et al.*, 1970).

La prueba química más adecuada para detectar la presencia de grupos carbonilo es su reducción por el hidruro de aluminio y litio o el borohidruro de sodio. El primero reduce aldehidos, cetonas, ácidos carotenoicos y sus ésteres, mientras que solamente las cetonas y aldehidos reaccionan con el borohidruro de sodio (Liaaen-Jensen, 1971).

## VALORACION

El método corriente para efectuar la determinación cuantitativa de carotenoides es la espectrofotometría, siendo el hexano o el éter de petróleo los solventes más comúnmente usados en la estimación de carotenos, mientras que para xantofilas se requieren solventes más polares.

El coeficiente de extinción específico se define como la

extinción a una longitud de onda dada en un determinado solvente de una solución al 1% en una cubeta de 1 cm. La extinción se determina a la longitud de onda apropiada (generalmente  $\lambda_{m\acute{a}x.}$ ) y la cantidad de carotenoide se calcula en base a la siguiente fórmula, donde  $x$  son los gramos de carotenoide,  $y$  los ml de solución y  $E$  la extinción medida a la longitud de onda apropiada.

$$x = \frac{E \cdot y}{E_{1\%}^{1\text{ cm}} \cdot 100}$$

Cuando no se conoce el coeficiente de extinción específico de un determinado carotenoide, se utilizan valores promedio (2.500 si el solvente es éter de petróleo, hexano, éter o etanol; 2.400 si se trata de cloroformo; 2.300 en el caso de benceno ó 2.000 si es disulfuro de carbono). Los mismos valores pueden aplicarse en el caso de determinar la cantidad total de pigmentos comprendidos en una mezcla.

En algunos casos se puede determinar el coeficiente de extinción específico de un carotenoide A si se cuenta con el dato equivalente de un pigmento B que contenga el mismo grupo cromóforo y se conocen los pesos moleculares respectivos. El cálculo se basa en que el coeficiente de extinción molar depende únicamente del grupo cromóforo, por lo que ha de ser idéntico para las dos sustancias antes mencionadas. Como el coeficiente de extinción molar es directamente proporcional al producto del coeficiente de extinción específico por el peso molecular, resulta que:

$$E_{1\%}^{1\text{ cm}A} = E_{1\%}^{1\text{ cm}B} \cdot \frac{PM_B}{PM_A}$$

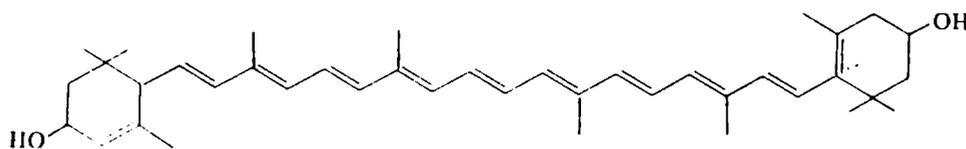
## DISTRIBUCION DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides parecen ser los únicos tetraterpenos naturales y se encuentran ampliamente distribuidos entre los seres vivos. Sin embargo su síntesis *de novo* la realizan únicamente plantas y bacterias ya que los carotenoides aislados de tejidos animales resultan simplemente de la alteración enzimática (especialmente oxidación) de carotenoides vegetales obtenidos a través de la cadena trófica respectiva. (Goodwin, 1976).

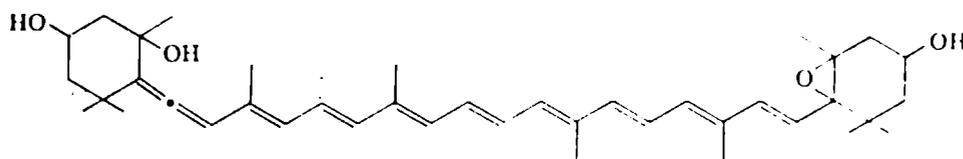
### TEJIDOS FOTOSINTETICOS

#### Plantas superiores

Todos los tejidos verdes de las plantas superiores contienen generalmente los mismos carotenoides principales, ubicados (probablemente en forma exclusiva) en el interior de los cloroplastos. Estos pigmentos son  $\beta$ -caroteno (XII), *luteína* (XXXIII), *violaxantina* (VII) y *neoxantina* (XXXIV).



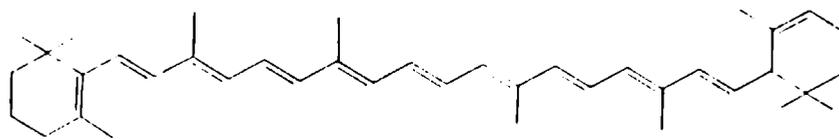
*luteína* (XXXIII)  
 $\beta, \epsilon$ -caroten-3,3'-diol



*neoxantina* (XXXIV)  
5',6'-epoxi-6,7-didehidro-5,6,5',6'-  
tetrahidro- $\beta, \beta$ -caroten-3,5,3'-trioi

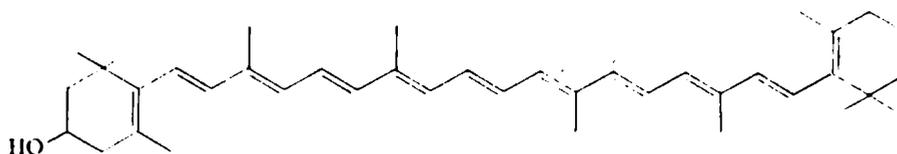
Pigmentos que aparecen con frecuencia pero no en forma constante y en pequeñas cantidades son  $\alpha$ -caroteno (XXXV),  $\beta$ -criptoxantina (XXXVI), zeaxantina (XXXVII) y anteraxantina (VIII). Sólo se encuentran trazas de los precursores biosin-

téticos parcialmente saturados fitoeno (XVI) y fitoflueno (XXV), que en el caso de *Vicia sativa* L. (Leguminosae) representan 1/200 de la cantidad de  $\beta$ -caroteno presente,



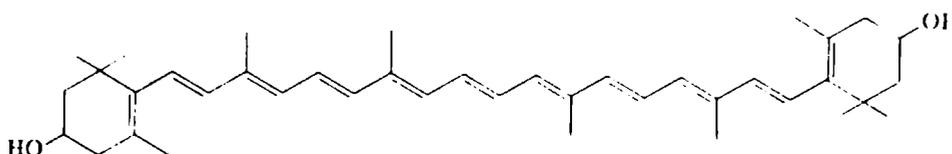
$\alpha$ -caroteno (XXXV)

$\beta, \epsilon$ -caroteno



$\beta$ -criptoxantina (XXXVI)

$\beta, \beta$ -caroten-3-ol



zeaxantina (XXXVII)

$\beta, \beta$ -caroten-3,3'-diol

Las xantofilas normalmente no están esterificadas en el cloroplasto, pero durante la senescencia, cuando el cloroplasto se desintegra, las que se encuentran en el citoplasma se hallan en forma de ésteres.

Resulta notable la estabilidad de la distribución cualitativa de los carotenoides en las hojas de las plantas superiores, que puede observarse en plantas de los más diversos tipos y de diferente habitat. Strain (1966), quien ha sido probablemente el investigador que ha estudiado el mayor número de especies, no encuentra variaciones significativas entre plantas insectívoras (*Drosera* sp., Droseraceae), una planta parásita como el muérdago (*Viscum* sp., Lorantaceae), una planta marina (*Phyllospadix* sp., Wejadaceae), plantas de lugares pantanosos, así como miembros de familias tan distintas como Compositae y Chenopodiaceae. Al mismo tiempo comprueba

que plantas endémicas de Europa, Asia, Africa y Sudamérica no modifican su composición en carotenoides al ser cultivadas en California o Hawaii. La persistencia del modelo a través de tan amplio rango taxonómico podría interpretarse como una prueba a favor del origen de todas las plantas superiores a partir de un ancestro común y de que toda mutación que altere este modelo en forma significativamente es de carácter letal.

Los pigmentos están probablemente ubicados en los *grana* cloroplásticos en forma de cromoproteínas, integrando los fotosistemas I y II; el primero contiene principalmente  $\beta$ -caroteno (XII) y trazas de luteína (XXXIII), mientras que en el segundo hay más xantofilas que  $\beta$ -caroteno.

#### Briófitas y Pteridófitas

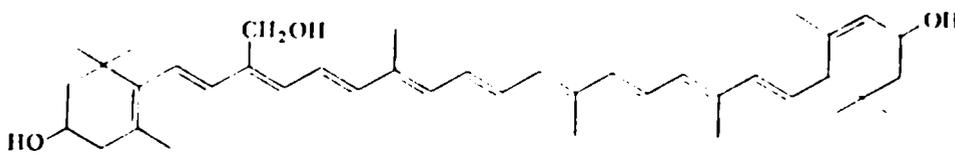
Si bien la información de la que se dispone es escasa, parecería que los carotenoides son los mismos que los que se encuentran en las plantas superiores.

#### Algas

Los carotenoides normalmente se encuentran en el interior de los cloroplastos, pero bajo ciertas condiciones pueden ubicarse en el citoplasma. A diferencia de lo que ocurre en las plantas superiores, los carotenoides plastidiales de las algas exhiben un amplio espectro, con considerables diferencias cualitativas que han resultado de indudable utilidad taxonómica.

Con ligeras excepciones, la distribución general de los carotenoides en algas verdes (Chlorophyta), tanto en especies unicelulares como en coloniales, es similar a la observada en plantas superiores, lo que no hace sino confirmar las premisas de los esquemas filogenéticos conocidos. No obstante existen algunos carotenoides característicos, como la *loroxantina* (XXXVIII) hallada en *Chlorella vulgaris*, *Cladophora trichotoma*,

*C. ovoidea*, *Scenedesmus obliquus* y *Ulva rigida* y la *sifonoxantina* (XXXIX) de las Siphonales, Codiales y Caulerpales.

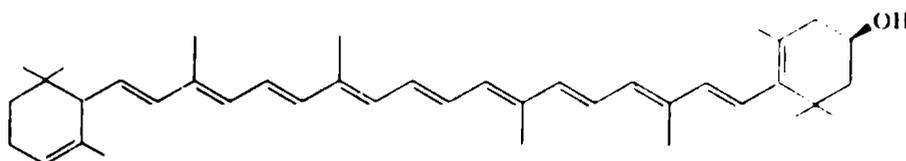


linoxantina (XXXVIII)  
β,ε-caroten-3,19,3'-trio1



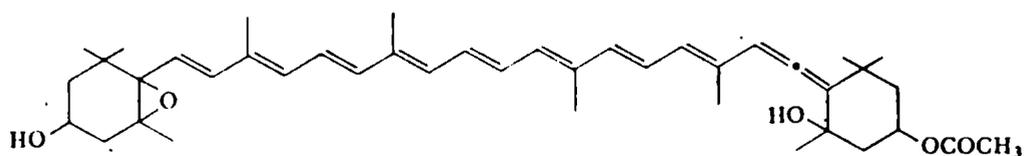
sifonoxantina (XXXIX)  
3,19,3'-trihidroxi-7,8-dihidro-β,ε-caroten-8-ona

El modelo de distribución de los carotenoides en Rhodophyta (algas rojas) es usualmente muy simple: α-caroteno (XXXV), β-caroteno (XII), luteína (XXXIII) y zeaxantina (XXXVII), junto a algunos monohidroxicarotenoides como β-criptoxantina (XXXVI) y α-criptoxantina (XL).



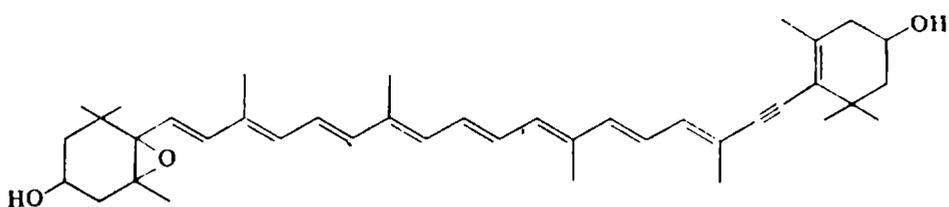
α-criptoxantina (XL)  
β,ε-caroten-3'-ol

Como era de esperarse, en todas las especies de Chryso-  
phyta examinadas está presente el β-caroteno (XII), pero la  
fracción xantofílica (especialmente en diatomeas) incluye al-  
gunos pigmentos característicos tales como *dinoxantina* (XLI),  
*diadinoxantina* (XLII) y *diatoxantina* (XLIII).



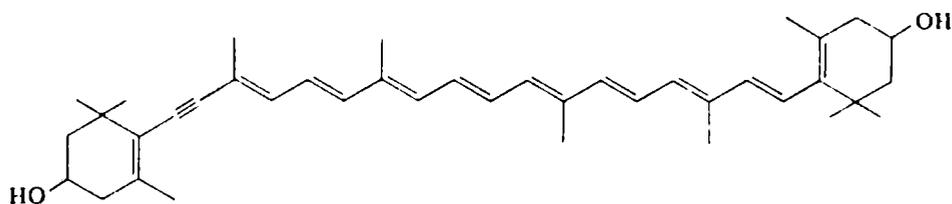
dinoxantina (XLI)

3'-acetoxi-5,6-epoxi-6',7'-didehidro-5,6,5'6'-  
tetrahidro- $\beta,\beta$ -caroten-3,5'-diol



diadinoxantina (XLII)

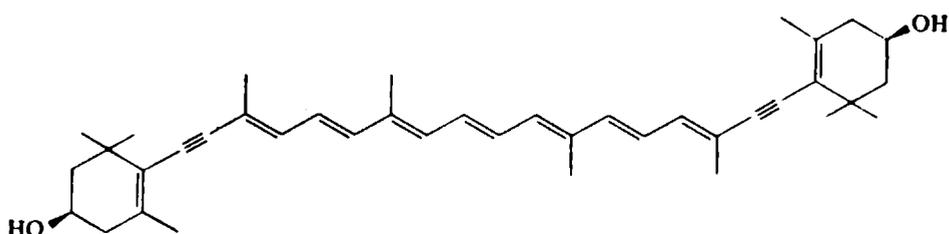
5,6-epoxi-7',8'-didehidro-5,6-  
dihidro- $\beta,\beta$ -caroten-3,3'-diol



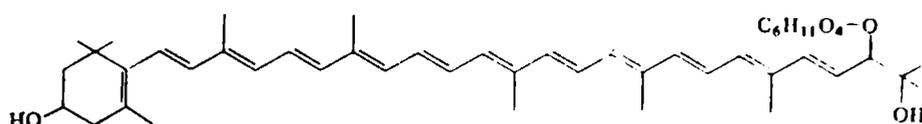
diatoxantina (XLIII)

7,8-didehidro- $\beta,\beta$ -caroten-3,3'-diol

Las algas pardas (Phaeophyta) se caracterizan por la presencia de fucoxantina (IX) y las Pyrrophyta por la de peridina (X), mientras que en Chryptophyta, a la preponderancia de  $\alpha$ -caroteno (XXXV) sobre  $\beta$ -caroteno (XII) se añade entre otros el carotenoide acetilénico *alloxantina* (XLIV). Las algas azulverdosas (Cyanophyta) sintetizan por otra parte carotenoides heterosídicos tales como *myxoxantofila* (XLV), un 2-O-ramnoglicósido.



alloxantina (XLIV)

7,8,7',8'-tetradehidro- $\beta,\beta$ -caroten-3,3'-diol

myxoxantofila (XLV)

2'-( $\beta$ -L-ramnopyranosiloxi)-3',4'-didehidro-1',2'-  
-dihidro- $\beta,\psi$ -caroten-3,1'-diolBacterias

Los carotenoides metoxilados sólo se han encontrado dentro de las bacterias fotosintéticas, particularmente en especies de Thiorhodaceae y Athiorhodaceae. También son frecuentes en las bacterias fotosintéticas los carotenoides alifáticos con grupos -OH terciarios en posición 1, ocasionalmente con grupos cetona conjugados en C<sub>2</sub> o aldehidos en C<sub>20</sub>. Arilcarotenoides monocíclicos con un grupo terminal trimetilfenilo han podido aislarse de Chlorobacteriaceae y Thiorhodaceae.

Las bacterias no fotosintéticas gram (+) de vida aerobia se han caracterizado por producir carotenoides con 45 y 50 átomos de carbono. También pueden encontrarse carotenoides heterosídicos dentro de ellas, como en las bacterias fotosintéticas y las algas azul-verdosas.

## TEJIDOS NO FOTOSINTETICOS DE PLANTAS SUPERIORES

Flores

No todas las flores contienen carotenoides. Un análisis

completo de pigmentos de pétalos usualmente revela la presencia de 15 a 20 componentes, donde las xantofilas están en su mayoría parcial o totalmente esterificadas. Los pigmentos se acumulan en cromoplastos, en algunos casos en concentraciones tan altas como para encontrarse en forma cristalina.

Los carotenoides están presentes en las anteras de algunas pero no de todas las plantas superiores. Naturalmente que no se incluye aquí a la esporopolenina, el principal componente molecular de la exina o pared externa de los granos de polen, considerada un carotenoide polimérico (Brooks y Shaw, 1978).

