

# Composición cuantitativa de los carotenoides de la alfalfa fresca. Variación en función del ciclo de crecimiento y estado de desarrollo de la planta (\*)

CARMEN CENTENO MARTÍNEZ

Instituto de Alimentación y Productividad Animal (C.S.I.C.). Madrid

## RESUMEN

*Se ha realizado un análisis detallado de las variaciones en la composición cuantitativa de los carotenoides de la alfalfa fresca (cv. Aragón) en función del ciclo de crecimiento y estado de desarrollo de la planta.*

*Las determinaciones analíticas se realizaron en limbos, restos de la planta y planta completa y se efectuaron los análisis cuando el desarrollo de la planta era de 25, 40, 50 y 60 cm. (principio de floración) y plena floración, así como para los cuatro ciclos de crecimiento de la planta durante el período comprendido entre los meses de abril a noviembre de 1972.*

*Los resultados obtenidos muestran que las diferencias para los carotenos sólo son significativas en el caso de los limbos del primer ciclo ( $P < 0,01$ ) y para la planta completa del 1.º y 2.º ciclo ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , respectivamente). Las diferencias del contenido en xantofilas sólo muestran significación estadística en el caso de la planta completa y correspondiente al 4.º ciclo ( $P < 0,05$ ). En cuanto a los carotenoides las diferencias son significativas para la planta completa y en el 3.º y 4.º ciclo ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , respectivamente).*

*No pueden establecerse relaciones entre las diferencias observadas en el contenido en carotenos y el distinto estado de desarrollo de la planta.*

---

(\*) Este trabajo forma parte de la tesis doctoral que con el título "Variación de la composición cuantitativa de los carotenoides de la alfalfa y su efecto en la pigmentación de los pollos" fue presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, obteniendo la calificación de sobresaliente "Cum Laude".

*No obstante se observa una tendencia a decrecer los carotenos a medida que el estado de desarrollo de la planta es más avanzado. Esta tendencia es más significativa para las xantofilas.*

*Puede observarse que existe una cierta relación no siempre constante entre el número de horas luz y el contenido de la alfalfa en carotenoides, por lo que no pueden determinarse conclusiones definitivas en este sentido.*

## I. INTRODUCCIÓN

La importancia económica de la pigmentación de la yema del huevo y piel de la canal de los pollos se deduce fácilmente del hecho de que en diversas comarcas de los países desarrollados el precio de estos productos se incrementa a medida que su coloración se intensifica, de forma que, en cierto grado, la pigmentación llega a convertirse en un factor estimulante de su demanda.

Un ejemplo de las distintas apetencias de los consumidores, dentro de un mismo país, y para diferentes intensidades de color de la yema o piel, es lo que ofrece nuestro país, donde pueden delimitarse tres zonas con una demanda de color bien definida. La primera de estas zonas corresponde al norte y mitad oriental de la Península, incluidas las Baleares, donde se exigen yemas y piel con tonalidades anaranjadas, que se intensifican en las Vascongadas, donde la demanda exige yemas rojas.

En la zona central de la Península el consumidor acepta tonalidades amarillo-naranjas, siendo netamente amarillas a medida que nos desplazamos hacia el sur, donde, si bien la demanda de color no ha sido muy exigente en los últimos años, se aprecia una tendencia hacia una mayor intensidad de la pigmentación de la piel.

Para satisfacer esta demanda de color o, en otras palabras, para conseguir que las diferentes intensidades de color sean las exigidas por el mercado, España gasta anualmente más de 150 millones de pesetas en xantofilas adicionales (bien sean sintéticas o naturales). No es de extrañar, pues, el interés de que han sido objeto últimamente en nuestro país, las investigaciones dirigidas al conocimiento de los pigmentos en sí, de su eficacia biopigmentante y de los factores que influyen en la pigmentación aviar.

Por otra parte, consideradas aisladamente cada una de las distintas materias vegetales que integran la alimentación de las aves, la alfalfa representa, después del maíz, la principal fuente de xantofilas y, por ello, el estudio de sus carotenoides, de las variaciones cuantitativas experimentadas por estos pigmentos a lo largo del ciclo vegetativo de la planta, o de su metabolismo y utilización biológica, parecen del máximo interés, sobre todo en países como España, donde existe un déficit notable en la producción del maíz, base fundamental de la pigmentación aviar.

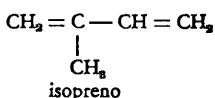
Dividida esta tesis doctoral en dos partes, la primera a la que se refiere esta publicación resume el estudio de las variaciones cuantitativas de los carotenoides de la alfalfa fresca en función del ciclo de crecimiento y estado de desarrollo de la planta.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Propiedades generales de los carotenoides*

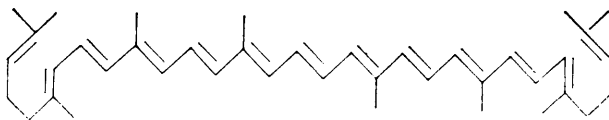
Los carotenoides (KARRER y JUCKER, 1950; GOODWIN, 1965) forman parte de un grupo de pigmentos naturales presentes en las plantas superiores, algas, bacterias, crustáceos, etc., que son susceptibles de ser metabolizados y almacenados por y en el organismo animal.

