

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

---

**Facultad de Química**



**ANALISIS DE METODOS EXPERIMENTALES  
PARA LA OBTENCION DE CAROTENOS  
A PARTIR DE ALFALFA**

**Tesis**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO  
PRESENTA**

**ROSA MARIA GUEL MONTOYA**

México, D. F.

1979



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1979

M.T. 158

FOCHA

PROC



Faint, illegible text, possibly a title or author name, appearing as bleed-through or ghosting from the reverse side of the page.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** PROF. CARLOS ROMO MEDRANO  
**VOCAL:** PROF: YOLANDA CABALLERO ARROYO  
**SECRETARIO:** PROF. GUILLERMO JOSE VALENZUELA  
**1er. SUPLENTE:** PROF. ELOISA URIARTE DE SANCHEZ  
**2o. SUPLENTE:** PROF. SELMA SONIA SOSA SEVILLA

**SITIO DONDE SE DESARROLLO  
EL TEMA: FACULTAD DE QUIMICA**

**SUSTENTANTE:**

**ROSA MARIA GUEL MONTOYA**

**ASESOR DEL TEMA:**

**PROF. YOLANDA CABALLERO ARROYO  
PROF. GUILLERMO JOSE VALENZUELA**



*A mis adorados padres*

*Samuel Guel Dávila*

*Alicia Montoya de Guel*

*con profundo cariño por su apoyo,  
su orientación y su valioso impulso*

*Con cariño a mis hermanos*

*Lydia*

*Elizabeth*

*Alicia*

*Fernando*

*A mi amiga Rebeca  
por su sincera amistad*

*A mis directores de tesis*

*Dra. Yolanda Caballero Arroyo*

*Ing. Guillermo José Valenzuela*

*con gratitud y respeto por su  
valiosa ayuda en la realización  
de éste trabajo*

*Especial agradecimiento al*

*Dr. Carlos Romo Medrano,*

*por su apoyo y estímulo*

Agradezco su valiosa cooperación al

Ing. Luis Ramírez

A mis amigos, compañeros y maestros

a la Universidad

# INDICE

INTRODUCCION. . . . .	10
I. GENERALIDADES. . . . .	12
1.1 Propiedades generales de los carotenoides. . . . .	13
1.2 Existencia del beta-caroteno. . . . .	17
1.3 Alfalfa, fuente de beta-caroteno. . . . .	25
1.4 Método de análisis de la alfalfa. . . . .	27
1.5 Estabilidad del beta-caroteno . . . . .	28
II. PARTE TEORICA. . . . .	30
2.1 Propiedades físicas del beta-caroteno. . . . .	31
2.2 Estructura del beta-caroteno. . . . .	38
2.3 Métodos generales de aislamiento. . . . .	40
2.4 Método de separación de los pigmentos. . . . .	44
2.5 Usos del beta-caroteno . . . . .	51
III. PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	62
3.1 Vía seca. . . . .	63
3.2 Vía húmeda. . . . .	65
IV. CONCLUSIONES. . . . .	66
V. REFERENCIAS. . . . .	68

## **INTRODUCCION**

La alfalfa es un producto conocido prácticamente en todo el mundo y cultivado ampliamente. Su empleo tradicional ha sido en el uso como alimento para animales hervívoros.

Contiene cantidades considerables de vitaminas y minerales, además es rica en proteínas. En los últimos años se ha venido usando para el consumo humano, siendo importado en forma de pastillas y de polvo como complemento alimenticio. (3)

La alfalfa tiene además un alto contenido de carotenos que se usan ampliamente, como colorantes alimenticios.

Es por lo tanto, la alfalfa, por sí misma y por los productos que se pueden extraer de ella, un producto de alto valor económico, que se cultiva abundantemente en la República Mexicana.

El siguiente trabajo tuvo la finalidad de hacer un estudio comparativo de diferentes métodos de extracción de los carotenos de la alfalfa. ~ on

## **GENERALIDADES**



## 1.1 Propiedades generales de los carotenoides

Los carotenoides son terpenos, no saturados, cuya fórmula empírica es  $C_{40}H_{56}$ , que se encuentran en unión con la clorofila ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

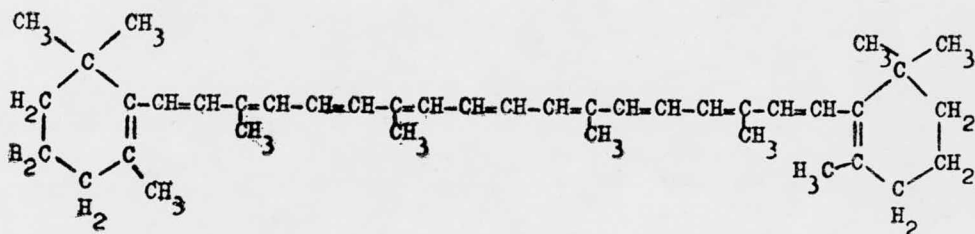
Los carotenoides son pigmentos amarillos a rojos de estructura alifática o alifática alicíclica, compuestos de grupos isopreno, usualmente 8 y arreglados de tal manera que en la parte media de la molécula están presentes dos grupos metilo en las posiciones 1:6, mientras que los otros grupos metilo laterales están en las posiciones 1:5, con una serie de dobles ligaduras conjugadas carbono-carbono constituyendo el sistema cromóforo de los carotenoides.<sup>1</sup>

Todos ellos cristalizan en forma de prismas de color rojo intenso y de alto punto de fusión (arriba de  $160^\circ$  grados) siendo estables al calentamiento en atmósfera inerte. Se disuelven rápidamente en las grasas y en los disolventes de éstas: cloroformo, bisulfuro de carbono, benceno y más difícilmente en éter de petróleo y son prácticamente insolubles en alcohol.

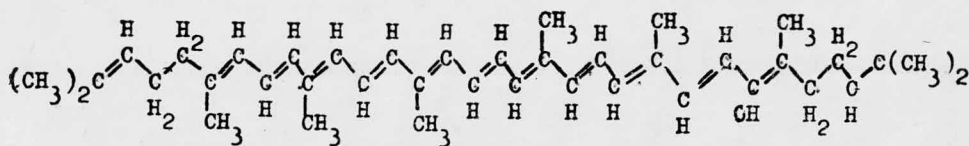
Presentan un espectro de absorción típico en la región verde azul del espectro, en que la posición de la máxima absorción varía de 450 a 500 milimicras dependiendo del disolvente usado.

Los carotenoides tienen una gran capacidad de absorción para el oxígeno y pueden funcionar como conductores de éste.

La estructura básica se demuestra con la fórmula del beta-caroteno que contiene 40 átomos de carbono.



Los carotenoides pueden relacionarse estructuralmente al compuesto original licopeno.

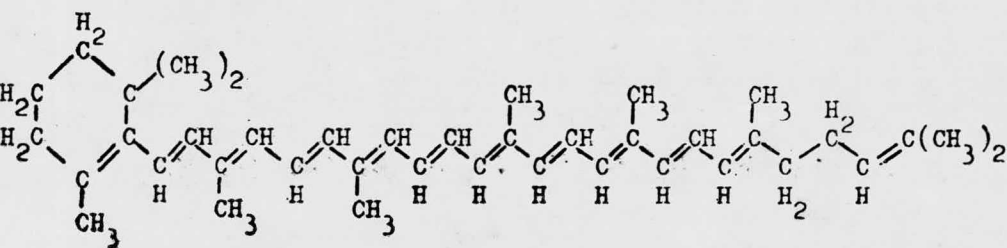


**trans-licopeno**

Estos pigmentos pueden derivarse del carotenoide original por cambios químicos como la migración de dobles ligaduras, introducción de grupos hidroxilo, ceto o metóxilo, hidrogenación parcial, ciclización, degradación oxidativa o isomerización.

Los carotenoides se subdividen en carotenos y xantofilas. Los carotenos incluyen todos los carotenos hidrocarbonados y las xantofilas todos los derivados hidróxi, epóxi y óxi, de los carotenos.

→ Un sistema de clasificación diferente subdivide a los carotenoides en acíclicos, monocíclicos y bicíclicos. Los respectivos compuestos originales son el licopeno, gama-caroteno y beta-caroteno.



**gamma-caroteno**

— Existe un gran número de carotenoides por isomerización *cis-trans*.<sup>2 3</sup> Teóricamente existen 1,056 isómeros *cis-trans* del beta-caroteno, sin embargo, los grupos metilo a lo largo de la cadena causan impedimento estérico que limita la transposición.<sup>2</sup> Por lo que el beta-caroteno tiene solamente 20 isómeros *cis-trans*.

La siguiente tabla muestra el desarrollo histórico del beta caroteno.

**TABLA I**

1830	primera mención	(1831)	Wachenroder
1890	fórmula molecular	(1906)	Willstätter
1930	constitución	(1929-31)	Karrer
1950	síntesis total	(1950)	Inhoffen
1953	método comercial	(1953)	Isler

Los carotenoides están muy difundidos, tanto en el reino animal como vegetal. Se encuentran en las hojas de todas las especies de plantas hasta ahora examinadas y en todas las partes verdes de la misma (hojas, tallos, etc.) Estos pigmentos se encuentran presentes en los tejidos fotosintéticos de las plantas superiores, algas y bacterias; en flores, frutos y raíces de las plantas superiores, así como en hongos y bacterias.

Los carotenoides también se encuentran ampliamente distribuidos en los animales, especialmente en los invertebrados marinos, almacenándose los carotenos en las gónodas, piel y alas.

En los animales los carotenoides existen como lípidos en células especializadas como en la piel de las truchas; disueltos en la grasa del cuerpo de las vacas y como cromoproteínas en los huevos de las langostas.

Un tipo especial de esta clase de compuestos juega un papel importante en la púrpura visual del ojo.

Se ha encontrado beta-caroteno puro en el corpus lúteum y el corpus rubrum de las vacas, en la placenta humana, en los testículos de toro y la glándula suprarrenal de casi todos los mamíferos; en la sangre y la mayoría de las vísceras.

Existen muy pocos conocimientos acerca de la función que los carotenos tienen en las plantas que los producen aún cuando parecen estar relacionados con el crecimiento activo e íntimamente asociados con la clorofila. Los retoños blanqueados contienen poco caroteno, haciendo pensar éste hecho el papel que la luz tiene en el proceso de su elaboración, pero una vez formado no desaparece sino que viran al amarillo en la obscuridad.

Muchas especies bacterianas sintetizan carotenoides y algo de beta-caroteno por sí mismas. Los hongos contienen poca o ninguna cantidad de caroteno. Las algas, por ejemplo la *Nitschia Closterium*, lo contiene en abundancia.

## 1.2 Existencia del beta-caroteno

—Desde el punto de vista económico el beta-caroteno es la provitamina A más importante. Es el carotenoíde distribuido más extensamente en la naturaleza, se ha encontrado en las hojas de todas las especies de plantas hasta ahora examinadas<sup>4</sup> ←

④

—También desde el punto de vista nutricional, el beta-caroteno es el carotenoíde más importante por su prevalecencia en la naturaleza y por su alta actividad provitamínica A.<sup>5</sup> ←

Comparando las fórmulas de los carotenos alfa, beta y gama, se ve que el anillo compuesto a la derecha e izquierda de la cadena poliénica es semejante en el caroteno beta y diferente en los carotenos alfa y gama.

El anillo izquierdo de los tres es conocido con el nombre de beta-ionona, ópticamente inactivo y es esencial en la actividad provitamínica A. La presencia de éste anillo es básica para la formación de vitamina A, ya que la estructura en anillo de la vitamina A, es decir, la beta-ionona, es la porción integral de la molécula y solamente los pigmentos que tienen esa configuración, pueden ser convertidos en compuestos activos. Es por éste hecho y así mismo al hecho de que el beta-caroteno contiene dos de tales anillos, mientras que los carotenos alfa y gama contienen solamente uno, lo que ha conducido a la teoría de que la actividad del beta-caroteno es superior en vitamina A, puesto que reinduce que su rompimiento simétrico da dos moléculas de vitamina A.

Efectivamente, puede notarse que si rompemos la molécula del beta-caroteno en su parte media podría dar dos moléculas idénticamente construidas, lo cual se verifica en el hígado por un proceso de hidrólisis, resultando dos moléculas de vitamina A a partir de una molécula de beta-caroteno.

Puesto que el beta-caroteno es la provitamina A su concentración en los materiales en que se encuentra se expresa en unidades de vitamina A.

La unidad internacional de actividad de provitamina A se define como la actividad biológica de 0.600 microgramos de trans-beta-caroteno puro. Así, un gramo de beta-caroteno contiene  $1.67 \times 10^6$  U.I. de provitamina A. Biológicamente, una unidad de vitamina A es equivalente a una unidad de provitamina A. El patrón internacional de provitamina A es una solución de beta-caroteno puro en aceite de semilla de algodón, que contiene 0.600 microgramos de la provitamina por 5.00 mg de solución estabilizada con hidroquinona.