A continuación se brinda una nómina de las especies cuyos carotenoides florales han sido estudiados. La información obtenida se ha ordenado alfabéticamente por familias, géneros y especies, consignándose en cada caso la fuente bibliográfica respectiva. Los nombres científicos de las especies estudiadas se mencionan tal como fueron citados por los autores en los trabajos originales.

#### AMARYLLIDACEAE

*Narcissus poeticus-recurvus* (Booth, 1957)

#### BALSAMINACEAE

*Impatiens noli-tangere* (Kuhn y Lederer, 1932; Nitsche y Pleugei, 1972; Toth y Szabolcs, 1970)

#### BIGNONIACEAE

*Tecoma capensis* (Taha, 1954)

*Tecoma radicans* (Grangaud y Garcia, 1952)

*Tecoma stans* (Premachandra *et al.*, 1974; Taha, 1954)

## COMPOSITAE

- Achillea ageratum* L. (Valadon y Mummery, 1971)
- Achillea filipendulina* Lam. (Valadon y Mummery, 1971)
- Arnica montana* (Karrer *et al.*, 1947)
- Bidens ferulaefolia* DC. (Valadon y Mummery, 1971)
- Calendula arvensis* (Baraud, 1958)
- Calendula officinalis* (Andreeva, 1961; Baraud, 1958; Goodwin, 1954; Karrer y Nott-hafft, 1932; Movchan, 1960; Zechmeister y Cholnoky, 1932)
- Chrysanthemum carinatum* (Valadon y Mummery, 1971)  
Schousb.
- Chrysanthemum coronarium* L. (Valadon y Mummery, 1971)
- Chrysanthemum segetum* L. (Valadon y Mummery, 1971)
- Coreopsis grandiflora* Nutt. (Valadon y Mummery, 1971)  
ex Chapm.
- Coreopsis tinctoria* Nutt. (Valadon y Mummery, 1971)
- Coreopsis verticillata* L. (Valadon y Mummery, 1971)
- Cosmidium brunette* Hort. (Valadon y Mummery, 1971)
- Crepis aurea* (Karrer *et al.*, 1947)
- Crepis capillaris* Wallr. (Valadon y Mummery, 1971)
- Dimorphoteca aurantiaca* Hort. (Valadon y Mummery, 1967)
- Dimorphoteca aurantiaca* (Karrer y Notthafft, 1932)
- Doronicum carpathicum* (Neamtu *et al.*, 1967)
- Gazania rigens* (L.) R.Br. (Valadon y Mummery, 1967)
- Gazania rigens* R.Br. (Zechmeister y Schroeder, 1943)
- Gazania rigens* (Schön, 1938)
- Gaillardia aristata* Pursch. (Valadon y Mummery, 1971)
- Gerbera jamesoni* Bolus ex (Valadon y Mummery, 1967)  
Gard. Chron.
- Helianthus annuus* (Nitsche y Pleugel, 1972; Toth y Szabolcs, 1970)

- Helianthus decapitatus* L. cv. (Valadon y Mummery, 1971)  
Loddon Gold
- Helichrysum bracteatum* Andr. (Valadon y Mummery, 1971)
- Hieracium aurantiacum* L. (Valadon y Mummery, 1967)
- Hieracium filarszkyi* (Neamtu et al., 1965 b)
- Hieracium pilosella* L. (Valadon y Mummery, 1967)
- Hypochoeris radicata* L. (Valadon y Mummery, 1967)
- Layia elegans* Torr. y Gray (Valadon y Mummery, 1971)
- Layia platyglossa* A. Gray (Valadon y Mummery, 1971)
- Leontodon autumnalis* (Kuhn y Lederer, 1932)
- Rudbeckia speciosum* Hort. (Valadon y Mummery, 1971)  
ex Link.
- Santolina teretifolia* Sennen (Valadon y Mummery, 1971)  
y Elias
- Santolina viridis* Hort. (Valadon y Mummery, 1971)
- Senecio doronicum* L. (Karrer y Notthafft, 1932)
- Senecio scandens* Buch.-Ham. (Valadon y Mummery, 1967)
- Solidago canadensis* L. (Valadon y Mummery, 1971)
- Solidago* sp. cv. Tom Thumb (Valadon y Mummery, 1971)
- Tagetes erecta* L. (Valadon y Mummery, 1967)
- Tagetes erecta* (Alam et al., 1968; Quackenbush y Miller, 1972)
- Tagetes patula* L. (Valadon y Mummery, 1967)
- Tagetes patula* (Quackenbush y Miller, 1972; Tarpo, 1970)
- Tanacetum vulgare* L. (Valadon y Mummery, 1971)
- Taraxacum kok-saghyz* Rodin (Valadon y Mummery, 1971)
- Taraxacum officinale* (Booth, 1964; Kuhn y Lederer, 1931; Nitsche y Pleugel, 1972; Toth y Szabolcs, 1970)
- Tragopogon pratensis* L. (Karrer y Notthafft, 1932; Valadon y Mummery, 1971)

- Tragopogon pratensis* (Karrer *et al.*, 1945)  
*Ursinia calenduliflora* Benth. (Valadon y Mummery, 1971)  
 & Hooker.  
*Venidium decurrens* Less. (Valadon y Mummery, 1971).

## CRUCIFERAE

- Sinapis officinalis* (Karrer y Notthafft, 1932)

## IRIDACEAE

- Iris pseudacorus* (Drumm y O'Connor, 1945)

## LEGUMINOSAE

- Astragalus peterfii* (Neamtu *et al.*, 1965 a)  
*Delonix regia* (Jungalwala y Cama, 1962)  
*Lotus corniculatus* (Karrer *et al.*, 1947)  
*Sarothamnus scoparius* (Karrer y Jucker, 1944)  
*Spartium junceum* L. (Spada y Cameroni, 1957)

## LILIACEAE

- Lilium amabile* (Valadon y Mummery, 1977)  
*Lilium Davidi* var. *Willmottiae* (Valadon y Mummery, 1977)  
*Lilium leichtheinii* var.  
     *maximowiczii* (Valadon y Mummery, 1977)  
*Lilium Maxwell*<sup>\*</sup> (Valadon y Mummery, 1977)  
*Narthecium ossifragum* (Stabursvik, 1959)

## LORANTACEAE

- Viscum album* (Neamtu y Bodea, 1970)

\* híbrido de los dos anteriores

## MAGNOLIACEAE

- Liriodendron* sp. (Demuth y Santamour, 1978)  
*Magnolia* sp. (Demuth y Santamour, 1978)

## MALVACEAE

- Hibiscus syriacus* L. (Hanny *et al.*, 1972)

## MUSACEAE

- Strelitzia reginae* (Tappi y Menziani, 1955)

## OENOTHERACEAE

- Oenothera* spp. (Chrometzka, 1971)

## OLEACEAE

- Osmanthus fragrans* (Suzuki y Tsukida, 1959)

## PAPAVERACEAE

- Chelidonium majus* L. (Neamtu *et al.*, 1979)

## PROTEACEAE

- Grevillea robusta* Cunningham (Zechmeister y Polgár, 1941)

## RANUNCULACEAE

- Adonis aestivalis* (Neamtu *et al.*, 1966)  
*Caltha palustris* L. (Karrer y Notthafft, 1932)  
*Caltha palustris* (Karrer y Jucker, 1947)  
*Ranunculus acer* (Karrer *et al.*, 1945; Kuhn y Lederer, 1932; Toth y Szabolcs, 1970)  
*Ranunculus arvensis* L. (Karrer y Notthafft, 1932)  
*Ranunculus carpaticus* (Neamtu *et al.*, 1967)  
*Ranunculus ficaria* (Cameroni y Bernabei, 1957)

*Trollius europaeus* L. (Karrer y Notthafft, 1932)

#### ROSACEAE

*Rosa foetida* (Buchecker y Eugster, 1977)

#### SOLANACEAE

*Brugmansia aurea* (Joshi, 1953)

*Physallis alkekengi* (Cholnoky y Szabolcs, 1959)

#### SCROPHULARIACEAE

*Mimulus cupreus* (Goodwin y Thomas, 1964)

*Mimulus longiflorus* Grant (Zechmeister y Schroeder, 1942)

*Mimulus tigrinus* (Goodwin y Thomas, 1964)

*Torenia bailloni* (Lang, 1970)

*Torenia fournieri* (Lang, 1970)

#### TROPAEOLACEAE

*Tropaeolum majus* (Sykut, 1966)

#### VIOLACEAE

*Viola tricolor* (Molnar y Szabolcs, 1980)

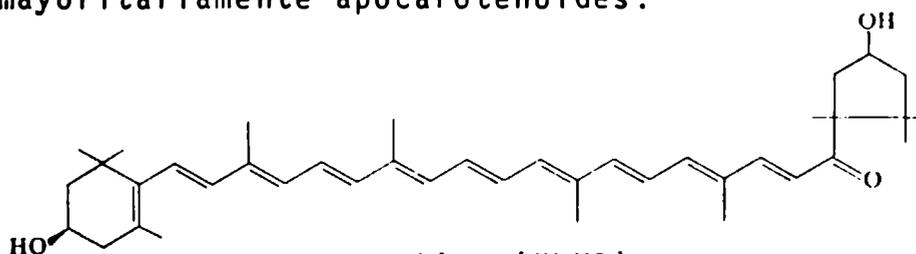
#### Semillas

A excepción del maíz, los carotenoides están presentes solamente en trazas en las semillas de cereales, mientras que las legumbres contienen "carotenoides cloroplásticos" en sus semillas inmaduras. Un carotenoide de origen típicamente seminal es la bixina (IV), el diapocarotenoide aislado de *Bixa orellana* L. (Bixaceae).

#### Frutos

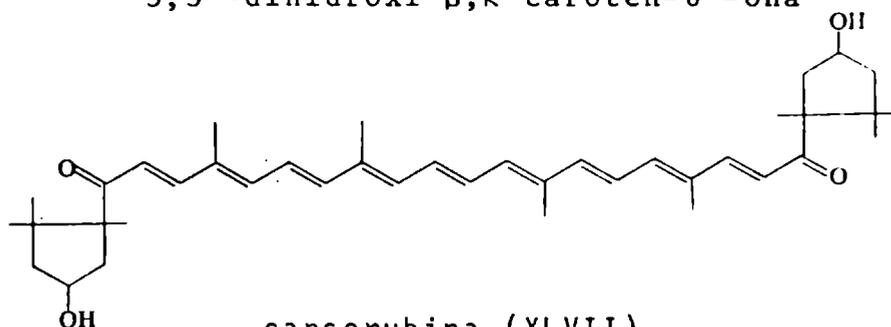
La abundante información de la que se dispone acerca de carotenoides de frutos permite dividir a éstos en ocho grupos, de

acuerdo al predominio de uno u otro tipo de pigmentos (Goodwin, 1976): 1) los que producen cantidades insignificantes de carotenoides, 2) los que tienen "carotenoides cloroplásticos", 3) aquéllos en los que hay una síntesis marcada de licopeno (XIV) y de sus precursores, 4) los que sintetizan  $\beta$ -caroteno (XII) y sus derivados, 5) los que se caracterizan por producir carotenoides epoxídicos, 6) los que producen pigmentos específicos, como *capsantina* (XLVI) y *capsorubina* (XLVII), aisladas del "ají" (*Capsicum annum* L., Solanaceae), 7) los que sintetizan principalmente poli-*cis*-carotenoides y 8) aquéllos que producen mayoritariamente apocarotenoides.



capsantina (XLVI)

3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\kappa$ '-caroten-6'-ona



capsorubina (XLVII)

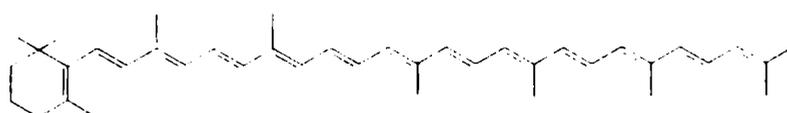
3,3'-dihidroxi- $\kappa$ , $\kappa$ '-caroten-6,6'-diona

### Raíces

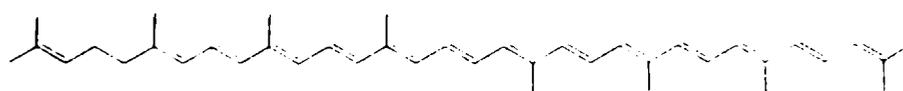
Sin duda la raíz carotenogénica más importante es la "zanahoria" (*Daucus carota* L., Umbelliferae), donde el principal pigmento en las variedades hortícolas más utilizadas es el  $\beta$ -caroteno (XII), mientras que las xantofilas representan sólo un 5 a 10% del total. Las "batatas" (*Ipomea batatas*, Poir., Convolvulaceae) también contienen cantidades significativas de carotenoides, en especial de  $\beta$ -caroteno (XII).

## HONGOS

En base al conocimiento que actualmente se p osee acerca de la distribución de carotenoides fúngicos pueden formularse algunas generalizaciones: 1) muchos hongos, en particular los Phycomycetes, sintetizan únicamente carotenos; 2) el  $\beta$ -caroteno (XII) no es un componente constante pero está bien distribuido y con frecuencia es cuantitativamente el pigmento principal; está ausente en algunos Chytridiales y Blastocladales, en los que es reemplazado por  $\gamma$ -caroteno (I), que en los hongos tiene una distribución mucho más amplia que el  $\beta$ -caroteno (XII); 3) hay carotenos característicos de hongos, con un doble enlace adicional en posición 3,4 como *toruleno* (XLVIII) y *3,4-dihidro-licopeno* (IL), que no existen en plantas superiores pero sí en bacterias fotosintéticas; 4) también hay xantofilas características, como *phillipsiaxantina* (L), *plectaniaxantina* (LI) y *aleuriaxantina* (LII), aisladas de algunos Discomycetes y 5) no se han encontrado carotenoides con anillo  $\epsilon$  ni xantofilas del tipo de las que se encuentran en las hojas, ni tampoco 5,6- o 5,8-epóxidos.

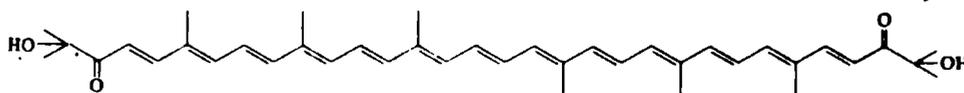


toruleno (XLVIII)

3',4'-didehidro- $\beta$ , $\psi$ -caroteno

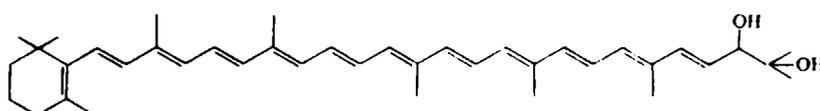
3,4-dihidrolicopeno (IL)

3,4-dihidro- $\psi$ , $\psi$ -caroteno



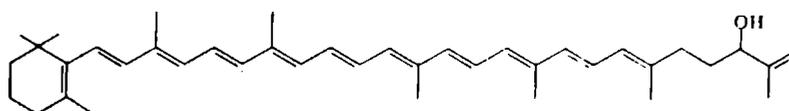
phillipsiaxantina (L)

1,1'-dihidroxí-3,4,3',4'-tetradehidro-1,2,1',2'-  
tetrahidro- $\psi,\psi$ -caroten-2,2'-diona



plectaniaxantina (LI)

3',4'-didehidro-1',2'-dihidro- $\beta,\psi$ -caroten-1',2'-diol



aleuriaxantina (LII)

1,16'-didehidro-1',2'-dihidro- $\beta,\psi$ -caroten-2'-ol

## FUNCIONES DE LOS CAROTENOIDES

### FUNCIONES FOTOSINTETICAS

Además de clorofila, los cloroplastos contienen pigmentos accesorios tales como los carotenoides en las plantas verdes y las ficobilinas en las algas rojas y azul-verdosas. A diferencia de la clorofila, ni los carotenoides ni las ficobilinas presentan fluorescencia *in vitro*, pero sin embargo *in vivo* son capaces de sensibilizar la fluorescencia de la clorofila. En la diatomea *Nitzschia* (Chrysophyta, Bacillariophyceae) la absorción de cuantos lumínicos por parte de la fucoxantina (IX) provoca la fluorescencia de la clorofila *a* aproximadamente con el mismo rendimiento que si la luz hubiera sido absorbida directamente por la clorofila. De igual modo

la fluorescencia de la clorofila *a* puede ser sensibilizada en el alga verde *Chlorella* (Chlorophyta, Chlorophyceae) por la absorción de luz por parte de la clorofila *b*, así como en algas rojas y azul-verdosas se ha demostrado que las ficobilinas también transfieren su energía a la clorofila. Estas transferencias de energía tienen lugar con singular eficiencia, pero naturalmente pueden transcurrir sólo desde un pigmento que absorbe a longitudes de onda menores hacia otro que lo hace a mayores longitudes de onda.

