

Carotenoides en especies cultivadas del género *Vicia*

2.—Variaciones de la composición cualitativa de los carotenoides de la veza común (*Vicia sativa* L.), veza velluda (*V. villosa* Roth), 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

Se aislaron y determinaron cuantitativamente los carotenos y xantofilas, en muestras liofilizadas, de cuatro especies del género *Vicia*; veza común, veza velluda, algarrobas y yeros, en cinco etapas del ciclo vegetativo de la planta.

El porcentaje de cada uno de los pigmentos del total de carotenoides en la s.s. se mantuvo prácticamente constante, osciló para los carotenos entre 31,22 % en *V. ervilia* a plena floración y 22,44 % en *V. monanthos* en estado de legumbres; para la luteína entre 50,93 % en *V. monanthos* en la iniciación de la floración y 38,22 % en *V. sativa* en plena floración; para la zeaxantina entre 8,14 % en *V. monanthos* en fase de legumbres y 3,55 % en *V. villosa* en la iniciación de la floración; para la violaxantina entre 14,71 % en *V. sativa* en estado de legumbres y 7,96 % en *V. ervilia* en plena floración y para la neoxantina entre 12,94 % en *V. sativa* en estado de legumbres y 6,10 % en *V. monanthos* a los 30 cm de altura; no obstante, se observó en los carotenos y la luteína una cierta tendencia a disminuir, mientras aumentaba la zeaxantina, que fue significativamente más alta que en la alfalfa 1,8 %; el mayor porcentaje en todos los tratamientos lo dio la luteína, con una media del 42 % del total. Los valores absolutos de cada pigmento, en general, disminuyeron ($P < 0,01$) a medida que progresaba el estado vegetativo de la planta.

INTRODUCCIÓN

En un trabajo previo (BARRO y GONZÁLEZ, 1979) se estudiaron los carotenoides totales en muestras liofilizadas de cuatro especies cultivadas

del género *Vicia* y en cinco etapas diferentes de sus ciclos de crecimiento y desarrollo, dada la importancia económica que estos pigmentos tienen en el mercado de piensos compuestos para las aves y dada la posibilidad de someter estas forrajeras a deshidratación para obtener harinas utilizables en la alimentación aviar.

Pero no basta conocer la cantidad de carotenoides totales, para predecir la capacidad de pigmentación sobre la yema del huevo y la piel de los pollos, pues del total de pigmentos carotenoides identificados hasta el momento (más de un centenar), sólo unos pocos, zeaxantina, luteína, criptoxantina y fucoxantina entre las xantofilas amarillas y capsorrubina, capxantina y contaxantina entre las rojas (BOTTEY y GARCÍA, 1975), además del β caroteno (CENTENO, 1974), tienen importancia a este respecto.

Por consiguiente, se ha estimado necesario cuantificar e identificar cada uno de los pigmentos integrantes de las cuatro leguminosas mencionadas como trabajo previo al estudio de su capacidad pigmentante sobre los productos avícolas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras se obtuvieron del mismo dispositivo experimental, en bloques al azar, descrito en el referido trabajo previo (BARRO y GONZÁLEZ, 1979).

La extracción de los carotenoides totales se realizó por el método de la AOAC. La separación y cuantificación de los carotenos y xantofilas que los integran, se hizo por cromatografía en capa fina, sobre placas de silicagel G 60 con indicador F₂₅₄, y de 0,25 mm de espesor, de la casa Merck; como líquido eluyente se utilizó hexano-acetona (65-35). Las placas se desarrollaron en la oscuridad.

La figura 1 representa una de las gráficas obtenidas de la lectura de las placas, que se realizó inmediatamente después del desarrollo, en un densitómetro Cromoscan Yoice-Loebl, con accesorio para lectura en capa fina, a 260 nm (filtro azul); esta gráfica está elegida al azar entre las 60 obtenidas como representativa de todas ellas, pues presentaban un aspecto semejante, tanto las obtenidas de los distintos cortes de cada especie, como las correspondientes a las diferentes especies estudiadas.

