



DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE
ACTIVA EN LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN *Tagetes erecta* L.**

TESIS DOCTORAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JOSÉ LUIS SÁNCHEZ MILLAN

TUTOR

Dr. FEDERICO ALFREDO GARCÍA JIMÉNEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D.F. ENERO 2010



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.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, cual sea su nombre...muchas gracias por la vida.

A la SAGRADA FAMILIA...muchas gracias por estar con mi familia y conmigo.

A mi esposa Sandra, y mis pequeños: Itzmaná y Tonalli, por los sufrimientos y alegrías que compartimos en esta aventura...gracias.

A mi mamá y mi familia, por su apoyo, desvelos y preocupaciones...gracias.

A mis abuelitos por su ejemplo y amor...muchas gracias

Al Dr. Federico Alfredo García Jiménez, por su apoyo en todos los sentidos y ayudarme a lograr ese sueño de niño que era ser investigador.

A la Maestra Yolanda Castells García, por hacernos a mi familia y a mí, ser parte de su familia sin serlo...gracias.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO...mi orgullo, amor y agradecimiento...muchas gracias.

A CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, por su apoyo para el logro de esta tesis...muchas gracias.

Al Dr. Héctor González Rosas... por su amistad y su gran ayuda para mi familia y para mí.

Al Dr. Roberto Arreguin Espinoza, por su amistad y ayuda en todos los sentidos...muchas gracias.

Al Dr. Ricardo Santiago Díaz, por su apoyo, amistad y por la cristalización de ese sueño científico que nació en “La casa de los azulejos”.

Al Dr. Víctor Luis Barradas M. Por su apoyo y por esta amistad que seguramente se traducirá en nuevos retos y logros.

Al Dr. Miguel Lara F. por su ayuda y amistad...gracias.

Al Dr. Federico Sánchez R. por su ayuda y amistad...gracias.

A la maestra Carmen Márquez por su ayuda con mis decenas de muestras en HPLC....gracias

A la maestra Virginia Vidales Gómez por su paciencia y apoyo...muchas gracias.

A la maestra y amiga Georgina Espinoza....por tu amistad y apoyo, gracias.

A la Dra. Suemi Rodríguez R. por su apoyo y amistad...muchas gracias

Al Dr. Arturo Aguirre G. por su amistad, ayuda y ejemplo científico...muchas gracias.

A las maestras Jessica Paez Arancibia y Rosa Valadez Olguín por su hermosa amistad, ayuda desinteresada y por sus enseñanzas..muchas gracias.

Al Dr. Francisco Lara por su apoyo y amistad...muchas gracias.

A mis amigos de INDUSTRIAS ALCOSA: Lic. Ramon Gutiérrez Q., Lic. Francisco Núñez U., Ing. Alejandro Ornelas C., Quim. Enrrique Hernández y al Ing. Enrrique Silva G., por su amistad y apoyo material para la realización de esta tesis....muchas gracias.

“GUTIÉRREZ

...Pero sírvete informarme de lo que no he querido preguntar a ningún otro: ¿ qué edificio es ése con tantas y tan grandes ventanas arriba y abajo, que por un lado da a la plaza, y por el frente a la calle pública, en el cual entran los jóvenes, ya de dos en dos, ya como si fueran acompañando a un maestro por honrarle, y llevan capas largas y bonetes cuadrados metidos hasta las orejas?

MESA

Es la Universidad, donde se educa a la juventud: los que entran son los alumnos, amantes de Minerva y de las Musas.”

Tomado de: Cervantes de Salazar Francisco. México en 1554. Biblioteca del estudiante universitario. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. 1993, quinta edición pag. 7.

ÍNDICE

	PAG.
AGRADECIMIENTOS y PENSAMIENTOS	3
1 INTRODUCCIÓN	6
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3 JUSTIFICACIÓN	17
4 HIPÓTESIS	18
5 OBJETIVOS	18
6 MATERIALES Y MÉTODOS	19
7 RESULTADOS	25
8 DISCUSIÓN	38
9 CONCLUSIÓN	43
10 RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	44
11 BIBLIOGRAFÍA	45
12 ANEXOS	51

RESUMEN

La prolongada e intensa iluminación en las plantas, puede provocar efectos negativos al dañar el sistema fotosintético, provocando fotoinhibición de la fotosíntesis (FIF) y fotodestrucción de carotenoides (FDC). La FIF, se refiere a una reducción en la eficiencia fotosintética, la cual es causada por exceso de luz. El primer punto de acción de la FIF es el fotosistema II (PSII). Lo anterior puede significar daños al desarrollo para algunas especies de plantas.

Plantas de cempoalxochitl (*Tagetes erecta* L.) fueron cultivadas bajo dos diferentes condiciones de irradiación solar. Se encontró que en ciertas condiciones de radiación fotosintéticamente activa (RFA) se puede incrementar en 33% el contenido de xantofilas en las inflorescencias, lo anterior esta correlacionado con incremento en carotenoides, peso seco de las lígulas y diámetro de las inflorescencias. Se demuestra que la intensidad y cantidad de luz tiene un efecto en la biosíntesis y fototransformación de carotenoides. Además se propone una conexión de la rama de los alfa-carotenos con la rama de los beta-carotenos mediante reacciones fotoquímicas, pero no se excluye la posibilidad de mecanismos enzimático-fotoquímico los cuales sea han descrito (p.e. ciclo de la zeaxantina).

ABSTRACT

Tagetes erecta L. (marigold) plant inflorescences and pure lutein, were irradiated under different light conditions. We found that under certain light conditions it is possible to increase the xanthophyll yield (33%) from the plant. This increase is correlated with a greater carotene content, dry ligule weight and inflorescence diameter. De novo carotenoid species were detected together with trans to cis isomerisation. There is an absorbance increase which appears to be related to cis isomers and was observed in certain in vitro light irradiation conditions. We present spectroscopic data for the carotenoid molecules observed together with the light quantity and quality at which they were formed. We also show that light intensity has an effect on carotenoid biosynthesis, as well as on other plant physiological aspects.

1 Introducción.

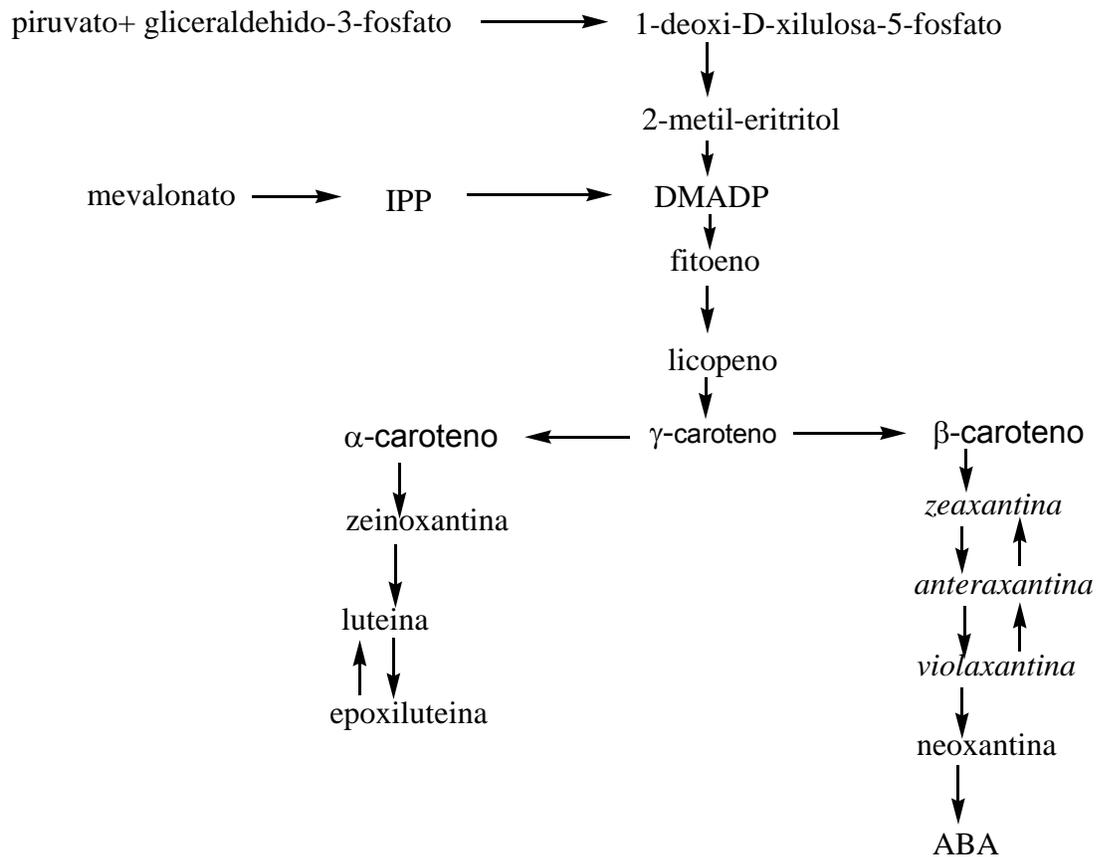
1.1 Carotenoides y fotosíntesis.

Los carotenoides son tetraterpenos C_{40} , los cuales pueden presentar 15 enlaces dobles conjugados en un esqueleto central y no siguen la ley de Ruzika (Carey, 1999). Los carotenoides son parte integral de las membranas fotosintéticas, ya que son utilizados por las plantas como pigmentos fotosintéticos accesorios que coadyuvan a la fotosíntesis absorbiendo luz en regiones donde la clorofila no absorbe. También se les ha atribuido un papel de irradiadores de exceso de energía luminosa mediante el ciclo de la zeaxantina y de la luteína-epoxiluteína (Bungard, 1999; Hirschberg, 2001). Además, tienen funciones antioxidantes a través de la destrucción de tripletes energéticos de la clorofila excitada. (Bartley, 1994; Ruban, 1999; Niyogi, 1997).

La biosíntesis de carotenoides se ha reportado en procariontes como bacterias fotosintéticas y algas unicelulares (Cunningham, 1998; Bartley, 1994; Ruban, 1999) y en eucariontes tales como en plantas superiores y en plantas no superiores como es el caso de *Cuscuta reflexa* (Cunningham, 1998; Bartley, 1994; Britton, 1998; Ruban, 1999).

Se ha demostrado que la biosíntesis de los carotenoides no solo tiene como precursor inicial al mevalonato, también en plantas superiores el gliceraldehido-3-fosfato y piruvato, son precursores del isopentenilpirofosfato mediante la ruta metabólica denominada 1-Deoxi-D-Xilulosa-5-fosfato (DOXP) (ver figura 1), (Cunningham, 1998).

Figura 1. Ruta metabólica de biosíntesis de carotenoides.



Biosíntesis de carotenoides en forma resumida. Se muestran las dos rutas descritas actualmente; la clásica donde se parte del mevalonato y la ruta de la 1-Deoxi-D-Xilulosa-5-fosfato, denominada como ruta DOXP. Las xantofilas que integran el ciclo de la zeaxantina se resaltan en cursiva. Isopentenilpirofosfato (IPP), dimetil-alil-difosfato (DMAP), ácido abscísico (ABA) (Bungard, 1999; Moehs, 2001).

