

Carotenoides en especies cultivadas del género *Vicia*

1.—Variaciones de la proporción de carotenoides totales en veza velluda (*Vicia villosa*, Roth), veza común (*V. sativa*, L.), algarrobas (*V. monanthos* Desf.) y yeros (*V. ervilia*, Willd) durante sus ciclos de crecimiento y desarrollo

C. BARRO y G. GONZÁLEZ

Departamento de Agricultura y Economía Agraria. Facultad de Veterinaria e Instituto de Alimentación y Productividad Animal del C.S.I.C. Madrid

RESUMEN

La proporción de carotenoides totales en muestras liofilizadas de veza velluda (V. villosa Roth), veza común (V. sativa L.), algarrobas (V. monanthos Desf.) y yeros (V. ervilia Willd) recolectadas en cinco fases de crecimiento y desarrollo: 20 y 30 cm de altura, iniciación de la floración (10 % de plantas en flor), plena floración y legumbres medianamente maduras, osciló entre un máximo de 1.567 mg/kg en V. villosa a los 20 cm de altura y un mínimo de 96 mg/kg en V. monanthos con legumbres en estado pastoso blando.

La disminución, en la proporción de carotenoides, con el estado de crecimiento fue muy significativa ($P < 0,01$) en todas las especies. Las diferencias interespecíficas en cada fase de crecimiento y desarrollo fueron generalmente muy significativas ($P < 0,01$) excepto entre las algarrobas y los yeros, que solamente difieren en la fase de semilla en estado pastoso blando, y en la iniciación de la floración, en la que todas las especies dieron aproximadamente los mismos valores.

INTRODUCCIÓN

Como es bien sabido, los carotenoides de los alimentos constituyen el principal agente pigmentante natural de los productos ganaderos. El color más o menos amarillo de la yema de los huevos de los pollos y de las grasas animales depende de la proporción en que dichos compuestos aparezcan en la ración que aquellos ingieren y determina, en muchos casos, su valor comercial. En nuestro país la carne de pollo y los huevos son tanto más cotizados cuanto más intenso es su color amarillo-dorado. La demanda por este color aumenta a medida que avanzamos hacia el norte, llegando

el consumidor de esta zona a solicitar los huevos de un color francamente naranja.

En la explotación práctica, aparte de los pigmentos comerciales o sintéticos (generalmente de importación), la principal fuente de carotenoides en la alimentación aviar, después del maíz, la constituyen las harinas deshidratadas de leguminosas forrajeras, principalmente de alfalfa, exhaustivamente estudiada, a este respecto, por BICKOFF y col. (1954). Sin embargo, existen otras forrajeras que pueden someterse a deshidratación y sus harinas utilizarse en la alimentación aviar de modo semejante a la alfalfa. Entre ellas tenemos las especies anuales del género *Vicia* de cultivo común en España*.

El trabajo que presentamos tiene como finalidad contribuir al conocimiento de los carotenoides de estas forrajeras. En esta primera comunicación se hace un estudio comparado de las proporciones de carotenoides totales de las cuatro especies: veza común (*V. sativa* L.); veza velluda (*V. villosa* Roth); algarrobas (*V. monanthos* Desf.) y los yeros (*V. ervilia* Willd), en cinco estados diferentes de sus ciclos de crecimiento y desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se planeó un dispositivo experimental de bloques al azar. Para ello se dispuso de cuatro parcelas en los campos de prácticas de la Cátedra de Agricultura de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, sitios en Puerta de Hierro, sembradas a fines de octubre de 1974, con cada una de las cuatro especies del género *Vicia* objeto de estudio: *V. sativa* L. (45 m² y 100 kg/Ha), *V. villosa* Roth (45 m² y 75 kg/Ha), *V. monanthos* Desf. (36 m² y 80 kg/Ha), procedente, la semilla, de casas comerciales, de Zaragoza las dos primeras, y de Valladolid las dos segundas.

Cada una de estas parcelas se dividió en nueve subparcelas, realizando las tomas de muestras de modo sucesivo en solamente tres de ellas elegidas al azar, en cinco estadios distintos del desarrollo de las plantas: 20 y 30 cm de altura, en la iniciación de la floración (10% de plantas en flor), en plena floración y con las legumbres a medio madurar. Los cortes para la toma de muestras se realizaron en la parte central de las subparcelas para evitar los efectos de borde y a unos 4 cm de altura del suelo.

Las muestras, inmediatamente después de cortadas, se trocearon y se liofilizaron en un aparato Leybold GT-41 a fin de minimizar las pérdidas de carotenoides por estereoisomerización y oxidación durante la desecación. Una vez deshidratadas se molieron y se guardaron a 15 °C bajo cero, en frascos topacio y atmósfera de nitrógeno hasta el momento del análisis.