De los ochenta carotenoides, que han sido más o menos individualizados o diferenciados, sólo se ha llegado a precisar la composición química de unos treinta y cinco, la mayoría de los cuales, por otra parte, tienen como característica común la de poseer cuarenta átomos de carbono en su molécula y estar formados por ocho residuos del hidrocarburo "isopreno".



Característica común a todos ellos es la unión de los restos de isopreno en el punto central de la molécula, lo que determina se inviertan los grupos metilo centrales, dando una actividad especial a ese doble enlace.

La estructura típica de esta familia es la del "licopeno", y a ella pueden referirse todos los demás.



licopeno

Variando los cierres de los anillos extremos se forma el grupo de los hidrocarburos carotenos, y si en la molécula introducimos grupos con oxígeno, como el hidroxilo, metoxilo, carbonilo o carboxilo, podremos representar casi todas las xantofilas.

Conviene insistir en la diferenciación de carotenos y xantofilas dentro de la familia de los carotenoides, ya que frecuentemente son motivo de confusión.

1. Los carotenos son hidrocarburos y en su molécula sólo entra el carbono y el hidrógeno.

2. En las moléculas de las xantofilas además del carbono y el hidrógeno está presente el oxígeno. En general las xantofilas son solubles en alcohol, grasas y lípidos; por esta razón algunos autores las denominaron "lipocromos".

La mayoría de los carotenoides vegetales se encuentran en los cromatóforos de las plantas; rara vez en estado cristalino y frecuentemente en suspensión coloidal en los lípidos de las células o en mezclas con grasas sólidas o semi-sólidas. En el reino animal, por el contrario, suelen encontrarse formando complejos lipo-proteicos.

Los carotenoides en la naturaleza se encuentran en la forma "trans-trans", que es la más estable. Sin embargo, bajo la acción de distintos agentes físico-químicos se deriva con frecuencia a la forma *cis-trans*, en los productos vegetales.

Entre los agentes que provocan la isomeria *cis* pueden citarse:

- a) Calentamiento a reflujo de la solución en un disolvente orgánico.
- b) Fusión de carotenoide cristalizado.
- c) Tratamiento con yodo.
- d) Tratamiento con ácidos.
- e) Por la acción de la luz.

Las consecuencias más importantes de la isomerización *cis* son:

- a) La intensidad de color decrece.
- b) La solubilidad aumenta.
- c) El punto de fusión disminuye.
- d) Se producen cambios en la actividad óptica.
- e) La adsorción en la columna cromatográfica varía notablemente.
- f) Los máximos en el espectro de absorción se desplazan a menores longitudes de onda.
- g) Los coeficientes de extinción son menores.
- h) Aparece un nuevo máximo en la zona ultravioleta del espectro a 142 milimicras ( $\pm 2$ ) de la longitud de onda máxima.
- i) La razón fundamental de la inestabilidad de estos pigmentos radica en el gran número de dobles enlaces.

Bajo la acción de los factores enunciados, no sólo se produce la isomerización de los carotenoides, sino también su destrucción.

## 2.2. Los carotenoides de la alfalfa

Las investigaciones llevadas a cabo respecto a la composición cualitativa de los carotenoides de la alfalfa fresca, se iniciaron a principios de siglo, aun cuando los trabajos realizados entonces deban considerarse como imperfectos.

STRAIN (1948), KARRER et al. (1948) y MESTER et al. (1952), observaron la presencia de distintas xantofilas en las hojas frescas de diferentes plantas.

Es en 1954 cuando BICKOFF et al., analizando muestras de alfalfa fresca y deshidratada y empleando la técnica cromatográfica, observan que en la alfalfa fresca los carotenoides están representados básicamente por seis pigmentos, de los que uno corresponde a los carotenos ( $\beta$ -caroteno) y los cinco restantes a las xantofilas (luteina, violaxantina, criptoxantina, zeaxantina y neoxantina).

Independientemente de estos pigmentos, que se encuentran en estado puro, existen algunas fracciones con cierto grado de isomerización y otras cuya relación conjunta se expone en la tabla núm. 1.

Del total de carotenoides expuestos en la tabla núm. 1, violaxantina, neoxantina, criptoxantina y zeaxantina, representan el 99 % del total de xantofilas de la alfalfa fresca, y el 78 % de xantofilas en la alfalfa deshidratada.