1.2 Daños al aparato fotosintético por exceso de luz.

La prolongada e intensa iluminación en las plantas (i.e. $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), puede provocar efectos negativos al dañar el sistema fotosintético, provocando fotoinhibición de la fotosíntesis (FIF) y fotodestrucción de carotenoides (FDC), (Young, 1990). La FIF, se refiere a una reducción en la eficiencia fotosintética, la cual como se mencionó, es causada por exceso de luz. El primer punto de acción de la FF es el fotosistema II (PSII). Esto involucra la fotoinactivación del PSII y la transformación de los centros de reacción activos en centros fotoquímicamente inactivos (Gussakovsky, 1997). Lo anterior puede significar daños al desarrollo para algunas especies de plantas, desde el punto de vista ecofisiológico y también industrial.

La exposición a condiciones fotoinhibitorias eventualmente conducirá a un blanqueamiento de la clorofila (clorosis) y carotenoides. Sin embargo existe mucha discrepancia entre varios autores en cuanto a cual intensidad luminosa produce un daño fotosintético, por ejemplo Young y Britton (1990) reportan que a $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se presenta una disminución drástica en el contenido de los pigmentos como violaxantina, anteraxantina y zeaxantina en hojas de cebada, Eskling (1998) indujo cambios drásticos en la concentración de violaxantina, anteraxantina y zeaxantina al exponer en hojas de espinaca a $900 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Schansker (1999) provocó fotoinhibición en hojas de chícharo a $5000 \text{:E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por periodos de 30 minutos de exposición; Sun (2001) reporta que el tabaco presenta daño en el aparato fotosintético cuando esta planta se expuso a la luz solar con una intensidad aproximada de $2400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en condiciones de campo. La diversidad de datos que existen sobre el tópico sugiere que es un fenómeno especie dependiente y también que se carece de datos experimentales que puedan indicar la cantidad de RFA donde se presentan daños en

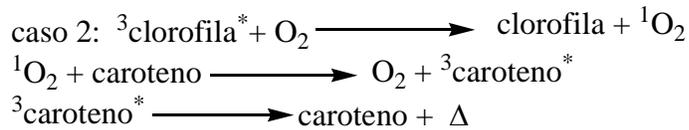
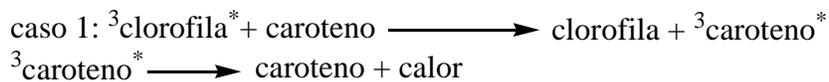
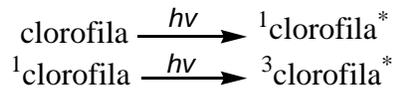
los carotenoides en las especies de interés, ya que no es posible generalizar una determinada intensidad de RFA para todas las especies de plantas.

El exceso de luz en plantas induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como oxígeno singulete (1O_2), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radical superoxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y radical perhidroxilo (O_2H^{\bullet}), las cuales dañan o pueden matar a la célula. Dentro de las ERO el oxígeno singulete, (1O_2), es una especie química muy dañina. Además, la tasa de pérdida de pigmento es directamente proporcional a la intensidad de la luz, pero puede ser modificada por otros factores como la temperatura elevada. El radical $O_2^{\bullet-}$ es producido en el cloroplasto cuando los electrones son transferidos directamente del PSII al oxígeno y es uno de los radicales de oxígeno más dañinos junto con el radical HO^{\bullet} , ya que es altamente destructivo para los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. En el caso de los lípidos el radical $O_2^{\bullet-}$ estimula la peroxidación de estos en las membranas tilacoidales y plasmáticas (Young, 1990; Bray, 2000).

1.3 Mecanismos de disipación de exceso de energía por alta luminosidad en plantas.

Dentro de los mecanismos de las plantas para contrarrestar los efectos negativos de la fotooxidación, se encuentra el de disipación de energía, donde los carotenoides son parte esencial. A continuación se presentan una serie de reacciones propuestas para explicar el posible mecanismo de disipación de exceso de energía en el aparato fotosintético (ver figura 2).

Figura 2. Mecanismo de disipación de exceso de energía luminosa en plantas.



En el primero de los casos, (caso 1) se muestra la forma en que el caroteno interviene para la captura de tripletes de clorofila y la disipación del exceso de energía en forma de calor. En el segundo caso (caso 2), se trata de la captura del oxígeno singulete y la exclusión de este de la membrana fotosintética en forma de calor, vía la intervención de caroteno (Styring, 1994).

Además, del sistema de reacciones de disipación de energía presentado arriba, las plantas cuentan con varios sistemas de desintoxicación para evitar el daño por radicales libres, como son el ácido ascórbico, α -tocoferol, α -caroteno, las enzimas

superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato-peroxidasa, principalmente. Sin embargo, existe en las plantas superiores un mecanismo que se ha propuesto entre otras cosas como coadyuvante para la disipación del exceso de energía luminosa, este mecanismo es conocido como el ciclo de la zeaxantina (ver figura 1) (Demming, 1988).

1.4 Oxidación de carotenoides por luz y otros agentes oxidantes.

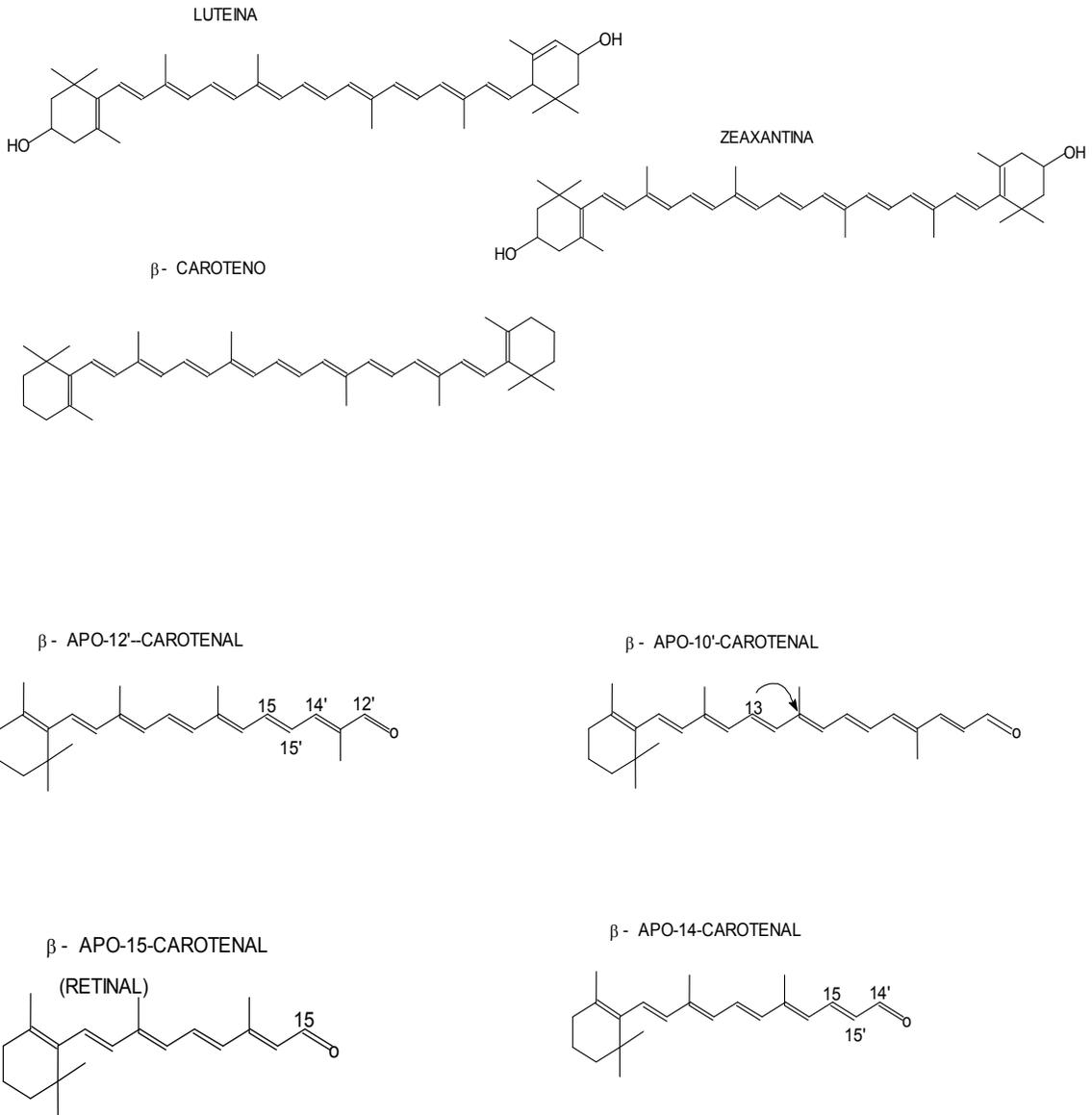
La exposición de las plantas a un exceso de luz puede provocar que el β -caroteno asociado a la clorofila, sea fotooxidado a β -caroteno-5,6-epóxido (Nour-Eddine, 1999).

Existen reportes sobre una correlación entre el fotoblanqueamiento de β -caroteno y la aparición de β -caroteno-epóxido (todo trans); este fenómeno está sujeto a variaciones diurnas, donde la concentración de este epóxido disminuye después de un período de oscuridad y se incrementa después de un periodo de luz natural. El β -caroteno -5,6-epóxido, es ópticamente no activo, lo que sugiere su origen no enzimático, y que probablemente sea producido por mecanismos fotoquímicos, además, la presencia de β -caroteno -5,6-epóxido en tejido fotosintético puede ser considerado como una daño a aparato fotosintético (Young, 1990).

En referencia a la oxidación de carotenoides, algunos autores han realizado investigaciones al respecto, utilizando estas moléculas e induciendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante la reacción de Fenton (Handelman, 1991; Siems, 1999; Polyakov, 2001), entre otras reacciones inductoras de estos radicales. También se han utilizado luz solar y luz fluorescente (Siems, 1999), en el trabajo de Seims, no se reporta ni la intensidad luminosa a la que se expusieron los carotenoides ni la temperatura alcanzada durante el experimento. Por otro lado, se utilizó luz ultravioleta y Rosa de Bengala (un reactivo inductor de ERO) para inducir la oxidación de carotenoides (Siems, 1999). Sin embargo, pocos trabajos se han

dedicado a determinar las especies químicas producto de la oxidación de carotenoides (Handelman, 1991). Respecto a lo anterior, se han identificado moléculas tales como: β -APO-10'-APO-CAROTENAL, β -APO-12'-CAROTENAL, β -APO-14'-CAROTENAL, β -APO-15'-CAROTENAL entre otros (ver figura 3).

Figura 3. Estructura química de Luteína, Zeaxantina, β -Caroteno y algunos productos de oxidación (apo-carotenos), (Englert, 1995).



1.5 Comportamiento de algunas xantofilas en plantas expuestas a alta radiación

fotosintéticamente activa.

Zapozhnikov y colaboradores (1957) fueron los primeros en reportar la disminución de la concentración de violaxantina en hojas expuestas a intensa RFA. Posteriormente, Yamamoto y colaboradores (1962) demostraron que la violaxantina se restituía a partir de zeaxantina en la oscuridad o en RFA, lo que confirmó que existía una interconversión de los pigmentos. Sin embargo, fueron los trabajos de Demming y colaboradores (1988) donde se propuso que el ciclo de la zeaxantina tenía un papel relacionado con la disipación del exceso de energía en el aparato fotosintético.