Para la extracción de carotenoides se siguió el método de QUACKENBUSH (1970), recomendado como oficial por la AOAC en 1970. Sin embargo, hemos de señalar que por este método no se consigue una extracción exhaustiva, pues si el residuo se tritura con arena en un mortero, y se lava repetidas veces con la mezcla extractora hasta que ésta no tenga color, to-

* Según el Anuario de Estadística Agraria (1976) de los 1.144.716 Ha de cultivos forrajeros en España, 275.552 Ha (el 24%) corresponden a las vezas (*V. villosa* Roth y *V. sativa* L.); 30.683 Ha a las algarrobas (*V. monanthos* Desf.) y 57.086 Ha a los yeros (*V. ervilia* Willd); en conjunto, pues, ocupan casi tanto espacio de cultivo como la alfalfa.

avía se obtiene una importante cantidad de pigmento, que puede llegar hasta un 10% del total. Esto es debido a que, al triturar el residuo con arena, se destruyen todas las estructuras celulares y llega el disolvente a los resquicios intracelulares, agotando así por completo todas las sustancias solubles en él. Por consiguiente estimamos que los resultados deben incrementarse aproximadamente en el referido 10% (TORTUERO, 1971).

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado, y se trabajó con material de vidrio topacio, en semipenumbra y a baja temperatura para minimizar las pérdidas por estereoisomerización. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Beckman DB-G. Todos los resultados se refieren a sustancia seca.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico, mediante el método de la varianza (SNEDECOR, 1964); cuando la significación resulta positiva para alguno de los factores considerados, se realizó la prueba de comparación de medias de Newmans-Keuls (KIRK, 1968).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad total de carotenoides disminuye de forma clara y acusada en las cuatro especies a medida que avanza el crecimiento y el desarrollo de la planta (tabla 1). Puede apreciarse también en el mismo cuadro que *V. sativa* y *V. villosa* son las especies que contienen mayor proporción de carotenoides en las etapas iniciales de crecimiento (20 y 30 cm de altura); en plena floración es *V. sativa* y en estado de legumbres *V. villosa*. Las diferencias se aminoran o anulan en la iniciación de la floración para las cuatro especies.

El análisis de varianza demuestra que las diferencias entre las especies y los tratamientos de corte, así como la interacción, cortes \times tratamientos, son significativas ($P < 0,01$).

TABLA 1

CAROTENOIDES TOTALES mg/kg s.s.s. (*)

Estado de crecimiento y desarrollo	<i>V. sativa</i>	<i>V. villosa</i>	<i>V. monanthos</i>	<i>V. erulia</i>
20 cm	1.398,82 ^a	1.567,77 ^b	960,98 ^c	944,09 ^c
30 cm	1.362,82 ^a	1.499,35 ^b	871,78 ^c	826,28 ^c
Iniciación floración	732,34 ^a	768,51 ^a	775,51 ^a	738,22 ^a
Plena floración	659,90 ^a	602,37 ^a	592,93 ^a	502,16 ^b
Frutos a medio madurar	243,01 ^a	459,60 ^b	95,97 ^c	291,67 ^a

(*) Los valores que se dan para cada estado de crecimiento y de desarrollo, son las medias de las tres repeticiones realizadas.

Las medias dentro de cada estado de crecimiento, con la misma letra exponencial, no difieren significativamente ($P < 0,01$).

Diferencias interespecíficas

La prueba de comparación de medias entre las cuatro especies estudiadas indica que no es significativa ($P > 0,01$) la diferencia entre los carotenoides totales de los yerros (660,50 mg/kg de s.s.) y las algarrobas (669,39 mg/kg de s.s.), mientras que son significativas ($P < 0,01$) el resto de las diferencias entre especies tomadas dos a dos.

Estas diferencias entre las especies se mantienen de modo significativo a lo largo del crecimiento y desarrollo de las plantas. No obstante hemos de destacar los siguientes resultados obtenidos de la prueba de comparación de medias para cada uno de los tratamientos estudiados:

- a) A los 20 cm de altura son significativas todas las diferencias entre las especies, con la excepción de la referente a la de las algarrobas (960,98 mg/kg) y los yerros (944,08 mg/kg), que no es significativa.
- b) A los 30 cm de altura de las plantas se repiten los mismos resultados estadísticos: diferencia altamente significativa ($P < 0,01$) entre los carotenoides de las especies, excepto la encontrada entre las algarrobas (826,28 mg/kg) y los yerros (871,77 mg/kg).
- c) En la iniciación de la floración dejan de ser estadísticamente significativas ($P > 0,01$) las diferencias entre los pigmentos encontrados en las cuatro especies.
- d) Cuando las plantas se encuentran en el estado de plena floración empiezan a manifestarse nuevamente las diferencias aunque de manera paulatina, pues la única diferencia significativa al 1 % es la encontrada entre la veza común (659,89 mg/kg) y los yerros (501,95 mg/kg); son significativas solamente al 5 % las diferencias encontradas entre la veza velluda (602,37 mg/kg) y los yerros (501,95 mg/kg), y algarrobas (592,92 mg/kg) y yerros (501,95 mg/kg), mientras que el resto de las diferencias no son significativas ($P > 0,01$).
- e) En el estado correspondiente al de las plantas con legumbres medianamente maduras, se hacen otra vez divergentes los resultados, pues todas las diferencias son altamente significativas ($P < 0,01$), con la sola excepción de la que hay entre los carotenoides encontrados en *V. ervilla* (272,59 mg/kg) y *V. sativa* (243,01 mg/kg), que no resultó significativa.

El hecho de que *V. sativa* y *V. villosa* muestren claras diferencias a favor de la segunda en las primeras etapas de crecimiento, diferencias

TABLA 2

RELACION HOJAS/TALLO DE *V. SATIVA* Y *V. VILLOSA*

	<i>V. sativa</i>	<i>V. villosa</i>
20 cm	2,44	3,42
30 cm	1,74	1,97
Iniciación floración	1,62	1,38
Plena floración	1,78	1,38

Fuente: TREVIÑO Y CABALLERO (1973).