Ensayos microscópicos han demostrado que la concentración de los pigmentos en el cloroplasto es del orden de 0,1 M, lo que equivaldría a una distancia promedio de las moléculas de los pigmentos cercana a los 50 Å, separación que los estudios teóricos de resonancia consideran aceptable como para que la transferencia de energía pueda ocurrir. En resumen, la hipótesis actualmente más aceptada en cuanto a la posible función de los pigmentos no clorofílicos en la fotosíntesis es la de que la luz absorbida por ellos es transferida a la clorofila *a* que es el pigmento que absorbe a mayores longitudes de onda (Whittingham, 1976).

#### FUNCIONES NO FOTOSINTÉTICAS DE LOS CAROTENOIDES

Existe una tendencia a buscar una función universal para los carotenoides de *todas* las plantas, sean o no clorofílicas (Burnett, 1976). La propuesta más plausible es la de que los carotenoides protegen a las células del daño fotooxidativo provocado por la incidencia de la luz visible, aún cuando las experiencias se han realizado principalmente en bacterias y algunas algas. Una hipótesis anterior, que de a poco va perdiendo apoyo, establece que los carotenoides actuarían como fotorreceptores en el fototropismo de hongos y plantas verdes, o en la fototaxis de algas móviles y de algunas bacterias. Una tercera propuesta implica a los carotenoides en la reproducción, especialmente en hongos. El hecho parece haberse comprobado, pero de todos modos no representa una

función *universal* de los carotenoides.

### Fotoprotección

Mutantes de bacterias fotosintéticas (*Rhodospseudomonas spheroides*) en las que los carotenos han sido reemplazados por fitoeno (XVI) -molécula considerablemente más saturada y con los máximos de absorción desplazados hacia el ultravioleta- pueden hacer fotosíntesis normal en condiciones anaeróbicas estrictas, pero al exponerlas a la luz en un medio aerobio la bacterioclorofila se destruye con rapidez y las células mueren. La bacterioclorofila absorbe *in vivo* entre 820 y 920 nm; si en aerobiosis se exponen los mutantes a una luz filtrada de tal modo que no lleguen radiaciones inferiores a 800 nm, la bacterioclorofila se destruye y las células mueren, por lo que puede establecerse que ha existido un proceso de fotooxidación (que requiere condiciones aeróbicas) por la destrucción de un pigmento sensible a aquélla (la bacterioclorofila) y que en células normales los carotenoides impiden la fotooxidación destructiva.

La acción protectora de los carotenoides en células normales también fue demostrada bloqueando su biosíntesis con difenilamina. La síntesis queda interrumpida en el paso previo a la formación del neurosporeno (XXVI), (con nueve dobles ligaduras conjugadas) que es el último carotenoide no saturado capaz de proteger a las células contra la fotooxidación.

En algas, hongos y plantas superiores también se ha señalado la existencia de una acción fotoprotectora por parte de los carotenoides, pero las experiencias no son tan concluyentes como en el caso de las bacterias fotosintéticas. No obstante pueden señalarse como características generales que para que un carotenoide demuestre acción fotoprotectora debe contener en su molécula un número mínimo de 9 a 11 dobles ligaduras conjugadas y que -al menos en microorganismos- dicha protección es ineficiente a bajas temperaturas.

En adición a las observaciones efectuadas en organismos se han realizado también una serie de ensayos *in vitro*, que han demostrado que sólo carotenoides con más de 7 dobles ligaduras conjugadas son efectivos como fotoprotectores y que esta es la única característica estructural exigible para que puedan desempeñar esa función, que además es dependiente de la relación caroteno/clorofila, aumentando hasta llegar a un punto de saturación a medida que aumenta el valor de dicha relación.

#### Fototropismo y fototaxis

La evidencia experimental de que los carotenoides juegan algún papel en fotorrespuestas tales como el fototropismo y la fototaxis no resulta concluyente. Casi toda esta evidencia proviene de comparar el espectro de acción de la fotorrespuesta con el espectro de absorción del carotenoide principal. Si los espectros, en opinión del investigador, son razonablemente congruentes, se admite que el carotenoide en cuestión puede ser efectivamente el pigmento fotorreceptivo involucrado en la respuesta.

No obstante existen dos clases de dificultades experimentales que perjudican seriamente la investigación: en primer término resulta aún difícil obtener espectros de acción suficientemente seguros y en segundo lugar es muy problemática la medida del espectro de absorción del o de los carotenoides en la célula intacta, a tal punto que la mayoría de las mediciones se han efectuado sobre extractivos de carotenoides. Aún en el caso de células más o menos intactas los resultados son difíciles de interpretar, porque tales espectros de absorción sufren la interferencia de otros pigmentos y la distorsión debida a la presencia de sustancias fluorescentes, comunes al menos en plantas superiores.

El tema del *fototropismo* -movimiento de orientación que

realiza el vegetal ante la influencia de la luz- en hongos y en plantas superiores ha merecido últimamente considerable atención, mas en base a nuevas experiencias y a la consideración general de la información de la que se dispone hasta el momento, se ha generalizado una opinión contraria a los carotenoides como fotorreceptores, función para la que las flavinas (especialmente la riboflavina) parecerían ser más adecuadas.

Se denomina *fototaxis* al comportamiento que las algas y hongos móviles y las células reproductivas flageladas (zoosporas, gametas, anterozoides) manifiestan como respuesta direccional en su movimiento al efecto de la iluminación.

Los fisiólogos vegetales se preocuparon por la fototaxis desde antiguo, siendo *Euglena gracilis* y otros euglénidos el material preferido, aunque no exclusivo, de estos estudios. Sucesivamente se describió el *cuerpo paraflagelar* situado en la base del flagelo principal de *Euglena* y la *mancha ocular* o *estigma*, organoide de color rojo o naranja común a muchas células móviles, reclamándose para ambos el papel de *locus* fotosensible. Una hipótesis que ahora ha recibido considerable apoyo experimental es la de que los pigmentos del estigma actuarían como pantalla ocultando el fotorreceptor primario y que el organismo reaccionaría de forma de minimizar dicho ocultamiento. El análisis de los espectros de acción de *Euglena* demuestran que el fotorreceptor primario no es un carotenoide, si bien los carotenoides del estigma y de los cloroplastos, junto con las clorofilas, actuarían en carácter de "pigmentos ocultantes".

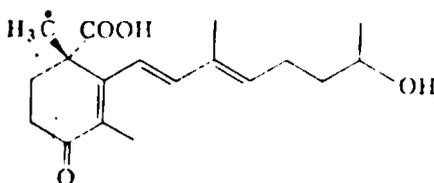
### Reproducción

Goodwin (1950) ha llamado la atención en cuanto a la amplia distribución y acumulación de carotenoides en las estructuras reproductoras de vegetales y animales. En las plantas superiores sirven pasivamente a los mecanismos de polinización y dispersión, haciendo atractivas para los animales las flores, los frutos y quizás algunas estructuras vegetativas. Sin embar-

go no existe evidencia alguna que permita soportar la idea de algún papel metabólico de los carotenoides en la reproducción de las plantas superiores, ni tampoco en la de las plantas inferiores de habitat terrestre.

En los hongos en cambio hay algunos hechos que permiten relacionar el aumento del contenido de carotenoides con los procesos sexuales. No obstante hay hongos que carecen de este tipo de pigmentos, por lo que tampoco puede afirmarse que jueguen un papel *universal* en la reproducción fúngica.

Es dentro de los Phycomycetes, especialmente Mucorales, donde se supone con fundamento que puede existir alguna relación entre el contenido de carotenoides y los mecanismos reproductivos que implican la diferenciación en cepas plus (+) y minus (-). Los factores difusibles que se han aislado en cultivos intra e interespecíficos de cepas de sexualidad opuesta han sido identificados como *ácidos trispóricos* (LIII), producidos por degradación oxidativa del  $\beta$ -caroteno(XII).



ácido trispórico (LIII)

11,12-dihidro-13-hidroxi-4-ceto-13-apo- $\beta$ -caroten-17-oico

## BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES

### ESQUEMA GENERAL

Aunque algunas bacterias no fotosintéticas producen carotenoides de 30, 45 y hasta 50 átomos de carbono, los más corrientes y en particular los de las plantas superiores son tetraterpenos ( $C_{40}$ ). La biosíntesis transcurre a través de la bien conocida

ruta metabólica de los terpenoides, cuya unidad básica ( $C_5$ ) es el isopentenilpirofosfato (IPP, "isopreno activo"), a partir del cual y por adiciones sucesivas se obtiene una serie de intermediarios con cadenas carbonadas compuestas de múltiplos de 5 carbonos. En la biosíntesis de carotenoides la cadena terpénica se construye hasta el nivel de  $C_{20}$ , momento en que dos unidades se condensan para dar lugar a la formación del esqueleto típico de 40 átomos de carbono. En la fig. 2 se presenta un esquema general (Britton, 1976) que ilustra acerca de las relaciones biosintéticas entre los carotenoides y los demás tipos de terpenoides.

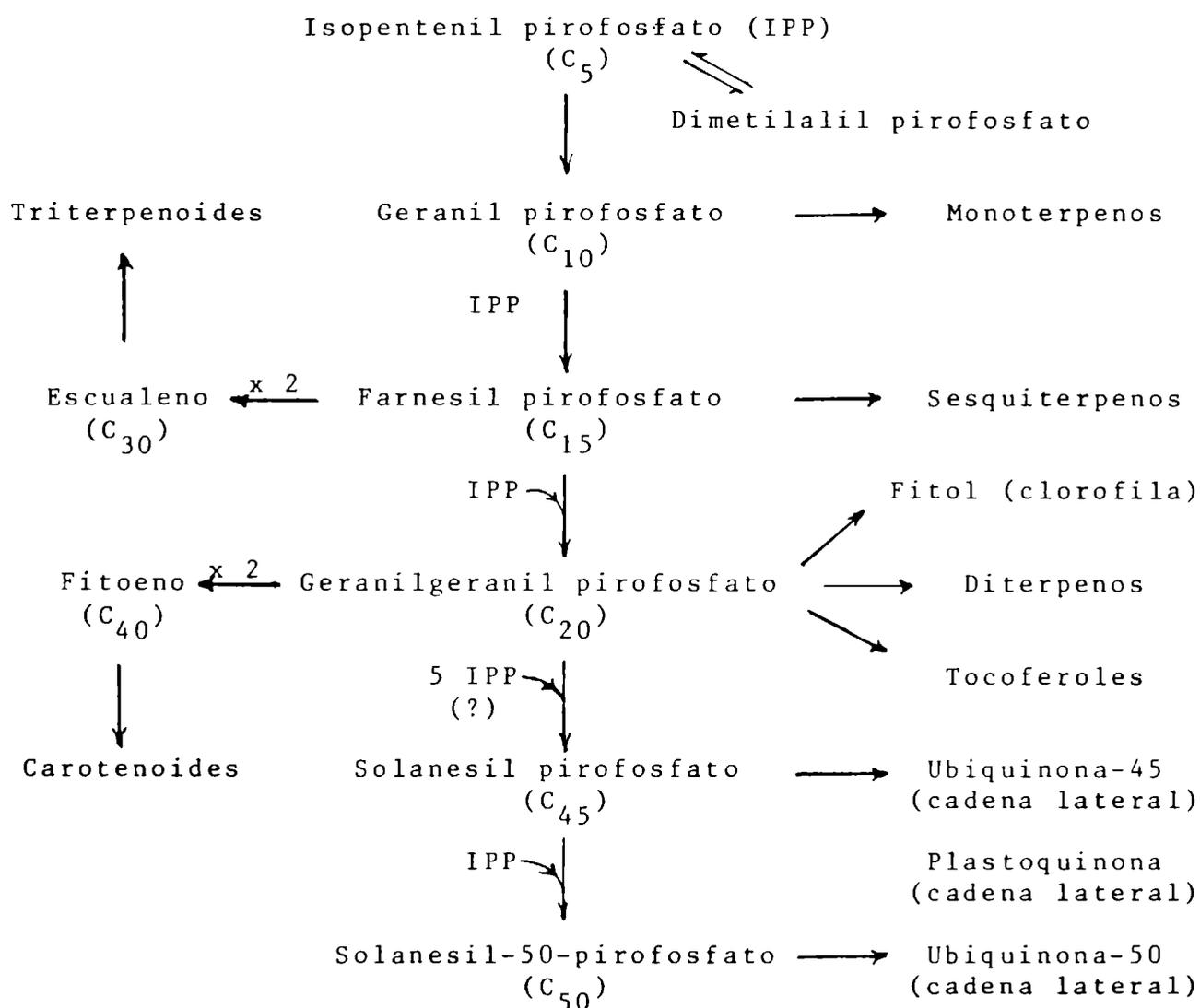


Figura 2. Esquema general de la biosíntesis de terpenoides

Se considera que los pasos previos a la formación de IPP son idénticos en la biosíntesis de todos los terpenoides. Está bien establecido que la primera etapa resulta de la condensación de una molécula de acetil-CoA para originar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), reacción catalizada por la HMG-CoA sintetasa. Higgins y Kekwick (1973) demostraron palmariamente que malonil-CoA no está involucrada en la formación de HMG-CoA en levaduras ni en plantas superiores. En cambio parecería ser posible la síntesis de HMG-CoA a partir de leucina o valina a través de un proceso que involucra una fijación de  $\text{CO}_2$  y que requiere biotina como cofactor.

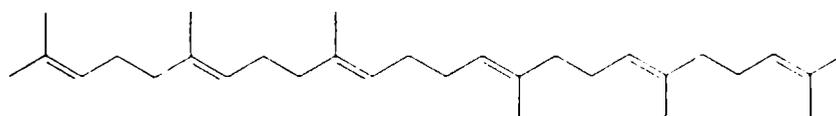
La conversión de HMG-CoA en ácido mevalónico (MVA, 3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), el primer precursor específico de los terpenoides, ha sido vastamente estudiada, pero sin embargo la reacción en plantas (Hepper y Audley, 1969) fue demostrada únicamente en el látex de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). La reducción de HMG-CoA a MVA transcurre en dos etapas y es catalizada por una HMG-CoA reductasa, requiriéndose dos moléculas de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ .

La incorporación de MVA a los carotenoides ha sido comprobada en numerosos sistemas carotenogénicos, incluidos diversos tejidos vegetales. En presencia de ATP y  $\text{Mg}^{++}$  (en algunos fitosistemas el  $\text{Mn}^{++}$  es más efectivo), la MVA quinasa incorpora un radical fosfato en  $\text{C}_5$  para dar MVA-5-fosfato (MVAP). Al igual que en los sistemas animales la enzima es inhibida por geranil, farnesil, geranil-geranil y fitil pirofosfatos y hasta cierto grado por el mismo MVAP. Por la acción de una MVAP quinasa, aislada de *Hevea brasiliensis* (Skilleter y Kekwick, 1971) y el consumo de otro ATP se llega al pirofosfato respectivo (MVAPP). Finalmente, en presencia de ATP y por acción de la MVAPP anhidrodecarboxilasa se origina IPP.

## FORMACION DE FITOENO

Si bien el IPP es la unidad biosintética fundamental a partir de la cual se construyen los carotenoides, previamente a la elongación de la cadena carbonada es necesaria una isomerización de IPP a dimetilalilpirofosfato (DMAPP). La condensación posterior de moléculas de IPP y DMAPP da lugar a la formación de un compuesto  $C_{10}$ , el geranil pirofosfato (GPP), que por adición de dos unidades de IPP produce sucesivamente farnesil pirofosfato (FPP), precursor de esteroides y sesquiterpenos y geranilgeranil pirofosfato (GGPP).

En la biosíntesis de esteroides la condensación de dos moléculas de FPP origina el triterpeno *escualeno* (LIV), mientras que una reacción análoga en la biosíntesis de carotenoides a partir de GGPP produciría *licoperseno* (LV). Aunque los primeros trabajos sugirieron la presencia de licoperseno en *Neurospora crassa* y en algunas variedades de zanahoria, todas las investigaciones posteriores fallaron en detectar la presencia del mismo. Por el contrario, la evidencia acumulada hasta ahora soporta con más firmeza la idea de que no es el licoperseno sino el fitoeno (XVI) el primer compuesto  $C_{40}$  generado en el curso de la biosíntesis de carotenoides.



Escualeno (LIV)

7,8,11,12,15,7',8',11',12',15'-decahidro  
-5,5'-diapo- $\psi,\psi$ -caroteno



Licoperseno (LV)

7,8,11,12,15,7',8',11',12',15'-decahidro- $\psi,\psi$ -caroteno

## DESATURACION

Antes de que se hubieran determinado las estructuras de los productos intermedios, ya se había postulado un esquema (Porter y Lincoln, 1950) de la conversión gradual de un precursor saturado en carotenos de cada vez menor grado de saturación. El esquema de desaturación que ahora se acepta se muestra en la fig. 3. Esta secuencia implica la remoción de pares de átomos de hidrógeno alternadamente de ambos lados de la molécula de fitoeno (XVI), produciendo sucesivamente fitoflueno (XXV),  $\zeta$ -caroteno (XV), neurosporeno (XXVI) y finalmente licopeno (XIV). En algunos hongos y bacterias en lugar de  $\zeta$ -caroteno se forma el isómero asimétrico 7,8,11,12-tetrahidro- $\psi$ , $\psi$ -caroteno (LVI).