Para identificar cada una de las manchas aparecidas, se recurrió al raspado de la placa y posterior disolución en el disolvente que se mostró más adecuado, seguido de un estudio del espectro de absorción de esta solución, realizando un barrido en el espectrofotómetro entre los 400 y 500 nm. Se identificaron así las cinco manchas aparecidas que resultaron ser β caroteno*, luteína, zeaxantina, violaxantina y neoxantina, según datos de FOPPEN (1971).

* Hay que hacer la salvedad de que cuando decimos β caroteno, deberíamos decir más propiamente carotenos, pues el espectro de absorción de esta fracción, en las numerosas veces que se estudió y utilizando distintos disolventes, daba unos máximos intermedios entre los que corresponden al α y al β caroteno, aunque siempre más cerca de este último, por lo que podemos afirmar que esta primera fracción está formada por una mezcla de carotenos, aunque con un claro predominio del β caroteno.

Estas cuatro xantofilas y la fracción correspondiente a carotenos, se aislaron también por BICKOFF y col. (1954), de los carotenoides de la alfalfa; quizá una sexta fracción, prácticamente invisible en la placa, situada entre los carotenos y la luteína, pudiera ser criptoxantina, pero dada su pequenísima proporción no nos ha sido posible cuantificarla, ni mucho menos, identificarla.

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico mediante el método de la varianza (SNEDECOR, 1964), realizándose, en su caso, la prueba de comparación de medias de Newmans-Keuls (KIRK, 1968).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes de cada uno de los carotenoides identificados en cada corte, así como los de la alfalfa dados por BICKOFF y col. (1954), están detallados en la tabla 1, en el que se ve que la proporción de luteína y zeaxantina (los de mayor interés pigmentante) resultó notoriamente superior en las cuatro *Vicias* que en la alfalfa, mientras que en ésta son más altas las cifras de violaxantina y neoxantina, aparte de la criptoxantina, que no pudo ser identificada por nosotros.

En la tabla 2 se dan los valores absolutos de los carotenos y xantofilas, aislados, identificados y cuantificados en las cuatro especies estudiadas y en cada uno de los cinco cortes efectuados. Aunque los valores de estos pigmentos disminuyen, en general, a medida que avanza el estado de crecimiento y desarrollo de la planta, el porcentaje de cada uno de ellos, con respecto a los carotenoides totales encontrados en cada corte, se mantuvo prácticamente constante durante toda la vida de las especies estudiadas, si bien al final del período vegetativo, se observó una cierta tendencia a disminuir el tanto por ciento de carotenos y luteína mientras

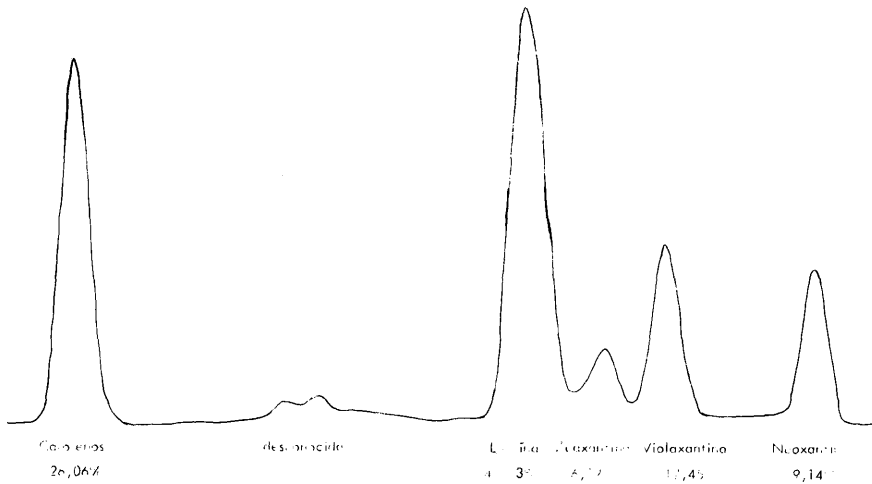


FIG. 1. Gráfica de los distintos pigmentos integrantes de los carotenoides totales de la *V. monanthos* a los 20 cm. de altura, separados por cromatografía en capa fina.