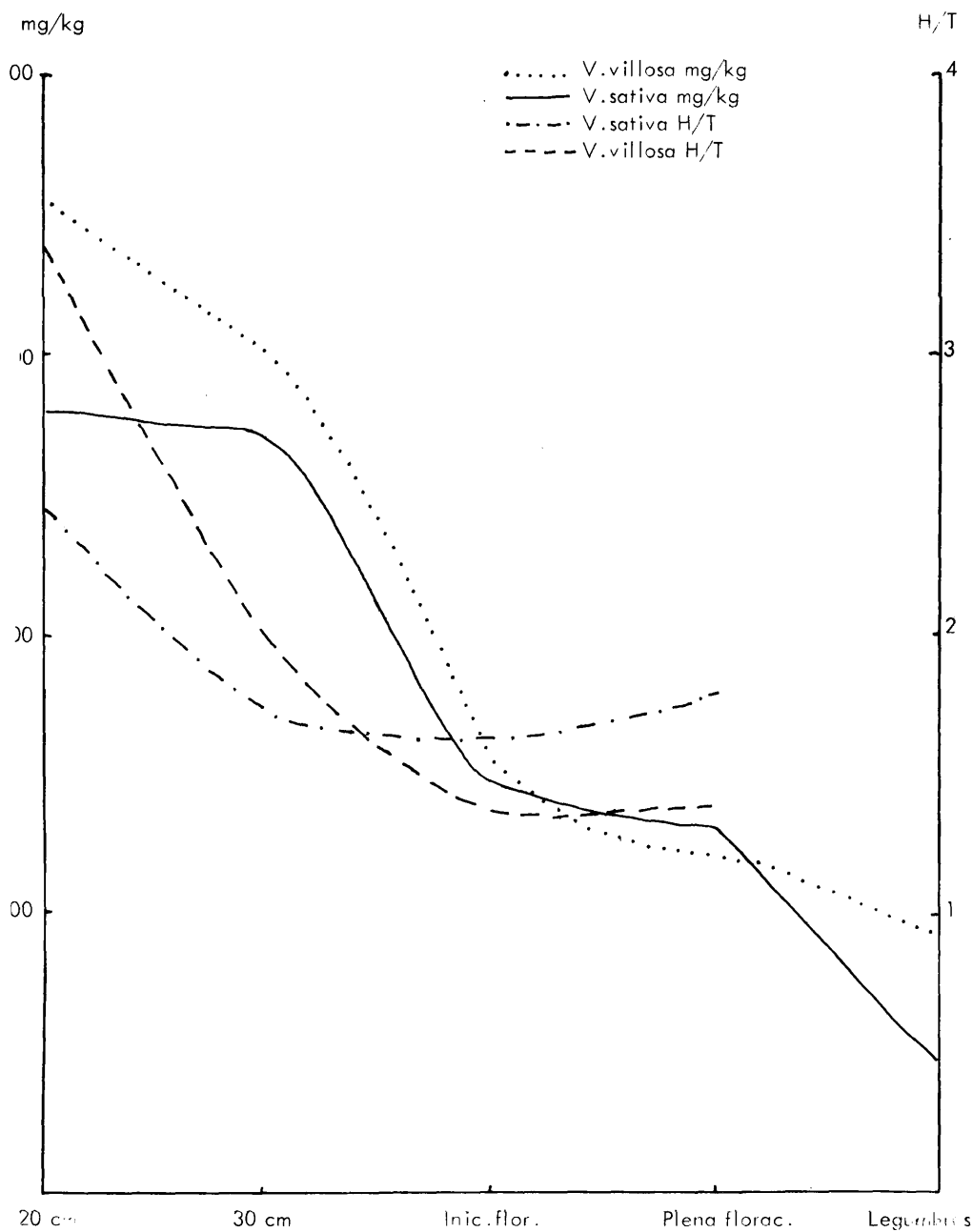


FIG. 1. Evolución de la proporción de carotenoides y de la razón hojas/tallo a lo largo del ciclo de crecimiento y desarrollo de *V. sativa* y *V. villosa*.

que se anulan en la iniciación de la floración y se muestran en plena floración para volver a la situación inicial en la fase de legumbres, puede explicarse fácilmente a la vista de la razón tallos/hojas expuesta en la tabla 2 (TREVIÑO y CABALLERO, 1973).

Localizados los carotenoides en los cloroplastos y éstos fundamentalmente en las hojas, es natural que exista un acusado paralelismo entre la proporción de aquéllas y de éstos en la sustancia seca del vegetal. De hecho ambas curvas muestran un claro paralelismo (fig. 1).

Diferencias intraespecíficas

La prueba de Newmans-Keuls confirmó que las diferencias de la proporción de carotenoides entre los estados de crecimiento y de desarrollo fueron todas significativas ($P < 0,01$); es decir, las concentraciones de carotenoides totales disminuyen rápida y significativamente a medida que progresa el estado de crecimiento y de desarrollo de las plantas.

Estas disminuciones son, sin duda, más acusadas que las que tienen lugar para otros componentes químico-bromatológicos; en *V. sativa*, la proteína bruta ($N \times 6,25$) baja del 31,39 % a los 20 cm, a 19,50 % en la plena floración; el extracto etéreo disminuye desde 4,66 % hasta 3,43 % en los mismos tratamientos; la fibra neutro detergente aumenta desde 23,11 % hasta 35,91 %. Para *V. villosa* los resultados fueron: para la proteína bruta 31,40 % a 20 cm y 21,55 % en plena floración; el extracto etéreo 4,89 % y 3,58 %, y la FND aumentó desde 28,07 % en el primer tratamiento hasta 40,08 % en el último (TREVIÑO y CABALLERO, 1973).

Las más acusadas diferencias en la proporción de estos pigmentos, se pueden explicar por su íntima conexión y dependencia con el desarrollo de los plastidios. Efectivamente, aunque algunas semillas suelen contener carotenoides (maíz, por ejemplo), la síntesis de éstos comienza inmediatamente después de la germinación, aun antes de que la plántula emerja del suelo, pues a diferencia de las clorofilas, la formación de carotenoides no necesita de la luz. Sin embargo, en completa oscuridad, los protoplastidios de las angiospermas solamente alcanzan la etapa de etioplastos, que se caracterizan por tener muy poca protoclorofila, pocos enzimas del ciclo fotosintético reductores del carbono (ciclo de Calvin-Benson) y pocos carotenoides. Como consecuencia de la irradiación con luz blanca de suficiente intensidad, se realiza la transformación de los etioplastos en cloroplastos maduros, transformación que supone un amplio crecimiento en longitud y volumen y cambios espectaculares de la composición molecular, de las estructuras finas y de las funciones de los plastidios. De este modo, a medida que progresa la formación de cloroplastos, la producción de carotenoides continúa con la misma rapidez, especialmente durante el período inicial de crecimiento activo. La máxima concentración se alcanza en el período de máxima velocidad de crecimiento. A partir de este momento, la cantidad de carotenoides sigue aumentando lentamente, pero no al mismo ritmo que la expansión de las hojas (formación de sustancia seca), por lo que, su concentración disminuye de modo muy acusado; las hojas jóvenes tienen, pues, una mayor proporción de carotenoides que las hojas viejas. Por consiguiente, una planta en estado de desarrollo avanzado puede contener mayor cantidad de carotenoides que una planta en el período