TABLA NUM. 1

XANTOFILAS PRESENTES EN LA ALFALFA FRESCA, EN TANTO POR CIENTO DEL TOTAL (\*)

XANTOFILAS	% del total
Criptoxantina ... ..	0,2
Criptoxantina ... ..	0,2
Mono-hidroxi-a-caroteno ... ..	0,2
Mono-hidroxi-a-caroteno ... ..	0,2
Criptoxantina ... ..	4,0
Luteína ... ..	40,0
Violaxantina ... ..	34,0
Zeasantina ... ..	2,0
Tareoxantina ... ..	0,2
Neoviolaxantina ... ..	0,2
Neoxantina ... ..	19,0

(\*) Fuente: Bickoff et al., 1954.

A su vez los tres primeros carotenoides significan el 90 % del total, siendo la luteína el principal componente de esta fracción y alcanzando el 40 % de las xantofilas totales.

De estas cinco xantofilas, la *luteína*, tiene un punto de fusión de 193°C. Es soluble en cloroformo, benceno, acetona, éter etílico y sulfuro de carbono. Poco soluble en etanol y metanol e insoluble en éter de petróleo. Es ópticamente activa y carece de actividad vitamínica A. Máximos de absorción en éter de petróleo: 420-447-477 (\*).

La *violaxantina* es un derivado diepóxido de la zeaxantina y se forma mediante oxidación de la misma. Es ópticamente inactiva y no tiene actividad vitamínica A. Máximos de absorción en éter de petróleo: 443-472 (\*).

La *criptoxantina* tiene un punto de fusión de 120°C. Es soluble en cloroformo y benceno, poco soluble en éter de petróleo, metanol y etanol. Es ópticamente inactiva y tiene actividad vitamínica A. Máximos de absorción en éter de petróleo: 425-451-483 (\*).

La *zeaxantina* se encuentra en las plantas tanto en estado libre o esterificada con ácido palmítico. Su punto de fusión es de 210°C. Soluble en metanol, éter etílico, cloroformo y sulfuro de carbono. Insoluble en éter de petróleo y hexano. Es ópticamente inactiva y carece de actividad vitamínica A. Máximos de absorción en éter de petróleo: 423-451-483 (\*).

La *neoxantina* es un isómero cis de la zeaxantina. Se han obtenido tres neoxantinas: A, B y C de puntos de fusión 106, 92 y 154°C, respectivamente. Son ópticamente inactivas y carecen de actividad vitamínica A. Máximos de absorción en éter de petróleo: 415-437-466 (\*).

(\*) Fte.: GOODWIN, T.W.: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 518, 519, 520, 522. Ed. Academic Press. London and New York. 1965.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. *Parcela experimental*

Las muestras analizadas proceden de una parcela sita en los terrenos de experimentación que posee el Instituto de Alimentación y Productividad Animal del C.S.I.C. de Madrid (Puerta de Hierro, Ciudad Universitaria).

Esta parcela tenía las siguientes características edafológicas referidas a los 30 cm. superiores: textura areno-arcillosa; pH (H<sub>2</sub>O) 7,70; pH (ClK) 7,00; C/N, 13,00; materia orgánica, 2,09 %; nitrógeno, 0,093 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 6.000 Kg./Ha.; K<sub>2</sub>O, 1.410 Kg./Ha.

Se trata, pues, de un suelo relativamente pobre en materia orgánica y en nitrógeno, muy rico en fósforo y con un nivel adecuado de potasio.

#### 3.2. *Diseño experimental*

Se proyectó dividiendo la parcela en cinco subparcelas de 75 m<sup>2</sup>. A su vez, en cada una de éstas, el diseño experimental se hizo en cuadrado latino de 5 × 5. Al finalizar cada ciclo en la subparcela objeto de análisis, se realizaba una siega de las restantes subparcelas y de nuevo, a su debido tiempo, se iniciaba la serie de cortes en la siguiente subparcela.

#### 3.3. *Recogida y preparación de las muestras*

Las muestras se recogieron de la parte central de cada una de las parcelas, troceándose la alfalfa, liofilizándola y conservando las muestras en atmósfera de nitrógeno hasta el momento de realizar los análisis correspondientes.

La recolección de las muestras se efectuó en distintos períodos de desarrollo de la planta, practicándose cinco cortes que se corresponden a una altura (expresada en centímetros) de 25, 40, 50, 60 cm. (iniciación de floración) y plena floración. Esta operación se repitió en cada uno de los ciclos que suelen corresponder al crecimiento de la planta en el período de un año.

Para facilitar las determinaciones analíticas de las cinco parcelas, se hizo un análisis conjunto, dos a dos, y una última muestra aisladamente, de manera que los análisis en vez de cinco quedaran reducidos a tres.

Todos los datos fueron sometidos a análisis estadístico siguiendo para ello el método de los bloques.

Los cortes y recogida de muestras en todos los ciclos se efectuaron según el esquema que se expone en la tabla núm. 2.

Por otra parte, se controlaron las horas-luz habidas durante cada ciclo con objeto de comprobar su influencia en el contenido de la alfalfa en carotenoides.