El ciclo de la zeaxantina es una ruta de epoxidación y des-epoxidación inducido por alternancia de alta RFA y baja RFA, también por una sobre acidificación de la región interna del tilacoide durante el estrés por luz (Demming, 1988; Bungard, 1999).

La actividad de-epoxidasa requiere de un pH aproximadamente de 5.0 y en cloroplastos su actividad es inducida por alta luminosidad, lo cual resulta en la acidificación del lumen por la bomba de protones. En contraste, la actividad epoxidasa tiene un pH óptimo de aproximadamente 7.5; por tanto estas actividades se llevan a cabo gracias a que existe un gradiente de pH en la membrana tilacoidal; además se tienen evidencias que el ácido ascórbico juega un papel de cofactor de la enzima violaxantina-de-epoxidasa (VDE), (Nour-Eddine, 1999). En plantas aclimatadas a alta RFA el ácido ascórbico es necesario para sostener una adecuada actividad de VDE. La necesidad de ácido ascórbico sugiere un mecanismo (para la de-epoxidación) de reducción de la VDE seguido de una deshidratación, pero se carece de evidencia directa de este mecanismo.

La actividad de de-epoxidación depende de al menos de 4 factores:

- a) Cantidad de pigmento o “poza del pigmento”.
- b) La cantidad de violaxantina disponible para ser de-epoxidada.
- c) pH lumenal adecuado.
- d) Presencia de ácido ascórbico.

El tamaño de la poza del pigmento se refiere a la concentración relativa a la clorofila, centros de reacción o proteínas tilacoidales. Esta poza también depende de la especie y condiciones de crecimiento, la cual se incrementa cuando existe alta luminosidad u otro tipo de estrés que afecten la actividad fotosintética (Yamamoto, 1999).

Respecto a la capacidad de la de-epoxidación, es la fracción de violaxantina que puede ser de-epoxidada, esta fracción de violaxantina depende de la especie y las condiciones de luz durante el crecimiento y se puede hablar de un 10% a más del 90 % y generalmente se incrementa con niveles altos de luz. La disponibilidad de violaxantina para ser de-epoxidada también es afectada por el estrés inducido por alta o baja temperatura (Yamamoto, 1999).

La epoxidación ocurre en la obscuridad o baja RFA, catalizada por la enzima zeaxantina-epoxidasa (ZE), después de la inducción de la de-epoxidación. La epoxidación es afectada por la necesidad de contar con una de-epoxidación inicial, y la epoxidación (de la zeaxantina) bajo alta luminosidad puede tomar horas. Es importante señalar que la epoxidación requiere de NADPH y FAD, pH 7.5, también requiere ferredoxina y otros reductores similares. También de la misma forma que la VDE, la ZE

requiere que su sustrato sea todo trans (Yamamoto, 1999).

La diversidad de datos en los cuales se presentan FIF y PDC, sugieren que es un fenómeno especie dependiente y actualmente no hay suficientes datos sobre a que RFA se presentan daños en carotenoides. Además, es poca la información de las especies químicas que se producen en la fototransformación de carotenoides *in vitro* (Siemns, 1999), y prácticamente nula en sistemas *in vivo* como las lígulas de *T. erecta*, Rajendra et al (2003).

requiere que su sustrato sea todo trans (Yamamoto, 1999).

La diversidad de datos en los cuales se presentan FIF y PDC, sugieren que es un fenómeno especie dependiente y actualmente no hay suficientes datos sobre a que RFA se presentan daños en carotenoides. Además, es poca la información de las especies químicas que se producen en la fototransformación de carotenoides *in vitro* (Siemns, 1999), y prácticamente nula en sistemas *in vivo* como las lígulas de *T. erecta*, Rajendra et al (2003).

2 Planteamiento del problema.

Las plantas en la naturaleza están sujetas a varios factores de estrés; por ejemplo, la falta o exceso de agua, la acción de patógenos y plagas, estrés por ozono y otros contaminantes del aire en algunas zonas urbanas, por mencionar algunos; sin embargo, el exceso de luz también puede ser un factor de estrés, el cual puede destruir a moléculas del sistema fotosintético, en especial a carotenoides (Young,1990 Godde,1999; Nour-Eddine,1999; Bray,2000; Rajendra,2003).

Un grupo de moléculas muy importantes que son blanco del exceso de luz en las plantas son los carotenoides. Se sabe poco sobre la cantidad de radiación fotosintéticamente activa (RFA) necesaria para la biosíntesis, máxima acumulación y fototransformación de los carotenoides en plantas. Por otro lado no se conocen las especies químicas producto de la fotooxidación de los carotenoides en tejidos vegetales, en especial en lígulas (Handelman, 1991).

El carotenoide que se estudió en este trabajo fue la luteína, este pigmento es preponderante en plantas (Young, 1990; Pogson, 1996; Sreekala, 2003). Y como modelo vegetal se utilizó las lígulas de *Tagetes erecta* L., (familia *Asteraceae*), por ser una especie cuya inflorescencia (lígulas) presentan tejido cromoplástico y poco o

ningún tejido cloroplástico. Esto es importante, pues la mayoría de los estudios sobre estrés por exceso de luz se han realizado en tejido cloroplástico y/o en cloroplastos aislados. Este material permite contar con un tejido donde la composición de los pigmentos es predominantemente de tipo carotenoide, donde el carotenoide mayoritario es la luteína, aunque también presenta cantidades importantes de zeaxantina (Gussakovsky, 1997; Schansker, 1999; Bosma, 2003). Estos pigmentos son importantes en la industria farmacéutica como antioxidantes naturales y en la industria avícola como pigmentos para la piel del pollo y la yema de huevo. Además, los carotenoides son muy importantes para la salud del humano, ya que son precursores de vitaminas y están presentes en la mácula del ojo y en la retina (Bosma, 2003).

En relación a la fotodestrucción de carotenoides en *Tagetes erecta* L., algunas empresas dedicadas a la industrialización de esta especie han observado que ciertas plantaciones de *Tagetes erecta* L. presentan daños en las inflorescencias, al parecer por exceso de luz solar (comunicación personal del Ing. Alejandro Ornelas C. Director de operación de INDUSTRIAS ALCOSA, www.alcosa.com.mx). Sin embargo los estudios reportados a la fecha en *T. erecta*, incluyen, nutrición vegetal, mejoramiento genético, densidad de plantación, sanidad vegetal y sistemas de irrigación para incrementar tanto la producción de flor fresca, así como, la producción de carotenoides (Rao, 2002; Bosma, 2003; Sreekala, 2003; Kumar, 2004). En contraste, existe poca información sobre las condiciones de luz en las que se presenta mayor biosíntesis de carotenoides y la fotodestrucción de estos en las inflorescencias de esta especie. Por lo que este trabajo también aporta datos sobre la RFA mas adecuada para el cultivo de esta especie, y por lo tanto poder seleccionar regiones en el país donde dicha RFA sea adecuada.

Por otro lado, este trabajo contribuye al conocimiento sobre la fototransformación de los carotenoides y la acción que esta pueda tener sobre los cambios en las

concentraciones de algunos de estos pigmentos, lo cual también contribuye al conocimiento sobre la fisiología de la plantas en condiciones adversas.

3 Justificación

Por los antecedentes anteriormente presentados, este trabajo tiene como propósito:

- Evaluar a que cantidad de RFA se presenta la fototransformación de luteína *in vitro* y determinar cuáles son los productos de fototransformación en estas mismas condiciones.
- Determinar la cantidad de RFA donde puede presentarse daño a los carotenoides. en lígulas de *Tagetes erecta L.*
- Determinar cuales son las especies químicas producto de la fototransformación de los carotenoides en el tejido indicado.

4 Hipótesis.

Existe una relación positiva entre la radiación fotosintéticamente activa y la concentración de carotenoides en lígulas de *T. erecta L.*, hasta un punto donde la radiación fotosintéticamente activa, tendrá efectos negativos en la concentración de carotenoides en lígulas de *T. erecta L.*

5 Objetivos.

5.1 Objetivo General.

Determinar el efecto de la radiación fotosintéticamente activa en la fototransformación de la xantofila luteína *in vitro* y en lígulas de *Tagetes erecta L.*

5.2 Objetivos particulares.

Determinar la cantidad de radiación fotosintéticamente activa necesaria para la fototransformación de luteína en condiciones *in vitro*.

Observar a que cantidad de radiación fotosintéticamente activa se produce fototransformación del carotenoide luteína en lígulas de *Tagetes erecta L.*

Describir las especies químicas producto de la fototransformación por radiación fotosintéticamente activa de luteína *in vitro* y en lígulas de *Tagetes erecta L.*

6 Materiales y Métodos

6.1 Estudio 1.

Efecto de la irradiación solar sobre luteína en condiciones *in vitro*.

Este estudio se realizó con la finalidad de conocer el efecto de la RFA proveniente de luz solar sobre la fotooxidación de luteína.

Se colocaron en 4 frascos de vidrio transparente 80 ml de una solución de luteína con una pureza de aproximadamente de 94 % proporcionada por el Ing. Químico Alejandro Ornelas C. y por el Químico Enrique Hernández de INDUSTRIAS ALCOSA, a una concentración de 1 mg/ml en acetato de etilo (al mismo tiempo se colocaron 4 frascos en oscuridad como control) y colocados en una bandeja con agua para controlar la temperatura entre 25-26 °C, lo anterior se colocó en una invernadero con cubierta de vidrio transparente de 7 mm de espesor. La RFA se midió con un sensor tipo cuántico (ver sección 4.5 para detalles). Se realizaron muestreos diariamente a las 10:45, 12:45, 14:45, 16:45 y 18:45 horas, durante 4 días. Se tomó una alícuota de 3 ml de cada frasco y se colocaron en 4 viales para su análisis por UV-VIS (ver secciones 6.9, 6.10 y 6.11).

El invernadero se mantuvo ventilado con un ventilador y con un extractor de aire automático y equipo de aire acondicionado. Las longitudes de onda de la RFA dentro del invernadero se midieron con un espectro-radiómetro portátil (ver sección 6.5). Cada muestra fue analizada por espectroscopia de UV-VIS, haciendo un barrido de 400 a 500 nm; cromatografía de líquidos de alta eficiencia con arreglo de diodos y resonancia magnética nuclear. La concentración de luteína fue calculada utilizando la fórmula de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción se obtuvo de literatura especializada (Britton, 1995), (ver secciones 6.9, 6.10 y 6.11).

6.2 Estudio 2.

Irradiación de luteína in vitro con luz artificial.

En este experimento se utilizó una solución como la descrita en la sección 6.1, colocándose en frascos de vidrio de 15 ml con 4 repeticiones, los cuales fueron colocados en una bandeja con agua y un serpentín de enfriamiento, con la finalidad de controlar la temperatura. La irradiación se realizó utilizando lámparas con filamento de ioduro de tungsteno. Los periodos de luz fueron 2, 4, 6 y 8 horas a 0,1000 y 1600 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Después de los tratamientos se analizaron las muestras con espectroscopia UV-VIS, HPLC con arreglo de diodos y RMN (ver secciones 6.9, 6.10 y 6.11), con la finalidad de determinar la formación de especies químicas producto de la fototransformación en la solución de luteína.