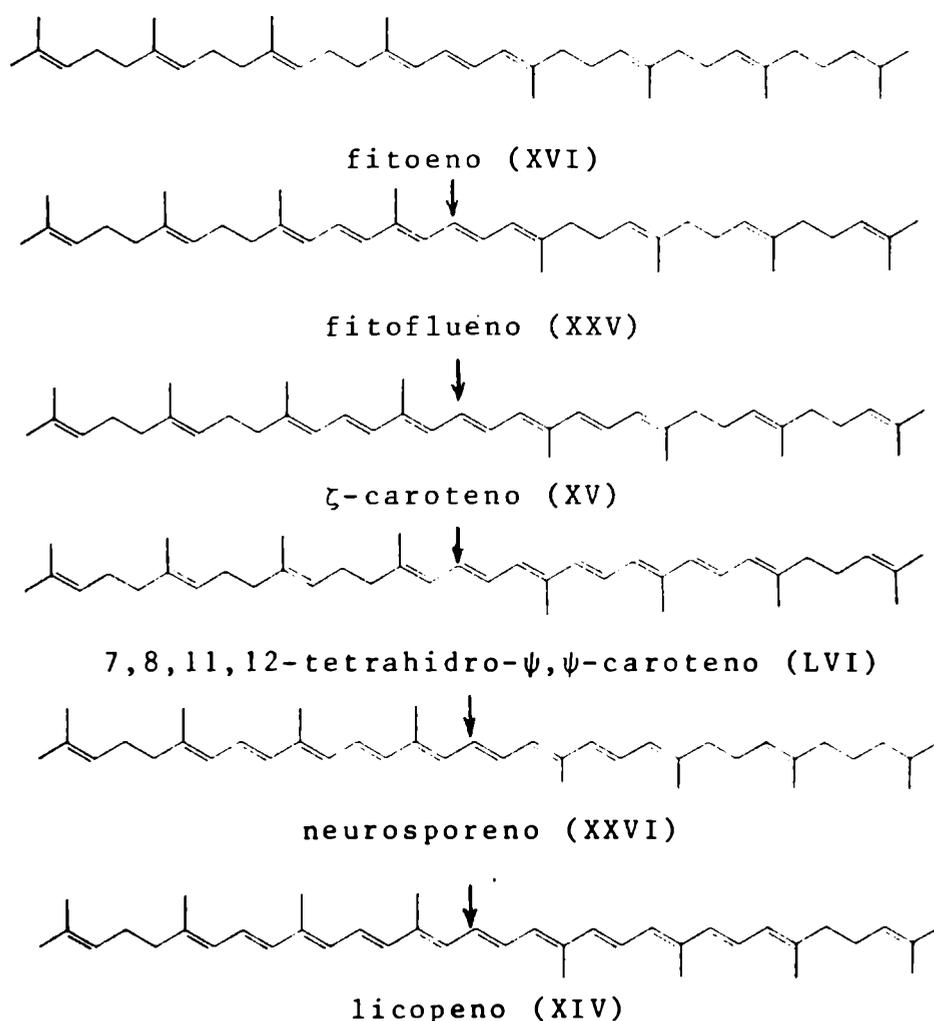


Figura 3. Esquema de desaturación gradual de fitoeno a licopeno

Hay de todos modos un hecho difícil de explicar a través del esquema de desaturación propuesto: el fitoeno de tomates, zanahorias y hongos es el isómero 15-*cis* (XXIV), mientras que los pigmentos normales más insaturados como licopeno (XIV) y  $\beta$ -caroteno (XII) son todo-*trans*. No obstante y en base a recientes experiencias se ha sugerido (Davies, 1973) que el isómero involucrado en la serie de desaturación es el *trans*-fitoeno (XVI), formado posiblemente por isomerización del 15-*cis*-fitoeno sintetizado previamente, mientras que el 15-*cis*-fitoeno se acumularía constituyendo esencialmente un reservorio metabólico inerte.

#### CICLACION

En los últimos años se ha acumulado una fuerte evidencia en apoyo del punto de vista propuesto por Porter y Lincoln (1950), en el sentido de considerar al licopeno (XIV) como el precursor acíclico inmediato de los carotenoides cíclicos. El mecanismo aceptado para la reacción de ciclación comprende en primer término el plegamiento de la molécula de tal modo que la doble unión existente entre los carbonos 1 y 2 quede espacialmente vecina a su similar establecida entre carbonos 5 y 6. En este momento se produce el ataque de  $C_2$  por parte de un protón, hecho que desencadena el proceso de ciclación para dar un "ion carbonio" intermediario, el que por pérdida de un protón de  $C_4$  o de  $C_6$  daría lugar a la formación de un anillo  $\epsilon$  o de un anillo  $\beta$ , respectivamente (fig. 4).

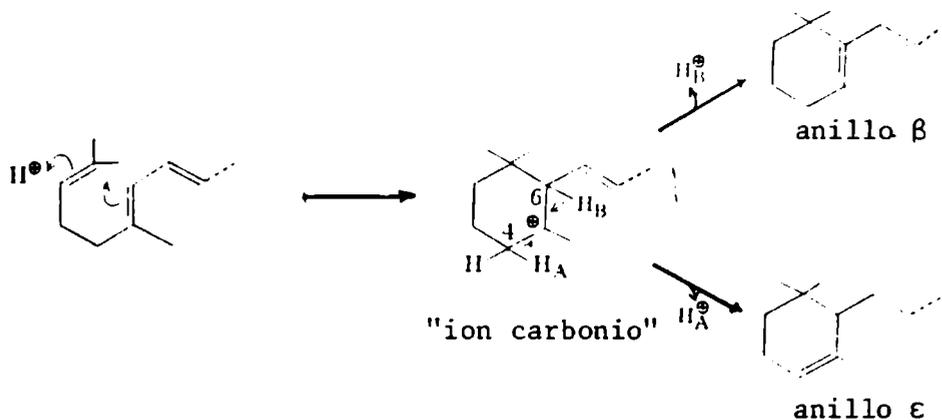


Figura 4. Mecanismo de ciclación

### HIDROXILACION EN C<sub>3</sub>

De los trescientos o más carotenoides naturales cuyas estructuras han sido determinadas, sólo unos cuarenta son hidrocarburos. El resto son xantofilas con al menos una función oxigenada en su molécula. Aunque las principales modificaciones estructurales, especialmente en los carotenoides cíclicos, involucran los carbonos 1 a 6 (átomos de carbono del anillo), no son raras las alteraciones de la cadena poliénica básica (v.g. creación de grupos alénicos o acetilénicos, hidroxilación de grupos metilo laterales). En la mayoría de estos casos el conocimiento biosintético que se posee es nulo y sólo se cuenta con algunos esquemas especulativos. Sin embargo existe alguna información bioquímica disponible en el caso de algunas reacciones, en especial en la hidroxilación en C<sub>3</sub>.

La característica estructural más saliente de las xantofilas de plantas superiores es precisamente la presencia de sustituyentes hidroxilados en los carbonos 3 y 3', como ocurre en la luteína (XXXIII) y la zeaxantina (XXXVII) o en carotenoides epoxídicos como la violaxantina (VII).

En general se ha aceptado que la introducción de los grupos hidroxilo ocurre en un estado avanzado de la vía biosintética; así luteína y zeaxantina se suponen originados por hidroxilación del  $\alpha$ -caroteno (XXXV) y del  $\beta$ -caroteno (XII), respectivamente. Este postulado ha recibido una confirmación experimental reciente (McDermott *et al.*, 1974) a través de estudios con inhibidores realizados sobre especies de *Flavobacterium*. Cuando este microorganismo -que produce normalmente zeaxantina como carotenoide principal- es cultivado en un medio con nicotina (que actúa como inhibidor de la ciclación) se acumula licopeno (XIV) y no hidroxilicopeno, como correspondería si la hidroxilación fuese previa a la ciclación. Al eliminar el inhibidor la ciclación tiene lugar y a expensas del licopeno acumulado se producen  $\beta$ -caroteno (en anaerobiosis) y zeaxan-

tina (en aerobiosis). Finalmente, si en ausencia de inhibidor se efectúa el cultivo en anaerobiosis para provocar acumulación de  $\beta$ -caroteno y posteriormente se pasa a condiciones aeróbicas, el  $\beta$ -caroteno es convertido en zeaxantina, confirmando que la hidroxilación es posterior a la ciclación. Mediante el uso de técnicas isotópicas se ha demostrado asimismo que el oxígeno necesario para que la hidroxilación tenga lugar no proviene del agua sino que es oxígeno molecular.

## APLICACIONES DE LOS CAROTENOIDES

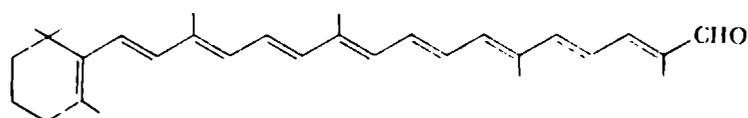
### COLORANTES DIRECTOS DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS

La mayoría de los vegetales y animales utilizados en la alimentación humana han sido provistos por la naturaleza de una dotación de pigmentos tan variada que la relación alimentos-color resulta inmediata e inevitable: el color amarillo fuerte de la yema de huevo y el rojo intenso del tomate maduro no pueden dejar de relacionarse con lo apetecible de su sabor. Es esta la causa por la que en la elaboración de productos alimenticios se adicionan colorantes, con el objeto de mejorar su aspecto.

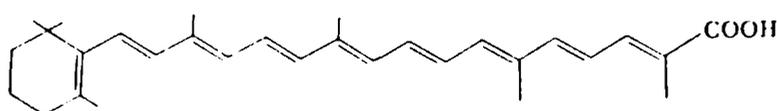
El Código Alimentario Argentino permite el uso de colorantes naturales y sólo como excepción (y en un restringido número de casos) el empleo de otro tipo de compuestos. Por ello y en razón de la elevada capacidad que poseen los carotenoides de comunicar su color a las sustancias con las que se hallen mezclados, esta clase de productos naturales se utiliza con mucha frecuencia en el proceso de elaboración de diferentes alimentos.

Los primeros carotenoides utilizados para dar color a los alimentos fueron incorporados en forma de extractos, pero este mé-

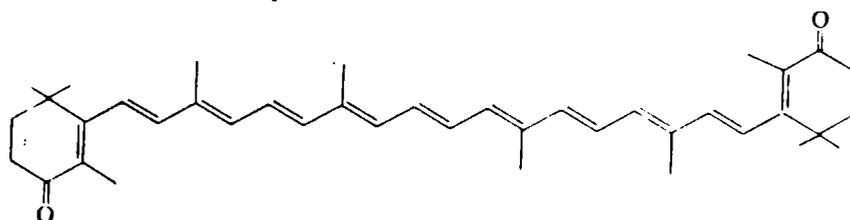
todo de aplicación tiene hoy un uso comercial limitado. Actualmente se sintetizan varios carotenoides en escala industrial, tales como el  $\beta$ -caroteno (XII), el  $\beta$ -apo-8'-carotenal (LVII), el éster etílico del ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenoico (LVIII) y la cantaxantina (LIX), lo que abarata notablemente los costos.



$\beta$ -apo-8'-carotenal (LVII)  
8'-apo- $\beta$ -caroten-8'-al



ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenoico (LVIII)  
8'-apo- $\beta$ -caroten-8'-oico



cantaxantina (LIX)  
 $\beta, \beta$ -caroten-4,4'-diona

Las dificultades de solubilidad y de estabilidad en el manipuleo de estas sustancias puras han sido resueltas preparándolas en dos formas: como suspensiones oleosas de cristales micropulverizados o como emulsiones conteniendo los carotenoides en soluciones sobresaturadas, lo que hace posible colorear alimentos con base tanto acuosa como lipídica.

El  $\beta$ -caroteno es utilizado en la coloración de productos alimenticios tan diversos como manteca, margarina, queso, helados, pastas, pan, aceites vegetales, salsas, yemas de huevo desecadas o congeladas, caramelos, alimentos dietéticos, jugos de frutas y bebidas.

El color natural de la manteca varía continuamente. Si no

se le agregaran colorantes durante su procesamiento, el color de este producto sería casi blanco en invierno y muy amarillo en verano, cuando los animales se nutren de pastos frescos. El  $\beta$ -caroteno que se le agrega permite mantener un color uniforme durante todas las épocas y además tiene acción provitamínica.

El  $\beta$ -caroteno comunica a las bebidas un color que simula el del jugo natural de naranja, mientras que el  $\beta$ -apo-8'-carotenal y especialmente sus combinaciones con el anterior proporcionan un tono anaranjado-rojizo más profundo que a menudo es preferido por los fabricantes de jugos de naranja artificiales. El ácido ascórbico ejerce un efecto estabilizante sobre el  $\beta$ -caroteno y el  $\beta$ -apo-8'-carotenal, contrastando en este sentido con la inestabilidad que presentan los colorantes F. D. & C. en presencia de dicho ácido y luz.

El  $\beta$ -apo-8'-carotenal se emplea para conseguir colores anaranjados o naranja-rojizos en pastelería, confituras y quesos. Solo o combinado con el  $\beta$ -caroteno proporciona una interesante gama de colores a distintos tipos de quesos. El color característico de la salsa tipo francesa no se logra con el  $\beta$ -caroteno pero sí con el  $\beta$ -apo-8'-carotenal. En cremas heladas el  $\beta$ -apo-8'-carotenal proporciona un agradable color durazno.

El elevado poder colorante de la cantaxantina se aprovecha en productos a base de tomates, como salsas, sopas, bebidas y conservas, así como para estandarizar la coloración de los productos elaborados. La cantaxantina puede proporcionar el color adecuado a las salchichas tipo Frankfurt con bajo contenido de carne y lo propio ocurre con otros embutidos. Este colorante también puede ser utilizado para simular el color de salsas de carne o de camarones.

En todos los casos el color resultante depende del contenido en grasas de los productos y de su color intrínseco.

Hasta aquí los carotenoides han sido discutidos como a-

ditivos colorantes individuales, pero su utilidad se hace aún mayor cuando se los emplea combinados con otros carotenoides, flavonoides, otros colorantes de alimentos permitidos (F. D. & C.) o concentrados de colorantes naturales (Bauernfeind, 1972).

El Comité de Expertos en Aditivos Alimenticios, organismo dependiente conjuntamente de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (WHO), basado en los datos de toxicidad crónica y en las especificaciones disponibles, han incluido al  $\beta$ -caroteno, al  $\beta$ -apo-8'-carotenal, al éster etílico del ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenoico y a la cantaxantina en la clase A, considerada aceptable para su uso en alimentación (solamente otros tres colorantes no naturales se incluyen en ella).

Bauernfeind (1974) recopiló y tabuló los resultados de una serie de estudios efectuados en un cierto número de alimentos en cuya elaboración se adicionaron carotenoides, consignando para cada producto el tipo de envase, el pigmento agregado, el momento y modo de adición y el contenido en dicho pigmento al concluir la elaboración y luego de su almacenamiento. El autor pudo comprobar que en general los carotenoides agregados como colorantes directos de alimentos son muy estables cuando los productos se elaboran siguiendo las técnicas industriales corrientes (en productos conservados a temperatura ambiente por un lapso de 12 meses, la concentración final de carotenoides osciló en los distintos casos entre el 88% y el 100% del valor inicial).

#### COLORANTES INDIRECTOS DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS

El término "pigmentante" referido a los carotenoides se emplea cuando al estar presentes o ser agregados a una ración animal dan color a ciertos tejidos del cuerpo en los cuales se acumulan.

El  $\beta$ -caroteno, además del importante papel que desempeña

como provitamina A, actúa también como pigmentante en las vacas lecheras. De la cantidad ingerida, lo que no se transforma en vitamina se almacena en el tejido adiposo y en la grasa de la leche como tal. Además del pigmento antes citado pueden encontrarse también  $\alpha$ -caroteno (XXXV),  $\beta$ -criptoxantina (XXXVI) y luteína (XXXIII).

Al igual que los mamíferos, las diferentes especies de aves pueden metabolizar los carotenoides ingeridos a vitamina A, pero a diferencia de aquéllos almacenan preferencialmente oxicarotenoides en el hígado, grasa corporal, huevos, piel, plumas y patas (Bauernfeind, 1972).

El pigmento amarillo-anaranjado de la yema del huevo no es sintetizado por la gallina, ni tampoco lo es el de las patas y piel de los pollos, sino que provienen de los oxicarotenoides contenidos en sus alimentos. Bajo condiciones naturales, los pollos obtienen estas sustancias de los pastos y plantas verdes, pero en los criaderos se recurre al uso de alimentos balanceados, donde el principal componente capaz de pigmentar es el maíz, que no siempre produce buenos resultados, a menos que se agreguen harina de alfalfa u otros aditivos.