#### 3.4. *Técnicas empleadas en la determinación de los carotenoides*

La determinación de los carotenoides de la alfalfa se realiza actualmente mediante técnicas analíticas que tienen como base:

TABLA NUM. 2

ESTADOS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA ALFALFA EN LOS QUE SE REALIZO LA SIEGA Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Tratamiento	Altura aproximada	Estado de la planta
A	25-30 cm.	Vegetativo
B	30-40 cm.	Vegetativo
C	40-50 cm.	Gemación.
D	50-60 cm.	Iniciación floración
E	60-70 cm.	Plena floración

- a) Extracción en frío y saponificación en frío (método de KOHLER).
- b) Extracción en caliente y saponificación en frío (método de TIEWS).
- c) Extracción y saponificación en caliente (TORTUERO, 1971).
- d) Método de la A.O.A.C. (QUACKENBUSH, 1970).

Las diferencias fundamentales entre estos cuatro métodos pueden resumirse: 1.º, en una saponificación incompleta en el método de KOHLER, que da lugar a una difícil separación de las distintas zonas o bandas durante la cromatografía; 2.º, en el método de TORTUERO se recurre a una extracción complementaria del residuo, ayudándose de arena lavada y mano de mortero.

Estas diferencias parecen ser la causa de que los métodos de KOHLER y de TIEWS efectúen una menor extracción de los carotenoides de la alfalfa en comparación con el método de TORTUERO, según se deduce de los resultados obtenidos en el estudio comparativo realizado por TORTUERO y GARCÍA (1971).

No obstante, y como en 1970 la A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) aceptó como método oficial para la determinación de carotenos y xantofilas en los productos vegetales el método modificado de QUACKENBUSCH, hemos creído conveniente realizar un estudio comparativo entre este último método y el de TORTUERO, cuyos resultados se recogen en la tabla número 3.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. Valoración comparativa entre diferentes métodos de análisis

En la tabla núm. 3 se exponen los resultados relativos al estudio comparativo entre los métodos de QUACKENBUSCH y TORTUERO y referidos a muestras de alfalfa fresca y liofilizada, así como los valores obtenidos para P.

De los resultados expuestos en la citada tabla núm. 3 y del análisis estadístico se deduce que las diferencias son significativas para valores inferiores a  $P < 1\%$ .

Estas diferencias en los resultados deben atribuirse a dos factores fundamentales. Uno, al hecho de que en el método de QUACKENBUSCH, y durante la saponificación en caliente, no se emplea un antioxidante, por ejemplo B.H.A. (butil-hidroxi-anisol), empleado en el método de TORTUERO, lo que

TABLA NUM. 3

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS METODOS DE QUACKENBUSH Y TORTUERO PARA LA DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN LA ALFALFA

Muestras (número)	Método de Tortuero mg./Kg. (s. seca)	Método de Quackenbush A.O.A.C. mg./Kg. (s. seca)	Diferencias en %
<i>Alfalfa fresca</i>			
1 ... ..	927	764	17,6
2 ... ..	910	782	14,1
3 ... ..	982	800	18,5
4 ... ..	951	781	17,8
5 ... ..	925	787	14,9
Valores medios ... ..	939	782	16,5
<i>Alfalfa liofilizada</i>			
1 ... ..	1.178	872	25,9
2 ... ..	1.220	847	30,5
3 ... ..	1.167	910	22,0
4 ... ..	1.163	858	26,2
5 ... ..	1.182	895	24,2
Valores medios ... ..	1.182	876	25,8

Significación estadística entre los valores medios:  $P < 0,01$ .

determina una destrucción pequeña, pero significativa, de una parte de los carotenoides. Por otro lado, las extracciones sucesivas que se realizan con el método de TORTUERO, ayudándose de arena y mano de mortero, permiten una más completa extracción, ya que al romperse las paredes celulares de un cierto número de células, cuya integridad no se ve afectada durante el proceso de saponificación, debido a la estructura de su pared más o menos lignificada, se produce una mayor salida de los jugos citoplásmicos y, por consiguiente, de los complejos lipo-proteo-carotenoideos. De esta manera pueden interpretarse las diferencias entre ambos métodos y que, como se observa en la tabla núm. 3, representan un 16,5 % de incremento en el caso de la alfalfa fresca y 25,8 % más cuando se trata de la alfalfa liofilizada.

4.2. *Variaciones en la composición cuantitativa de los carotenoides de la alfalfa en función del ciclo de crecimiento.*

En las tablas números 4, 5 y 6 se exponen los resultados referidos a la influencia del estado de desarrollo de la alfalfa sobre el contenido en carotenos, xantofilas y carotenoides totales de la planta en sus distintos ciclos de crecimiento.

Del mismo modo, en el gráfico núm. 1 se representa la evolución del contenido en carotenos y xantofilas para distintos tamaños de la planta, en función del ciclo de crecimiento.