6.3 Estudio 3.

Efecto de 2 ambientes contrastantes de radiación solar en la biosíntesis de pigmentos en lígulas de *T. erecta L.*

En esta sección se describe el material vegetal utilizado

En este estudio se cultivaron 2 lotes de 15 plantas cada uno de *Tagetes erecta L.* var. HAWAI en bolsas de plástico de 5 litros de volumen con sustrato a base de tezontle fino y agrolita en una proporción de (60:40), además, se utilizó la solución hidropónica descrita por Hoagland y Arnon (Hoagland, 1950) para la nutrición de las plantas. Las semillas se sembraron en turba y se trasplantaron a los 30 días de la siembra. Un lote de plantas se colocó desde su transplante en un invernadero con recubrimiento de vidrio de 7 mm de espesor y el segundo lote en un invernadero con cubierta de plástico blanco lechoso, calibre 720, con aditivo anti-UV.

La temperatura se controló en un intervalo entre 15°C y 30 °C mediante aire acondicionado y ventiladores; la luz incidente en las plantas se midió mediante un sensor cuántico como el descrito anteriormente, además se registro la temperatura y humedad relativa cada 5 minutos con un equipo HOBO (modelo: H08-003-02, Onset Computer Corporation. Street: 470 MacArthur Blvd., Bourne, MA 02532).

Cuando las inflorescencias alcanzaron 90 días después de la siembra se procedió a medir el diámetro de las inflorescencias para posteriormente cortar y pesar las lígulas, para luego deshidratarlas en una estufa a 50 °C durante 8 –10 horas y macerarlas hasta atravesar la malla #40 y obtener la harina correspondiente. Posteriormente se extrajo los carotenoides de esta harina (ver sección 6.8) y determinar la concentración de carotenoides. Así como, las especies químicas de estos (ver secciones 6.9, 6.10 y 6.11).

6.4 Estudio 4

Efecto de la radiación fotosintéticamente activa en carotenoides de lígulas de *T. erecta* L.

Se cultivaron plantas de *Tagetes erecta* L., de la variedad ya indicada, en las condiciones descritas en el estudio 3, estas plantas estuvieron expuestas durante su crecimiento y desarrollo a una RFA de aproximadamente $800 \mu\text{M cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante el tiempo necesario para alcanzar el estadio de la inflorescencia con mayor concentración de luteína determinado en el estudio 3. Cuando las inflorescencias alcanzaron 90 días después de la siembra, en ese momento se aplicaron el mismo esquema de tratamientos indicados en la sección 6.2 de radiación fotosintéticamente activa, proveniente de lámparas de tungsteno con yoduro de tungsteno, donde los tratamientos indicados se repitieron 4 veces cada uno.

Inmediatamente después de aplicar los tratamientos indicados, se procedió a obtener la harina de las lígulas (HL) y determinar la concentración de carotenoides y las especies químicas de estos o sus derivados presentes en las lígulas (ver secciones 6.9, 6.10 y 6.11).

6.5 Medición de luz solar y artificial.

La RFA en los invernaderos y en los estudios *in vitro* fue medida con un sensor quíntico (LI-190, LI-COR, Lincoln, NE, USA) acoplado a un registrador de datos (CR510, Campbell Scientific, Inc. UT, USA), registrando cada 5 minutos. El espectro luminoso dentro de los invernaderos fue determinado con un espectro-radiómetro (LI-1800, LI-COR, Logan, UT, USA).

6.6 Control de temperatura.

La temperatura dentro de los invernaderos fue controlada con aire acondicionado, ventiladores y extractores de aire. La cual se mantuvo entre 15  C y 28  C (nocturna y diurna respectivamente).

6.7 Cosecha de inflorescencias.

Cuando las plantas alcanzaron 90 días después de sembradas, se midió su diámetro, se cortó la inflorescencia desde la base del receptáculo, esta se pesó, para posteriormente pesar las lígulas, las cuales fueron cortadas al ras del borde del receptáculo y deshidratadas en una estufa a 50 °C durante 8-10 horas, determinándose posteriormente el peso seco de estas.

6.8 Extracción de carotenoides.

Las lígulas deshidratadas fueron maceradas hasta malla # 40, para obtener harina de lígulas de *T. erecta* (HL). La extracción y saponificación de carotenoides fue realizado de acuerdo con una ligera modificación a la técnica descrita por la AOAC (Long, 2000). Se pesaron aproximadamente 50 mg de HL y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, y se adicionó una mezcla de hexano, etanol, acetona y tolueno (HEAT) en una proporción 10:6:7:7 vol/vol/vol/vol. Después se agitó durante 1 minuto y el matraz fue conectado a un condensador con tapón para establecer un sistema de reflujo, lo anterior en un baño de agua a 50 °C durante 45 min. Posteriormente la muestra se enfrió a 25 °C por 10 – 15 min; se reajusto el volumen de HEAT. Después se añadió 2 ml de potasa metanólica al 40 % y se agito durante 1 minuto. Una vez hecho esto, se reconectó el matraz al sistema de reflujo y se colocó en el baño de agua a 50 °C por 20 minutos. El matraz fue enfriado en agua fresca y posteriormente se añadieron 30 ml de hexano, la mezcla fue transferida a un matraz aforado de 100 ml donde se añadió sulfato sodio (10% en agua) hasta la marca del aforo, y se agito vigorosamente durante 1 minuto. La mezcla se transfirió a un embudo de separación y se dejó reposar en la oscuridad durante 1 hora, y posteriormente se colectó la fase superior.

6.9 Espectroscopía ultravioleta-visible

Cada muestra fue analizada con un espectrofotómetro, realizando un barrido entre 400-500 nm (UV-3101-PC, SHIMADZU, JAPAN). La concentración de carotenoides fue determinada utilizando la ley de Lambert-Beer usando el coeficiente de absorción para luteína (Britton, 1995).

6.10 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Los extractos (oleorresinas) de las HL y las muestras de los estudios *in vitro* fueron analizados con un equipo de HPLC con arreglo de diodos (1525, Waters, MA USA.), con un detector 2996 (Waters, MA USA), en fase reversa, utilizando una columna ALLTECH, [Adsorbosphere de alumina, HSC18, longitud 15 cm, diámetro 4.6 mm y diámetro interno de 5 μm]. La fase móvil fue acetonitrilo-metanol en una proporción 98:2 ratio en sistema isocrático a 1 ml min⁻¹ a 23 C°. La región explorada del espectro UV-VIS fue de 300 a 500 nm y la detección fue 441 y 474 λ .

6.11 Análisis con resonancia magnética nuclear.

Se utilizó un equipo de RMN, Eclipse (JEOL, JAPAN), el instrumento se ajustó para determinar ¹H y ¹³C in CDCL₃. La frecuencia del aparato fue a 300 MHz.

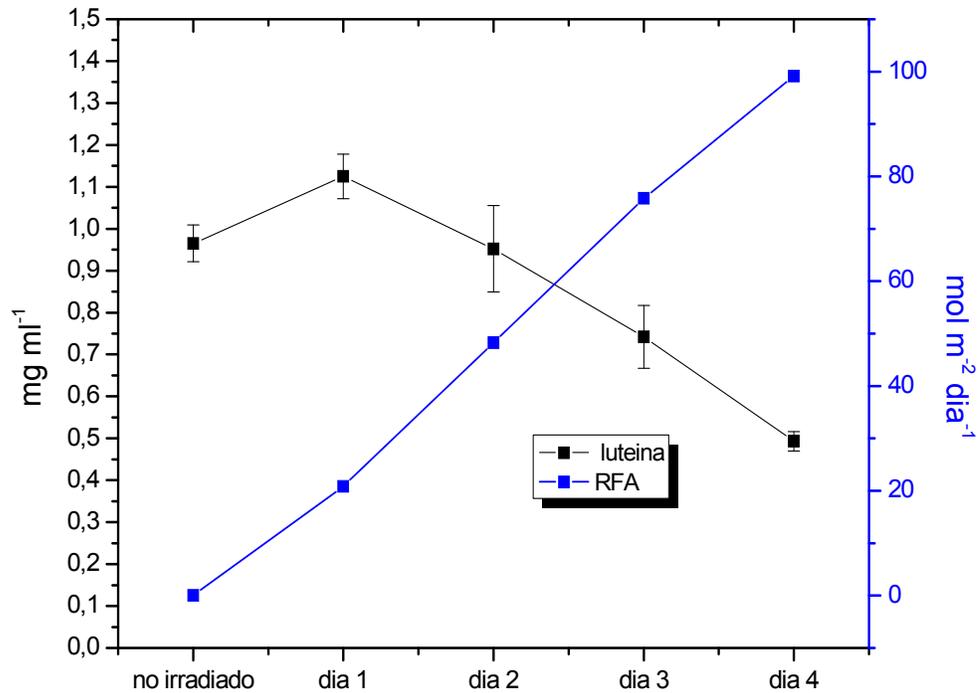
7 Resultados.

7.1 Irradiación con luz solar de luteína en condiciones in vitro.

La RFA acumulada durante los 4 días del estudio fue: 99.12 mol m^{-2} (Gráfica 1). Sorprendentemente, en el primer día de exposición a luz solar ($20.82 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), la luteína presentó un incremento en la absorbancia de aproximadamente 14.22 %. En los siguientes días dicha absorbancia disminuyó hasta 43 % en el cuarto día.

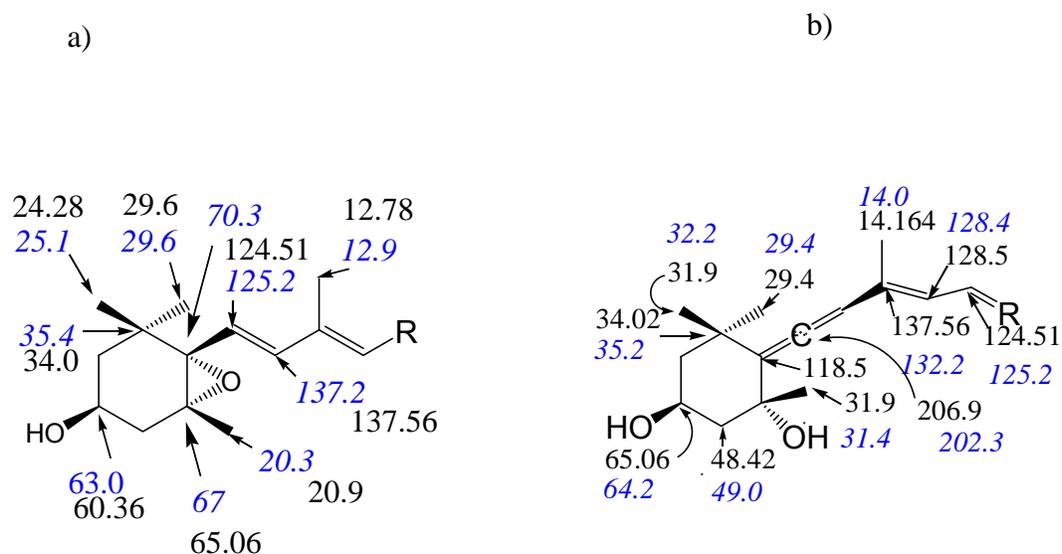
Los resultados del análisis por HPLC, muestran que las concentraciones de luteína y zeaxantina durante los 4 días de irradiación solar, mostraron disminución significativa en la luteína e incremento en la zeaxantina en el tercer día. Estos datos sugieren una fotoisomerización de luteína a zeaxantina; sin embargo la absorbancia total final fue menor que la solución de luteína no irradiada. Los datos de resonancia magnética nuclear de la solución de luteína en el cuarto día mostraron señales de epóxidos y alenos. (Figura 4).