Hasta la adopción del actual patrón de acetato de vitamina A la U.S.P. usaba el patrón internacional de beta-caroteno para valorar los aceites de hígado de bacalao como normas de referencia de la vitamina A.

**TABLA II**  
**MATERIAS PRIMAS CON MAYOR CONTENIDO DE**  
**BETA-CAROTENO**

Las concentraciones de beta-caroteno se expresan en Unidades Internacionales.

	<b>Beta-caroteno</b> <b>i.u./ por 100 g</b>
Frijol ( <i>Phaseolus Vulgaris</i> ) . . . . .	930
Frijol ( <i>Phaseolus cocineus</i> ) . . . . .	650
Grosella negra ( <i>Ribes nigrum</i> ) . . . . .	250
Col de Bruselas ( <i>Brassica olerácea</i> ) . . . . .	700
Zanahoria, raíz ( <i>Daucus carota</i> ) . . . . .	20,000
Zanahoria, hoja . . . . .	19,500
Trébol, hoja . . . . .	19,500
Trébol ( <i>Trifolium repens</i> ) . . . . .	23,00
Mastuerzo ( <i>Lepidium sativum</i> ) . . . . .	8,300
Grosella blanca ( <i>Ribes grossularia</i> ) . . . . .	230
Pastos . . . . .	19,500
Lechuga ( <i>Lactuca serriola</i> ) . . . . .	2,600
Menta ( <i>Mentha spicata</i> ) . . . . .	19,000
Narcisos . . . . .	500,000
Ortiga ( <i>Urtica dioica</i> ) . . . . .	23,000
Perejil ( <i>Carum petroselinum</i> ) . . . . .	13,800
Pera ( <i>Pisum sativum</i> ) . . . . .	670
Espinacas ( <i>Spinacia oleracea</i> ) . . . . .	11,000
Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) . . . . .	1,300
Berro ( <i>Nasturtium officinale</i> ) . . . . .	5,200
Alfalfa seca ( <i>Medicago sativa</i> ) . . . . .	66,600
Aceite de palma roja (muy madurada) . . . . .	113,000
Aceite de palma roja (madura) . . . . .	84,000

Como se observa en la tabla anterior las materias primas con mayor contenido de beta-caroteno son: el trébol, pastos, narcisos, alfalfa y zanahoria.

**TABLA III**

Contenido promedio de Beta-Caroteno por cada 100 gr.

	i.u. por 100 gr.
Zanahoria .....	19,500
Trébol .....	21,000
Pastos .....	19,500
Alfalfa .....	21,500
Alfalfa seca .....	50,500

**TABLA IV**

Rendimiento de Aminoácidos Esenciales y Proteína Total

COSECHA	RENDIMIENTO APROX. DE AMINOACIDOS ESENCIALES (lbs/Acre)	RENDIMIENTO TOTAL DE PROTEINAS
Alfalfa .....	300	2,400
Frijol de soya .....	150	650
Maíz .....	170	1,550
Clavel .....	150	
Semilla para ganado .....	130	
Sorgo .....	100	2,010
Frijol de campo .....	100	
Cebada .....	60	
Semilla de algodón .....	50	
Trigo .....	50	400
Arroz .....	85	20

En la tabla anterior se muestran los rendimientos de aminoácidos esenciales y de proteína total de varios forrajes y semillas.<sup>6</sup>



5

La obtención del beta-caroteno puro se lleva a cabo principalmente extrayéndolo de diversos vegetales y separándolo por medios cromatográficos. Sin embargo, los productos que se importan al país son preparados, que además de beta-caroteno, contienen xantofilas, clorofilas, fosfolípidos, etc., es decir, que para satisfacer el mercado nacional no se requiere obtener un producto puro.

La selección de la materia prima se debe hacer tomando en cuenta la disponibilidad, bajo costo, alto rendimiento de beta-caroteno y el aprovechamiento de los subproductos.

Como se puede observar la alfalfa es una de las materias primas con mayor contenido de beta-caroteno, y fue escogida para este trabajo, además por su alto contenido de beta-caroteno, por su bajo costo y por la facilidad de disponer de ella en buena calidad y en todo el año.

NO

La alfalfa es la fuente principal de extracción de beta-caroteno o provitamina A, que se utiliza como complemento dietético para el hombre, además se obtienen subproductos de mayor valor, con alto contenido proteínico, que se puede utilizar como alimento para el ganado y como complemento para la alimentación avícola.

Los principales Estados en los que se cultiva la alfalfa, en orden de importancia, son:

	Siembra (año)	Cosecha
Guanajuato .....	Nov/ Feb	Mar/Oct
México .....	Sep/Feb	Mar/Nov
Hidalgo .....	Dic/Jun	Ene/Nov
Querétaro .....	Mar/Abr	Mar/Nov
Durango .....	Nov/Feb	Mar/Oct
Chihuahua .....	Sep/Dic	Mar/Oct

En la tabla anterior, se ve la disponibilidad de la alfalfa, que es prácticamente de todo el año.

Datos estadísticos de la producción de alfalfa.

**TABLA V**

<b>AÑO</b>	<b>MILES DE TONELADAS</b>	<b>VALOR DE PRODUCCION MILES DE PESOS</b>	<b>SUP. Has. COSECHADAS</b>	<b>REND. Kg. p/Ha</b>	<b>PRECIO RURAL X TON</b>
1971	9,689	1.347,232	164	59,138	140
1972	10,434	1.358,769	168	62,143	130
1973	11,158	1.506,679	181	61,761	140
1974	13,278	2.192,158	201	66,035	170
1975	14,260	3.168,795	204	70,040	220
1976	13,483	2.844,521	205	65,819	210
1977	14,493	3.823,988	384	37,721	264
1978	15,631	7.344,400	200	78,155	470

Funte: Sría de Agricultura y Recursos Hidráulicos

**TABLA VI**  
**PRODUCCION DE ALFALFA VERDE 1975**

ENTIDADES FEDERATIVAS	PRODUCCION			RENDI- MIENTO Kg/Ha
	SUPERFICIE HECTAREAS	PRODUCCION TOTAL	VALOR MILES	
Estados Unidos Mexicanos	414,917	14,259,603	3,241,348	34,367
Aguascalientes . . . . .	8,000	280,000	39,200	35,000
Baja California . . . . .	31,280	782,000	129,030	26,598
Baja California Sur . . . . .	4,068	210,200	42,040	51,672
Coahuila . . . . .	14,596	585,368	118,450	40,105
Chiapas . . . . .	100	2,000	430	20,000
Chihuahua . . . . .	39,164	1,637,745	297,239	41,818
Distrito Federal . . . . .	1,360	15,880	3,113	11,676
Durango . . . . .	20,619	831,812	140,508	40,343
Guanajuato . . . . .	69,400	2,845,400	919,550	41,000
Hidalgo . . . . .	34,300	1,264,060	198,078	36,853
Jalisco . . . . .	9,505	380,150	116,119	39,995
México . . . . .	42,000	1,344,000	315,840	32,000
Michoacán . . . . .	7,745	197,250	44,064	25,468
Morelos . . . . .	858	33,846	7,124	39,448
Nayarit . . . . .	60	1,200	576	20,000
Nuevo León . . . . .	4,494	131,066	44,377	29,165
Oaxaca . . . . .	4,930	109,975	101,726	22,307
Puebla . . . . .	31,000	718,000	147,680	23,161
Querétaro . . . . .	21,990	879,600	165,048	40,000
San Luis Potosí . . . . .	12,350	380,000	67,000	30,769
Sinaloa . . . . .	4,810	176,485	29,120	36,691
Sonora . . . . .	39,774	1,143,502	228,203	28,750
Tamaulipas . . . . .	11	149	148	13,545
Tlaxcala . . . . .	2,153	35,915	10,585	16,681
Veracruz . . . . .	1,350	46,000	7,700	34,074
Zacatecas . . . . .	9,000	228,000	68,400	25,333

Fuente: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos

**TABLA VII**  
**PRODUCCION DE ALFALFA VERDE 1976**

ENTIDADES FEDERATIVAS	PRODUCCION			RENDI- MIENTO Kg/Ha
	SUPERFICIE HECTAREAS	PRODUCCION TOTAL	VALOR MILES	
Estados Unidos Mexicanos	400,606	13,483,318	2,844,521	33,657
Aguascalientes .....	8,825	230,894	53,367	26,163
Baja California .....	31,000	930,000	176,700	30,000
Baja California Sur .....	4,712	235,600	47,120	50,000
Coahuila .....	12,974	464,986	95,993	35,839
Chiapas .....	100	2,000	400	20,000
Chihuahua .....	43,278	1,709,481	230,672	39,500
Distrito Federal .....	1,370	26,352	5,007	19,235
Durango .....	22,376	809,551	157,448	36,179
Guanajuato .....	62,150	2,309,400	692,820	37,158
Hidalgo .....	34,000	1,038,500	147,455	30,544
Jalisco .....	10,000	428,500	144,315	42,425
México .....	42,300	1,353,600	189,504	32,000
Michoacán .....	7,800	210,600	6,800	27,000
Morelos .....	840	30,165	7,936	35,910
Nayarit .....	60	1,200	720	20,000
Nuevo León .....	4,925	146,666	73,333	29,779
Oaxaca .....	4,860	172,277	46,592	35,447
Puebla .....	31,000	871,375	182,403	28,108
Querétaro .....	16,961	573,345	141,320	33,803
San Luis Potosí .....	12,900	485,250	78,683	37,616
Sinaloa .....	5,931	123,918	29,740	20,893
Sonora .....	28,330	956,137	179,187	33,749
Tamaulipas .....	72	881	881	12,236
Tlaxcala .....	3,242	54,405	20,035	16,781
Veracruz .....	1,500	37,750	9,470	25,166
Zacatecas .....	9,000	280,485	86,620	31,165

Fuente: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

### 1.3 Alfalfa fuente de beta-caroteno

El nombre botánico de la alfalfa es *Medicago sativa*. Pertenece a la familia de las leguminosas, subfamilia de las papilionáceas, la cuál comprende muchas variedades herbáceas y algunas arbóreas que llegan a elevarse hasta tres metros de altura.

Un alfalfar bien cultivado puede llegar a durar hasta cien años, pero generalmente, la producción promedio es de 35 a 50 años, efectuándose de 6 a 8 cortes por año.

El contenido de sustancias nutritivas y la composición química de la alfalfa es muy variable en los distintos países, pues depende del clima, tipo de alfalfa, clase de tierra y época de recolección.

La alfalfa, debido a sus excelentes propiedades alimenticias se emplea en distintas formas para la alimentación de diversas clases de animales incluyendo al hombre por lo tanto es una planta de cultivo universal.

La alfalfa contiene grandes cantidades de vitaminas y sales minerales, predominando el calcio y vitaminas antirraquíticas. Es rica en vitamina B-1, llamada tiamina, ésta vitamina actúa sobre el Sistema Nervioso Central ayudando en el control de los estados de temor, irritabilidad e inquietud. Contiene vitamina B-2 que evita las hemorragias y es un factor de coagulación, además, la alfalfa proporciona al organismo calcio y proteínas que ayudan al desarrollo, evita el raquitismo y sirve contra las enfermedades renales.

La alfalfa en México, tiene aproximadamente, la siguiente composición: <sup>6</sup>.

Humedad .....	6.9	a	7.14%
Grasa extraída con éter .....	2.32	a	3.69%
Fibra cruda .....	26.41	a	18.54%
Cenizas .....	8.40	a	10.32%
Extracto libre de nitrógeno ...	37.85	a	40.77%
<b>Minerales</b>			
Manganeso .....	29	a	37. P.P.M.
Zinc .....	20		
Fósforo .....	2,230	a	2,780
Cobalto .....	0.18	a	0.30

Potasio .....	23,300	a	25,100	
Cobre .....	10.4	a	11.1	
Calcio .....	12,300	a	14,800	
Selenio .....	0.50	a	0.54	
Fierro .....	312	a	448	
Cloro .....	4,350	a	5,250	
Magnesio .....	2,900	a	3,450	
Iodo .....	0.12	a	0.20	
Sodio .....	700	a	1,105	
<b>Vitaminas</b>				
Vitamina A .....	77,404	a	191,365	u.i. por lb
Beta-caroteno .....	102	a	252.5	
Xantofila .....	175	a	401	
Riboflavina .....	10.6	a	17.4	
Niacina .....	41.9	a	58.8	
Colina .....	1,550	a	1,853	
Acido pantoténico .....	20.91	a	33.0	
Vitamina E (tocoferol) .....	98	a	151	
Acido fólico .....	1.54	a	3	
Betaína .....	4,670	a	5,434	
Piridoxina .....	6.5	a	7.8	
Vitamina K .....	9.9	a	10	
Tiamina .....	3	a	4.2	
<b>Aminoácidos</b>				
Treonina .....	0.6	a	1.0	%
Triptófano .....	0.4	a	0.6	
Metionina .....	0.2	a	0.4	
Lisina .....	0.6	a	1.0	
Arginina .....	0.6	a	1.0	
Glicina .....	0.7	a	1.1	
Histidina .....	0.3	a	0.5	
Isoleucina .....	1.1	a	1.7	
Fenil alanina .....	0.8	a	1.2	
Tirosina .....	0.4	a	0.8	
Alanina .....	0.8	a	1.3	
Acido aspártico .....	1.7	a	2.3	
Prolina .....	0.8	a	1.1	
Serina .....	0.7	a	0.9	
Valina .....	0.7	a	1.2	

#### 1.4 Método de análisis de la alfalfa

**Humedad.**—El contenido de humedad en la alfalfa se determina por diferencia de pesos, es decir, se pesa la alfalfa húmeda, se deja secar aproximadamente dos semanas bajo las condiciones que se mencionan más adelante, pesándose cuando está seca. El contenido de humedad, es el peso de la alfalfa húmeda menos el peso de la alfalfa seca.