EVOLUCION DEL CONTENIDO EN CAROTENOS Y XANTOFILAS  
 PARA DISTINTOS TAMAÑOS DE LA PLANTA EN FUNCION —  
 DEL CICLO DE CRECIMIENTO

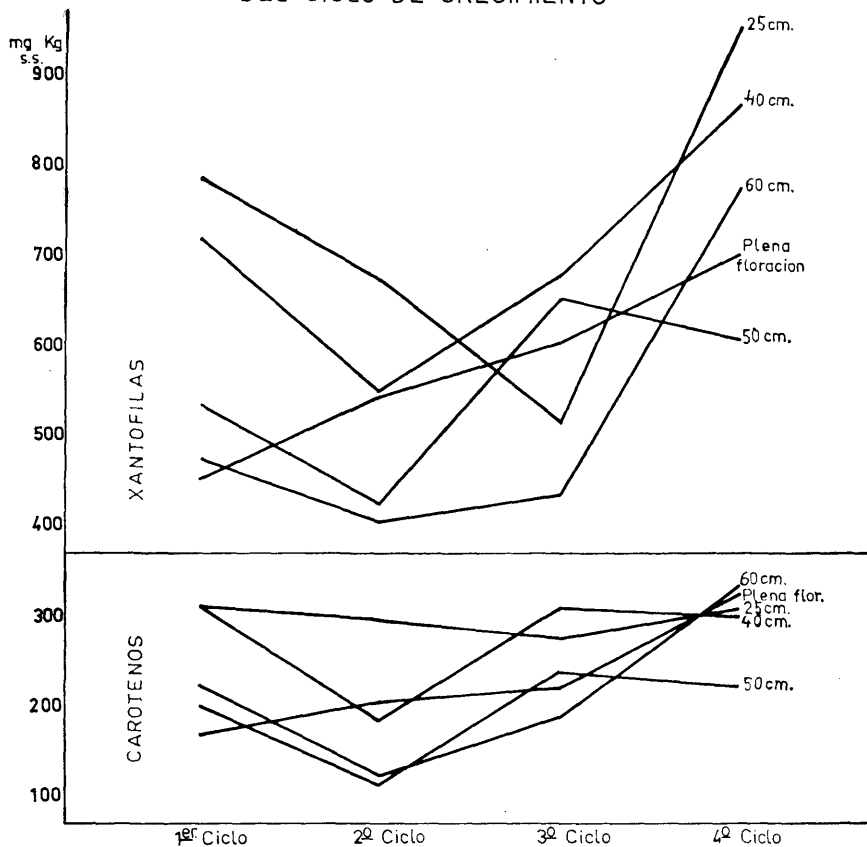


Gráfico núm. 1

El análisis estadístico de los resultados expuestos en la tabla núm. 4 demuestra que las diferencias sobre el contenido en carotenos sólo son significativas para los limbos del primer ciclo y para la planta completa del primero y segundo ciclo. El grado de significancia en el primer caso alcanza valores de P inferiores al 1%. En el segundo caso, es decir, para los carotenos en la planta completa, los valores de P son inferiores para el 1% y 5%, respectivamente.

En la tabla núm. 5, las diferencias del contenido en xantofilas, relativas a las distintas fases de desarrollo de la planta y ciclo de crecimiento, sólo muestran un grado de significancia positivo en el caso de la planta completa y correspondiente al 4.º ciclo. Los valores de P sólo son significativos al 5%.

En la tabla núm. 6 los resultados referidos a carotenoides totales de la planta continúan poniendo de manifiesto que las diferencias obtenidas sólo son significativas estadísticamente para la planta completa en el tercero y cuarto ciclo y con valores inferiores al 1% y 5%, respectivamente.

TABLA NUM. 4

INFLUENCIA DEL ESTADO DE DESARROLLO DE LA ALFALFA SOBRE  
EL CONTENIDO EN CAROTENOS DE LA PLANTA EN SUS  
DISTINTOS CICLOS DE CRECIMIENTO (1)

TAMAÑO Y CICLOS DE LA PLANTA	Limbo mg./Kg. (s. seca)	Resto planta mg./Kg. (s. seca)	Planta completa mg./Kg. (s. seca)
<b>Primer ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	541 ac (**)	115	316 ab (*)
40 cm. ... ..	646 ab	56	314 ab
50 cm. ... ..	508 c	79	205 b
Principio floración ... ..	438 c	46	228 b
Plena floración ... ..	460 c	59	117 b
<b>Segundo ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	517	79	301 a (**)
40 cm. ... ..	562	69	196 b
50 cm. ... ..	398	32	-123 b
Principio floración ... ..	324	39	127 b
Plena floración ... ..	502	62	210 ac
<b>Tercer ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	496	103	278
40 cm. ... ..	512	55	319
50 cm. ... ..	489	63	246
Principio floración ... ..	431	90	191
Plena floración ... ..	467	73	220
<b>Cuarto ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	377	55	313
40 cm. ... ..	392	65	302
50 cm. ... ..	536	60	228
Principio floración ... ..	622	66	348
Plena floración ... ..	577	97	335

(1) El resultado que se expone en la tabla es la media de las tres repeticiones pertenecientes a cada una de las parcelas.