Gráfica 1. Comportamiento de las concentraciones de luteína en solución expuesta a 4 días de irradiación solar



En esta tabla se muestra la variación en la concentración de luteína inducida por la radiación luminosa. A $75 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa acumulada la concentración de zeaxantina se incrementó de $0.0226 \text{ mg ml}^{-1}$ a $0.2021 \text{ mg ml}^{-1}$ (aproximadamente 9 veces, datos no mostrados). El incremento aparente en la concentración del día 1, se explica por un fenómeno de isomerización de tipo trans-cis y no corresponde a un aumento real.

Figura 4. a y b.- Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de 2 moléculas encontradas tipo: epóxido (a) y aleno (b) en la solución de luteína irradiada con luz solar al día 4 ($75 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$).



Los valores en color negro son los datos reportados por Englert (1999) y los valores en itálica, son los valores obtenidos experimentalmente en este trabajo.

7.2 Irradiación de luteína *in vitro* con RFA artificial.

Se detectaron diferencias en los espectros UV-VIS, de la solución de luteína irradiada. Después de 2 horas de irradiación a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la absorbancia fue mas alta (1.402 a 448 nm) que la no irradiada (1.28 a 448 nm), mientras que a 4,6 y 8 horas con la misma intensidad luminosa, la absorbancia fue de 1.208; 1.141; 1.119 a 448 nm respectivamente, lo cual fue menor que el tratamiento no irradiado. Cuando la solución de luteína fue irradiada durante 2 horas a $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la absorbancia fue mayor (1.38 a 448 nm) que la no irradiada (1.28 a 448 nm). Sin embargo, la absorbancia

prácticamente no sufrió cambios cuando fue irradiada a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 2 horas.

A $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 4 horas de irradiación la absorbancia (a 448 nm) detectada fue 1.288, lo cual es prácticamente la misma que en la no irradiada; después de 6 h se observó una pequeña diferencia (abs. = 1.254 a 448 nm). Después de 8 horas de irradiación a la misma intensidad la absorbancia fue 1.131 a 448 nm, la cual fue menor que las irradiadas a 0, 4 y 6 h y prácticamente la misma a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Gráfica 2). Utilizando las técnicas analíticas indicadas y comparando los resultados con datos reportados en la literatura (Britton,1995; Englert,1995; Long,2000), proponemos una lista de carotenoides encontrados en nuestros estudios, una herramienta muy útil para tal propósito fue la determinación de la estructura fina espectral para cada carotenoide (Britton,1995), (Tablas 1 y 2). Se detectó una aparente modificación fotoquímica de luteína a isómeros cis de luteína, así como, de zexantina a isómeros cis de zeaxantina, además, se detectaron cis-luteína-5,6-epóxido, cis-neoxantina, cis-anteraxantina y cis-violaxantina principalmente. A $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 4 h de irradiación, se encontró una caída en la absorbancia de la solución de luteína, también en estas condiciones se detectaron carotenoides similares a los descritos anteriormente. Estos datos de absorbancia sugieren que la luteína puede ser la fuente para la formación de estas nuevas moléculas vía una reacción fotoquímica, ya que Bungard et al (1999), demostró que la luteína puede ser fototransformada a luteína-5,6-epóxido. En $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 6 h de exposición, el área relativa del pico obtenido por HPLC presentó un decremento importante, mientras que en el caso de la zeaxantina irradiada a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 2 h exposición, se observó la mayor área relativa. En contraste con lo anterior, la menor área relativa fue en el tratamiento de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 8 h de exposición; pero a 6 h no se detectó zeaxantina, probablemente debido a una fototransformación hacia neoxantina, pues en el análisis HPLC, el área relativa del pico de la zeaxantina decayó, apareciendo el pico de la neoxantina.

Tabla 1. Datos cromatográficos y espectroscópicos de carotenoides encontrados en luteína en solución irradiada a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Irradiación en horas	Tiempo de retención (min.)	II λ *	III λ *	λ_{cis} *	III/II* %	CIS/II* %	Concentración mg ml ⁻¹	Carotenoide propuesto
0	9.9	445.0	478.0		54.0		0.93	luteína standard
0	11.0	452.0	480.0		28.0		0.06	zeaxantina standard
2	4.0	437.0	466.0		108.5	4.3	0.0025	cis-neoaxantina
2	4.7	440.6	469.7	329.0	94.6	2.7	0.0106	cis-luteína-5,6-epóxido
2	6.6	444.3	474.5		50.2		0.0149	anteraxantina
2	8.8	446.7	474.5		63.2		0.8153	luteína
2	9.5	450.5	470.0	335.0		6.1	0.0461	zeaxantina
2	9.9	441.8	468.5	332.8	38.7	30.5	0.0889	cis-luteína-5,6-epóxido
2	10.7	453.0	473.0	338.7	82.3	25.9	0.0107	cis-zeaxantina
4	3.8	437.0	466.0	326.0	57.0	6.8	0.0075	cis-neoxantina
4	4.0	439.4	466.0	305.4	111.8	25.6	0.0025	cis-neoxantina
4	4.5	440.6	469.7	328.0	80.4	2.7	0.0143	cis-luteína-5,6-epóxido
4	6.2	445.5	474.5	330.0	35.4	38.7	0.0158	cis-anteraxantina
4	8.2	446.7	474.5		60.3		0.78	luteína
4	8.8	451.5	473.2	336.3		1.0	0.0376	cis-zeaxantina
4	9.2	440.6	468.0	332.8	36.4	32.7	0.11	cis-luteína-5,6-epóxido
6	4.8	442.0	470.0	330.0	84.4	3.8	0.009	cis-violaxantina
6	9.6	450.3	474.1			6.6	0.041	zeaxantina
6	9.9	442.0	468.0	332.8	40.0	30.3	0.0819	cis-luteína-5,6-epóxido
8	4.7	441.8	469.7	326.0	93.7	10.0	0.0101	cis-luteína-5,6-epóxido
8	8.8	446.7	474.5		58.3		0.8325	luteína
8	9.5	450.3	475.8	335.0		4.9	0.046	zeaxantina
8	9.8	441.8	469.7	331.0	36.4	38.0	0.0077	cis-luteína-5,6-epóxido

* Según Britton (1995); II λ * longitud de onda del segundo pico del espectro visible del carotenoide; III λ * longitud de onda del tercer pico del espectro visible del carotenoide; λ_{cis} * longitud de onda del pico cis del espectro uv-visible del carotenoide.

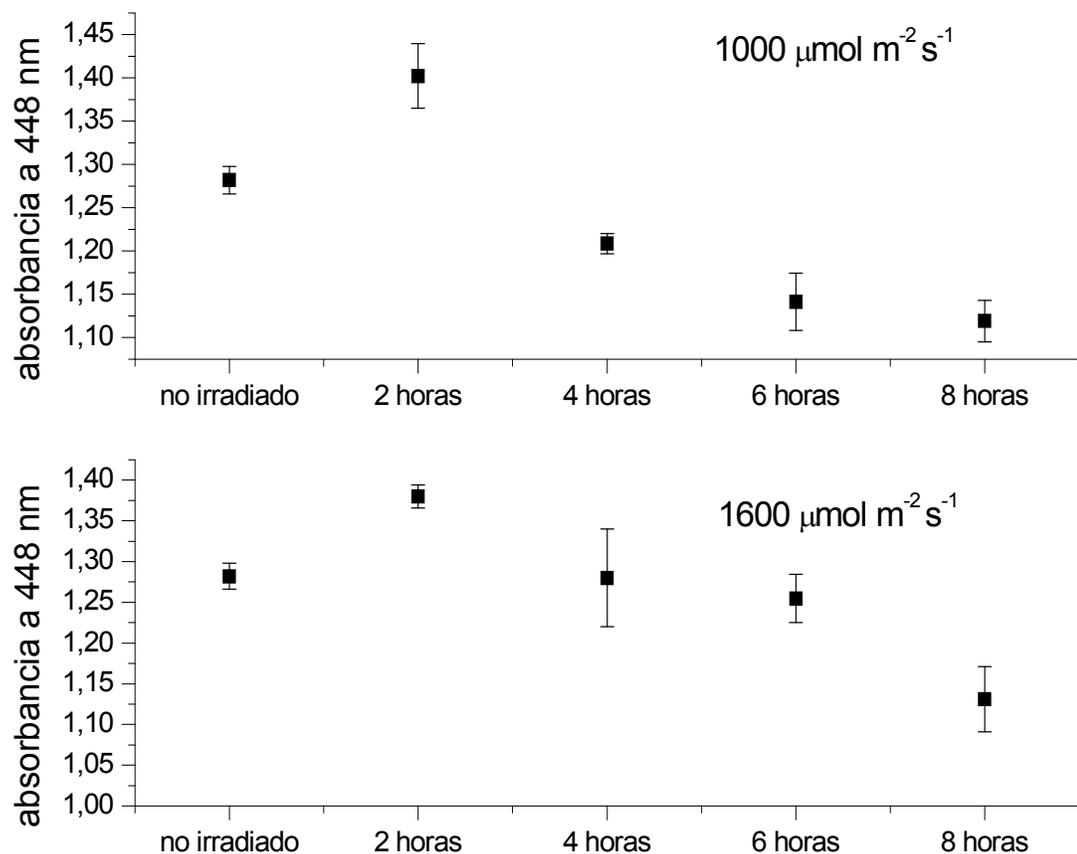
Tabla 2. Datos cromatográficos y espectroscópicos de carotenoides encontrados en luteína en solución irradiada a $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Irradiación en horas	Tiempo de retención (min.)	II λ *	III λ *	λ_{cis} *	III/II %	CIS/II %	Concentración mg ml^{-1}	Carotenoide propuesto
0	9.97	445.0	478.0		54.0		0.9361	luteína standard
0	11.08	452.0	480.0		28.0		0.0639	zeaxantina standard
2	4.65	440.6	469.7	311.0	97.5	12.43	0.0109	violaxantina
2	8.65	446.7	474.5	337.0	64.3	8.94	0.8091	luteína
2	9.32	450.0	473.0	331.0	0.6	5.21	0.0411	zeaxantina
2	9.71	441.8	468.0	332.8	36.2	31.10	0.104	cis-luteína-5,6-epóxido
4	4.67	439.4	472.1	329.0	99.8	13.20	0.0101	cis-luteína-5,6-epóxido
4	9.15	453	468.7	336.0	37.7	4.28	0.0425	zeaxantina
4	9.54	441.8	468.5	332.8	43.8	28.07	0.0988	cis-luteína-5,6-epóxido
6	4.59	440.1	460.7		91.1		0.019	violaxantina
6	5.50	440.6	468.5	338.7	112.8	57.82	0.0076	cis-luteína-5,6-epóxido
6	5.95	441.8	470.9	354.8	90.9	2.34	0.0105	cis-luteína-5,6-epóxido
6	8.41	446.7	474.5	336.0	63.1	2.76	0.689	luteína
6	9.02	449.1	470.2	346.0	5.5	1.50	0.0292	zeaxantina
6	9.45	441.8	468.5	332.8	37.3	31.47	0.155	cis-luteína-5,6-epóxido
8	4.51	440.6	469.7		96.3		0.0168	violaxantina
8	5.40	438.2	468.5	332.8	85.6	88.51	0.0061	cis-neoxantina
8	5.83	441.8	472.1	355.4	93.8	4.44	0.0085	cis-anteraxantina
8	8.88	451.0	477.0		36.8		0.0349	zeaxantina
8	9.32	440.6	468.5	332.0	35.3	31.88	0.12	cis-luteína-5,6-epóxido

* Según Britton (1995); II λ * longitud de onda del segundo pico del espectro visible del carotenoide; III λ * longitud de onda del tercer pico del espectro visible del carotenoide; λ_{cis} * longitud de onda del pico del espectro uv-visible del carotenoide.