CUADRO 3

PRODUCCION DE CAROTENOIDES POR CUATRO ESPECIES FORRAJERAS
DEL GENERO VICIA EN CINCO ESTADIOS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Variación	Rendimientos por hectárea									
	Kilos de sustancia seca (x)					Gramos de carotenoides totales				
	20 cm	30 cm	Iniciac. floración	Plena floración	Legum- bres	20 cm	30 cm	Iniciac. floración	Plena floración	Legum- bres
<i>V. sativa</i> L.	3.318	4.219	5.181	7.061	—	4.614	5.749	3.794	4.659	—
<i>V. villosa</i> Roth	2.663	3.934	4.616	5.991	—	4.174	5.898	3.547	3.608	—
<i>V. monanthos</i> Desf.	1.381	2.453	4.749	6.419	5.885	1.327	2.138	3.682	3.806	564
<i>V. ervilia</i> Willd	1.449	2.468	3.462	3.822	3.372	1.367	2.039	2.555	1.919	983

* Los rendimientos por hectárea proceden de trabajos previos con las mismas especies y sobre idéntico suelo, de TREVINO y CABALLERO, 1973.

joven, de crecimiento activo, aunque su concentración en ésta sea un 50 % superior (BRITTON y GOODWIN, 1973).

El grado en que el estado de crecimiento y de desarrollo influyó sobre la proporción de carotenoides en cada especie, se obtuvo mediante los análisis de varianza correspondientes y, en su caso, las pruebas de comparación de medias.

Rendimientos

Por último se puede estimar el rendimiento de carotenoides totales por hectárea de cada una de estas distintas especies según el momento del ciclo de crecimiento y desarrollo en que se corte, a partir de los rendimientos en sustancia seca obtenidos para cada especie y cada variante de siega.

Esta estimación aparece en la tabla 3, elaborada a partir de los resultados obtenidos por TREVIÑO y CABALLERO (1973) en condiciones idénticas de explotación e indica que los máximos rendimientos de carotenoides por hectárea se obtienen en *V. sativa* y *V. villosa* a los 30 cm de altura, mientras que en *V. monanthos* y *V. ervilia* los máximos rendimientos de carotenoides se dan en plena floración e iniciación de la floración respectivamente.

El hecho de que no coincidan en ningún caso máximo rendimiento de sustancia seca con máximo rendimiento de carotenoides, puede indicar que hay una reducción en la producción de carotenoides con el crecimiento y desarrollo, coincidiendo con un proceso de destrucción de los mismos.

BIBLIOGRAFIA

- BICKOFF, E. M., LIVINGSTON, A. L., BAILEY, G. F., THOPSON, C. R., 1954: *Santhophylls in fresh and dehydrated alfalfa*. J. Agr. and Food Chem., 2 (11): 563-566.
- BRITTON, G., GOODWIN, T. W., 1971: *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Vol. I. Academic Press, Londres, Nueva York.
- KIRK, M., 1968: *Experimental design. Procedures for the behaviour sciences*. Brooks/Cole Publissings Co. Belmont.
- QUACKEMBUSH, F. W., 1970: J. AOAC, 53, 181-185 (1970).
- SNEDECOR, G. W., 1964: *Métodos estadísticos*. Compañía Editorial Continental, S. A., México.
- TORTUERO, F., GARCÍA, M.^a S., 1971: *Métodos para la determinación de carotenoides en la alfalfa*. Av. Ali. y Mej. Ani., XII (6): 3-6.
- TREVIÑO, J., CABALLERO, R., 1973: *Estudio comparativo de los rendimientos, composición químico-bromatológica y digestibilidad de las especies Vicia sativa L. y Vicia villosa Roth*. Pastos, 3 (2): 248-256.

VARIATIONS OF TOTAL CAROTENOIDS CONTENT IN *V. SATIVA* L., *V. VILLOSA* ROTH, *V. MONANTHOS* DESF. AND *V. ERVILIA* WILLD IN DIFFERENT STAGES OF GROWTH AND DEVELOPMENT

SUMMARY

Carotenoid contents of liofilized samples of *V. villosa* Roth, *V. sativa* L., *V. monanthos* Desf. and *V. ervilia* Willd harvested at five stages of growth and development (20 cm and 30 cm in height, 10 % flowers, full flower and grains at soft dough stage), ranged from a maximum of 1,567 mg/kg DM in *V. villosa* at 20 cm in height to a minimum of 96 mg/kg DM in *V. monanthos* with grains at soft dough stage. The amounts of total carotenoids were significantly lower ($P < 0.01$) as the stage of growth advanced in all species.

Interspecific differences for every stage of growth were generally significant ($P < 0.01$) except for *V. monanthos* and *ervilia* that only gave different values with grains at soft dough stage and for all the four species at 10 % flower stage at which they gave similar values.