—▷ **Carotenos.**—El método utilizado para determinar la presencia de un carotenoide consiste en emplear ácidos fuertes como ácido sulfúrico. La forma de efectuarlo es la siguiente: se prepara un extracto de la planta por estudiar con éter de petróleo o cloroformo y ahí se agregan unas gotas de ácido sulfúrico concentrado, éste se colorea de azul si existen carotenoides. Las preparaciones purificadas de carotenoides dan una coloración azul mucho más intensa. Estas coloraciones azules intensas dan una absorción máxima característica que puede utilizarse para la estimación cuantitativa de carotenoides.<sup>7</sup> ←

—▷ Otro método es el microquímico que permite determinar la presencia de carotenoides en una planta. Se hace actuar, durante algunos días, un reactivo que contiene 20% de hidróxido de potasio y 40% de alcohol etílico sobre la planta por estudiar, saponificándose las grasas, de tal manera que la clorofila y los carotenos cristalicen y puedan distinguirse bajo el microscopio. Este método no permite determinar exactamente los carotenos presentes ni diferenciarlos.<sup>7</sup> ←

**Saponinas.**—Se determinan las saponinas usando hongos *Trichoderma Viride*. Las muestras se extraen a reflujo durante dos horas y media con etanol al 50%, el etanol se evapora, la muestra se redisuelve en agua y se toman alícuotas que se añaden a una preparación de agar de dextrosa de papas (PDA). El crecimiento de los hongos en PDA se compara con una saponina estándar para determinar y cuantear el contenido de saponinas de alfalfa.<sup>8</sup>

## 1.5 Estabilidad del beta-caroteno

→ Es especialmente sensible a la luz, calor, oxígeno atmosférico y ácidos, hecho que dificulta su manejo. ↵

→ Es importante seguir una serie de precauciones generales en el manejo de carotenoides, no solamente para evitar pérdidas durante el transcurso del aislamiento de los mismos, sino también para impedir que los carotenoides, particularmente lábiles, se conviertan en otros carotenoides. ↵

→ Para lograr rendimientos satisfactorios se debe evitar: la concentración de soluciones por calentamiento excesivo; el uso de cromatogramas de capa fina o columnas no protegidas; la exposición prolongada de las soluciones de carotenoides al aire o a la luz, especialmente a la luz del sol o a la luz ultravioleta ya que ambas inducen la fotoisomerización cis-trans que conducen a la fotodestrucción de los carotenoides. Es por esto recomendable que el laboratorio esté equipado para producir luz de día de baja intensidad. También deberá excluirse la luz completamente del sistema cromatográfico y de las soluciones de carotenoides. ↵

A causa de la termolabilidad de muchos carotenoides, el calentamiento deberá usarse cuando sea absolutamente necesario en la manipulación de los pigmentos. Como los solventes usados en la extracción y purificación final deben recuperarse por destilación de preferencia al vacío es importante elegir disolventes con bajo punto de ebullición.

→ Los carotenoides son estables al calor en un sistema que contenga un mínimo de oxígeno. Las soluciones de carotenoides pueden calentarse bajo nitrógeno a 150°C con pérdidas muy pequeñas. Cuando las soluciones de beta-caroteno se calientan sobre 60°C, ocurre la isomerización cis-trans, resultando una mezcla de esteroisómeros que contiene principalmente trans beta-caroteno. A la temperatura ambiente también ocurre la isomerización cis-trans, pero muy lentamente. ↵

Todos los carotenoides tienen dobles ligaduras conjugadas carbono-carbono en su cadena, responsables de sus propiedades como colorantes y de su sensibilidad a la oxidación.



Los carotenoides pueden ser oxidizados por oxígeno o por peróxidos.<sup>9</sup> Los carotenoides son particularmente sensibles cuando están aislados o puros. Es recomendable usar antioxidantes en la cromatografía como etoxiquina, quinol<sup>10</sup> y pirogalol.<sup>11</sup>

A no ser que los ácidos se usen deliberadamente para iniciar reacciones o en la separación de carotenoides, deben eliminarse en cualquier etapa de la manipulación de carotenoides ya que la descomposición de los carotenoides resulta de la exposición de éstos con los ácidos.

La purificación de solventes para el uso en análisis de carotenoides necesita ser particularmente rigurosa, no solo por el efecto perjudicial de ciertas impurezas sobre los carotenoides, sino también, por que la evaporación de grandes volúmenes de solventes puros, acumulan las impurezas, interfiriendo en el análisis cualitativo y cuantitativo. Por eso se recomienda eliminar todas las impurezas de los disolventes y secarlos con sulfato de sodio anhidro.<sup>12</sup>

Los carotenoides deben almacenarse en la obscuridad, bajo una atmósfera de nitrógeno o en el caso de sólidos al vacío, a una temperatura de -20°C. Los carotenoides puros se conservan mejor como sólidos cristalinos, también pueden guardarse en solución, con disolventes tales como éter de petróleo, hexano o benceno.

Los caretonoides no son sensibles al pH en un rango de 2-7 excepto que tengan un grupo caboxilo tales como la bixina, que cambia de color y solubilidad con el pH. El beta-caroteno no cambia de color con el pH y es estable en un pH 2-7.<sup>1</sup>

**PARTE TEORICA**

## 2.1 Propiedades del beta-caroteno

→ El beta-caroteno forma prismas hexagonales de color violeta oscuro; cuando se obtienen por cristalización en una mezcla de benceno y metanol; y forma cristales cuadráticos o rómbicos de color rojo cuando se cristalizan en éter de petróleo.

**Punto de Fusión.**—181-182°C ; 187.5° (Miller)

**Solubilidad.**—El beta-caroteno se solubiliza fácilmente en disulfuro de carbono, cloroformo y benceno, siendo menos soluble en éter de petróleo y éter etílico. 100 mililitros de n-hexano disuelven 109 miligramos de beta-caroteno a 0°C.. El pigmento es casi insoluble en metanol y etanol.<sup>13</sup> A

### PROPIEDADES ESPECTROSCOPICAS

Solvente	Absorción máxima en milimicrones, (m $\mu$ )		
Disulfuro de carbono .....	520	485	450
Cloroformo .....	485	461	435
Petróleo .....	483.5	452	426
Hexano .....	477	450	425
Eter de petróleo .....	425	448	475
Etanol .....	427	449	475
Acetona .....	429	452	478
Benceno .....	435	462	487
Tolueno .....	434	463	490
Piridina .....	450	485	520

→ **Actividad óptica.**—El beta-caroteno tiene una estructura simétrica y por lo tanto, es ópticamente inactivo. A

**Reacciones coloridas.**—El beta-caroteno da soluciones azul o violeta con una gran variedad de ácidos fuertes concentrados, tales como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido tricloroacético y ácidos de Lewis como tricloruro de antimonio o tricloruro arsénico.<sup>14</sup>

Por ejemplo al disolver 1 a 2 miligramos de beta-caroteno en 2 mililitros de cloroformo y agregar ácido sulfúrico concentrado la capa ácida adquiere un color que va del azul intenso al azul-violeta y ocasionalmente un color verde azulado con desaparición del mismo al diluir con ácido.

Si se disuelve el pigmento en cloroformo y se agrega una gota de ácido nítrico fumante, se produce inmediatamente una coloración azul, que se transitoria, la cuál se torna gris despúes y finalmente da un color amarillo sucio.

Al disolver 1-2 miligramos de beta-caroteno en cloroformo y al agregar una solución de tricloruro de antimonio se produce una coloración azul obscuro, que tiene un máximo de absorción a 590 milimicras.<sup>13, 7</sup>

El cloruro de hidrógeno en solución etérea o metanólica no produce coloración con el beta-caroteno. Estas pruebas colorimétricas se pueden usar para la identificación cuantitativa del beta-caroteno.<sup>15</sup>

**Prueba de partición.**—Al realizar la partición entre éter de petróleo y una solución acuosa de metanol al 90 %, la concentración de beta-caroteno en el primero es 660 veces mayor que en el último.

**Estabilidad en álcalis.**—El beta-caroteno es estable en los álcalis y permanece estable por años, almacenado en vacío o en una atmósfera de gas inerte.

**Propiedades cromatográficas.** — El beta-caroteno se absorbe moderadamente en hidróxido de calcio, a partir de una solución de éter de petróleo. La elución puede efectuarse por medio de una solución etérea que contenga alrededor de 5% de metanol. El beta-caroteno que se encuentre débilmente absorbido en carbonato de zinc o carbonato de calcio se eluye durante el desarrollo del cromatograma.

En una columna cromatográfica invertida se encuentra abajo del alfa-caroteno y arriba del gama-caroteno.

**Comportamiento con oxígeno.**—Al permanecer en el aire el beta-caroteno absorbe oxígeno con velocidad ascendente, formando productos incoloros. Según Karrer y Jucker<sup>13</sup> el primer producto formado por la oxidación del beta-caroteno fué el mono-epóxido del beta-caroteno, que

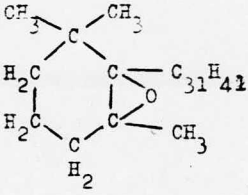
tiene un átomo de oxígeno unido entre dos átomos de carbono sobre la parte interior de uno de los anillos de beta-ionona.

Este epóxido es muy sensible a los ácidos minerales, dando el mutacromo con la formación de un anillo furanoíco.

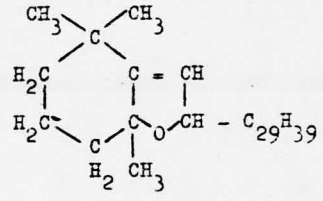
Una oxidación más severa, con ácido crómico diluído, causa la apertura de uno de los anillos de beta-ionona, formando semi beta-carotenona.

La oxidación con permanganato forma un aldehído.<sup>16, 17</sup>

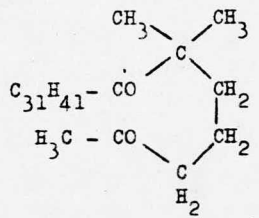
Fórmulas desarrolladas de algunos de los compuestos formados por oxidación del beta-caroteno.



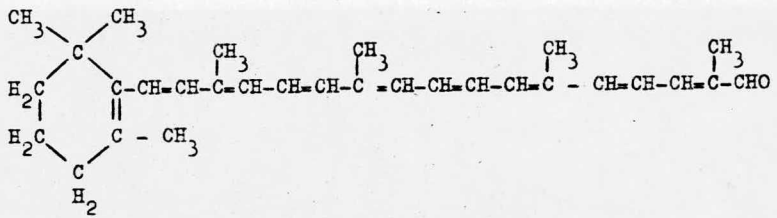
epóxido del beta-caroteno



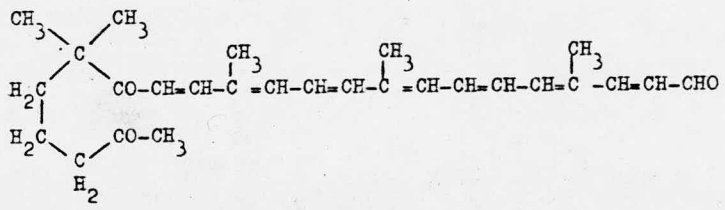
mutacromo, con anillo furánico



semi-beta-carotenona



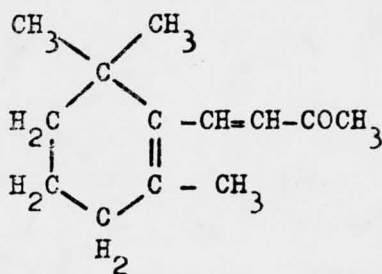
beta-apo-2-carotenal



beta-carotenona aldehído

La oxidación del beta-caroteno se evidencia por el olor característico a violetas de la beta-ionona.