TABLA 1

VALORES MEDIOS (1) DE LOS CINCO PIGMENTOS AISLADOS
DE LA S.S. DE *V. SATIVA* L., *V. VILLOSA* ROTH, *V. MONANTHOS* DESF.
Y *V. ERVILIA* WILLD.
(% del total de carotenoides)

	Carotenos	Luteína	Zea-xantina	Viola-xantina	Neo-xantina	Cripto-xantina
<i>V. sativa</i>						
20 cm	23,60	45,15	6,96	13,48	10,71	—
30 cm	28,45	38,66	7,31	14,72	10,83	—
Iniciación floración	28,88	39,54	6,70	13,89	11,00	—
Plena floración	28,16	38,22	7,87	14,04	11,89	—
Legumbres	25,66	38,55	8,14	14,73	12,94	—
MEDIA	26,89	39,75	7,58	14,18	11,60	—
<i>V. villosa</i>						
20 cm	28,18	42,62	3,86	14,19	11,13	—
30 cm	28,56	43,60	3,76	13,56	10,50	—
Iniciación floración	27,74	42,08	3,55	15,30	11,55	—
Plena floración	28,17	44,46	3,73	13,15	10,29	—
Legumbres	27,59	44,60	6,88	10,28	10,63	—
MEDIA	28,10	43,56	4,12	13,40	10,82	—
<i>V. monanthos</i>						
20 cm	26,03	54,61	6,73	12,47	9,15	—
30 cm	31,04	48,61	4,82	9,94	6,10	—
Iniciación floración	28,58	50,93	4,30	9,72	6,44	—
Plena floración	29,35	44,15	6,30	10,96	9,22	—
Legumbres	22,44	44,76	8,72	13,35	10,69	—
MEDIA	27,60	46,79	6,00	11,24	8,37	—
<i>V. ervilia</i>						
20 cm	28,26	46,23	6,3	9,40	9,76	—
30 cm	26,81	44,90	5,38	11,98	10,91	—
Iniciación floración	29,30	42,63	7,24	11,24	9,66	—
Plena floración	31,22	46,75	5,09	7,96	9,15	—
Legumbres	27,00	48,46	5,30	9,24	10,01	—
MEDIA	28,15	45,41	6,20	10,23	10,01	—
<i>M. sativa</i> (2)						
MEDIA	20	32	1,8	27,4	15,4	3,4

(1) Los valores corresponden a la media aritmética de las tres repeticiones.

(2) Datos de BICKOFF y col. (1954).

TABLA 2

VALORES MEDIOS (1) DE LOS CINCO PIGMENTOS AISLADOS
DE *V. SATIVA* L., *V. VILLOSA* ROTH, *V. MONANTHOS* DESF.
Y *V. ERVILIA* WILLD.
(en mg/kg de sustancias seca)

		<i>V. sativa</i>	<i>V. villosa</i>	<i>V. monanthos</i>	<i>V. ervilia</i>
CAROTENOS	20 cm	330,21	411,82	250,18	266,86
	30 cm	387,87	428,28	270,63	221,57
	Iniciación floración	211,54	213,19	221,70	216,30
	Plena floración	185,88	169,74	174,06	156,78
	Legumbres	62,37	126,81	21,54	78,78
LUTEINA	20 cm	631,67	668,31	438,33	436,51
	30 cm	526,83	653,73	423,78	371,00
	Iniciación floración	289,61	323,22	395,02	314,74
	Plena floración	252,23	269,09	261,78	234,80
	Legumbres	93,70	204,99	42,96	141,36
ZEAXANTINA	20 cm	97,48	60,52	64,70	59,64
	30 cm	99,65	56,41	37,1	44,53
	Iniciación floración	49,10	27,31	33,36	53,51
	Plena floración	51,96	22,48	37,37	25,61
	Legumbres	19,80	31,64	8,37	15,47
VIOLAXANTINA	20 cm	188,65	222,47	119,85	88,77
	30cm	200,70	203,40	86,72	99,00
	Iniciación floración	101,71	117,64	75,40	82,99
	Plena floración	92,66	79,27	65,04	40,02
	Legumbres	35,77	47,25	12,82	26,97
NEOXANTINA	20 cm	149,93	174,57	87,93	92,21
	30 cm	147,67	157,52	53,23	90,17
	Iniciación floración	80,55	88,81	50,02	71,34
	Plena floración	78,50	62,04	54,68	45,96
	Legumbres	31,47	48,90	10,26	29,20