Las tablas 1 y 2 incluyen información del análisis por HPLC con arreglo de diodos, así como la estructura fina espectral según la notación propuesta por Britton (1995), lo anterior se utilizó para la identificación de las especies químicas encontradas después de los experimentos de irradiación de luteína. Se observaron isómeros cis de luteína y zeaxantina pero no se muestran en esta tabla.

Grafica 2. Comportamiento de la absorbancia de luteína en solución irradiada con luz RFA artificial.



En esta gráfica se muestra la absorbancia de una solución de luteína irradiada con luz fotosintéticamente activa (1000 y $1600 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) proveniente de lámparas a diferentes tiempos de exposición. En ambas intensidades de luz y a dos horas de irradiación se observa el mayor incremento en la absorbancia de la solución de luteína respecto al tratamiento no irradiado.

7.3 Efecto de 2 ambientes contrastantes de radiación solar en la biosíntesis de pigmentos en lígulas de *T. erecta* L.

El promedio de la RFA registrado dentro del invernadero con cubierta plástica durante el periodo de estudio fue de $13.65 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y en el invernadero con cubierta de vidrio en promedio fue de aproximadamente $20.291 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Adicionalmente se encontraron diferencias importantes en la cantidad de luz ultravioleta A, en el invernadero con cubierta de vidrio, se detectó aproximadamente $62.88 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mientras que en el invernadero con plástico, prácticamente no se detectó.

La temperatura promedio dentro del invernadero con cubierta de plástico (ICP) fue de $17.2 \text{ }^\circ\text{C}$ y en el invernadero con cubierta de vidrio (ICV) fue de $19.1 \text{ }^\circ\text{C}$, sin embargo, la diferencia de temperaturas no fue significativa ($t = 4.11844 \times 10^{-6}$, $p \leq 0.05$).

Se encontró que las inflorescencias de las plantas cultivadas en el invernadero con cubierta de plástico presentaron mayor diámetro ($8.1 \pm 1.16 \text{ cm}$) que las cultivadas en el invernadero de vidrio ($6.77 \pm 0.71 \text{ cm}$) ($t_{(0.05, 18)} = 3.034$). El peso seco de lígulas fue mayor en las plantas provenientes del invernadero de plástico ($0.624 \pm 0.24 \text{ g}$) que en las del invernadero de vidrio ($0.45 \pm 0.12 \text{ g}$) ($t_{(0.05, 18)} = 2.34$). Además, el contenido

total de carotenoides fue mayor en las plantas del invernadero de plástico ($3.12, \pm 1.18401 \text{ g kg}^{-1}$) que en el invernadero de vidrio ($2.14, \pm 0.57 \text{ g kg}^{-1}$) ($t_{(0.05, 18)} = 2.34$).

Diferentes carotenoides fueron detectados en las inflorescencias de ambos invernaderos, por ejemplo en el invernadero de plástico se detectó: violaxantina, tres isómeros de cis-luteína 5,6-epóxido, aloxantina, cis-luteína y dos isómeros de cis-zeaxantina, mientras que en el invernadero de vidrio se detectaron: cis-luteína-epóxido, un aparente epoxi-caroteno, cis-luteína 5,6-epóxido, cis-anteraxantina, cis-luteína y cis-zeaxantina (Tablas 3, 4; Gráficas 4,5; Figura 5 y 6).

Tabla 3. Datos cromatográficos y espectroscópicos de carotenoides encontrados en inflorescencias de *T. erecta*, cultivadas bajo un invernadero con cubierta plástica.

Tiempo de retención (min.)	II λ *	III λ *	λ_{cis} *	III/II %	CIS/II %	Concentración mg ml ⁻¹	Carotenoide propuesto
4.94	440.6	469.7		63.0		0.03744	cis-luteína-5,6-epoxidó
5.36	441.8	470.9	335.1	88.9	3.7	0.04524	cis-violaxantina
6.57	441.8	469.7	312.5	92.4	5.6	0.03744	cis-violaxantina
7.05	439.4	469.0	314.9	56.8	38.2	0.04992	cis-neoxantina
7.40	449.1	478.2	301.8	38.9	16.1	0.06084	cis-zeaxantina
7.72	449.1	478.2	311.3	80.3	2.5	0.06396	cis-zeaxantina
10.28	446.7	474.5	332.8	52.9	4.4	13.87464	cis-luteína
11.45	451.5	478.2	339.9	26.1	3.4	0.36192	cis-zeaxantina

* Según Britton (1995); II λ * longitud de onda del segundo pico del espectro visible del carotenoide; III λ * longitud de onda del tercer pico del espectro visible del carotenoide; λ_{cis} * longitud de onda del pico cis del espectro uv-visible del carotenoide.

Tabla 4. Datos cromatográficos y espectroscópicos de carotenoides encontrados en inflorescencias de *T. erecta*, cultivadas bajo un invernadero con cubierta de vidrio.

Tiempo de retención en min.	II λ *	III λ *	λ cis*	III/II %	CIS/II %	Concentración g kg ⁻¹	Carotenoide Propuesto
5.191	439.4	469.7	365.0	104.4	7.70	0.05457	cis-luteína-5,6-epóxido
6.359	441.8	470.9		119.0		0.05029	Violaxantina
6.869	440.6	469.7	329.2	93.6	18.79	0.1177	cis-luteína 5,6-epóxido
7.488	443.0	472.1	329.2	8.5	456.79	0.15515	cis- anteraxantina
8.107	444.0	467.0	338.0		9.90	0.05671	cis- anteraxantina
10.067	447.9	474.5	334.0	52.0	3.34	8.9773	cis-luteína
11.236	452.0	478.2	343.5	21.7	5.04	0.31779	cis-zeaxantina

*Notación según Britton (1995); II λ * longitud de onda del segundo pico del espectro visible del carotenoide; III λ * longitud de onda del tercer pico del espectro visible del carotenoide; λ cis* longitud de onda del pico cis del espectro uv-visible del carotenoide.

En las tablas 5 y 6 se muestra información de HPLC con arreglo de diodos y la estructura fina espectral (Britton, 1995) de las especies químicas de carotenoides encontrados en las inflorescencias de *T. erecta* cultivadas en invernaderos con diferente tipo de cubiertas.

Tabla 5. Efecto sobre algunos caracteres morfológicos y concentración de carotenoides en inflorescencias de *T. erecta* L. cultivadas bajo 2 distintas cubiertas.

PARÁMETERO	CUBIERTA DE PLASTICO 0	CUBIERTA DE VIDRIO 0
Diámetro (cm)	8.1a*	6.77 b
Peso seco de lígulas (g)	0.624 c	0.46 d
Concentración de xantofilas totales (g/kg)	6.24 e	4.56 f

*Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativa según Tukey, $P \leq 0.05$.

Las diferentes cubiertas de los invernaderos modifican la luz solar incidente en las plantas, por ejemplo la cubierta plástica reduce la RFA y reduce la mayoría de la radiación UV. Estas modificaciones de la luz inducen diferencias en parámetros de las plantas como el diámetro de las inflorescencias, peso seco de lígulas y la concentración de xantofilas.

Figura 5 a y b. Desplazamiento químico de ^{13}C de caroteoides: epóxido (a) y aleno (b), encontrados en lígulas provenientes del invernadero con cubierta de plástico.

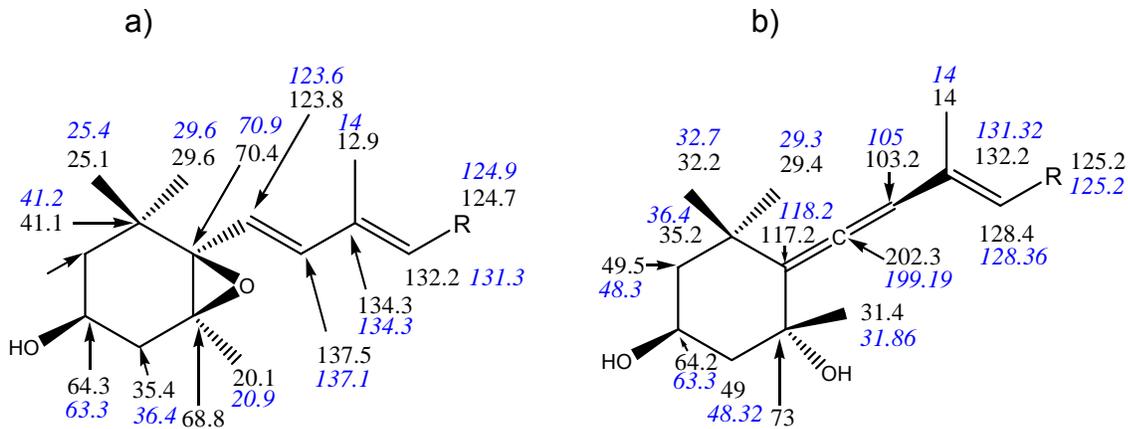
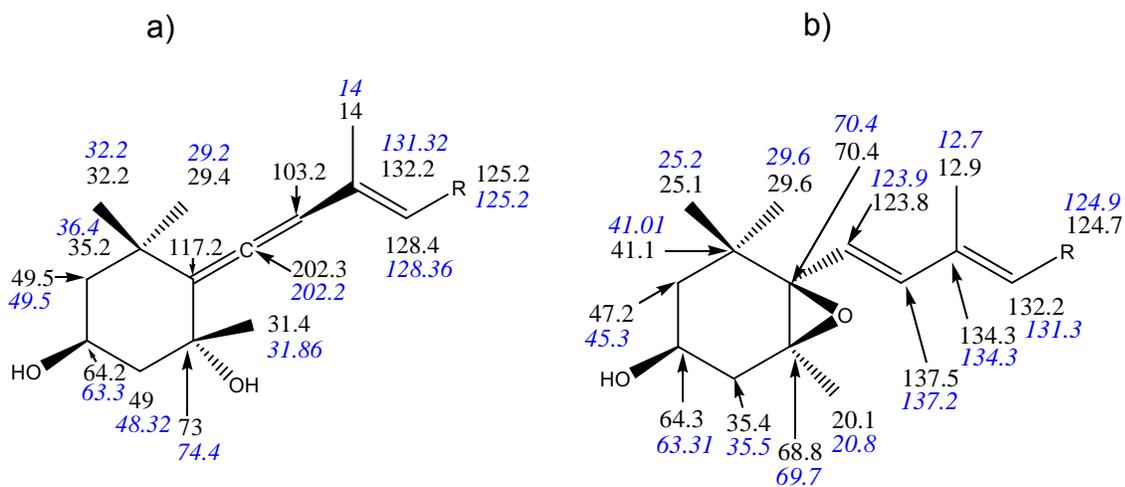