Las iononas son líquidos de alto punto de ebullición, con un característico olor a violetas. En el beta-caroteno ambos extremos de la molécula tienen la estructura de la beta-ionona.



beta-ionona

Productos de oxidación del beta-caroteno con oxígeno.<sup>18</sup>

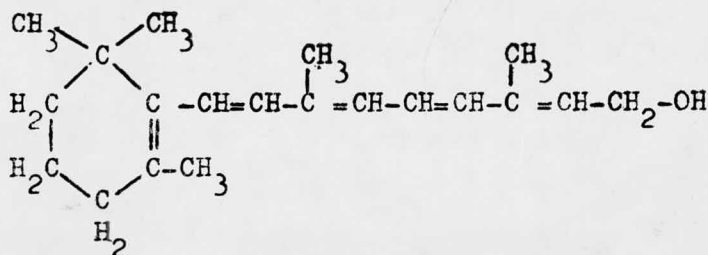
Compuesto	Absorción máxima en milimicrones, (m $\mu$ ), en hexano		
Beta-caroteno 5,6-monoepóxido isómero	473	444	423
Beta-caroteno 5,6,5',6'-diepóxido	468	440	417
Beta-caroteno 5,8-monoepóxido	450	427	404
Beta-caroteno 5,8-monoepóxido isómero	448	427	404 500
Carbonil polieno	378		
Beta-caroteno 5,8,5',8'-diepóxido	426	401	381

La oxidación del beta-caroteno causa una disminución del color y de la potencia vitamínica.

**Detección y estimación.**—El beta-caroteno puede separarse de los otros hidrocarburos carotenoides por absorción en hidróxido de calcio, a partir de éter de petróleo y puede identificarse por su máxima absorción (475 m $\mu$ ). De acuerdo con Kuhn y Brockmann<sup>19</sup> una solución alcohólica de azobenceno puede utilizarse como estándar para determinaciones colorimétricas.

**Estado cristalino.**—El beta-caroteno puro en estado cristalino puede examinarse bajo un microscopio. Desafortunadamente, solamente es posible obtener sólidos somicristalinos al aislarlos.

**Comportamiento fisiológico.**—<sup>20</sup> La vitamina A es un alcohol primario con un gran peso molecular (294), cuya fórmula empírica es C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>OH y su fórmula estructural establecida por Karrer es la siguiente:



La actividad de la vitamina A, es en parte debida al anillo beta-ionona, pero existen evidencias de que la doble ligadura en la cadena lineal (cadena poliénica) esté igualmente ligada con la actividad fisiológica.

El problema de la naturaleza química de ésta vitamina vino con la demostración de que ésta se presenta en fuentes vegetales, como un pigmento amarillo, identificado primitivamente por Wackenroder en 1826 y llamado por él caroteno debido a que lo obtuvo de la zanahoria.

Steenbock fué el primero en sugerir que podía haber alguna relación entre el caroteno y la vitamina A pues encontró que la avitaminosis en ratas puede curarse con vegetales verdes y frescos y que la acción saludable corresponde a la cantidad de caroteno presente.

Pero la prueba de que el caroteno es la provitamina A se debe primordialmente a Moore, Karrer y colaboradores, quienes demostraron que es suficiente nutrir ciertos animales con carotenos para después encontrar en el hígado vitamina A y no caroteno.



Los compuestos encontrados en las plantas con actividad de vitamina A para los animales pertenece a la clase de los caretenoides con 40 átomos de carbono en los que se suceden regularmente en acoplamiento simple y doble los átomos de carbono y se llaman provitaminas A. El término de provitaminas, sólo debe ser empleado tomando como base aquellos organismos que los transforman en vitamina A.

En condiciones normales, la vitamina A es rápidamente absorbida por el tracto intestinal aún cuándo su correcta absorción está por los demás relacionada a la presencia de grasas y a la naturaleza de ellas, pues se ha visto que cuándo más insaturado es el aceite es mayor la absorción.

Una vez que las provitaminas han atravesado la pared intestinal pasan al torrente sanguíneo el cuál las transporta a través de todo el organismo. La cantidad de caroteno existente en el suero sanguíneo es variable; cantidad que se encuentra duplicada o triplicada en ciertos padecimientos de conversión y cuando se ingieren grandes cantidades de sustancias que lo contienen.

Las provitaminas son separadas de la sangre por el sistema retículo-endotelial, convertidas y almacenadas. La conversión de provitamina A en vitamina A puede demostrarse experimentalmente siguiendo los niveles del caroteno y vitamina A en la sangre.

El lugar principal de almacenamiento de la vitamina A es el hígado, el cuál contiene Moore 100,000 veces mayor cantidad de vitamina que todos los otros depósitos de grasa.

La concentración de vitamina A en hígados humanos es por término medio 200 U.I. por gramo de tejido fresco, en adultos: 130 U.I. en los niños y 17 U.I. en infantes.

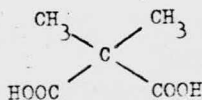
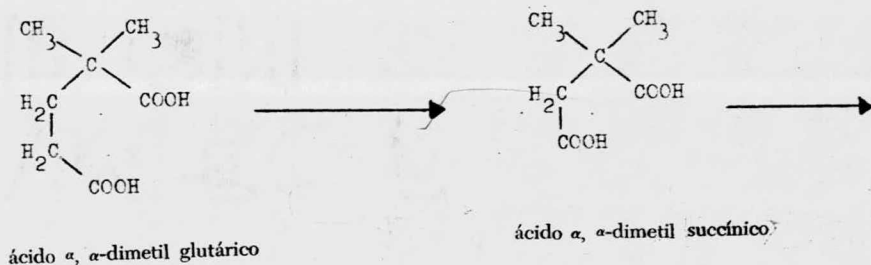
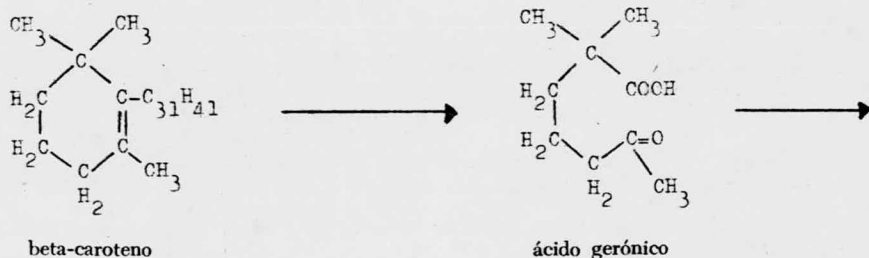
En los seres humanos normales parece que no existe ninguna excreción urinaria de vitamina A, ni de caroteno, excepto cuándo ha sido administrada una dosis excesiva de cualquiera de esas sustancias.

La acción de la vitamina A está íntimamente ligada a la existencia del anillo ionón, así como a la presencia de las dobles ligaduras, y es interesante también, en relación con sus propiedades bioquímicas, su estructura de alcohol primario, ya que sea de un modo u otro, la vitamina actúa en el organismo por sí misma.

**Actividad Biológica.**—Aproximadamente 1.600,000 U.I. de vitamina A por gramo.

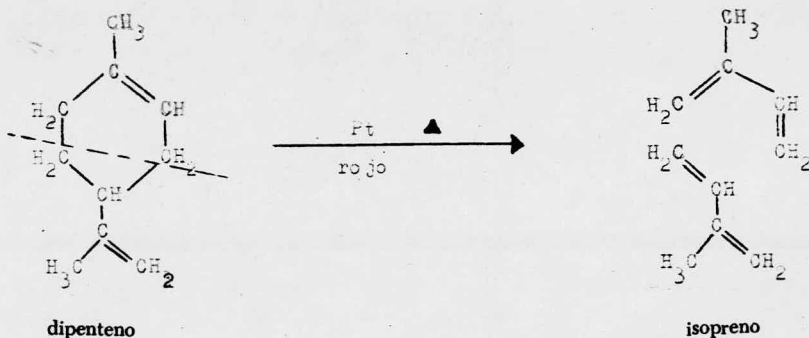
## 2.2 Estructura del beta-caroteno

La destrucción del beta-caroteno por oxidación con permanganato (21, 22, 23) da una serie de compuestos como son el ácido  $\alpha$ -dimetilglutárico, ácido  $\alpha$ -dimetilsuccínico, ácido dimetilmalónico y ácido gerónico (o ácido  $\alpha$ ,  $\alpha$ -dimetil- $\delta$ -acetil valérico). Las reacciones son:



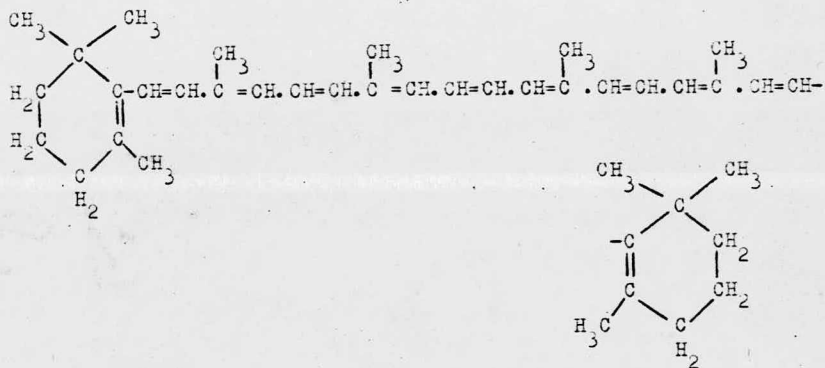
ácido dimetil malónico

La oxidación de la molécula del anillo de la beta-ionona, da productos de oxidación similares por lo cual se deduce que la molécula del beta-caroteno contiene dos sistemas de anillos de beta-ionona. Estos anillos están unidos por una cadena de cuatro unidades de isopreno.<sup>24</sup> La producción del isopreno,<sup>5</sup> se hace a partir de dipenteno. La reacción es:



El beta-caroteno puede considerarse como el producto de la dimerización, cola con cola, de dos unidades de 20 carbonos, producidos a su vez por la condensación cabeza con cola de cuatro unidades isoprénicas. Los carotenoides hidrocarbonados son nombrados carotenos y los carotenoides oxigenados son conocidos como xantofilas.

La estructura del beta-caroteno se da a continuación:



### 2.3 Métodos generales de aislamiento

— El procedimiento para la separación de los carotenoides es el siguiente:

- 1.—Preparación de los materiales que se van a examinar y extracción de los carotenoides.
- 2.—División de los carotenoides en constituyentes hipofásicos y epifásicos.
- 3.—Separación de los pigmentos presentes en cada fase y preparación en una forma cristalina.

Como los carotenoides están distribuidos ampliamente en forma natural y se encuentran en una gran variedad de tipos de tejidos, no hay un método general de extracción que se pueda adaptar y adoptarse como una técnica común.

Existen principalmente dos vías de extracción: por vía húmeda y por vía seca.

Si es por vía seca, el material debe deshidratarse antes de la extracción. Esto se realiza fácilmente por secado al sol, preferiblemente en una corriente de aire, o en un cuarto bien ventilado. Es muy importante que el material se extienda y voltee de vez en cuando para llevar a cabo un secado uniforme y prevenir la fermentación que destruye los carotenoides.

Una vez seco el material se separan las hojas de los tallos para facilitar la molienda, molidos los tallos se juntan con las hojas y se efectúa la extracción con el disolvente adecuado y a reflujo.

La extracción puede efectuarse con una gran variedad de disolventes como benceno, éter de petróleo, disulfuro de carbono, cloroformo, hexano, etanol, metanol y acetona. Una vez que se completa la extracción, se concentran los extractos, pudiendo recuperarse posteriormente el disolvente.

Como la mayoría de los carotenoides hidroxilados existen en la naturaleza en forma de ésteres, antes de la separación por disolventes es necesario saponificarlos<sup>25</sup> para lograr un análisis final de carotenoides.

Se debe eliminar el material lípido indeseable que podría interferir con la absorción cromatográfica.

La manera de efectuar la saponificación es la siguiente: el extracto total se disuelve en etanol o metanol y se agrega un mililitro de hidróxido de potasio acuoso al 60% en peso en 10 mililitros de solución metanólica.

Algunos carotenoides no se disuelven fácilmente en etanol o metanol, si éste es el caso, el extracto se disuelve primero en el mínimo volumen necesario de éter de petróleo o benceno, enseguida se le egrega el alcohol y el hidróxido de potasio.

Hay dos métodos para el tratamiento subsecuente:

I.—La mezcla alcalina se calienta de 5 a 10 minutos en la obscuridad a baño maría y bajo una corriente de nitrógeno<sup>9</sup> y se enfría posteriormente.

II.—La mezcla alcalina se deja reposar en un cuarto oscuro a temperatura ambiente o a 5°C bajo una corriente de nitrógeno durante 12-16 horas.

El método en caliente es más rápido sin embargo, el método en frío es más recomendable para aquellos carotenoides que son particularmente termolábiles, como la xantofila.