(1) Los valores corresponden a la media aritmética de las tres repeticiones.

aumentaba, aunque levemente, el de zeaxantina, violaxantina y neoxantina. Parece, por lo tanto, que lo primero que deja de formarse al ir muriendo la planta, son los carotenos y la luteína, aunque también pudiera ser que al empezar a fallar los sistemas enzimáticos, hubiera una oxidación de aquellos, transformándose en xantofilas más oxigenadas.

Variaciones interespecíficas

En lo que se refiere a carotenos, fue la veza velluda a los 30 cm de altura la que dio el valor más alto de las cuatro especies y en todos los tratamientos (428,28 mg/kg), pero en la plena floración de las plantas, que coincide con el máximo rendimiento, fue en la veza común donde se encontró mayor cantidad (185,88 mg/kg), seguida por las algarrobas, la veza velluda y los yeros.

La cifra mayor de luteína (269,09 mg/kg), se encontró en la veza velluda en la fase de plena floración, aunque esta cantidad no difiere significativamente ($P > 0,01$) de la que se da para las algarrobas en el mismo tratamiento (261,78 mg/kg).

La veza común fue la que dio valores más altos de zeaxantina en los cinco tratamientos, siendo de destacar la gran diferencia entre la cantidad de zeaxantina encontrada en la veza en plena floración (51,96 mg/kg), frente a la que aparece en las otras especies en el mismo tratamiento (veza velluda 22,48 mg/kg, algarrobas 37,37 mg/kg, yeros 25,61 mg/kg). También fue la veza común en el estado de plena floración, la más rica de las cuatro especies en violaxantina (92,66 mg/kg) y en neoxantina (78,50 mg/kg).

Aunque las cantidades de carotenos y xantofilas, son mayores en las primeras etapas del ciclo vegetativo de las plantas, hemos destacado los resultados correspondientes a la fase de plena floración, por coincidir con el mayor rendimiento de sustancia seca por hectárea. También hay que hacer notar que si en los primeros estadios del período de crecimiento, son francamente más altas las cifras dadas para las vezas que las de las algarrobas y los yeros, en las etapas de floración de las plantas, llegan a igualarse las cantidades de pigmentos de las cuatro especies, sus diferencias no resultaron significativas ($P > 0,01$), aunque no debemos olvidar que los rendimientos en sustancia seca por hectárea, son muy superiores para las vezas estudiadas que para los yeros y algarrobas.