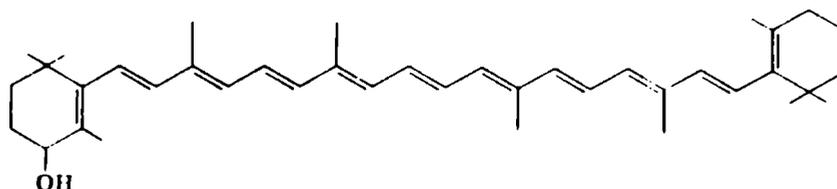
En los últimos años se efectuaron varios estudios para tratar de determinar el poder pigmentante de carotenoides puros (Bunnell y Bauernfeind, 1958; Nadai y Brubacher, 1970; Scott *et al.*, 1968 y Steinegger y Zanetti, 1957). De esta manera pudo comprobarse que tanto el éster etílico del ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenoico como el  $\beta$ -apo-8'-carotenal adicionados a la dieta de aves aumentan el color de la yema de los huevos (Marusich, 1967; Marusich y Bauernfeind, 1970), pero que el último no es efectivo para incrementar la pigmentación de la piel y patas de los pollos (Marusich, 1970; Marusich y Bauernfeind, 1970). La cantaxantina es eficaz en ambos sentidos, pero debe ser usada en combinación con otros carotenoides.

## ACCION PROVITAMINICA

Cuando los pigmentos sintetizados por las plantas son ingeridos por los animales pueden ser metabolizados de diferentes modos. Una transformación importante que se produce tanto en mamíferos como en pájaros, anfibios y peces es la conversión de ciertos carotenoides en vitamina A. La vitamina A es un compuesto exclusivamente animal, presente prácticamente en todas las especies, quienes sin embargo son incapaces de efectuar su síntesis *de novo*. Es esta la razón fundamental de su inclusión o de la de sus precursores en la dieta alimenticia.

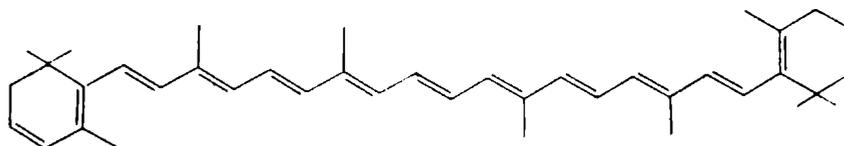
Tradicionalmente se ha aceptado que para que un carotenoide presente actividad provitamínica debe contar como mínimo con un anillo  $\beta$  sin sustituir, unido a una cadena poliénica de al menos once carbonos, pudiendo el otro extremo ser o no cíclico. Efectivamente, el  $\beta$ -caroteno (XII), con dos anillos  $\beta$ , es el carotenoide que presenta la mayor actividad, mientras que tanto el  $\alpha$ -caroteno (XXXV) como el  $\gamma$ -caroteno (I), con un solo anillo  $\beta$  no sustituido, tienen aproximadamente la mitad de dicho valor.

Sin embargo la introducción de oxígeno en la molécula en determinadas condiciones no provoca la desaparición de la actividad. Así los  $\beta$ -apo-carotenoides, productos intermedios de la degradación del  $\beta$ -caroteno a vitamina A (Glover y Redfearn, 1954), son biológicamente activos cuando se administran por vía bucal o parenteral; también son activos los correspondientes carotenales, ácidos carotenoicos y algunos ésteres. Asimismo el 5,6-epoxi- $\beta$ -caroteno (XXVIII), el 5,8-epoxi- $\beta$ -caroteno (XXX), el 5,6,5'6'-diepoxi- $\beta$ -caroteno (XXIX) y el 5,8,5',8'-diepoxi- $\beta$ -caroteno (XXXII) son precursores de la vitamina A a pesar de la alteración del anillo  $\beta$ , presumiéndose que *in vivo* estos compuestos son revertidos a  $\beta$ -caroteno. Otros carotenoides oxigenados tales como  $\beta$ -criptoxantina (XXXVI) e *isocriptoxantina* (LX) son también biológicamente activos.



isocriptoxantina (LX)  
 $\beta, \beta$ -caroten-4-ol

Surmatis *et al.* (1958) comprobaron que el agregado de un grupo metilo a ambos anillos  $\beta$  en posiciones 2 y 2' no destruye la actividad provitamínica, ni tampoco el reemplazo de un metilo por un etilo en las posiciones 1 y 1'. Sin embargo la sustitución de un metilo por un grupo isobutilo en posiciones 1 y 1' anula el carácter de provitamina. Finalmente la deshidrogenación del anillo  $\beta$  como en el caso del 3,4-dehidro- $\beta$ -caroteno (LXI) provoca disminución pero no pérdida de la acción provitamínica.



3,4-dehidro- $\beta$ -caroteno (LXI)  
 3,4-dehidro- $\beta, \beta$ -caroteno

La actividad se pierde totalmente cuando se produce hidrogenación completa de los anillos  $\beta$  y cuando grupos hidroxilo o cetona se hallan unidos a ambos anillos en posiciones 3 y 3' ó 4 y 4'. Una excepción a lo anterior es el elevado valor provitamínico de la astaxantina (VI) y la cantaxantina (LIX) en los peces (Gros y Budowski, 1966), hecho de significativa trascendencia en la cadena alimenticia marina.

## M A T E R I A L

Se estudiaron diecinueve especies que en forma silvestre o cultivada crecen en distintas áreas de la provincia de Buenos Aires, aún cuando el material destinado al análisis de carotenoides proviene exclusivamente de una zona ubicada entre La Plata y Buenos Aires.

La determinación de cada especie fue realizada sobre ejemplares completos, los que fueron destinados al herbario de la Cátedra de Botánica.

Diez de las especies investigadas pertenecen a la familia Compositae, tres a Cruciferae, dos a Leguminosae, una a Iridaceae, una a Oenotheraceae, una a Oleaceae y una a Ranunculaceae.

En la mayoría de los casos el material estuvo representado por las flores completas, con menor frecuencia por pétalos y excepcionalmente por inflorescencias, como en el caso de *Solidago chilensis*, donde razones de tamaño obligaron a procesar los capítulos enteros.

DESCRIPCION BOTANICA, PROCEDENCIA  
Y EPOCA DE RECOLECCION

*Bidens laevis* (L.) B.S.P. (Compositae)

Hierba anual o perenne, erecta, con tallos sencillos o poco ramosos, glabros, de 0,3 a 1 m de altura. Hojas simples, sésiles, lanceoladas y serradas. Capítulos radiados, grandes, largamente pedunculados, de flores amarillas (otoño). Común en regiones templado-cálidas de



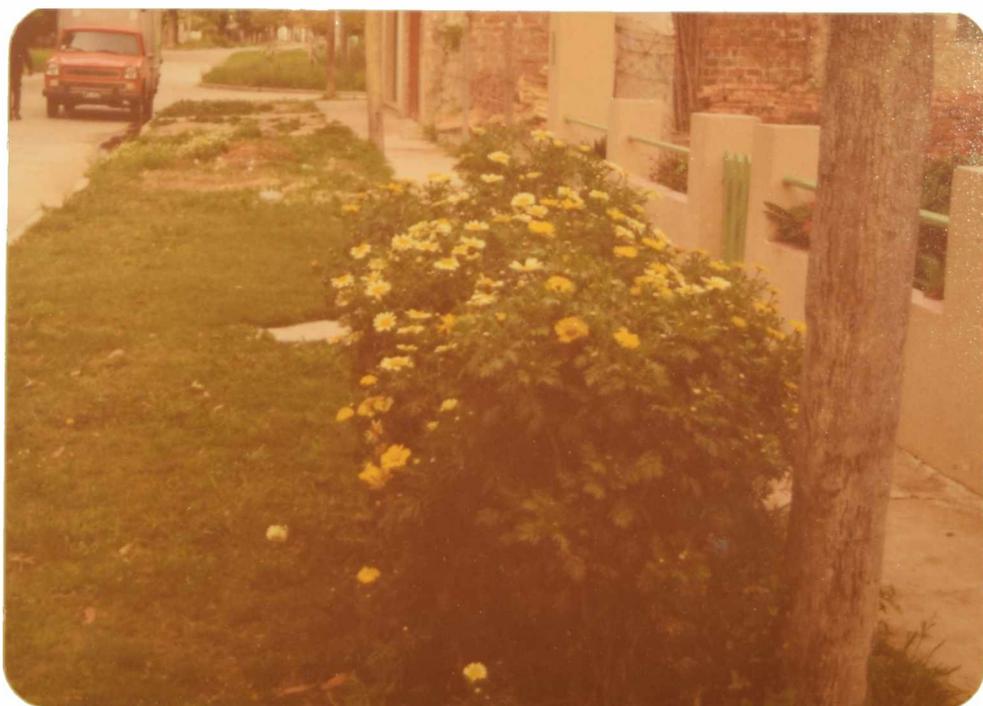
América, es frecuente encontrarla en lugares pantanosos y a orillas de cursos de agua (Cabrera, 1941).

Lugar y fecha de recolección: Plátanos, marzo de 1978.

Material seleccionado: flores.

*Chrysanthemum frutescens* L. (Compositae)

Arbusto leñoso, de 0,5 a 1,5 m de altura, muy ramificado, formando una copa globosa. Hojas bipinnadas, capítulos solitarios, terminales, de 3 a 5 cm de diámetro, con flores amarillas. Originaria de las Islas Canarias, florece durante todo el año, especialmente en invierno; n.v. "margarita amarilla" (Dimitri, 1978-80).



Lugar y fecha de recolección: Plátanos, octubre de 1979.

Material seleccionado: flores.

*Hypochoeris radicata* L. (Compositae)

Hierba perenne, con hojas dispuestas en rosetas y tallos escapiformes, más o menos ramificados. Hojas oblanceoladas, profundamente runcinadas. Capítulos solitarios en el extremo de las ramificaciones del escapo. Flores amarillas, liguladas. La especie es originaria de Europa y es adventicia en Sudamérica (Cabrera, 1941).

Lugar y fecha de recolección: Berazategui, enero de 1978.

Material seleccionado: flores.

*Picris echioides* L. (Compositae)

Hierba anual erecta, ramosa, densamente hojosa, de 0,5 a 1 m de altura, con tallos estriados y laxamente hirsutos. Hojas basales arrosetadas, pecioladas, las superiores sésiles y semiabrazadoras en la base. Capítulos de flores amarillas liguladas, isomorfos, dispuestos en cimas paucifloras en el ápice de las ramas. Originaria de la región Mediterránea, es adventicia en América (Cabrera, 1941).



Lugar y fecha de recolección: Berazategui, noviembre de 1977.

Material seleccionado: flores.

*Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less. var.  
*tripartitus* (DC.) Baker (Compositae)

Hierba perenne, con tallos erectos, glabros, estriados, ramosos en la parte superior y densamente hojosos, de 1,5 m de altura. Hojas alternas, sésiles y profundamente pinnatisectas. Capítulos muy numerosos, pedicelados, dispuestos en amplios corimbos. Flores amarillas, dimorfas: las marginales liguladas, las del disco tubulosas. Especie higrófila frecuente en la orilla de los arroyos y lagunas del Brasil, Uruguay y nordeste de la Argentina (Cabrera, 1941).



Lugar y fecha de recolección: Hudson, noviembre de 1977.  
Material seleccionado: flores.

*Senecio petasites* DC. (Compositae)

Planta subleñosa perenne, de 1 a 1,5 m de altura, pubescente. Hojas grandes, pecioladas, anchamente aovadas o suborbiculares, lobuladas, subcordadas en la base. Capítulos de 1 a 1,5 cm de diámetro reunidos en panojas terminales. Flores amarillas dimorfas. Originaria de México, cultivada en nuestro país (Dimitri, 1978-80).



Lugar y fecha de recolección: La Plata, agosto de 1978.

Material seleccionado: flores.

*Solidago chilensis* Meyen (Compositae)

Hierba perenne, rizomatosa, glabra, con tallos erectos, simples y delgados, de cerca de 1 m de altura. Hojas hasta el ápice, de forma lineal-lanceolada, enteras, trinervadas. Capítulos radiados pequeños y numerosos, dispuestos en panoja. Flores amarillas. Especie frecuente en América Austral; n.v.: "romerillo dorado" (Cabrera, 1941).



Lugar y fecha de recolección: Plátanos, marzo de 1978

Material seleccionado: capítulos.

*Sonchus asper* (L.) Hill (Compositae)

Hierba anual de 0,4 a 1 m de altura, con tallos ramosos. Hojas inferiores ovoido-lanceoladas, abrazadoras y auriculadas en la base, todas espinudo-dentadas en el margen. Capítulos numerosos, dispuestos en cimas en el ápice de los tallos. Flores amarillas, isomorfas, liguladas. Origenaria de Europa, adventicia en todas las regiones templadas (Cabrera, 1941).



Lugar y fecha de recolección: Hudson, noviembre de 1978.

Material seleccionado: flores.

*Tagetes erecta* L. (Compositae)

Planta anual glandulosa, de 0,5 m de altura, poco ramificada. Hojas pinnatífidas con los segmentos aserrados o enteros, lanceolados. Capítulos amarillos o anaranjados, de 6 a 8 cm de diámetro. Originaria de México, florece en verano y otoño; n.v.: "clavel japonés", "copete" (Dimitri (1978-80)



Lugar y fecha de recolección: Villa Elisa, noviembre de 1977.

Material seleccionado: flores amarillas y anaranjadas.

*Wedelia glauca* (Ort.) Hoffmann (Compositae)

Hierba perenne, rizomatosa, con tallos erectos, estriados, laxamente pubescentes, sencillos o poco ramosos, hojosos hasta el ápice, de 0,5 a 1 m de altura. Hojas opuestas, lanceoladas. Capítulos largamente pedicelados, solitarios en el extremo de las ramitas. Flores amarillas, dimorfas.



Especie frecuente en el sur del Brasil, en el Uruguay y en el norte y centro de Argentina; n.v. "sunchillo" (Cabrera, 1941).

Lugar y fecha de recolección: La Plata, noviembre de 1977.

Material seleccionado: flores.

*Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris* (L.) Hanchen.  
(Cruciferae)

Hierba anual glauca, glabra, de 0,3 a 1,2 m de altura. Hojas superiores oblongo-lanceoladas, agudas en el ápice, auriculadas y semibrazadoras en la base. Hojas inferiores lirado-pinnatífidas, con el lóbulo terminal muy grande y los laterales anchos y delgados. Flores amarillas, reunidas



en racimos en los que las flores abiertas superan a los pimpollos en altura. El fruto es una silicua terminada en un rostro indehisciente aseminado, de 5 a 6 cm de longitud. Originaria de Europa, adventicia en todas las regiones templadas. Florece a fines del invierno y en primavera; n.v.: "nabo", "mostacilla" (Cabrera y Zardini, 1978).

Lugar y fecha de recolección: Sarandí, septiembre de 1979.

Material seleccionado: flores.

*Rapistrum rugosum* (L.) All. (Cruciferae)

Hierba bienal, ramosa, pubescente, de 0,5 a 1,5 m de altura. Hojas inferiores lirado-pinnatífidas, las superiores lanceoladas. Flores amarillas pequeñas, dispuestas en largos racimos. El fruto es una silícula formada por dos artículos sobrepuestos, el superior globoso, rugoso, uniseminado e



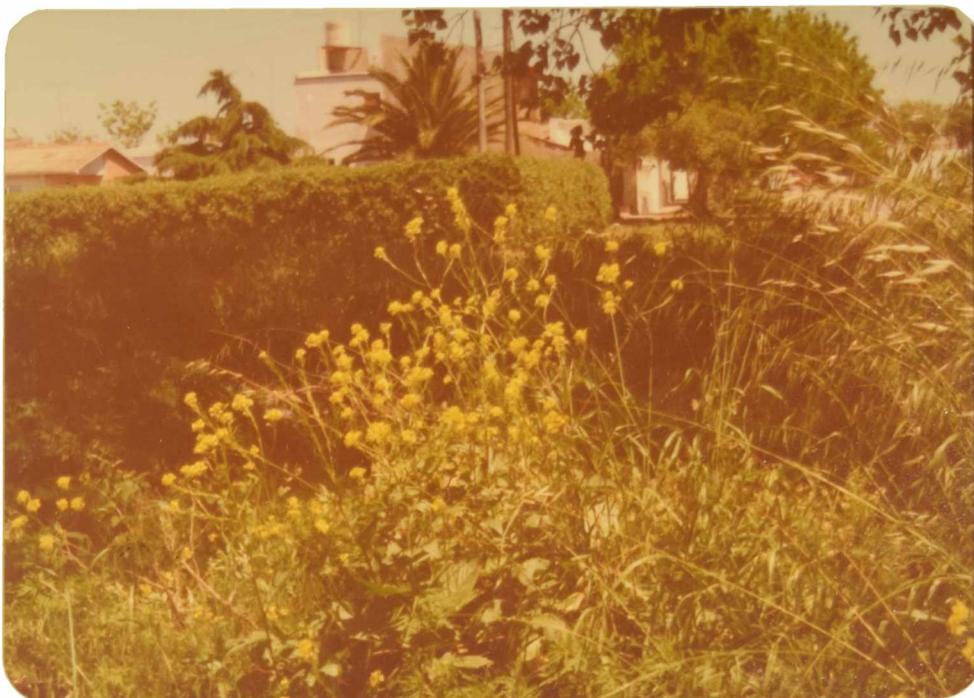
indehisciente. Originaria de Europa, adventicia en terraplenes y suelos modificados (Cabrera y Zardini, 1978)

Lugar y fecha de recolección: Hudson, noviembre de 1978.