Las operaciones subsiguientes son las mismas independientemente del método usado en la saponificación.

Una vez efectuada la saponificación y antes de la cromatografía se efectúa la división de los carotenoides en hipofásicos y epifásicos. Los carotenoides con dos o más grupos hidroxilados son llamados pigmentos hipofásicos y aquellos sin grupos hidroxilados pigmentos epifásicos. Los carotenoides hipofásicos y epifásicos más frecuentes son los siguientes:

Epifásicos	Características intermedias entre hipofásicos y epifásicos	Hipofásicos
Aetinioeritrina	Celaxantina	Anteraxantina
Afanina	Gazaniaxantina	Auroxantina
Afanicina	Griptoxantina	Afanizofila
$\alpha$ -caroteno	Licoxantina	Astaceno
$\alpha$ -caroteno epóxido	Rodoxantina	Astaxantina
$\beta$ -caroteno	Rubicromo	Azafrina
$\gamma$ -caroteno	Rubixantina	Bixina
Citroxantina	Sarcinaxantina	Capsantina

Equinenona  
Flavodina  
Hematoxantina  
Leprotina  
Licopeno  
Micoxantina  
Pro-  $\delta$ -caroteno  
Pro-licopeno  
Rodopsina  
Rodopurpurina  
Rodovibrina  
Rodoviolascina  
Sarcinina  
Torulina

Capsorubina  
 $\beta$ -citraurina  
Crisantemaxantina  
Crosetina  
Cintiaxantina  
Flavoxantina  
Fucoxantina  
Glicimerina  
Canari-xantofila  
Licofila  
Mitiloxantina  
Nioxantofila  
Oscilaxantina  
Pectenoxantina  
Pentaxantina  
Petaloxantina  
Picofulvina  
Acido salmón  
Carotenoide satinwood  
Sulcatoxantina  
Taraxantina  
Torularodina  
Troxantina  
Violaxantina  
Voleritrina  
Xantofila  
Xantofila epóxido  
Zeaxantina

## CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina es una técnica usada para el análisis cualitativo e identificación de los carotenoides.

Los adsorbentes que pueden ser usados para los carotenoides son listados en la siguiente tabla:

**TABLA IX**

Adsorbentes usados para cromatografía en capa fina de carotenoides listados en un orden aproximado de incremento en afinidad de adsorción.

Celulosa .....	(26)
Sucrosa .....	(27)
Manitol .....	(28)
Kieselguhr .....	(29)
CaCO <sub>3</sub> -MgO-Ca(OH) <sub>2</sub> .....	(30) (31)
30:6:5	
Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	(32)
ZnCO <sub>3</sub> .....	(33)
Mg <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	(34)
MgO-Kieselguhr .....	(35)
1:1	
MgO .....	(36)
MgO-sílica gel .....	(37) (38)
1:1	
Ca(OH) <sub>2</sub> .....	(39)
Ca(OH) <sub>2</sub> -sílica gel .....	(40)
6:1	
Acido silísico .....	(41)
Sílica gel .....	(42) (43) (44)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	(42)

## 2.4 Método de separación de los pigmentos

### Método por vía seca

En un embudo de separación se disuelve el extracto de carotenoides con éter de petróleo, combinando los extractos semejantes. separen dos fases. Le fase superior contiene los llamados carotenos epifásicos y la fase inferior los llamados carotenos hipofásicos.

La fase superior se extrae con metanol y la fase inferior se extrae con éter de petróleo, combinando los extractos semejantes.

La solución de pigmentos epifásicos se lava con agua, secada con sulfato de sodio, concentrada en vacío y sujeta a cromatografía.

Esta técnica de separación es la más adecuada ya que presenta muchas ventajas como son:

Por depender de procesos físicos reversibles, no se alteran las sustancias durante la separación. A diferencia de los métodos químicos de separación las técnicas cromatográficas no requieren reactivos específicos para cada uno de los componentes de las mexas.

Las técnicas cromatográficas permiten el análisis de mezclas completas aún cuándo sus componentes sean sustancias sin describir y cuya presencia es desconocida o insospechada.

Los métodos cromatográficos se hallan entre las técnicas de separación más precisas. Se pueden aislar mínimas cantidades de sustancias que puedan ser analizadas por los métodos más sensibles.

El extracto epifásico concentrado se sujeta a cromatografía en columna con un adsorbente adecuado y se eluye con disolventes polares o no polares dependiendo de la naturaleza del carotenoide.

Las sustancias porosas empleadas como adsorbentes deben adsorber los componentes de las mezclas selectiva y reversiblemente. Deberán permitir la recuperación de las sustancias adsorbidas sin cambio, o alteración de las mismas, así como favorecer un flujo regular del líquido de lavado, asegurando así la formación de zonas uniformes y bien definidas.



---

Los adsorbentes más comúnmente usados para la cromatografía de carotenoides se enlistan a continuación:

---

Celulosa  
Sacarosa  
Almidón  
Carbonato de calcio  
Fósforo de calcio  
Carbonato de zinc  
Carbonato de magnesio  
Óxido de aluminio  
Óxido de magnesio  
Hidróxido de calcio  
Óxido de calcio  
Sílica gel

---

Los disolventes desempeñan un papel muy importante en la adsorción y separación de mezclas. Son sustancias que permiten la adsorción reversible y selectiva de los componentes, así como la determinación y recuperación de los productos separados. La adsorción de una sustancia dada aumenta, en general, a medida que decrece la polaridad de los disolventes empleados y viceversa.

Para disminuir la adsorción y por lo tanto favorecer el desarrollo del cromatograma, puede añadirse a un líquido de lavado débilmente polar pequeñas cantidades de disolvente de mayor polaridad. Estos disolventes polares pueden mejorar la separación de las mezclas por desplazamiento selectivo de las sustancias adsorbidas.

Los disolventes más comúnmente usados en la cromatografía de carotenoides, en orden de su poder de elución, están listados en la siguiente tabla: <sup>4 5</sup>

TABLA X

Solvente	Punto de ebullición	Ultravioleta
Eter de petróleo <sup>46</sup>	40-60°C	210
n-hexano	68.7	210
Ciclo hexano	80.7	210
Tetracloruro de carbono	76.7	265
Benceno	80.1	280
Tolueno	110.6	285
Eter dietílico	34.5	220
Acetona	56.5	330
Acetato de etilo	77.1	260
Diclorometano	40	245
Alcohol ter-amílico	102	210
n-propanol	97.4	210
Etanol	78.5	210
Metanol	64.1	210
Piridina	115.3	305

Los carotenos se separan sobre columna de hidróxido de calcio o alúmina activada (Brockman grado 11; 3% agua).

Los carotenoides monohidroxilados son separados sobre alúmina no muy activa. Para los carotenoides de polaridad intermedia son más convenientes el carbonato de calcio y el óxido de magnesio. Las xantofilas más polares requieren un adsorbente muy activo tal como la calulosa.

El poder de adsorción no es solamente característica de la fase estacionaria sino también es importante la selectividad de diversos factores estructurales.

La alúmina y la gel de sílice son buenos adsorbentes generales para las separaciones de compuestos de polaridades muy diferentes.

Las separaciones de los carotenos sobre óxido de magnesio, hidróxido de calcio, carbonato de zinc, dependen en gran parte de el número, posición y tipo de dobles ligaduras.<sup>9</sup>

Las columnas pueden prepararse en diversas formas que dependen en parte de las propiedades del adsorbente. Los adsorbentes de partículas

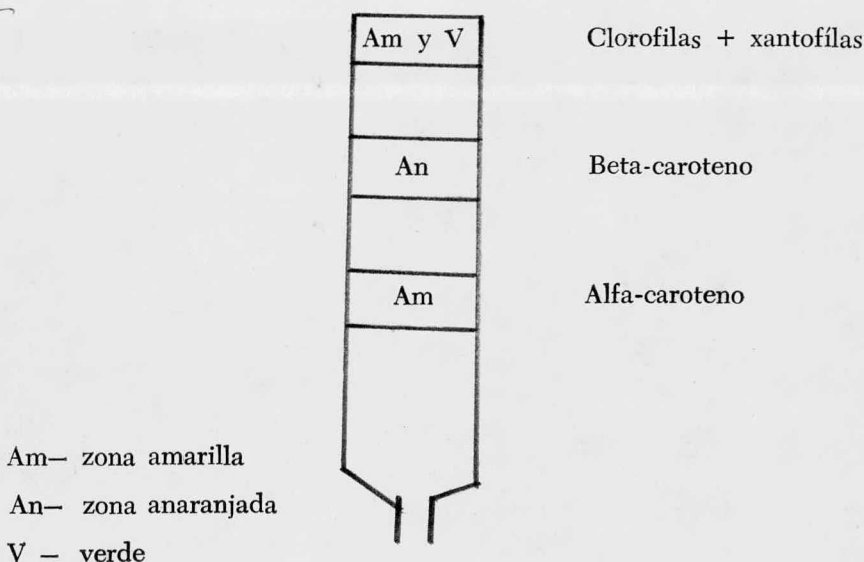
redondas, pequeñas y tensas pueden cargarse en seco por apelmazamiento en el tubo. Los polvos secos no comprensibles se pueden apisonar en el tubo en pequeñas porciones sucesivas, mientras que los polvos compresibles tales como la arena silíceo y azúcar en polvo, pueden prensarse fuertemente dentro del tubo con un émbolo solo ligeramente menor que el tubo mismo.

Los adsorbentes de polvo fino se pueden mezclar con ayuda de un filtro, como arena silíceo, tratada térmicamente antes de ser colocada dentro del tubo, consiguiéndose así mejorar la elución. Muchos adsorbentes se emplean hechos una suspensión con el disolvente y así se vierten dentro del tubo.

El extracto epifásico concentrado se aplica en el tope superior de los sustratos de la columna empacada con el adsorbente y disolvente adecuado y desplazándose a través de la columna, hasta que las zonas coloreadas se separan a lo largo de la columna. Los carotenos son eluidos secuencialmente e norden de su afinidad creciente de adsorción.

Cada fracción visualmente distinta se colecta separadamente, se evapora a sequedad y se redisuelve en un pequeño volumen de solvente, y se examina por cromatografía en capa fina o por espectrofotometría.

La separación de los carotenos es la siguiente:



## Cromatografía en columna.

NO

En el trabajo desarrollado se ensayaron los dos métodos descritos con ligeras variantes para determinar el rendimiento de beta-caroteno.

En la extracción con hexano por vía seca se obtuvieron soluciones café-rojizo que una vez concentradas produjeron sólidos viscosos de color verde oscuro.

A éstos sólidos viscosos se les efectuó la saponificación y la separación de los carotenos hipofásicos y epifásicos.

Se intentó la separación de los carotenos epifásicos por columna cromatográfica protegida de la luz con papel aluminio, usando gel de sílice como adsorbente y éter de petróleo como eluyente, se recogió la primera fracción de color amarillo. Para disminuir la adsorción y favorecer el desarrollo del cromatograma se añadieron gradualmente pequeñas cantidades de disolventes más polares.

Las fracciones recogidas fueron concentradas y analizadas cualitativamente. Los máximos de adsorción de éstas fracciones no corresponden a los máximos de adsorción del beta-caroteno.

Esto se debe probablemente a la sensibilidad de los carotenos a la luz y al oxígeno atmosférico, que provocó la oxidación de los mismos durante el desarrollo del cromatograma.

Se hicieron nuevos extractos y se sometieron a cromatografía pero no se lograron aislar puros, ya que dentro de la misma columna se apreciaban cambios de coloración.

De acuerdo a la literatura es posible la separación pero en condiciones que lo protejan del oxígeno y la luz.

g'

### Coagulación. Método por vía húmeda.

La alfalfa fresca se muele con aproximadamente 500 mililitros de agua por cada kilogramo de alfalfa. La misma cantidad de agua se puede usar para moler toda la cantidad de alfalfa, quedando así un jugo concentrado de alfalfa.

La mezcla se filtra y al filtrado se le adiciona aproximadamente un gramo de amoníaco por cada kilogramo de alfalfa; al final debe quedar un pH entre 8 y 8.5. El tratamiento con amoníaco elimina esencialmente las pérdidas de caroteno y ayuda al proceso de coagulación, facilitando la separación del coágulo.

Al filtrado se le hace pasar una corriente de vapor de agua, la cual contribuye a incrementar el volumen total del líquido en un 10 a 15%. La temperatura en el recipiente que contiene el jugo de alfalfa se mantiene entre 80-82°C, modulando el flujo de vapor y manteniéndolo el tiempo necesario para que el coágulo formado se integre y flote.

La dureza y estabilidad del coágulo varía con el pH, obteniéndose las características óptimas a un pH de 8.5. Un coágulo más duro es más fácil de manejar durante la operación.