Influencia del momento del corte

La fase de crecimiento en que se realiza el corte influye de manera decisiva en la cantidad de pigmentos obtenidos de cada especie, pues fueron, en general, significativamente menores los valores para cada uno de los pigmentos, a medida que avanzaba el ciclo vegetativo, si bien hubo algunas variaciones para los distintos cortes y las diferentes especies. En la veza común los carotenos y la violaxantina aumentaron al pasar de los 20 a los 30 cm de altura (carotenos 330,21 mg/kg a los 20 cm y 387,87 mg/kg a los 30 cm; violaxantina 188,65 mg/kg a los 20 cm y 200,70 mg/kg a los 30 cm), la cantidad de zeaxantina encontrada en el tratamiento correspondiente a la plena floración (51,96 mg/kg) fue mayor que cuando el corte se efectuó en la iniciación de la floración. En la veza velluda, aumentó la zeaxantina al pasar la planta de los estados de iniciación de la floración (27,31 mg/kg) y plena floración (22,48 mg/kg), al de plantas con legumbres medianamente maduras (31,64 mg/kg), que fue el último corte realizado. También fue más alta la cantidad de zeaxantina en las algarrobas en plena floración (37,37 mg/kg) que cuando se iniciaba la floración en las mismas, asimismo se encontró mayor cantidad de neoxantina en las algarrobas con flores (54,68 mg/kg) que cuando éstas tenían 30 cm de altura (33,23 mg/kg). En los yeros, creció la cantidad de zeaxantina al pasar de los 30 cm de altura (44,53 mg/kg) a la iniciación de la floración (53,51 mg/kg), así como la violaxantina que aumentó de 88,77 mg/kg a los 20 cm a 99,00 mg/kg a los 30 cm de altura.

BIBLIOGRAFIA

- BARRO, C., GONZÁLEZ, G., 1979: *Carotenoides en especies cultivadas del género Vicia L.* XIX. Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, Zaragoza.
- BICLOFF, E. M., LIVINGSTON, A. L., BAILEY, G. E., TOHPSON, C. R., 1954: *Xanthophylls in fresh and dehydrated alfalfa*. J. Agr. Food. Chem., 2, 563-566.
- BOTEY SERRA, J., GARCÍA FITE, D., 1975: *Determinación de las xantofilas por cromatografía líquida de alta presión. Aplicación a las xantofilas en las yemas del huevo como determinante de su color*. Afinidad XXXII, 325: 249-225.
- CENTENO, C., 1974: *Variaciones de la composición cuantitativa de los carotenoides de la alfalfa y su efecto en la pigmentación de los pollos*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia.
- FOPPEN, F. H., 1971: *Tables from the identification of carotenoids pigments*. Chromatography Rev., 14 (1): 133-298.
- GOODWIN, T. W., 1965: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Academic Press, Londres, Nueva York, 1965.
- KARRER, P., JUCKER, E., 1950: *Carotenoids*. Elsevier Pub. Inc., 1950.
- KIRK, M., 1968: *Experimental design. Procedures for the behaviour sciences*. Brooks/Cole Publising Co. Belmont.
- QUACKENBUSH, F. W., DYER, M. A., SMALLIDGE, R. L., 1970: *Analysis for carotenes and xanthophylls in dried plant materials*. J. of AOAC, 53 (1): 181-185.
- SNEDECOR, G. W., 1964: *Métodos estadísticos*. Compañía Editorial Continental, S. A., México.
- 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.

SUMMARY

Total carotenoids (carotens and xanthophylls) of freeze-dried samples of *Vicia* species (common, hairy, bard and bitter) were analysed quantitatively in five stages of the plant's vegetative cycle.

The DM per cent of carotens and xanthophylls was fairly constant in the different species of *Vicia*. These values, in the case of carotens, were $\pm 31\%$ for the *V. ervilia* in full flowering and of 22 % for *V. monanthos* in legume stage. In relation with the lutein the figures were in the order of $\pm 51\%$ for *V. monanthos* at the beginning of flowering and 38 % for *V. sativa* in full flowering. The values for zeaxantin were about $\pm 8\%$ in *V. monanthos* in the stage of legume and $\pm 3\%$ en *villosa* at the beginning of flowering. The violaxantin showed values of $\pm 8\%$ for *V. ervilia* in full flowering. The neoxantin percentage represented an $\pm 13\%$ in *V. sativa* in legume stage and $\pm 6\%$ for *V. mononchos* at 30 cm tall. Despite such small variation in the results for the different carotenoids, there was observed, in the percentages of carotens and lutein, some tendency to decrease and meanwhile the zeaxantin, violaxantin and neoxantin showed a certain increase. On the other hand, the absolute values for each pigment decreased in general ($P < 0.01$) as the vegetative stage of the plant advanced.