Material seleccionado: flores.

*Sinapis arvensis* L. var. *schkuhriana* (Reichenb.)  
Hagenb. (Cruciferae)

Hierba anual,  
de 1 a 1,5 m de altura. Hojas inferiores lirado-pinnatifidas, las superiores ovado-lanceoladas, irregularmente dentadas. Flores amarillas dispuestas en racimos. El fruto es una silicua de 3 a 4 cm de longitud, largamente rostrada, con una semilla en la base



del rostro. Originaria de Europa, adventicia en América (Cabrera, 1953).

Lugar y fecha de recolección: La Plata, septiembre de 1979.

Material seleccionado: flores.

*Iris pseudacorus* L. (Iridaceae)

Hierba perenne,  
robusta, con rizoma corto y grueso. Hojas ensiformes, glaucas. Tallos floríferos de 0,6 a 0,9 m de altura, con varias hojas y varias espatas con dos a tres flores cada una. Tépalos amarillos de 5 a 7 cm de longitud. Originaria de Europa, frecuente en suelos inundables



del Delta y de la ribera del Plata (Cabrera y Zardini, 1978).

Lugar y fecha de recolección: Sarandí, septiembre de 1979.

Material seleccionado: tépalos.

*Lotus corniculatus* L. var. *tenuifolius* L.  
(Leguminosae)

Hierba perenne con tallos acostados y follaje verde-azulado, con hojas compuestas de tres folíolos apicales y dos basales (seudoestípulas). Flores estivales amarillas, pequeñas, dispuestas en umbelas 4-6 flores. Originaria de Europa, se ha naturalizado ampliamente en casi toda la



provincia de Buenos Aires, formando parte de praderas naturales, especialmente en suelos un tanto bajos y salobres (Burkart, 1952).

Lugar y fecha de recolección: Punta Lara, diciembre de 1979.

Material seleccionado: flores.

*Spartium junceum* L. (Leguminosae)

Arbusto originario del sur de Europa, de 3 a 4 m de altura y provisto de ramas delgadas, verdes, subáfilas, con flores amarillo-doradas de 2,5 cm de longitud, que florecen en primavera. Puede considerársela como planta semixerófila y calcífila; n.v. "retama" (Burkart, 1952).

Lugar y fecha de recolección: La Plata, noviembre de 1977.

Material seleccionado: pétalos.

*Oenothera affinis* Camb. (Oenotheraceae)

Planta erguida, anual o bienal, velluda, de 0,4 a 0,8 m de altura. Hojas linear-lanceoladas, agudas, dentadas, verde-grisáceas; las superiores sésiles. Flores nocturnas, amarillas, de 3 a 4 cm de diámetro. Originaria de Chile y Argentina, común en el Delta, junto a las vías férreas; n.v. "flor de la oración" (Dimitri, 1978-80).

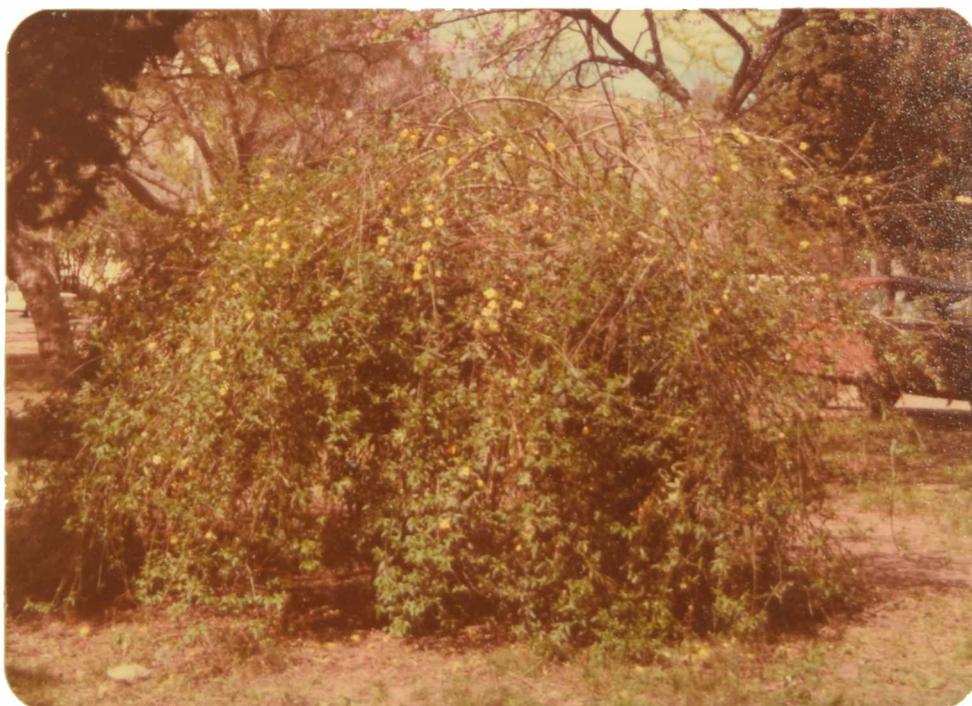


Lugar y fecha de recolección: Hudson, noviembre de 1978.

Material seleccionado: flores.

*Jasminum meznyci* Hance (Oleaceae)

Arbusto apoyante de ramas largas y sarmentosas. Hojas opuestas, glabras, compuestas de tres folíolos oblongo-lanceolados. Flores amarillas solitarias, de 3 a 5 cm de diámetro, simples o dobles. De origen incierto, florece en invierno; n.v. "jazmín amarillo" (Dimitri, 1978-80).



Lugar y fecha de recolección: La Plata, agosto de 1979.

Material seleccionado: flores.

*Ranunculus repens* L. (Ranunculaceae)

Hierba glabra,  
perenne, rastrera,  
palustre o subpalus-  
tre, estolonífera.

Hojas uni-, bi- o  
tripartidas, las in-  
feriores largamente  
pecioladas, las su-  
periores sésiles.

Flores amarillas de  
más o menos 2 cm de  
diámetro, termina-  
les. Cosmopolita,  
común en lugares  
húmedos y palustres;

n.v. "botón de oro" (Dimitri, 1978-80).

Lugar y fecha de recolección: Punta Lara, octubre de 1979.

Material seleccionado: pétalos.

ACONDICIONAMIENTO Y CONSERVACION  
DEL MATERIAL

Las muestras fueron mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  desde el momento de su recolección. Posteriormente el material fue liofilizado, por ser éste el único proceso de deshidratación que asegura la inalterabilidad de los pigmentos. El material desecado se pulverizó, tamizó y conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en frascos de cierre hermético y al abrigo de la luz.

## M E T O D O S

### ELECCION DEL METODO DE EXTRACCION Y SAPONIFICACION

Como ya ha sido consignado (c.f. "Extracción", pág. 15), en la elección del método de extracción importa el contenido de agua de la muestra. Por tratarse aquí de material seco no se utiliza acetona como solvente exclusivo, sino que se recurre a mezclas extractantes de menor polaridad.

En las flores las xantofilas se hallan parcial o totalmente esterificadas (Kuhn *et al.*, 1931) por lo que necesariamente debe procederse a saponificar la muestra. La saponificación puede llevarse a cabo conjuntamente con la extracción, tanto en frío como en caliente. En el primer caso la muestra puede dejarse en contacto con la mezcla extractante-saponificante durante toda la noche, o acelerar el proceso con agitación permanente, como proponen Knowles *et al.*, (1972), quienes además demostraron que los resultados obtenidos en ambos casos son equivalentes. La otra alternativa es la técnica desarrollada por Quackenbush y Miller (1972), que se lleva a cabo en caliente.

Si bien en un estudio colaborativo posterior Quackenbush

(1973) demuestra que ambos métodos son igualmente eficientes en el caso del gluten de maíz y de harina de alfalfa, no incluye una experiencia similar para la "harina" de flores de *Tagetes erecta*, en la que el contenido en carotenoides hidroxilados es muy elevado, en tanto es casi nula la proporción de carotenos. Este hecho nos sugirió la conveniencia de someter la muestra de *Tagetes erecta* a los dos métodos antes citados, que son descriptos a continuación.

#### Método en frío

Una pequeña cantidad (100 a 200 mg) de pétalos liofilizados y molidos se colocan en un erlenmeyer con tapa el que se le adicionan 30 ml de hexano-acetona (7:3), agitando durante 30 minutos en forma continua. Al cabo de ese tiempo se agregan 2 ml de hidróxido de potasio metanólico al 40% y se vuelve a agitar durante un minuto, dejando luego la mezcla en reposo durante otros 30 minutos. La fase orgánica superior se lleva a volumen de 100 ml con hexano (Knowles *et al.*, 1972).

#### Método en caliente

La misma cantidad de muestra se coloca en un matraz que contiene 30 ml de la mezcla hexano-acetona-etanol-tolueno (10:7:6:7) y un ml de agua y se agita vigorosamente durante un minuto. Luego se incorporan 2 ml de hidróxido de potasio metanólico al 40% y se vuelve a agitar un minuto más. Se adapta al balón un refrigerante a reflujo y se coloca dentro de un baño de agua a 56°C durante 20 minutos. La mezcla se pasa luego a una ampolla de decantación y el balón se lava 3 veces con 10 ml de hexano y otras tantas con igual cantidad de sulfato de sodio al 10%, incorporando a la ampolla los líquidos de lavado. Se agita para homogeneizar y se deja en reposo durante una hora. Al cabo de ese tiempo la fase orgánica superior se trasvasa a un matraz de 50 ml y se lleva a volumen con hexano (Quackenbush y Miller, 1972).

Alícuotas de ambos extractivos fueron fraccionadas y valoradas de acuerdo al procedimiento que se describe más adelante. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	Mét. en frío	Mét. en caliente
Carotenos	5,44 (81%)	0,07 (1,5%)
Pigmentos monohidroxilados	0,96 (14%)	0,83 (11,5%)
Pigmentos dihidroxilados	0,32 (5%)	3,77 (81,0%)
Carotenoides totales	6,72	4,67

Como puede observarse, los valores relativos obtenidos por uno y otro método son casi exactamente opuestos, predominando aparentemente los carotenos en el método en frío, mientras que en el método en caliente son los pigmentos dihidroxilados los más abundantes, con un porcentaje similar al de aquéllos. Esta aparente contradicción obedece a una deficiente saponificación en el método en frío, por lo que los carotenoides esterificados, que migran junto a los carotenos en el sistema cromatográfico empleado, aumentan artificialmente la proporción de éstos.

El mayor contenido en carotenoides totales del método en frío puede deberse a varias razones, entre ellas la extracción de sustancias coloreadas ajenas a los carotenoides. Naturalmente que no puede descartarse la destrucción parcial de algunos carotenoides al aplicar el método en caliente, pero aún así no puede dudarse de su elección en este caso pues asegura la saponificación completa de los ésteres presentes.

#### FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Se utiliza una columna de vidrio de 30 cm de largo y de 12,5 mm de diámetro interno que termina en un tubo capilar de 10 cm de largo y de 2 mm de diámetro interno. El conjunto está unido por medio de una conexión esmerilada a un kitasato graduado de 125 ml de capacidad, el que finalmente se conecta a la línea de vacío.

La mezcla adsorbente está integrada por sílica-gel "G" y kieselgur "G" (Merck) en iguales proporciones, la que previamente a su uso se homogeneiza mediante agitación magnética y se activa a 110°C durante una hora.

Antes de proceder al armado de la columna se obtura la zona de estrechamiento con un pequeño disco de papel de filtro y una vez hecho esto se incorpora la mezcla adsorbente hasta alcanzar la mitad de la altura de la columna. A continuación se aplica vacío y al mismo tiempo se compacta la columna de adsorbente presionando la superficie con un dispositivo adecuado, compuesto por una varilla con un extremo plano de igual diámetro que el diámetro interno de la columna, de tal manera que la altura final del adsorbente sea de 7 cm. Por el mismo procedimiento se deposita una capa adicional de sulfato de sodio anhidro de 1 cm de altura.

En la mayoría de los casos y previamente a la siembra cromatográfica los extractivos fueron concentrados en evaporador rotatorio a 40°C, según la concentración inicial de carotenoides. De acuerdo con ello el volumen del extractivo a ser cromatografiado puede oscilar entre 1 y 5 ml.

Una vez finalizada la siembra comienza a adicionarse el primer solvente de elución (hexano-acetona, 96:4), que debe mantener una altura constante de 10 cm por encima de la superficie de la columna. En este momento se conecta el sistema a la línea de vacío, hecho que provoca la elución de la primera fracción, representada por los carotenos. Cuando el volumen del eluato alcanza los 20 ml se interrumpe el vacío y se trasvasa a un matraz de 25 ml, donde se lleva a volumen con hexano. Cambiando el primer solvente por uno más polar (hexano-acetona, 90:10) y repitiendo el procedimiento anterior se consigue separar la segunda fracción, que contiene los pigmentos monohidroxilados. El agregado de un eluyente de mayor polaridad (hexano-acetona, 80:20) provoca la elución de los pigmentos dihidroxilados (Quackenbush *et al.*, 1970).

## VALORACION

Para estimar la cantidad de pigmentos contenida en cada una de las fracciones se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{A}{a \cdot l \cdot d} = \text{mg de carotenoides/g de muestra}$$

A = absorbancia de la solución (a 436 nm para carotenos y 474 nm para xantofilas)

a = coeficiente de extinción específico/10 (196 para carotenos y 236 para xantofilas)

l = longitud de la celda (1 cm)

d = factor de dilución:

$$\frac{\text{peso de la muestra (g)} \cdot \text{alícuota sembrada (ml)}}{\text{vol. total del extractivo (ml)} \cdot \text{vol. final del eluato (ml)}}$$

El contenido en carotenoides totales resulta de sumar los de cada una de las fracciones separadas.

## RESULTADOS

La información sobre el contenido en carotenoides totales (CT), carotenos (C), pigmentos monohidroxiados (MHP) y dihidroxiados (DHP) de las especies estudiadas se consigna en la tabla I. Los resultados se expresan como miligramos de pigmento por gramo de peso seco de muestra, determinándose asimismo la cantidad relativa de cada uno de ellos. Teniendo en cuenta que los pigmentos monohidroxiados exhiben aproximadamente un 50% de la capacidad que como pigmentantes de aves muestran los dihidroxiados, se ha considerado de interés incluir el valor que resulta de adicionar a éstos la mitad del contenido de los primeros ( $1/2$  MHP + DHP), al que Quackenbush *et al.* (1970) denominaran "DHP equivalente".

La tabla II ofrece una expresión gráfica de los resultados obtenidos. En la primera columna se representa para cada especie el contenido en carotenoides totales, en la segunda se indica la relación porcentual de las tres fracciones y la última corresponde al "DHP equivalente" relativo.