(\*) Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los datos con las mismas letras no son significativos entre sí.

(\*\*) Diferencias significativas ( $P < 0,01$ ). Los datos con las mismas letras no son significativos entre sí.

Podríamos decir como resumen del estudio comparativo de los resultados correspondientes a cada una de las tablas núms. 4, 5 y 6, que no pueden establecerse relaciones entre las diferencias observadas en el contenido en carotenos y el distinto grado de desarrollo de la planta. Así, aun cuando parece observarse una tendencia a decrecer los carotenos a medida que el tamaño de la planta aumenta, esta observación no se mantiene constante para los distintos ciclos. En el caso de las xantofilas esta tendencia a disminuir en sentido inverso al grado de desarrollo de la planta parece ser más constante

**TABLA NUM. 5**

**INFLUENCIA DEL ESTADO DE DESARROLLO DE LA ALFALFA SOBRE  
EL CONTENIDO EN XANTOFILAS DE LA PLANTA EN SUS  
DISTINTOS CICLOS DE CRECIMIENTO (1)**

<b>TAMAÑO Y CICLO DE LA PLANTA</b>	<b>Limbo mg./Kg. (s. seca)</b>	<b>Resto planta mg./Kg. (s. seca)</b>	<b>Planta completa mg./Kg. (s. seca)</b>
<b>Primer ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	1.113	<b>323</b>	<b>788</b>
40 cm. ... ..	1.064	<b>147</b>	<b>725</b>
50 cm. ... ..	1.187	<b>170</b>	<b>543</b>
Principio floración ... ..	1.037	<b>150</b>	<b>478</b>
Plena floración ... ..	1.076	<b>152</b>	<b>451</b>
<b>Segundo ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	1.269	<b>248</b>	<b>682</b>
40 cm. ... ..	1.291	<b>201</b>	<b>553</b>
50 cm. ... ..	1.235	<b>185</b>	<b>428</b>
Principio floración ... ..	1.056	<b>166</b>	<b>409</b>
Plena floración ... ..	1.059	<b>189</b>	<b>550</b>
<b>Tercer ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	1.129	<b>183</b>	<b>519</b>
40 cm. ... ..	1.077	<b>177</b>	<b>684</b>
50 cm. ... ..	1.133	<b>196</b>	<b>658</b>
Principio floración ... ..	865	<b>194</b>	<b>442</b>
Plena floración ... ..	1.024	<b>215</b>	<b>606</b>
<b>Cuarto ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	1.506	<b>239</b>	959 a (*)
40 cm. ... ..	1.420	<b>203</b>	875 ab
50 cm. ... ..	1.285	<b>184</b>	603 cb
Principio floración ... ..	1.545	<b>202</b>	785 cb
Plena floración ... ..	1.021	<b>240</b>	703 cb

(1) Los datos expuestos en la tabla son los resultados de las tres repeticiones correspondientes a cada una de las parcelas.

(\*) Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los datos con las mismas letras no son significativos entre sí.

para los distintos ciclos y lo mismo puede afirmarse para los carotenoides totales en cada una de las partes de las plantas analizadas.

**4.3. Variación en la composición cuantitativa de los carotenoides de la alfalfa fresca en función del estado de desarrollo**

En el gráfico núm. 1 se observa que la evolución del contenido en carotenos para los distintos estados de desarrollo analizados se mantiene dentro de unas diferencias muy pequeñas, excepto en el segundo ciclo, donde los valores

TABLA NUM. 6

INFLUENCIA DEL ESTADO DE DESARROLLO DE LA ALFALFA SOBRE  
EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES TOTALES DE LA PLANTA  
EN SUS DISTINTOS CICLOS DE CRECIMIENTO (1)

TAMAÑO Y CICLO DE LA PLANTA	Limbos mg./Kg. (s. seca)	Resto planta mg./Kg. (s. seca)	Planta completa mg./Kg. (s. seca)
<b>Primer ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	1.705	456	1.103 ab (**)
40 cm. ... ..	1.710	207	1.043 ab
50 cm. ... ..	1.647	225	780 b
Principio floración ... ..	1.563	229	758 b
Plena floración ... ..	1.657	230	659 b
<b>Segundo ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	1.711	325	1.009 a (*)
40 cm. ... ..	2.002	283	900 ac
50 cm. ... ..	1.778	219	618 b
Principio floración ... ..	1.551	222	593 b
Plena floración ... ..	1.565	255	764 cb
<b>Tercer ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	1.820	296	892
40 cm. ... ..	1.681	255	1.082
50 cm. ... ..	1.721	278	942
Principio floración ... ..	1.358	299	644
Plena floración ... ..	1.594	305	874
<b>Cuarto ciclo:</b>			
25 cm. ... ..	1.973	317	1.318
40 cm. ... ..	1.889	295	1.082
50 cm. ... ..	1.844	245	843
Principio floración ... ..	2.216	276	1.150
Plena floración ... ..	1.642	347	1.047

(1) Los datos corresponden a la media de las tres repeticiones de cada una de las parcelas.