En la siguiente tabla se muestran las pérdidas de caroteno y xantofila de acuerdo al pH. Se observa que la adición de amoníaco elimina las pérdidas de caroteno y reduce la de xantofilas <sup>49</sup>.

**Pérdida de caroteno y xantofila durante la coagulación.**

pH	Pérdida de caroteno	Pérdida de xantofilas
5.8	10.6%	36.5%
6.5	17.5	42.8
7.5	5.8	29.7
8.0	5.4	26.6
8.5	0.0	5.8

Una vez formado el coágulo se separa mecánicamente, se seca y se analiza, o bien se extrae con cloroformo, se concentra y se analiza y finalmente puede ser cromatografiado para obtener el beta caroteno puro, aunque como se mencionó anteriormente, para las necesidades del mercado no es necesaria ésta purificación.

## 2.5 Usos del beta-caroteno.

El beta-caroteno fue usado inicialmente para el tratamiento de las molestias de niños raquíticos o como prevención para las enfermedades de invierno en niños y adultos.

En la actualidad el beta-caroteno se utiliza en la producción de productos farmacéuticos y veterinarios y en la manufactura de margarina vitaminada, en gran cantidad de productos alimenticios y cosméticos.

Su importancia mayor es como componente de alimentos para animales, el precio de pastos, alfalfas, etc., ha sido determinado en gran parte, y algunas veces completamente, por su contenido de beta-caroteno.

El beta-caroteno ha sido también usado como un suplemento vitamínico en la fortificación de la margarina. Los avicultores usan éste producto para dar a las aves o los huevos de las aves una pigmentación de color amarillo, usándose para estandarizar la pigmentación de la yema en las raciones para ponedoras.

Para la nutrición humana el beta-caroteno es la provitamina más importante. En la mayoría de los alimentos comunes sobrepasa eminentemente las otras provitaminas en concentración.

Algunos de los nombres comerciales son: Carophyl 10, presentado en forma de polvo estabilizado; conteniendo 10% del éster etílico del ácido beta-apo-8-carotenoico y beta-caroteno.

Extracto de Luzerna que contiene clorofilas alfa y beta en un 20%, xantofilas de 0.6 a 0.8%, beta-caroteno de 0.3 a 0.4%, tocoférols de 0.8 a 1%, vitamina K de 0.15 a 0.2%. El resto está compuesto de materias grasas, fosfolípidos y esterols.

### **Análisis cualitativo y cuantitativo de los espectros.**

El cuanteo de beta-caroteno en los diferentes extractos obtenidos se hizo por medio de espectrofotometría en el visible.

Se consultó la literatura y sólo se encontraron los datos de E 1%/1cm del beta-caroteno, pero no se encontró el valor del coeficiente de extinción molar.

Se consiguieron varias muestras de beta-caroteno para determinar el espectro cuantitativo y obtener el dato deseado.

Como ya se mencionó el beta-caroteno es un compuesto poco estable por lo que fue difícil de conseguir. Se nos proporcionó en dos presentaciones:

Una como suspensión oleosa al 30% y la otra como cristales puros, sintéticos en ampoyetas de un gramo, bajo una atmósfera de dióxido de carbono.

Se determinaron los espectros y se calcularon los coeficientes de extinción molar, encontrándose ligeras diferencias entre ambas muestras.

Considerando más representativo el espectro obtenido con los cristales puros éstos datos se tomaron como patrón de comparación.

Se hicieron dos espectros en el visible de beta-caroteno puro con diferentes concentraciones, obteniéndose los siguientes resultados:

Para el primer espectro se tomaron 1.5 mg de beta-caroteno, se aforaron con 25 mililitros de hexano, se tomó una alícuota de 3 mililitros y se aforaron a 25 mililitros, quedando una concentración de 0.18 bg/ml.

Del espectro se eligió el máximo de  $\lambda_{460}$ , que a esa concentración mostró una absorbancia de 0.805.

#### Cálculos:

P.M. beta-caroteno = 537  
Concentración =  $1.34 \times 10^{-5}$  moles/litro  
Longitud de la celda = 1 cm.

#### Fórmula aplicada:

$$A = E \times C \times L$$
$$E = 60,074.$$

En el mismo espectro se identificó un hombro  $\lambda_{477}$  con una absorbancia de 0.685 y  $E=51,119$ .

Para el segundo espectro se tomó 1.5 mg de beta-caroteno, se aforaron a 25 mililitros con hexano, se tomó una alícuota de un mililitro y se aforó a diez mililitros, quedando una concentración de 0.06 miligramos.

Del espectro se eligió el máximo de  $\lambda_{460}$  que mostró una absorbancia de 0.7.



### Cálculos:

P.M. beta-caroteno = 537  
Concentración =  $1.11 \times 10^{-5}$  moles/litro.  
Longitud de la celda = 1 cm.

### Fórmula aplicada:

$$A = E \times C \times L$$

$$E = 63, 063.$$

En el mismo espectro se identificó un hombro  $\lambda_{477}$  con una absorbancia de 0.6 y  $E = 54, 054$ .

Se tomaron como valores de extinción molar los siguientes:

$$\lambda_{460} (61, 600) \text{ y } \lambda_{477} (52,600).$$

En éste trabajo se estudiaron dos muestras de alfalfa:

- 1).—Alfalfa seca extraída con hexano.
- 2).— Alfalfa húmeda para formar un coágulo.

Los resultados obtenidos en el tratamiento de una muestra fresca se muestran a continuación:

Un kilogramo de alfalfa fresca se secaron con las condiciones anteriormente mencionadas, produciendo 148 gramos de alfalfa seca, es decir, 14.8% de alfalfa seca en base a alfalfa fresca.

De la alfalfa seca se hizo un extracto con hexano que una vez concentrado pesó 2.2750 gramos que representa un 1.54% de la alfalfa seca.

A éste extracto se le hicieron espectros cualitativos en la región del visible en el cual se observaron los siguientes máximos:  $\lambda_{411}$ ,  $\lambda_{477}$ ,  $\lambda_{670}$ , de ellos el de mayor intensidad fue el de  $\lambda_{411}$ .

Los máximos se compararon con los datos de la literatura y se pudieron asignar los de 411 y 670 a la clorofila  $a^{47}$  y el máximo de 477 al beta-caroteno.

El extracto con hexano fue sometido a saponificación obteniéndose los componentes epifásicos e hipofásicos y en la interfase, una cantidad apreciable de un producto blanco de aspecto ceroso.

En el espectro cualitativo en la región del visible del extracto epifásico se observaron máximos a  $\lambda_{390}$ ,  $\lambda_{422}$ ,  $\lambda_{450}$  y  $\lambda_{477}$ . Por comparación con datos de la literatura<sup>47</sup>, se asignó el máximo de 390 a  $\beta$ -caroteno; el máximo de 422 se puede asignar a una xantofila y los máximos de 450 y 477 corresponden al beta-caroteno, ya no se observaron los máximos debidos a la clorofila.

A los extractos con hexano y epifásico se les determinó el análisis espectroscópico cuantitativo con los siguientes resultados:

Se calculó el coeficiente de extinción molar para el máximo a  $\lambda_{477}$ , que corresponden a la absorción del beta-caroteno.

Se pesaron 5.81 miligramos del extracto con hexano, se aforaron a diez mililitros y se sacó el espectro. Para el máximo  $\lambda_{477}$ , le corresponde una absorbancia de 0.65. Espectro 111.

#### Cálculos:

P.M. beta-caroteno = 537  
Concentración =  $108 \times 10^{-5}$  moles/litro  
Longitud de la celda = 1cm.

#### Fórmula aplicada:

$$A = E \times C \times L$$
$$E = 601.85.$$

Por comparación con el coeficiente de extinción molar del beta-caroteno puro del máximo  $\lambda_{477}$  (52, 600) se detectó un 1.14% de beta-caroteno en el extracto con hexano.

Se pesaron 4.83 miligramos de extracto epifásico y se aforaron a diez mililitros. Del espectro se eligió un máximo de  $\lambda_{460}$  que a esa concentración mostró una absorbancia de 0.67. Espectro IV.

#### Cálculos:

P.M. beta-caroteno = 537  
Concentración =  $89.9 \times 10^{-5}$  moles/litro  
Longitud de la celda = 1cm.

#### Fórmula aplicada:

$$A = E \times C \times L$$
$$E = 745.3.$$

Por comparación con el coeficiente de extinción molar del beta-caroteno puro del máximo  $\lambda_{460}$  (61, 600) se obtuvo 1.21% de beta-caroteno en el extracto epifásico.

Del mismo espectro se eligió un hombro a  $\lambda_{477}$  que a esa concentración mostró una absorbancia de 0.61 y  $E=679$ .

Por comparación con el coeficiente de extinción molar del beta-caroteno puro a  $\lambda_{477}$  (52, 600), se obtuvo 1.3% de beta-caroteno.

Al observar el contenido de beta-caroteno en el extracto con hexano, se ve que es el mismo valor que se calcula en el extracto epifásico, lo que indica una extracción prácticamente cuantitativa al pasar el extracto con hexano a epifásico.

## **RESULTADOS**

De un kilogramo de alfalfa fresca se obtuvieron 148 gramos de alfalfa seca que representa un 14.8%, el resto es humedad y fibra cruda.

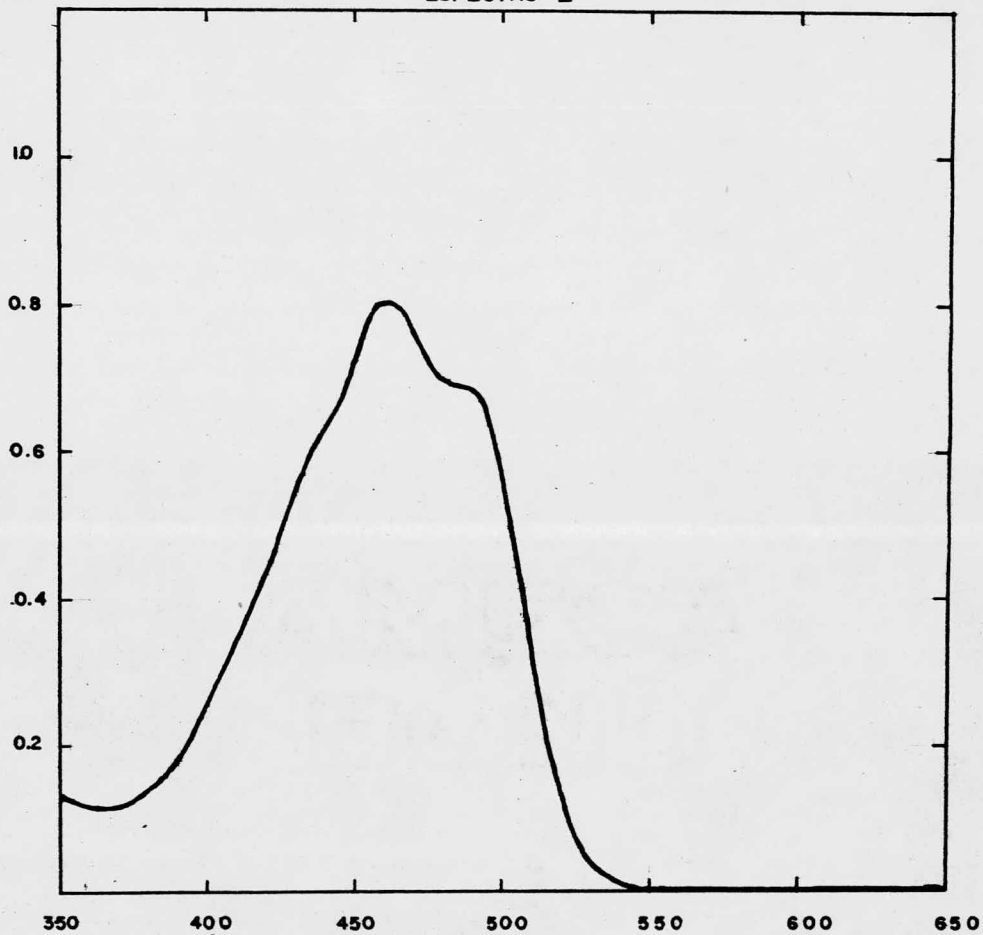
Una vez evaporado el extracto con hexano se obtuvo 2.2750 gramos de un producto sólido grasoso de color verde que representa un 1.54% de la alfalfa seca. Este producto ya es un concentrado de colorantes de la alfalfa.

Después de la saponificación se obtuvieron 0.9310 gramos de extracto epifásico que representa los carotenos de la planta y que constituyen un 40.92% del extracto con hexano y un 0.63% de la alfalfa seca.

En el método de coagulación se observó que el coágulo no se forma si se procesa la alfalfa ya seca.