E S P E C I E S E S T U D I A D A S

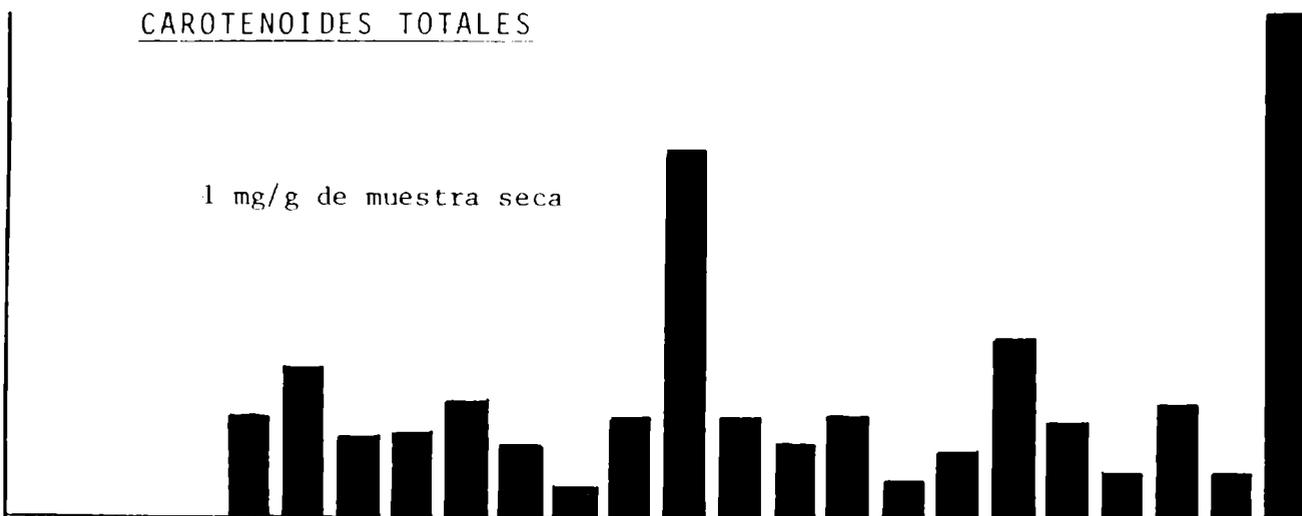
	CANTIDAD DE PIGMENTOS (mg/g de muestra seca)				CANTIDAD RELATIVA DE CADA PIGMENTO				
	CT	C	MHP	DHP	1/2 MHP + DHP	C	MHP	DHP	1/2 MHP + DHP
<b>COMPOSITAE</b>									
<i>Bidens laevis</i> (L.) B.S.P.	1,21	0,14	0,39	0,68	0,88	11,6	32,2	56,2	72,3
<i>Chrysanthemum frutescens</i> L.	1,88	0,36	0,97	0,55	1,03	19,1	51,6	29,3	55,1
<i>Hypochoeris radicata</i> L.	0,94	0,84	0,02	0,08	0,09	89,4	2,1	8,5	9,6
<i>Picris echinoides</i> L.	1,07	1,02	0,02	0,03	0,04	95,3	1,9	2,8	3,8
<i>Senecio brasiliensis</i> (Spreng.) Less. var. <i>tripartitus</i> (DC.) Baker	1,33	0,02	0,04	1,27	1,29	1,5	3,0	95,5	97,0
<i>Senecio petasites</i> DC.	0,85	0,83	0,01	0,01	0,02	97,7	1,2	1,1	1,8
<i>Solidago chilensis</i> Meyen	0,33	0,01	0,03	0,29	0,31	3,0	9,1	87,9	92,5
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	1,20	0,03	0,15	1,02	1,09	2,5	12,5	85,0	91,2
<i>Tagetes erecta</i> L. (fl. anaranjadas)	4,67	0,07	0,83	3,77	4,19	1,5	17,8	80,7	89,6
<i>Tagetes erecta</i> L. (fl. amarillas)	1,23	0,03	0,27	0,93	1,07	2,4	22,0	75,6	86,6
<i>Wedelia glauca</i> (Ort.) Hoffmann	0,90	0,76	0,01	0,13	0,14	84,4	1,1	14,5	15,1
<b>CRUCIFERAE</b>									
<i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>sylvestris</i> (L.) Hanchen.	1,41	tr.	tr.	1,41	1,41	tr.	tr.	100,0	100,0
<i>Rapistrum rugosum</i> (L.) All.	0,37	0,02	0,03	0,32	0,34	5,4	8,1	86,5	90,5
<i>Siapiis arvensis</i> L. var. <i>schikwhiana</i> (Reichenb.) Hagenb.	0,81	0,05	0,04	0,72	0,74	6,2	4,9	88,9	91,4
<b>IRIDACEAE</b>									
<i>Iris pseudacorus</i> L.	2,24	0,10	0,24	1,90	2,02	4,5	10,7	84,8	90,1
<b>LEGUMINOSAE</b>									
<i>Lotus corniculatus</i> L. var. <i>tenuifolius</i> L.	1,18	1,08	0,01	0,09	0,10	91,5	0,9	7,6	8,1
<i>Spartium junceum</i> L.	0,53	0,48	0,01	0,04	0,05	90,6	1,9	7,5	8,5
<b>OENOTHERACEAE</b>									
<i>Oenothera affinis</i> Camb.	1,41	0,07	0,33	1,01	1,18	5,0	23,4	71,6	83,3
<b>OLEACEAE</b>									
<i>Jasminum meznisi</i> Hance	0,60	tr.	0,04	0,56	0,58	tr.	6,7	93,3	96,7
<b>RANUNCULACEAE</b>									
<i>Ranunculus repens</i> L.	6,50	0,04	0,06	6,40	6,43	0,6	0,9	98,5	98,9

CT: carotenoides totales, C: carotenos, MHP: pigmentos monohidroxiados, DHP: pigmentos dihidroxiados, tr.: trazas

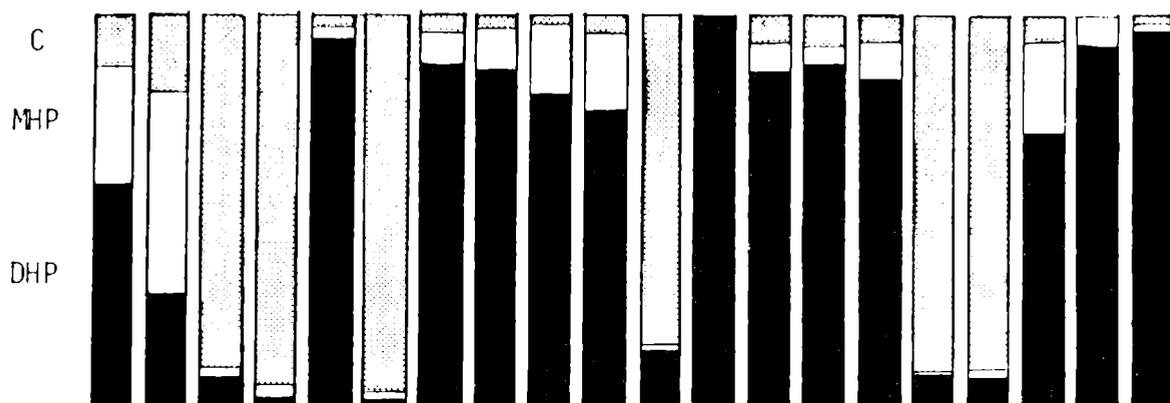
Tabla I. Expresión numérica de los resultados

CAROTENOIDES TOTALES

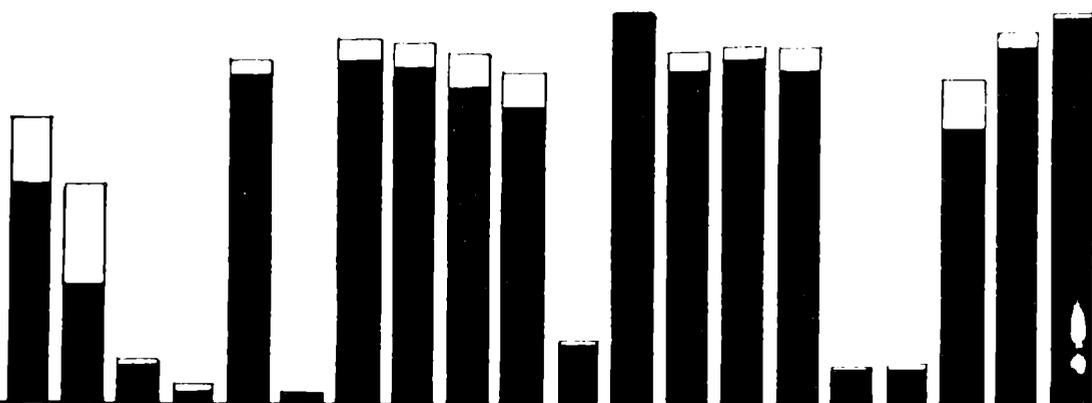
1 mg/g de muestra seca



CANTIDAD RELATIVA DE CADA FRACCION



VALORES RELATIVOS DE DHP EQUIVALENTE



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Compositae

1. *Bidens laevis*, 2. *Chrysanthemum frutescens*, 3. *Hypochoeris radicata*, 4. *Picris echioides*, 5. *Senecio brasiliensis* var. *tripartitus*, 6. *Senecio petasites*, 7. *Solidago chilensis*, 8. *Senchus asper*, 9. *Tagetes erecta* (fl. anaranjadas), 10. *T. erecta* (fl. amarillas), 11. *Wedelia glauca*

Cruciferae

12. *Brassica rapa* subsp. *sylvestris*, 13. *Rapistrum rugosum*, 14. *Sinapis arvensis* var. *schkubiriana*

Iridaceae

15. *Iris pseudacorus*

Leguminosae

16. *Lotus corniculatus* var. *tenuifolius*, 17. *Spartium junceum*

Oenotheraceae

18. *Oenothera affinis*

Oleaceae

19. *Jasminum meznii*

Ranunculaceae

20. *Ranunculus repens*

Tabla II. Expresión gráfica de los resultados

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se ha estudiado el contenido en carotenoides totales, carotenos y pigmentos monohidroxilados y dihidroxilados de un grupo de especies que crecen en estado silvestre o que se cultivan en la provincia de Buenos Aires.

Independientemente del efectivo aporte al conocimiento fitoquímico de nuestra Flora, los objetivos del trabajo han estado dirigidos a la búsqueda de especies con un contenido destacado en carotenoides hidroxilados, que son los que poseen mayor poder pigmentante al ser incorporados a la dieta de aves de corral.

Existen estudios previos sobre cinco de las diecinueve especies incluídas en el presente trabajo, pero sólo en *Hypochoeris radicata* y *Tagetes erecta* se provee información cuantitativa. La inclusión de *T. erecta*, fuente principal de carotenoides cuando se los utiliza como colorantes indirectos de alimentos, obedece a la necesidad de disponer de un "patrón biológico" con el que puedan compararse los resultados obtenidos con las demás especies.

*Tagetes erecta* ha sido objeto de numerosos estudios, pero los resultados no siempre son coincidentes. Alam *et al.* (1968) encuentran que luteína (64%) y anteraxantina (31%), ambos pigmen-

tos dihidroxilados, representan la casi totalidad de los carotenoides presentes. Por el contrario, Valadon y Mummery (1967) sostienen que el pigmento predominante es el 5,6-epoxi- $\beta$ -caroteno, afirmación que es refutada por Quackenbush y Miller (1972), quienes argumentan que tales resultados obedecen a una deficiente saponificación de los ésteres de las xantofilas presentes, que los hace aparecer como carotenos o sus epóxidos al examen cromatográfico.

Los resultados obtenidos al analizar en el presente trabajo muestras de flores amarillas y anaranjadas de *T. erecta*, aplicando un procedimiento similar al de Quackenbush y Miller (1972), son inferiores en un 23% a los consignados por estos autores, pero las proporciones de las fracciones de diferente grado de oxidación concuerdan estrechamente. Debe señalarse, empero, que los especímenes estudiados provienen de un cultivo destinado a fines exclusivamente ornamentales. El contenido relativo en carotenoides totales corresponde a lo esperado: las plantas con flores anaranjadas contienen casi tres veces más pigmentos que las de flores amarillas (4,67 y 1,23 mg/g de peso seco, respectivamente).

De las nueve especies restantes de Compositae analizadas, sólo *Hypochoeris radicata* ha sido estudiada previamente (Valadon y Mummery, 1967). Los valores de carotenoides totales consignados por estos autores resultan considerablemente más altos (3,87 mg/g), pero la diferencia más significativa estriba en que los pigmentos preponderantes son los carotenoides dihidroxilados, en tanto que en nuestro caso la fracción mayor está representada por los carotenos (89,4%).

*Chrysanthemum frutescens* merece destacarse tanto por su alto contenido en carotenoides totales (1,88 mg/g, el más elevado de las especies estudiadas de esta familia, excepción hecha de *Tagetes erecta*) como por ser la única en la que la fracción más abundante (51,6%) son los pigmentos monohidroxilados. Valadon y Mummery (1971), estudiando especies afines, encontraron elevados valores

de carotenoides totales en *Ch. coronarium* (2,61 mg/g), *Ch. segetum* (6,97 mg/g) y *Ch. carinatum* (10,53 mg/g), prevaleciendo siempre los carotenos.

Las dos especies de *Senecio* estudiadas se comportan en forma diametralmente opuesta: *S. brasiliensis* var. *tripartitus*, con una cantidad aceptable de carotenoides totales (1,33 mg/g), tiene sólo 1,5% de carotenos, en tanto que en *S. petasites*, donde el rendimiento es menor (0,85 mg/g), los carotenos representan el 97,7% del total. Solamente otras dos especies de *Senecio* han sido analizadas: *S. doronicum* (Karrer y Notthafft, 1932), donde simplemente se constata la presencia de zeaxantina y *S. scandens* (Valadon y Mummery, 1967), con más bajo contenido en carotenoides totales (0,67 mg/g) y mayoría de carotenos y epoxicarotenos.

*Bidens laevis* tiene una discreta cantidad de carotenoides totales (1,21 mg/g), con predominio de pigmentos dihidroxilados (56,2%) y una proporción importante de pigmentos monohidroxilados (32,2%). Valadon y Mummery (1971) estudiaron *B. ferulaefolia*, que contiene 5,76 mg/g de carotenoides totales, entre los que prevalecen los carotenos y sus epóxidos.

*Solidago chilensis* es la especie con menos carotenoides totales (0,33 mg/g), representados casi exclusivamente por dihidroxicarotenoides. Valadon y Mummery (1971) encontraron que en *S. canadensis* existe una mayor cantidad de carotenoides totales (1,47 mg/g), con ligero predominio de pigmentos dihidroxilados.

Las últimas tres especies de Compositae estudiadas tienen un contenido similar en carotenoides totales, siendo algo mayor en *Sonchus asper* (1,20 mg/g) que en *Picris echinoides* (1,07 mg/g) y en *Wedelia glauca* (0,90 mg/g). En *S. asper* es alto el valor de dihidroxi-carotenoides y muy bajo el de carotenos, en tanto que las otras dos especies muestran un comportamiento exactamente opuesto. No se tienen referencias de estudios sobre carotenoides florales de especies pertenecientes a los tres géneros mencionados.

El contenido en carotenoides totales varía considerablemente en las tres especies de Cruciferae estudiadas, siendo relativamente pequeño (0,37 mg/g) en *Rapistrum rugosum*, algo más del doble (0,81 mg/g) en *Sinapis arvensis* var. *schkuhriana* y casi tres veces mayor (1,41 mg/g) en *Brassica rapa* subsp. *sylvestris*. La cantidad relativa de pigmentos dihidroxilados es considerablemente elevada en los tres, llegando en la última de ellas prácticamente al 100%. El único antecedente respecto a Cruciferae lo constituye la determinación de violaxantina en *Sinapis officinalis* (Karrer y Notthafft, 1932).

*Iris pseudacorus* ya ha sido objeto de un análisis cualitativo anterior (Drumm y O'Connor, 1945), en el que se indica la presencia de  $\beta$ -caroteno, violaxantina y luteína. En nuestro caso hemos comprobado que se trata de una especie buena productora de carotenoides (2,24 mg/g), en la que hay un amplio predominio de pigmentos dihidroxilados.

También las dos especies de Leguminosae han sido estudiadas previamente, sin aportar información acerca de la cantidad de pigmentos presentes: en *Lotus corniculatus* (Karrer et al., 1947) se menciona la existencia de  $\beta$ -caroteno, violaxantina, luteína y un epóxido de ésta, mientras que en *Spartium junceum* (Spada y Cameroni, 1957) se han identificado además  $\alpha$ -caroteno y su epóxido, flavoxantina y crisantemaxantina, pero no violaxantina. En el presente trabajo se ha podido establecer que existe una marcada diferencia en el contenido total de carotenoides, que es de 1,18 mg/g en *Lotus corniculatus* var. *tenuifolius* y de 0,53 mg/g en *Spartium junceum*. No obstante la proporción relativa de las fracciones de distinto grado de oxidación es coincidente, donde los carotenos tienen amplio predominio.

Con respecto a Oenotheraceae, el único antecedente es un trabajo de Chrometzka (1971), en el que se analizan los carotenoides de alrededor de una docena de especies e híbridos interes-

pecíficos de *Oenothera*, agrupados en tres series de acuerdo a la tonalidad de sus flores: "amarillo normal", "azufrada" y "oro viejo". El rendimiento informado sobre el contenido en carotenoides totales es sorprendentemente elevado, ya que oscila entre 4,5 y 5 mg/g de peso fresco de flores, mientras que la proporción de carotenos varía entre 31,5% y 48,2% y la de hidroxicarotenoides lo hace entre 51,8% y 68,5%. Los resultados obtenidos con *Oenothera affinis* no son comparables con los que el autor antes citado señala para otras especies del género: en primer lugar el contenido total de carotenoides es considerablemente menor (1,41 mg/g de peso seco de flores) y por otra parte el porcentaje de carotenos es mucho más bajo (5%).

Sólo existen trazas de carotenos en las flores de *Jasminum meznayi*, que resultaría ser una especie promisoría en cuanto a su capacidad pigmentante, de no ser por su bajo contenido en carotenoides totales (0,60 mg/g). Únicamente se ha estudiado con anterioridad una especie de Oleaceae, *Osmanthus fragrans* (Suzuki y Tsukida, 1959), en la que sólo se han identificado algunos carotenos.