(\*) Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los datos con las mismas letras no son significativos entre sí.

(\*\*) Diferencias significativas ( $P < 0,01$ ). Los datos con las mismas letras no son significativos entre sí.

correspondientes a 40, 50 y 60 cm. experimentan un descenso más notable; por el contrario, cuando se trata de las xantofilas se observa una tendencia más generalizada a disminuir durante el segundo ciclo para iniciar una recuperación en el tercero y adquirir las mayores concentraciones en el cuarto ciclo.

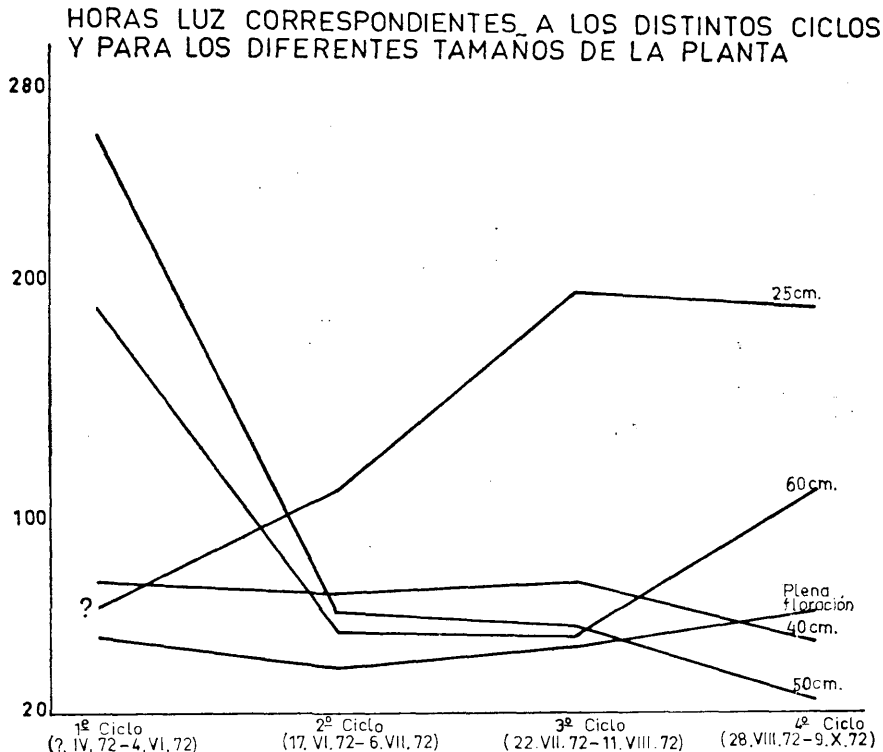
#### 4.4. Influencia de las horas luz sobre el contenido en carotenoides de la alfalfa fresca.

De acuerdo con el gráfico núm. 1, relativo a la evolución de la composición cuantitativa de los carotenoides de la alfalfa fresca en función del ciclo vegetativo, y el gráfico núm. 2, en el que se representan las horas-luz correspondientes a los distintos ciclos y para las diferentes alturas de la planta, puede observarse que existe una cierta relación, no siempre constante, entre el número de horas-luz y el contenido de la alfalfa en carotenoides. Esta inconsistencia en los resultados no permite deducir conclusiones definitivas en este sentido.

#### V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las distintas determinaciones analíticas, tanto en la propia metodología, como en las diferentes partes de la planta, así como del análisis estadístico efectuado sobre la composición en carotenoides de la alfalfa (cv. *Aragón*), en sus diferentes estados de desarrollo y a lo largo del ciclo vegetativo de la planta es posible deducir las conclusiones siguientes:

El estudio comparativo entre los métodos de QUACKENBUSH y TORTUERO



demuestra que este último método es más adecuado para la determinación de carotenoides de distintos tipos de alfalfa.

El hecho de que el método analítico de TORTUERO permita una mayor extracción de pigmentos puede atribuirse a las operaciones complementarias de extracción que se realizan con dicha técnica, así como a la adición de un antioxidante (B.H.T., B.H.A., ascorbato sódico, atoxiquin).

Las diferencias encontradas en el contenido en carotenos para cada una de las distintas partes de la planta y diferentes ciclos sólo son significativas para los limbos del primer ciclo ( $P < 0,05$ ) y para la planta completa del primero y segundo ciclo ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , respectivamente).

Las diferencias del contenido en xantofilas, relativas a las distintas fases de desarrollo de la planta y ciclo de crecimiento, sólo muestran un grado de significancia positivo en el caso de la planta completa y correspondiente al cuarto ciclo ( $P < 0,05$ ).