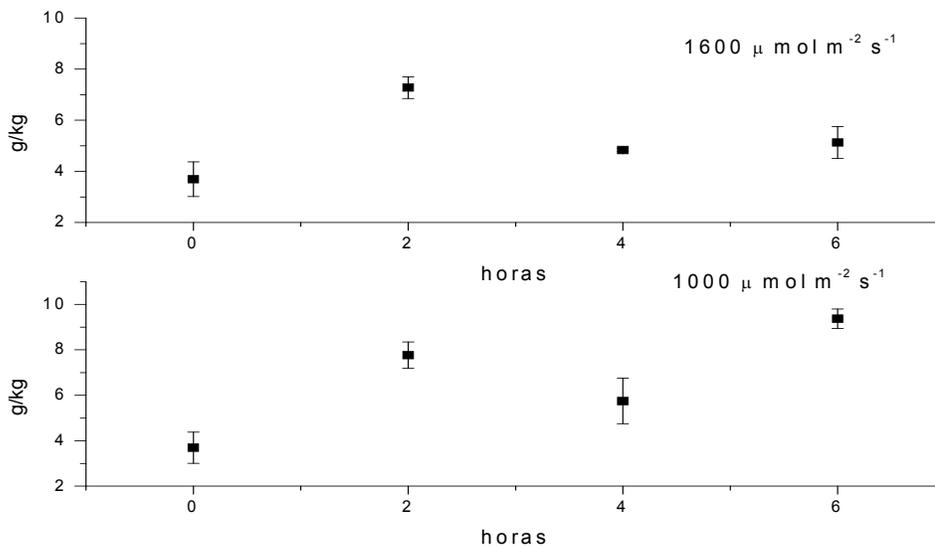
Figura 6 a y b. Desplazamiento químico de ^{13}C de caroteoides: aleno (a) y epóxido (b) y encontrados en lígulas provenientes del invernadero con cubierta de vidrio. Los valores en color negro son los datos reportados por Englert (1999) y los valores en itálica, son los valores obtenidos experimentalmente en este trabajo.



7.4 Efecto de la radiación fotosintéticamente activa en carotenoides de lígulas de *T. erecta* L.

En general las inflorescencias irradiadas a $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a cualquiera de los tiempos de irradiación, presentaron menor concentración de carotenoides ($5.67 \pm 1.48 \text{ g kg}^{-1}$ por kilogramo de harina) que el grupo de las inflorescencias irradiadas a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($7.68, \pm 1.25 \text{ g kg}^{-1}$ por kilogramo de harina) ($t_{(0.05,46)} = 5.12$). Sin embargo, el tratamiento donde se presentó la mayor concentración de carotenoides fue $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 6 h ($8.85 \pm 1.22 \text{ g kg}^{-1}$ por kilogramo de harina) y el que presentó menor concentración ($4.37 \pm 1.03 \text{ g kg}^{-1}$) fue el de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 4 h de irradiación. Sin embargo, en ambos grupos de irradiación se presentaron mayor concentración de carotenoides que el grupo no irradiado ($2.4 \pm 0.57 \text{ g kg}^{-1}$ por kilogramo de harina), (Gráfica 3).

Gráfica 3. Efecto de la irradiación con RFA artificial en inflorescencias de *T. erecta* L.



En forma general el tratamiento de $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ indujo la mayor concentración de xantofilas totales.

En forma general el tratamiento de $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ indujo la mayor concentración de xantofilas totales.

8 Discusión.

Cuando los carotenoides como la luteína y la zexantina son irradiadas con RFA solar o artificial, estas moléculas están sujetas a transformaciones fotoquímicas. Este hecho se ha descrito en trabajos previos (Handelman, 1991; Siems, 1999), sin embargo en estos, no se midió la cantidad de RFA; ni la temperatura fue controlada.

Se encontró una relación lineal negativa entre la absorbancia de la solución de luteína y la irradiación solar. Sin embargo, bajo algunas condiciones de irradiación, la solución de luteína puede presentar incrementos en la absorbancia. Este efecto se observó en la solución de luteína expuesta a luz solar y artificial. Esto puede ser explicado en términos de rotación de un anillo de la luteína, de tal forma que se establece un doble enlace adicional, además de isomerización cis-trans (ver figura 7). Estas fototransformaciones de carotenoides afectan tanto la absorbancia como el tiempo de retención en la cromatografía.

En la solución de luteína irradiada, se encontró evidencia de fototransformación de luteína a zeaxantina, así como, a moléculas nuevas en la solución como epoxi-carotenoides y carotenoides alénicos. Por ejemplo con irradiación artificial a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y después de 4 horas de exposición, se detectó una molécula tipo neoxantina. Los datos con los que contamos, sugieren que tanto la luteína y la zeaxantina irradiadas pueden ser el origen de estos alenos y epóxidos, sin embargo, aún no determinamos el mecanismo de reacción, lo cual puede ser tema para futuros trabajos. Al respecto la luteína presenta cambios más drásticos de área relativa que la zeaxantina; esto sugiere reacciones fotoquímicas en las cuales la luteína es transformada a neoxantina u otro intermediario del ciclo de la zeaxantina. Esta última

reacción tiene implicaciones fisiológicas, por que establecería una nueva ruta metabólica que puede conectar la gran cantidad de reservas de luteína y ser utilizadas por la planta en estres por estar bajo exceso de iluminación. Lo anterior puede incrementar la eficiencia del ciclo de la zeaxantina y la biosíntesis de ABA. Además, la propia luteína puede ser autoepoxidada y entrar en un ciclo luteína ↔ luteína-5,6-epoxido y este ciclo también puede ayudar a la disipación del exceso de energía por la planta. Sin embargo, con los datos con los que se cuenta, no se puede excluir la posibilidad que estas transformaciones de la luteína sean reacciones fotoquímicas-enzimáticas en la planta. Por lo que es importante desarrollar investigación al respecto. Los estudios realizados en plantas dentro de los 2 tipos de invernaderos, demuestran que estas cubiertas modifican la luz incidente en las plantas, en cantidad y calidad. Estos ambientes de luz afectan en forma significativa la morfología y fisiología de las inflorescencias de *T. erecta*. En el presente estudio la RFA y radiación UV, fueron más intensos en el invernadero con cubierta de vidrio que en el de plástico. Lo anterior condujo a una reducción del diámetro de las inflorescencias, peso seco de lígulas y contenido de carotenoides en las plantas cultivadas en el invernadero con cubierta de vidrio, en contraste con el invernadero con cubierta plástica. Mas aun, estos resultados bajo estos tipos de luz sugieren fuertemente que la cantidad y especies químicas de carotenoides se ven afectados fuertemente en las inflorescencias de esta planta.

En las lígulas provenientes de ambos invernaderos, detectamos epoxi-luteína y metabolitos componentes del ciclo de la zexantina-antexantina. Esto es un resultado interesante por que Bungard et al (2) demostraron que la luteína se puede auto-epoxidar mediante determinada condición de RFA y des-epoxidar cuando el estímulo luminoso se detenía y que este ciclo puede ayudar a la planta a disipar el exceso de energía luminosa. También se encontró en nuestro estudio que la luteína es el carotenoide más abundante y que la zexantina se presenta en menor cantidad independientemente de las condiciones de irradiación.

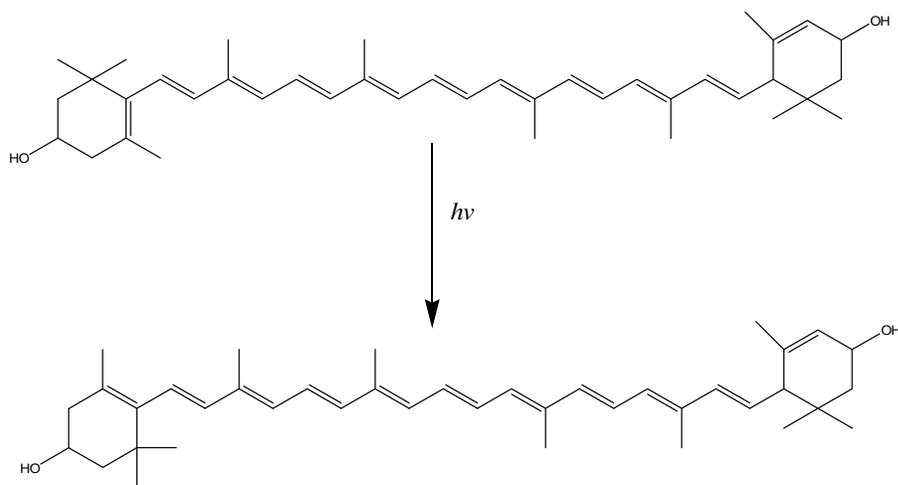
En muestras de carotenos provenientes de lígulas del invernadero con cubierta de vidrio, las áreas relativas de los picos obtenidos por HPLC de los epoxi-carotenoides, fueron menores que los correspondientes de la zexantina (2.08:2.97) y mucho mas bajo en el invernadero con cubierta de plástico (0.85:2.32). En otras palabras la concentración relativa de los epoxi-carotenoides es mayor donde las condiciones de irradiación solar fueron mas severas e intensas, sugiriendo con esto que la puesta en marcha del ciclo de luteína-epoxiluteína depende tanto de la cantidad como de la calidad de luz incidente.

Sin embargo, bajo las condiciones de luz dentro del invernadero de vidrio, el ciclo de la zexantina-violaxantina y el de la luteína-epoxiluteína pueden trabajar juntos para disipar el exceso de energía luminosa. Pero, en el invernadero con cubierta plástica nuestros datos sugieren que el principal ciclo es el de zeaxantina-anteraxantina. Esto implica que *T. erecta*, tiene una gran cantidad de luteína que puede utilizar para disipar el exceso de energía luminosa mediante el ciclo luteína-epoxiluteína en adición al ciclo de la zeaxantina. Si se compara la concentración de luteína y sus correspondientes datos de HPLC de las lígulas obtenidas en ambos invernaderos, la concentración de luteína es menor en el invernadero de vidrio que en el de plástico. Entonces surge una pregunta: ¿Qué pasa con la diferencia de luteína?, se inhibe su biosíntesis o sufre transformaciones fotoquímicas o bien fotoquímicas-enzimáticas? de tal forma que cierta fracción de luteína es transformada en zexantina y otras especies de carotenoides. En relación a lo anterior, las diferencias del área relativa del pico de HPLC correspondiente a zeaxantina, luteína y otros carotenoides de las lígulas de ambos invernaderos son aproximadamente de 0.65%, 4.95% and 4.11%, respectivamente, siendo 4.76 % la suma de la zeaxantina y otros carotenoides exceptuando a la luteína. Por lo tanto, la luteína puede ser la fuente del incremento de la zeaxantina y epoxi-carotenoides, dado que $4.95 - 4.76 = 0.19$, por lo que la diferencia de la cantidad de luteína es suficiente para los incrementos de zeaxantina y otros carotenoides. Esto es un punto interesante para futuras investigaciones por que la luteína (un α -caroteno) es

el principal carotenoide almacenado en plantas y puede ser sujeta a transformaciones fotoquímicas o fotoquímicas-enzimáticas para producir un carotenoide o carotenoides de la rama de los β -carotenoides y establecer una conexión entre ambas ramas (Figura 8). Otro aspecto importante que hay que mencionar es que la biosíntesis de carotenoides en lígulas de *T. erecta*, se ve afectada por distintas intensidades y en pocas horas de irradiación con RFA, como lo demuestra el experimento de irradiación artificial en condiciones in vivo.