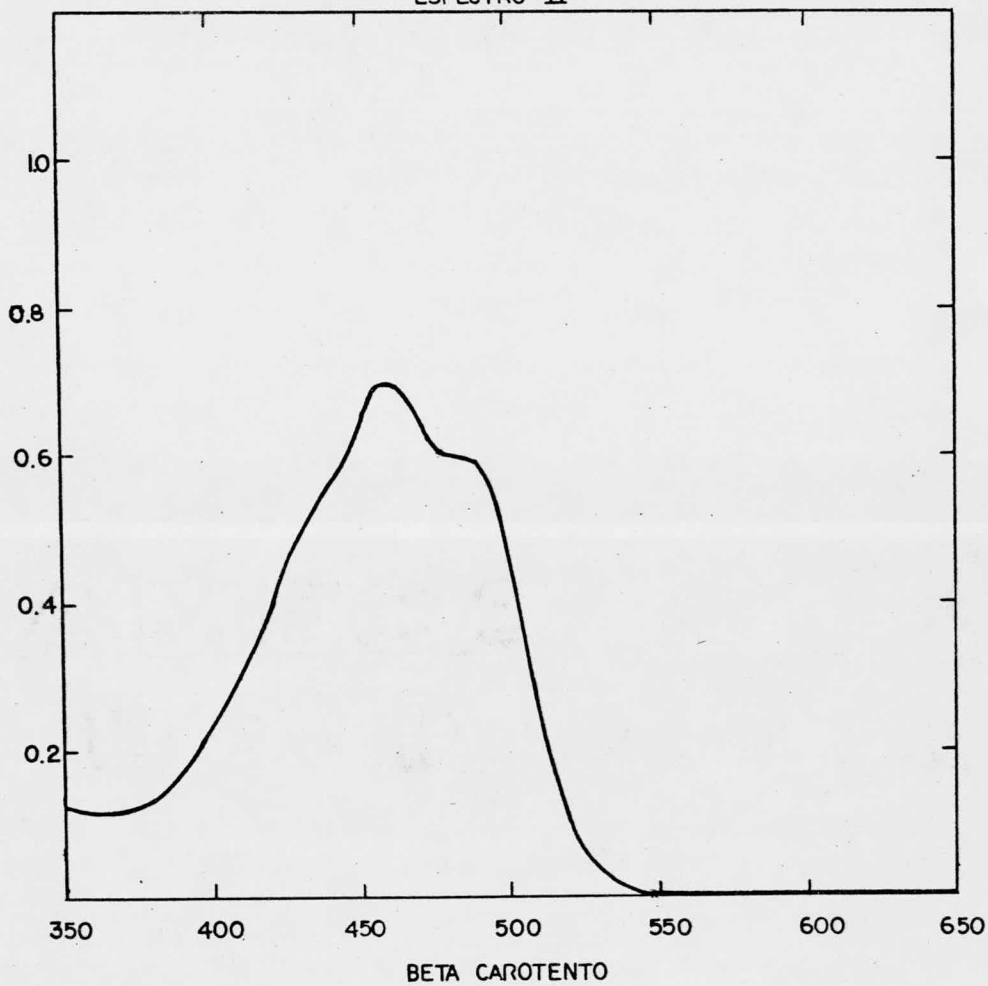
Con la alfalfa fresca se forma fácilmente el coágulo. Una vez hechos los extractos con disolventes adecuados se hicieron los espectros en el visible encontrándose como los máximos más importantes los correspondientes a la clorofila que por absorber en zona muy cercana a la absorción del beta-caroteno no permitieron observar éste por lo que se deduce que está en muy baja concentración.

ESPECTRO I

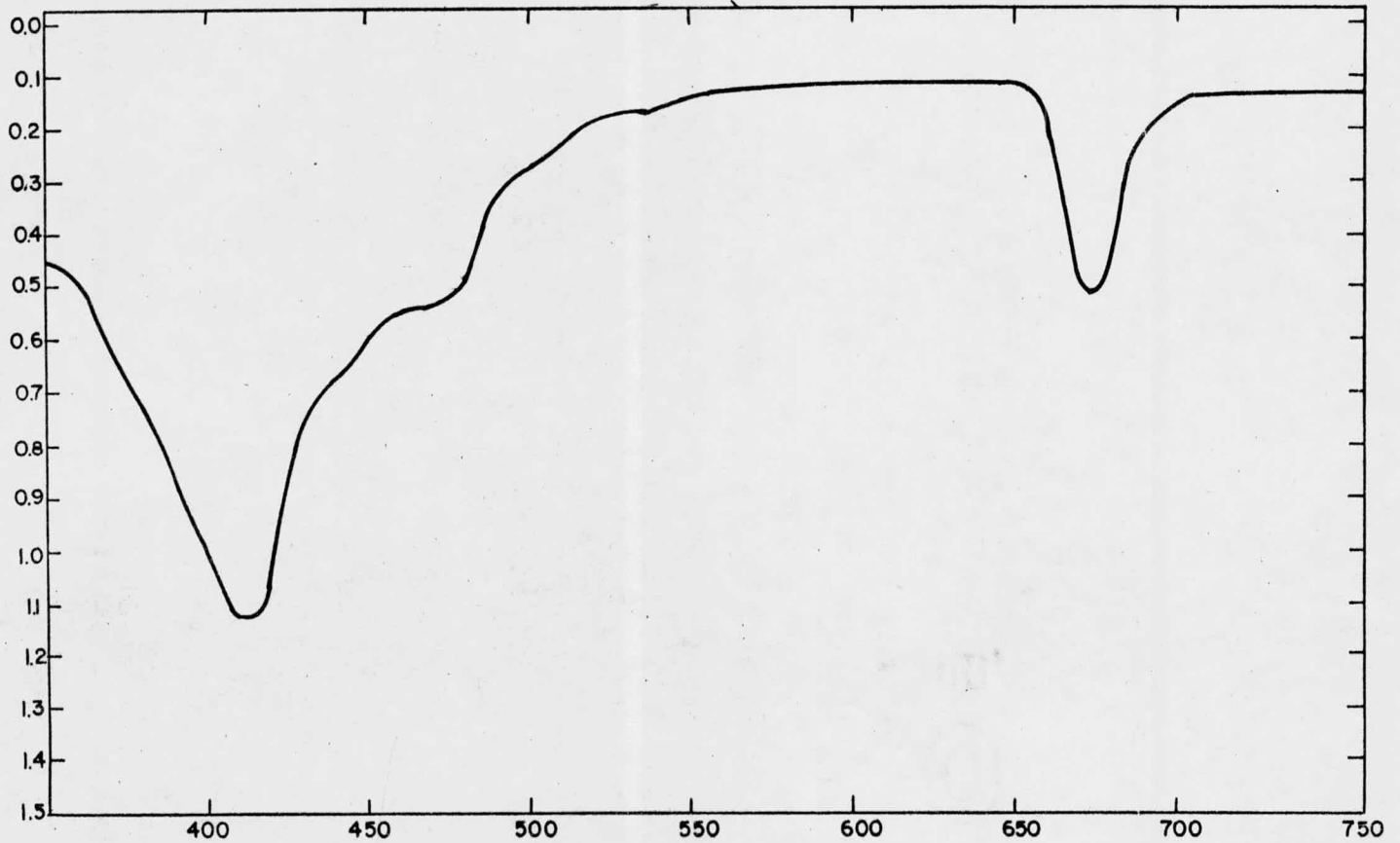


BETA - CAROTENO.

ESPECTRO II

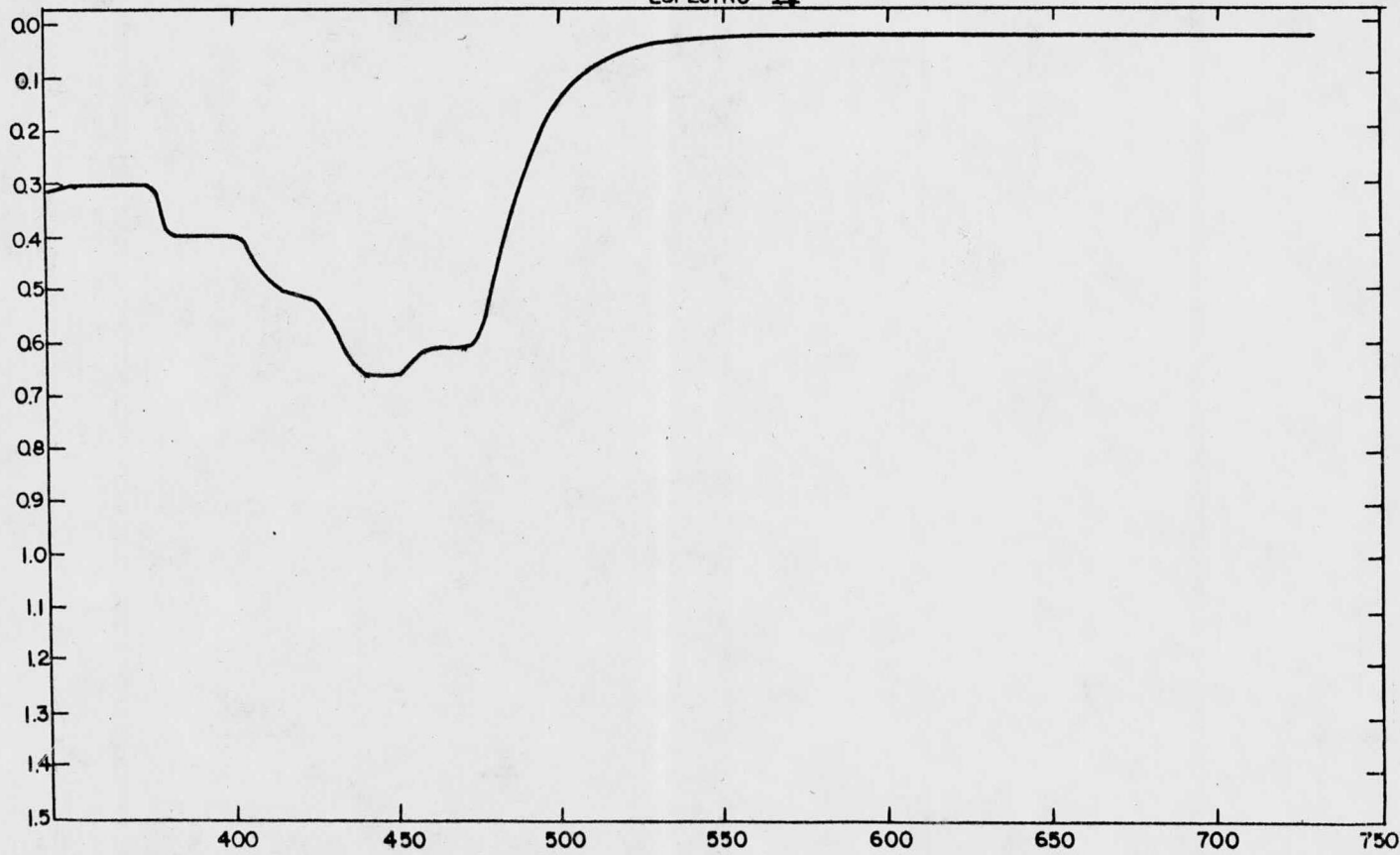


ESPECTRO **II**



EXTRACTO HEXANICO

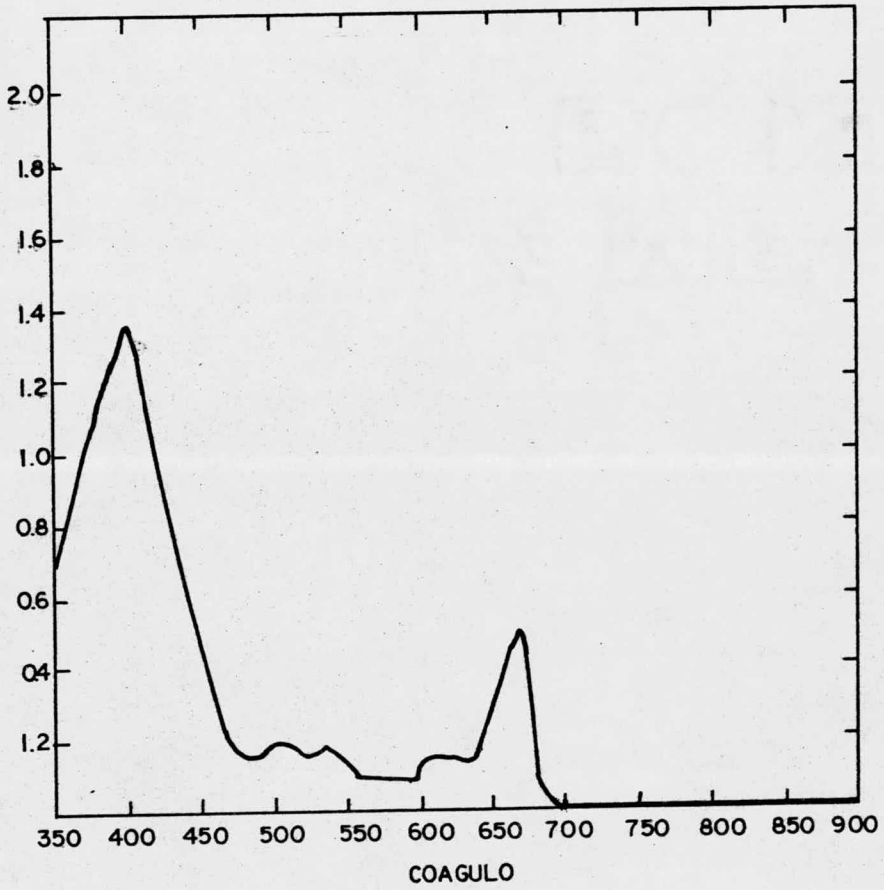
ESPECTRO IV



EXTRACTO EPIFASICO



ESPECTRO V



**PARTE EXPERIMENTAL**

### 3.1 VIA SECA.

#### 1.—Preparación de la alfalfa.

Un kilogramo de alfalfa se deshidrató en un cuarto bien ventilado, extendiéndose y volteando de vez en cuando para llevar a cabo un secado uniforme y prevenir la fermentación que destruye los carotenoides.