En cuanto a los carotenoides, las diferencias obtenidas sólo son significativas estadísticamente para la planta y en el tercero y cuarto ciclo ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , respectivamente).

No es posible establecer relaciones definitivas entre el contenido en carotenos y el distinto grado de desarrollo de la planta.

Cuando se trata de las xantofilas, aun cuando no se ha observado una constante relación en la totalidad de los casos, el porcentaje casuístico es suficiente como para aceptar una marcada tendencia a disminuir su contenido en sentido inverso al desarrollo de la planta.

La evolución del contenido en carotenos para los distintos estados de desarrollo analizados se mantiene dentro de unas diferencias muy pequeñas, excepto en el segundo ciclo.

Cuando se trata de las xantofilas, se observa una tendencia más generalizada a disminuir durante el segundo ciclo, para iniciar una recuperación en el tercero y adquirir las mayores concentraciones en el cuarto ciclo.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) BICKOFF, E.M.; LIVINGSTON, A.L.; BAILEY, G.E., and THOMPSON, C.R., 1954: *Xanthophylls in fresh and dehydrated alfalfa*. J. Agr. Food Chem., 2, 563-566.
- (2) CZARNOCKI, J.; SIBBALD, I.R., and EVANS, E.V., 1961: *The determination of chromic oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry*. Can. J. Ani. Sci., 41 (1), 167-169.
- (3) GOODWIN, T.W., 1965: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Ed. Academic Press, London.
- (4) KARRER, P., and JUCKER, E., 1945: *Oxyde des B-carotins: B-carotin-mono-epoxyd, B-carotin-di-epoxyd, mutatochrom, aurochrom, luteochrom*. Helv. Chim. Acta., 28, 427-436.
- (5) KARRER, P., and JUCKER, E., 1950: *Carotenoids*. Ed. Elsevier Publishing Company, Inc. Amsterdam.
- (6) KOHLER, G.O.; KNOWLES, R.E., and LIVINGSTON, A.L., 1967: *An improvised analytical procedure for determination of xanthophylls*. J. of Ass. Off. Anal. Chem., 50, 707-711.
- (7) LIVINGSTON, A.L.; KNOWLES, R.E.; NELSON, J.W., and KOHLER, G.O., 1968: *Xanthophyll and carotene loss during pilot and industrie scale*. J. Agr. Food Chem., 16, 84-87.
- (8) MOSTER, J.B.; QUACKENBUSH, C.W., and PORTER, J.W., 1952: *The carotenoids of corn seedlings*. Arch. Biochem. Biophys., 38, 287-296.
- (9) QUACKENBUSH, F.W.; DYER, M.A., and SMALLIDGE, R.L., 1970: *Analysis for carotenes and xanthophylls in dried plant materials*. J. of Ass. Off. Anal. Chem., 53, 118-185.

(10) STRAIN, H.H., 1948: *Leaf xanthophylls*. Carnegie Institute of Washington, pub. 490, Washington, D.C.

(11) TIEWS, H. Citado por TORTUERO, F., 1967: *Effect of different levels of dehydrated alfalfa meal in practical rations of laying hens on the pigmentation of egg yolk, their influence in the utilization of red xanthophylls*. Poultry Sci., 47, 376-383.

(12) TORTUERO, F., y GARCÍA, M.<sup>a</sup>S., 1971: *Métodos para la determinación de carotenoides en la alfalfa*. Avanc. Ali. y Mej. Ani., vol. XI, núm. 6, 3-6.

#### VARIABILITY OF THE QUANTITATIVE EVALUATION OF ALFALFA CAROTENOIDS IN RELATION TO DIFFERENT STAGES OF THE PLANT

##### SUMMARY

It has been done a detailed analysis about the variations on the quantitative composition of the carotenoids in fresh lucerne (cv. *Aragon*) and the relationship with the growing cycle and development of the plant.

The analytical determinations have been studied on the leaves, stems and whole plant. Analysis were done when development of the plant was 25, 40, 50, 60 cm. height (early flowering) and whole flowering as well as the four cycles of the plant during the period between April and November 1972.

The obtained results indicate that the difference in carotenoids are only significant for leaves of the first cycle ( $P < 0,01$ ) and for the whole plant of first and second cycle ( $P < 0,01$  and  $P < 0,05$  respectively). Differences on xanthophylls contents show statistic signification only for whole plant in its fourth cycle ( $P < 0,05$ ).

For carotenoids, the differences are significant for whole plant on the third and fourth cycle ( $P < 0,01$  and  $P < 0,05$  respectively).

We can not state any relationship among the differences observed on carotenoid contents and development of the plant.

But it has been observed a decrease in the carotene in the plant as the development stage of the plant goes up. This is more significant in the case of xanthophylls.

There can be observed that there is a relationship, not always constant, between light-hours number and carotenoids content in lucerne, so, there can not be stated any definitive conclusions in this way.