De todas las especies analizadas, *Ranunculus repens* resulta ser la más importante por su rendimiento en carotenoides (6,50 mg/g), superior incluso a la producción de *Tagetes erecta*, que como ya se ha mencionado es la fuente tradicional en cuanto a su aplicación como pigmentante de aves de corral. También supera a esta última especie en la proporción de dihidroxicarotenoides, que alcanza a 98,5%. Aún cuando se han estudiado otras cuatro especies de *Ranunculus* (c.f. pág. 40), no se acompañan datos cuantitativos.

Resulta procedente efectuar, por fin, un análisis comparado del comportamiento de las especies estudiadas. En cuanto a la cantidad total de carotenoides y como se acaba de señalar, *Ranunculus repens* es la especie de mayor producción (6,50 mg/g), que

es el triple de *Iris pseudacorus* (2,24 mg/g). El rendimiento del resto de las especies es inferior a los 2 mg/g, de las cuales la mitad es incluso menor que 1 mg/g. *Solidago chilensis* resulta ser la especie más pobremente dotada en este aspecto (0,33 mg/g).

Si bien el conocimiento de la cantidad total de carotenoides presentes proporciona una información preliminar valiosa para la posible elección de una especie como fuente de este tipo de productos naturales, atendiendo a su aplicación como pigmentantes de aves resulta decisiva la proporción de pigmentos hidroxilados. En este sentido adquieren fundamental importancia los valores absolutos de los respectivos "DHP equivalentes", por lo que a *Ranunculus repens* (6,43 mg/g) e *Iris pseudacorus* (2,02 mg/g) deberían agregarse *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* (1,41 mg/g), *Senecio brasiliensis* var. *tripartitus* (1,29 mg/g), *Oenothera affinis* (1,18 mg/g), *Sonchus asper* (1,09 mg/g) y *Chrysanthemum frutescens* (1,03 mg/g) como especies promisorias en cuanto a su posible explotación como fuente alternativa de xantofilas.

*Mateo*

## REFERENCIAS

## BIBLIOGRAFICAS

- Aasen, A. J. y S. Liaaen-Jensen (1965) Acta Chem. Scand. 19: 1843-53
- Aasen, A. J. y S. Liaaen-Jensen (1966) Acta Chem. Scand. 20: 2322-4
- Alam, A. U., J. R. Couch y C. R. Creger (1968) Can. J. Bot. 46:  
1539-41
- Andreeva, L. G. (1961) Aptekhnol. Delo 10: 46-9 (C.A. 56, 1769d)
- Arpin, N. (1968) "Les caroténoïdes des discomycètes: Essai chimio-  
taxonomique", Université de Lyon (citado por Davies (1976)  
pág. 156)
- Baraud, J. (1958) Rev. Gen. Bot. 65: 221-43
- Bauernfeind, J. C. (1972) Agr. Food Chem. 20: 456-73
- Bauernfeind, J. C. (1974) en "The Encyclopedia of Food Technology"  
(A. H. Johnson y M. S. Peterson, eds.) The Avi Publ. Co. Inc.,  
Westport, Connecticut, págs. 163-73
- Booth, V. H. (1957) Biochem. J. 65: 660-3
- Booth, V. H. (1964) Phytochemistry 3: 229-34
- Britton, G. (1976) en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments"  
(T. W. Goodwin, ed.), vol. 1, págs. 262-327. Academic Press,  
London
- Britton, G. y T. W. Goodwin (1971) Meth. Enzymol. 18C: 654-706
- Brooks, J. y G. Shaw (1978) Grana 17: 91-7
- Buchecker, R. y C. H. Eugster (1977) Helv. Chim. Acta 60: 1754-7
- Bunnell, R. H. y J. C. Bauernfeind (1958) Proc. 11th. World's Poul-  
try Congress, Mexico (citado por Bauernfeind (1972) pag. 467)
- Burkart, A. (1952) "Las Leguminosas Argentinas Silvestres y Culti-  
vadas" (2da. ed.) Acme Agency, Buenos Aires

- Burnett, J. H. (1976) en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T. W. Goodwin, ed.), vol. 1, págs. 655-79. Academic Press, London
- Cabrera, A. L. (1941) "Compuestas Bonaerenses" Revista del Museo de La Plata (n.s.) Tomo IV, Sección Botánica, N° 17
- Cabrera, A. L. (1953) "Manual de la Flora de los alrededores de Buenos Aires", Editorial Acme, Buenos Aires
- Cabrera, A. L. y E. M. Zardini (1978) "Manual de la Flora de los alrededores de Buenos Aires" (2da. ed.), Editorial Acme, Buenos Aires
- Cameroni, R. y M. T. Bernabei (1957) Atti. Soc. Nat. e Mat. Modena 87-88: 125-31 (C.A. 53, 15215c)
- Cholnoky, L. y J. Szabolcs (1959) Ann. 626: 206-15
- Chrometzka, P. (1971) Theor. Appl. Genet. 41: 205-7
- Curl, A. L. (1953) J. Agr. Food Chem. 1: 456-60
- Curl, A. L. y G. F. Bailey (1961) J. Agr. Food Chem. 9: 403-5
- Davies, B. H. (1967) Biochem. J. 103: 51-2P
- Davies, B. H. (1973) Pure appl. Chem. 35: 1-28
- Davies, B. H. (1976) en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T. W. Goodwin, ed.) vol. 2, págs. 38-165, Academic Press, London
- Davies, B. H., S. Matthews y J. T. O. Kirk (1970) Phytochemistry 9: 797-805
- Demuth, P. y F. Santamour (1978) Bull. Torrey Bot. Club 105: 65-6
- Dimitri, M. J. (1978-80) "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería (3a. ed.) Tomo I, vols. 1 y 2, Editorial Acme, Buenos Aires
- Drumm, P. J. y W. F. O'Connor (1945) Biochem. J. 39: 211-2
- Egger, K. (1962) Planta 58: 664-7
- Egger, K. (1964) Ber. Dt. Bot. Gess. 77: 145-50
- El-Tiney, A. H. y C. O. Chichester (1970) J. Org. Chem. 35: 2290-3
- Entschel, R. y P. Carrer (1958) Helv. Chim. Acta 41: 402-3

- Foppen, F. H. (1971) *Chromatog. Revs.* 14: 133-298
- Glover, J. y E. R. Redfearn (1954) *Biochem. J.* 58: 15P
- Goodwin, T. W. (1950) *Biol. Rev.* 25: 391-413
- Goodwin, T. W. (1954) *Biochem. J.* 58: 90-4
- Goodwin, T. W. (1956) en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T. W. Goodwin, ed.) vol. 1, págs. 225-261, Academic Press, London
- Goodwin, T. W. y D. M. Thomas (1964) *Phytochemistry* 3: 47-50
- Grangaud, R. e I. Garcia (1952) *Compt. Rend. Soc. Biol.* 146: 1577-9
- Gros, J. y P. Budowski (1966) *Biochem. J.* 101: 747-54
- Hager, A. y H. Stransky (1970) *Arch. Mikrobiol.* 71: 132-63
- Hanny, B. W., R. D. Henson, A. C. Thompson, R. C. Gueldner y P. A. Hedin (1972) *J. Agr. Food Chem.* 20: 914-6
- Hepper, C. M. y B. G. Audley (1969) *Biochem. J.* 114: 379-86
- Higgins, M. J. P. y R. G. O. Kekwick (1973) *Biochem. J.* 134: 295-310
- Inhoffen, H. H., H. Pommer y F. Bohlmann (1950 a) *Justus Liebig's Annln. Chem.* 569: 237-46
- Inhoffen, H. H., H. Pommer y F. Westphal (1950 b) *Justus Liebig's Annln. Chem.* 570: 69-72
- Jensen, A. y S. Liaaen-Jensen (1959) *Acta Chem. Scand.* 13: 1863-8
- Joshi, P. C. (1953) *J. Indian Bot. Soc.* 32: 17-20
- Jungalwala, F. B. y H. R. Cama (1962) *Biochem. J.* 85: 1-8
- Karrer, P. y C. H. Eugster (1950) *Helv. Chim. Acta*, 33: 1172-4
- Karrer, P. y E. Jucker (1944) *Helv. Chim. Acta* 27: 1585-8
- Karrer, P. y E. Jucker (1947) *Helv. Chim. Acta* 30: 1774-5
- Karrer, P. y E. Jucker (1950) "Carotenoids" Elsevier Publ., New York & Amsterdam
- Karrer, P. y A. Notthafft (1932) *Helv. Chim. Acta* 15: 1195-204
- Karrer, P. , E. Jucker, J. Rutschman y K. Steinlin (1945) *Helv. Chim. Acta* 28: 1146-56

- Karrer, P., E. Jucker y E. Krause-Voith (1947) *Helv. Chim. Acta* 30: 537-8
- Kleining, H. y H. Nitsche (1968) *Phytochemistry* 7: 1171-5
- Knowles, R., A. Livingston y G. Kohler (1972) *J. Agr. Food Chem.* 20: 1127-9
- Kuhn, R. y E. Lederer (1931) *Z. Physiol. Chem.* 200: 108-14
- Kuhn, R. y E. Lederer (1932) *Z. Physiol. Chem.* 213: 188-91
- Lang, W. (1970) *Z. Pflanzenphysiol.* 62: 299-301
- Liaaen-Jensen, S. (1962) *K. Norske Vidensk Selsk. Forh.* n° 8  
(citado por Davies, 1976)
- Liaaen-Jensen, S. (1971) en "Carotenoids" (O. Isler, ed.) págs.  
61-188, Birkhäuser, Basle
- Marusich, W. L. (1967) *Feedstuffs* 39: 48 (citado por Bauernfeind,  
1972)
- Marusich, W. L. (1970) *Feedstuffs* 42: 30 (citado por Bauernfeind,  
1972)
- Marusich, W. L. y J. C. Bauernfeind (1970) *Poultry Sci.* 49:  
1555-66 y 1566-79
- McCormick, A. y S. Liaaen-Jensen (1966) *Acta Chem. Scand.* 20:  
1989-2011
- McDermott, J. C. B., D. J. Brown, G. Britton y T. W. Goodwin  
(1974) *Biochem. J.* 144: 231-43
- Mercer, E. I., B. H. Davies y T. W. Goodwin (1963) *Biochem. J.*  
87: 317-25
- Milas, N. A., P. Davis, I. Belic y D. A. Fles (1950) *J. Am. Chem.*  
*Soc.* 72: 4844.
- Molnar, P. y J. Szabolcs (1980) *Phytochemistry* 19: 623-7
- Moss, G. P. y B. C. L. Weedon (1976) en "Chemistry and Biochemis-  
try of Plant Pigments" (T. W. Goodwin, ed.) vol. 1, págs.  
149-224, Academic Press, London
- Movchan, S. D. (1960) *Zhur. Priklad. Khim.* 33: 484-6 (C.A. 54,  
12274i)

- Nadai, J. y G. Brubacher (1970) *Int. Encycl. Food Nutr.* 9: 449  
(citado por Bauernfeind, 1972)
- Neamtu, G. y C. Bodea (1970) *Stud. Cercet. Biochim.* 13: 59-63
- Neamtu, G., V. Tamas y C. Bodea (1965 a) *Stud. Cercet. Biochim.*  
8: 67-9
- Neamtu, G., V. Tamas y C. Bodea (1965 b) *Stud. Cercet. Biochim.*  
8: 411-4
- Neamtu, G., V. Tamas y C. Bodea (1966) *Rev. Roum. Biochim.* 3:  
305-10
- Neamtu, G., V. Tamas y C. Bodea (1967) *Rev. Roum. Biochim.* 4:  
59-65
- Neamtu, G., G. Illyes y L. Tiberin (1979) *Stud. Cercet. Biochim.*  
22: 175-9
- Nitsche, H. y C. Pleugel (1972) *Phytochemistry* 11: 3383-5
- Porter, J. W. y R. E. Lincoln (1950) *Archs. Biochem. Biophys.*  
27: 390-403
- Premachandra, B. R., J. John y H. R. Cama (1974) *Indian J. Nutr.*  
*Diet.* 11: 28-32
- Quackenbush, F. W. (1973) *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 56: 748-53
- Quackenbush, F. W. y S. L. Miller (1972) *J. Ass. Off. Anal. Chem.*  
55: 617-21
- Quackenbush, F. W., M. A. Dyer y R. L. Smallidge (1970) *J. Ass.*  
*Off. Anal. Chem.* 53: 181-5
- Randerath, K. (1963) "Thin-Layer Chromatography", Academic Press,  
New York & London
- Schmidt, K., G. W. Francis y S. Liaaen-Jensen (1971) *Acta Chem.*  
*Scand.* 25: 2476-86
- Schön, K. (1938) *Biochem. J.* 32: 1566-70
- Scott, M. L., I. Ascarelli y G. Olson (1968) *Poultry Sci.* 47:  
863-72
- Skilleter, D. N. y R. G. O. Kekwick (1971) *Biochem. J.* 124:  
407-17

- Spada, A. y R. Cameroni (1957) Atti Soc. Nat. e Mat. Modena 87-88  
53-61 (C.A. 53, 11538g)
- Stabursvik, A. (1959) Norgestek. Vitenskapsakad Ser. 2, N° 6,  
89pp (C.A. 55, 14599i)
- Steineger, P. y G. Zanetti (1957) Arch. Gefluegelk. 21: 236 (ci-  
tado por Bauernfeind, 1972)
- Steward, I. y T. A. Wheaton (1971) J. Chromatog. 55: 325-36
- Strain, H. H. (1966) en "Biochemistry of Chloroplasts" (T. W.  
Goodwin, ed.) vol. 1, págs. 387-406, Academic Press, Lon-  
don & New York
- Surmatis, J. D., J. Maricq y A. Ofner (1958) J. Org. Chem. 23:  
157-62
- Suzuki, N. y K. Tsukida (1959) Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 7:  
133-4
- Sykut, A. (1966) Acta Soc. Bot. Polon. 35: 41-57
- Taha, M. M. (1954) Biochem. J. 58: 413-5
- Tappi, G. y E. Menziani (1955) Gazz. Chim. Ital. 85: 720-4
- Tarpo, E. (1970) Farmacia (Bucharest) 18: 305-12
- Taylor, R. F. y B. H. Davies (1975) J. Chromatog. 103: 327-40
- Toth, G. y J. Szabolcs (1970) Acta Chim. (Budapest) 64: 393-406
- Valadon, L. R. G. y R. S. Mummery (1967) Phytochemistry 6: 983-8
- Valadon, L. R. G. y R. S. Mummery (1971) Phytochemistry 10:  
2349-53
- Valadon, L. R. G. y R. S. Mummery (1977) Z. Pflanzenphysiol.  
82: 407-16
- Warren, C. K. y B. C. L. Weedon (1958) J. Chem. Soc. 1958:  
3972-86
- Weedon, B. C. L. (1969) Forsch. Chem. Org. Natstoffe 276: 81-130
- Whittingham, C. P. (1976) en "Chemistry and Biochemistry of Plant  
Pigments" (T. W. Goodwin, ed.) vol. 1, págs. 624-54, Acade-  
mic Press, London
- Winterstein, A. , A. Studer y R. Ruegg (1960) Ber. Dt. Chem. Gess.

93: 2951-65

Zechmeister, L. y L. V. Cholnoky (1932) Z. Physiol. Chem. 208:  
26-32

Zechmeister, L. y A. Polgár (1941) J. Biol. Chem. 140: 1-3

Zechmeister, L. y W. A. Schroeder (1942) Arch. Biochem. 1: 231-8

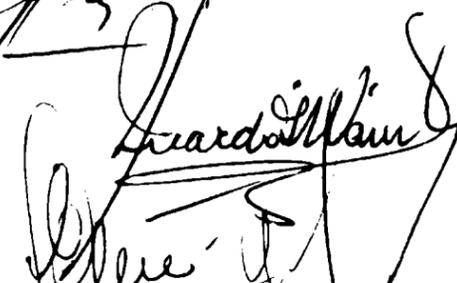
Zechmeister, L. y W. A. Schroeder (1943) J. Am. Chem. Soc. 65:  
1535-40

Acta N.º 582 -

- En la fecha se reunió el Jurado para dictaminar sobre el trabajo de tesis presentado por el ex-alumno de la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas (Orientación Biológica Clásica), señorita Claudia Luisa Natalucci, titulado: "Oblición, falsación de Caracteroides florales de plantas que crecen en la Provincia de Buenos Aires. Separación de fracciones de diferente grado de oxidación, y su relación con la capacidad pigmentante", le fue oportunamente aprobado. —
- Habiendo realizado el trabajo, se procede a discutirle cuál fue el número merecido, resolviéndose por unanimidad del Jurado aprobarlo y certificarlo con la nota de Sobresaliente diez (10). —

Lo Dileto 18 de diciembre de 1981 —

Presentes:

D. Néstor Caffini   
D. Ricardo Wainberg   
D. Eloy Brandile   
Dra. Marta Najera   
Dra. Procelo Bompiano 

F E D E E R R A T A S

pág.	línea	dice	debe decir
14	21	meno-cis	mono-cis
46	29	gnenerales	generales
75	10	el que	al que
75	29	a um	a un