Una vez seca la alfalfa se separaron las hojas de los tallos para facilitar la molienda, molidos los tallos se juntan con las hojas. Obteniéndose un peso de 143.8 gramos de alfalfa seca.

#### 2.—Extracción con hexano.

En un matraz de bola de dos litros, se colocaron 143.8 gramos de alfalfa seca con aproximadamente un litro de disolvente, se calentó a reflujo durante una hora, se dejó enfriar, después se procedió a filtrar y la solución obtenida se concentró en el rotavapor, después de evaporar el disolvente se obtuvo un extracto café-verdoso que pesó 2.1676 gramos.

Con la alfalfa residual que quedó de la primera extracción, se procedió a hacer una segunda y tercera extracción con hexano, bajo las mismas condiciones, se dejaron enfriar, después se filtraron y las soluciones obtenidas se concentraron en el rotavapor, después de evaporar el disolvente se obtuvieron el segundo y tercer extracto con pesos 1.767 g y 1.058 g respectivamente. Estos dos extractos y el primero se les efectuó una placa cromatográfica en capa fina de gel de sílice, usando benceno como eluyente, donde se comprobó la semejanza en la composición de los extractos, por lo que se juntaron y se obtuvo un extracto hexánico con un peso de 4.991 gramos.

Como el extracto estaba emulsionado se separó por medio de una centrifuga, en el fondo se depositó un producto grasoso de color ligeramente amarillo, que no fue estudiado, y se lavó con cloroformo hasta que no dió mancha de beta-caroteno. El extracto clorofórmico se juntó con la solución centrifugada que una vez evaporada produjo 2.2750 gramos de un sólido verde oscuro.

Este extracto se analizó cuantitativamente por espectrofotometría en el visible.

éter de petróleo = 210 mm

**3.—Saponificación.**

Se disolvió 2.2750 gramos de extracto de éter de petróleo, se colocaron en un matraz redondo 24/40 de 250 mililitros, se adicionaron 2 gramos de hidróxido de potasio disueltos en 40 mililitros de etanol y se procedió a refluir la mezcla con agitación por un período de dos horas.

Después se enfrió y se efectuó la separación de los carotenoides hipofásicos y epifásicos.

**4.—División de los carotenoides en constituyentes hipofásicos y epifásicos.**

En un embudo de separación de 250 mililitros se colocó la mezcla anterior con 50 mililitros de éter de petróleo, se adicionó 150 mililitros de agua destilada hasta la formación de dos fases, se formó también un producto grasoso de color ligeramente amarillo que fue lavado con cloroformo hasta que no dió mancha de beta-caroteno. El residuo no fue estudiado.

La fase superior contiene principalmente los carotenos epifásicos y la fase inferior principalmente los carotenos hipofásicos.

Se separaron las dos fases y se efectuaron nuevas extracciones.

La fase inferior se extrajo cinco veces más con 100 mililitros cada una de éter de petróleo, juntándose los extractos similares.

El producto grasoso se extrajo tres veces más con 100 mililitros cada una de éter de petróleo, juntándose los extractos similares.

La solución epifásica se concentró en el rotavapor, después de evaporado el disolvente se obtuvo un extracto con un peso de 0.9310 gramos, que se analizó cuantitativamente por espectrofotometría en la región del visible.

Hidroxido de calcio + celtita

epifásicos - sin grupos hidroxilo  
hipofásicos - con 2 o más grupos hidroxilo

Grupos pl... Gel de sílice  
benzeno

Columna - Gel de sílice  
éter de petróleo

### 3.2 VIA HUMEDA.

Un kilogramo de alfalfa fresca se molió con aproximadamente 500 mililitros de agua. La mezcla se filtró y al filtrado se le adicionó un gramo de amoníaco.

Al filtrado se le hizo pasar una corriente de vapor de agua, manteniendo la temperatura del recipiente que contiene el jugo de alfalfa entre 80-82°C.

Una vez formado el coágulo se separó mecánicamente, se extrajo con diferentes disolventes, como: cloroformo y tetracloruro de carbono, se evaporaron los extractos y se realizó el análisis espectroscópico cuantitativo en el visible.

Los máximos se compararon con los datos de la literatura y se pudieron asignar los de 411 y 670 a la clorofila. No se pudo identificar ningún máximo del beta-caroteno.

#### Contenido de proteínas.

Se determinó el contenido de proteínas al coágulo por el método Kjeldahl<sup>48</sup>.

Se tomó una muestra del coágulo de 6 gramos, se colocó en el frasco Kjeldahl, se le adicionó 96% de sulfato de sodio, 3.5% de sulfato de cobre, 0.5% de dióxido de selenio en un total de 8 gramos y 20 mililitros de ácido sulfúrico concentrado y se efectuó la digestión.

Una vez terminada la digestión se le adicionó a la solución una grana-lla de zinc, 100 mililitros de hidróxido de sodio al 50%, un trozo de para-fina y se efectuó la destilación, recogién-dose el destilado en una solución de ácido bórico al 2% con 0.16 de% rojo de metilo y 0.083% de bromocresol como indicador.

Finalmente la solución destilada se tituló con ácido sulfúrico 0.1 N. Se calculó el contenido de nitrógeno de acuerdo a la siguientes fórmula:

$$\% = \frac{\text{m.eq.} \times \text{ml} \times \text{N} \times 100}{\text{P}}$$

se encontró que la muestra contenía un 21.3% de proteínas.

## **CONCLUSIONES**

El beta-caroteno puro se puede obtener a partir de alfalfa seca o húmeda. Si el objetivo se obtener preparados comerciales de la calidad de los que se importan en México, no es necesario llevar a cabo una separación cromatográfica.

La composición de los preparados comerciales importados de Alemania República Federal, Estados Unidos, Suiza y Uruguay, por los laboratorios Productos Roche, Ciba Geigy, Comercial Reka, Hoffman, Pinter Boswort, productos cosméticos cabello y Merck de México, éstos tienen una concentración promedio de pro-vitamina A que oscila entre 0.3 y 0.4% en peso.

El beta-caroteno es un producto de alto valor comercial que se puede obtener a partir de alfalfa. Este proceso de extracción es relativamente sencilla hasta la obtención del extracto epifásico.

La obtención de productos puros resulta difícil dada la fácil descomposición del beta-caroteno.

## **REFERENCIAS**



1. "Advances in Food Research". C. O. Chichester. Ed. Board. Academic Press. New York, 15 (1966).
2. L. Zechmeister, "Cis-trans Isomerization and Stereochemistry of Carotenoids and Phiphenylpolyenes", Chem. Rev., 34 267 (1944).
3. L. Zechmeister, "Cis-trans Isomeric Carotenoids, Vitamina A and Arylpolyenes". Academic Press, New York (1962).
4. T. W. Goodwin, "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment". Academic Press, New York (1965).
5. T. Moore, "Vitamin A". Elsevier publishing Co. New York (1957).
6. W. R. Akeson y M. A. Stahmann, "Leaf Protein Concentrates". Econ Botany, 20, 244 (1966).
7. E. Lederer, "Les Carotenoides des Plantes". Hermann Et. Cie. Editeurs Paris (1934).
8. A. Livingston y C. Hand, "Microbiological Assay for Saponin in Alfalfa Products". Journal of the AOAC., 60, 957 (1977).
9. G. Britton y T. W. Goodwin, Meth. "Enzym". (1971).
10. J. W. Nelson y A. L. Livingston, J. "Chromat". 28, 465 (1967).
11. V. H. Booth, "Analyst". Lond., 84, 464-465 (1959).
12. A. I. Vogel, "A Texbook of Practical Organic Chemistry". Longmans Green, London (1959).
13. P. Karrer y E. Jucker, "Carotenoids". Elsevier Publishing Co., Amsterdam 1950).
14. F. H. Carr y E. A. Price, J. "Biochem". 20, 497 (1926).
15. P. Karrer y B. Euler, "Helv. Chim. Acta", 15, 496 (1932).
16. P. Karrer y U. Solmssen, "Helv. Chim. Acta", 20, 682 (1937).
17. P. Karrer, U. Solmssen y W. Gugelmann, "Helv. Chim. Acta", 20, 1020 (1937).
18. A. H. El-tinay y C. O. Chichester, Oxidation of Beta-carotene, "J. Org. Chem.", 35, 7, 2290 (1970).

19. R. Kuhn y Z. Brockmann, "Physiol. Chem.". 206, 41 (1932).
20. Minerva Bucantz R., "Un ensayo sobre el metabolismo del caroteno". (1945).
21. P. Karrer y A. Helfenstein, "Helv. Chim. Acta", 12, 114 (1929).
22. P. Karrer, A. Helfenstein, H. Wehrli y A. Wettstein, "Helv. Chim. Acta", 13, 1084 (1930).
23. P. Karrer y R. Morf, "Helv. Chim. Acta", 14, 1033 (1931).
24. P. Karrer y C. H. Eugster, "Helv. Chim. Acta", 33, 1172 (1950).
25. T. W. Goodwin, "In Modern Methods of Plant Analysis". K. Paech y M. V. Tracey, Springer-Verlag Berlín 3, 272 (1955).
26. K. Egger, "Phytochemistry". 4, 609-618 (1965).
27. B. Colman y W. Vishniac, "Biochem. Biophys. Acta", 82, 616-618 (1964).
28. I. W. Smith, R. W. Breidenbach y D. Rubenstein, "Science". N. Y. 148, 508-509 (1965).
29. J. S. "Nature". Lond 203, 1261-1263 (1964).
30. A. Hager y T. Meyer-Bartenrath, "Planta". 69, 198-217 (1966).
31. A. Hager y M. Stransky, "Arch. Mikrobiol". 71, 132-163 (1970).
32. H. R. Bolliger y A. König, "Thin-Layer Chromatography". Springer Verlag, New York y Berlín, 259-311 (1969).
33. I. Stewart y T. A. Wheaton, "Journal Chromat.". 55, 325-336 (1971).
34. H. Nitsche y K. Egger, "Phytochemistry", 8, 1577-1582 (1969).
35. G. Britton y T. W. Goodwin, "Meth. Enzym". 18-C, 654-701 (1971).
36. U. Schwueter, H. R. Bolliger, L. H. Chopard-dit Jean, G. Englert M. Kofler, A. V. König, C. Planta, R. Rüegg, W. Vetter y O. Isler, Chimia, Switz 19, 294-302 (1965).
37. B. H. Davies y A. F. Rees, "Phytochemistry". 12, 2745-2750 (1973).
38. B. H. Davies, J. Villoutreix, R. J. H. Williams y T. W. Goodwin, "Biochem J.", 89, 96-P (1963).

39. E. Stahl, H. R. Bolliger y L. Lehnert, "Carotine un Carotinoide" (Wiss. Veröff, dt. Ges Ernähr., Vol. 9) 129-134, Steikopff, Darmstadt (1963).
40. H. R. Bolliger y A. König, "Thin-Layer Chromatography". (E. Stahl ed) 259-311, Springer-Verlag, New York y Berlín (1969).
41. K. Demole, "Phytochemistry". 4, 609-618 (1965).
42. G. Britton y T. W. Goodwin, "Meth. Enzym". 18C, 654-701 (1971).
43. B. H. Davies, "Biochem J.", 116, 93-99 (1970).
44. B. H. Davies, "Biochem, J.", 116, 101-110 (1970).
45. I. Stewart y T. A. Wheaton, J. "Chromat". 55, 325 (1971).
46. H. H. Stewart, "Chloroplast Pigments and Chromatographic Analysis". Pennsylvania State University Press.
47. The Index Merk, "An Encyclopedia of Chemicals and drugs".
48. David Pearson, "The Chemical Analysis of Foods".
49. Guillermo José Valenzuela, "Beta-caroteno". (1975).