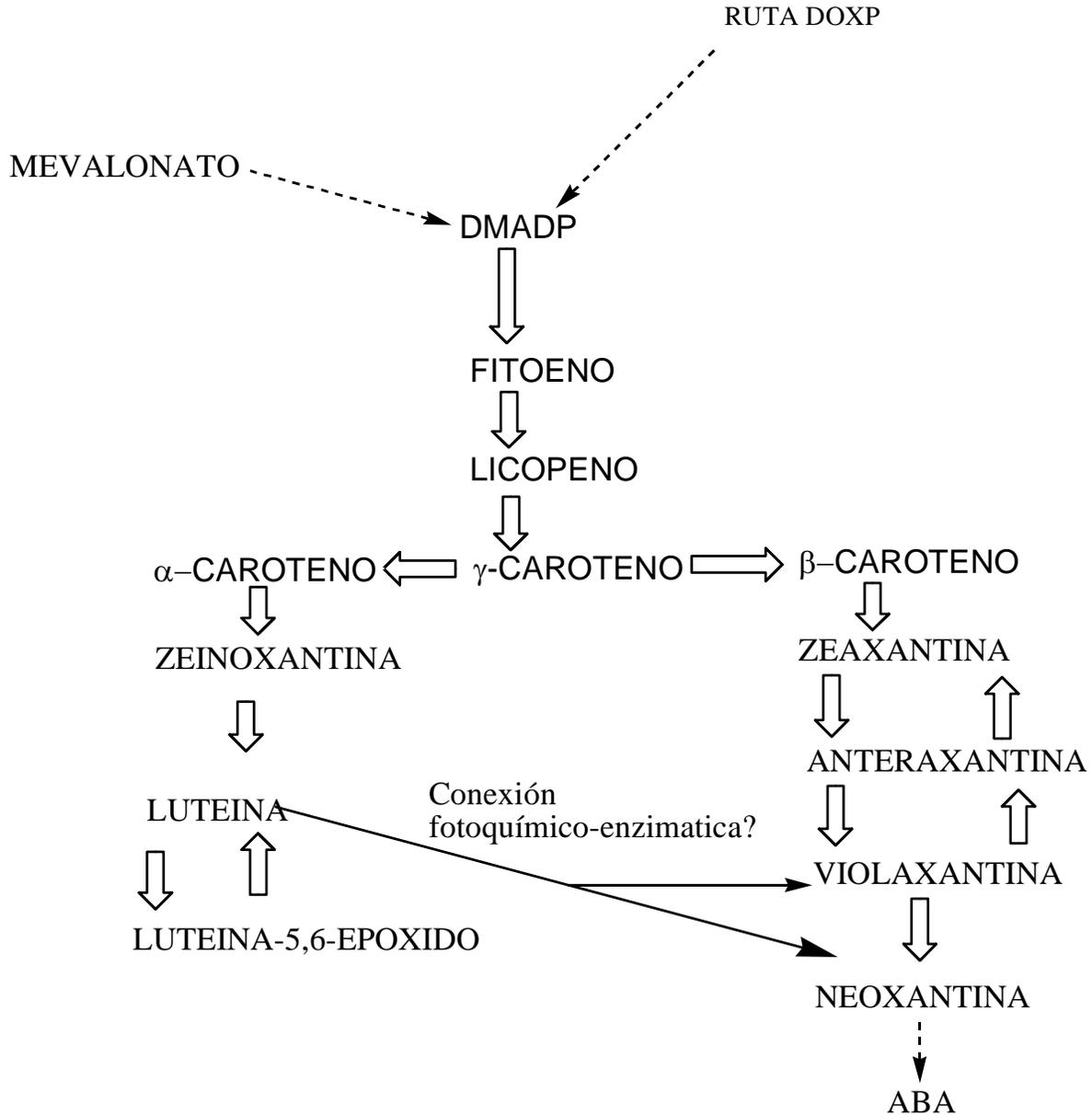
Por otro lado, tomando en cuenta los sistemas de análisis de carotenoides como el que se utilizó en este trabajo, hace falta el desarrollo de métodos de análisis que consuman menos tiempo y de preferencia poco o ningún disolvente orgánico, los cuales pueden constituir problemas de contaminación, además de que en el caso del análisis masivo de muestras se convierten en un fuerte gasto económico. Por lo tanto, se desarrolló un sistema de análisis de carotenoides en lígulas frescas *in vivo*, así como, en harina de este tejido. Este sistema se basa en la espectroscopia RAMAN, para abundar en el tema se pide al lector revise el anexo 1 de este manuscrito.

Figura 7. Rotación de propuesta de un anillo de luteína inducida por luz



En determinadas condiciones de irradiación artificial de luteína en solución, se presenta un incremento en la absorbancia, el cual puede ser explicado por la rotación de un anillo de la luteína, de tal forma que se establece un doble enlace más.

Figura 8.- Ruta propuesta de conexión entre luteína y la rama de los β -carotenoides.



9 Conclusión.

La biosíntesis de carotenoides en *T. erecta*, es dramáticamente afectada por la cantidad de luz, calidad y tiempo de irradiación. Puesto que controlando estos parámetros, se puede incrementar el diámetro de inflorescencias, peso seco de las lígulas y la concentración de carotenoides (lo cual se demuestra en el uso de los dos tipos de invernaderos). En los experimentos con irradiación artificial utilizados in vivo, aplicada a inflorescencias, la concentración de carotenoides presenta una función compleja no lineal, En general utilizando una irradiación de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entre 2 y 8 horas de exposición, se induce una concentración mas alta que la obtenida con $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los mismos tiempos, siendo $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 6 horas de irradiación, las condiciones donde se presenta la mayor concentración de carotenoides, pero tanto a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentan mayor concentración que en los tratamientos no irradiados. Además, con las condiciones de irradiación indicadas se presentan especies químicas de carotenoides no pre-existentes.

Por otro lado, bajo ciertas condiciones de irradiación indicadas en este trabajo, aplicadas a carotenoides en solución, se presenta un incremento en la absorbancia, lo cual es factible de explicar en términos de incremento de dobles enlaces e isomería cis de las moléculas en cuestión.

10 Recomendaciones y sugerencias.

El estudio del efecto de la luz sobre la fisiología de las plantas es un aspecto de suma importancia y en la medida que se comprenda mejor, los fenómenos producidos por la irradiación luminosa en las plantas se podrán proponer soluciones o mejoras en la productividad de los vegetales cultivados. Se debe realizar estudios tanto del efecto de diferentes cantidades de fotones, como de diferentes longitudes de onda de esos fotones y por supuesto estudiar el efecto de lo anterior en combinación con otros factores que afectan el desarrollo de las plantas como: nutrición, temperatura, irrigación, humedad relativa, concentración de CO₂ y reguladores del crecimiento.

En este trabajo se demuestra que la concentración de carotenoides en lígulas de *T. erecta* se incrementa entre 800 y 1600 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de RFA aun cuando se requiere de afinar mas este rango mediante el establecimiento de experimentos variando la intensidad de irradiación luminosa. Además, se propone una conexión de la rama de los α -carotenos con la rama de los β -carotenos mediante reacciones fotoquímicas, pero no se excluye la posibilidad de mecanismos enzimático-fotoquímicos los cuales se han descrito (p.e. ciclo de la zeaxantina).

Siendo México el centro de origen de *Tagetes erecta* L. (Serrato,2004), se puede encontrar una gran diversidad genética de esta especie, lo cual es fundamental para iniciar cualquier programa de mejoramiento genético y de esta manera poder generar variedades e híbridos que permitan a, agricultores e industriales mexicanos competir a nivel mundial. Sin embargo, es también importante determinar los nichos agroecológicos donde se pueda cultivar esta planta y se pueda expresar así competitivamente la biosíntesis de carotenoides.

11 Bibliografía.

Bartley, G. E., P. A. Scolnik (1994) Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **45**,287-301.

Bosma, T.L., J. M. Dole, N. O. Maness (2003) Optimizing marigold (*Tagetes erecta* L.) petal and pigment yield. *Crop Scien.***43**:6, 2118-2124.

Bouvier, F., R. A. Backhaus, B. Camara (1998) Induction and Control of Chromoplast-specific carotenoids genes by oxidative stress. *The J. of Biol. Chem.* **273**, 46, 13, 30651-30659.

Bray, E.A., J. Bailey-Serres, E. Weretilnyk (2000) Responses to Abiotic Stress. *En Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (Edited by B.B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones), pp. 1189-1203. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA.

Breusegem, V. F., M. Van Montagu, D. Inzé(2002) Engineering Stress Tolerance in Maize In *Oxidative Stress in Plants*. (Edited by Inzé, D., M. Van Montagu), pp.191-209. Taylor and Francis, Cornwall, UK.

Britton, G. (1995) UV/Visible Spectroscopy. *En Carotenoids Volume 1B: Spectroscopy* (Edited By Britton, G., S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), pp.13-62. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Bungard R. A., A. V. Ruban, J.M. Hibberd, M. C. Press, P. Horton, J. D. Scholes (1999) Unusual carotenoid composition and new type of xanthophyll cycle in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:1135-1139.

Carey, F. A. QUIMICA ORGANICA. McGraw-Hill. MEXICO 1999; pp 948-949.

Cunningham, F.X; Jr. And E. Gantt. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998. 49:557-83.

Demming B.K., Winter, A. Kruger, F.C. Czygan (1988) Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination to high light and water stress. *Plant Physiol.* 84:218-224.

Englert, G. (1995) NMR Spectroscopy. *En: Carotenoids Volume 1B: Spectroscopy* (Edited By Britton G., S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), pp. 147-252. Birkhäuser Verlag, Basel, SUIZA.

Eskling, M., H.E. Akerlund (1998) Changes in the quantities of violaxanthin de-epoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach from low to high light. *Photosyn. Res.* **57**, 41-50.

Godde, D. (1999). Adaptations of the photosynthetic apparatus to stress conditions. *En: Plants responses to environmental stresses* (Editado por Lerner, H.R.), pp 451-463. Marcel Dekker Inc. Nueva York, EUA.

Gussakovsky, E. E., V. Barzda, Y. Shahak, G. Garab (1997) Irreversible disassembly of chiral macrodomains in thylakoids due to photoinhibition. *Photosyn. Res.* **51**,119-126.

Handelman, G. J., Frederik J.G.M. Van Kuuk, A. Chatterje, N. I. Krinsky (1991) Characterization of products formed during the autooxidation of β -carotene. *Free Rad. Biol. & Med.* **10**, 427-437.

Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current. Op. Plant Biol.*

Hogland, D. R. and D.I. Arnon (1950). The waterculture method for growing plants without soil. *Calif. Agric Exp Station, Circular*, 347.

Kimura, M., D.B. Rodriguez-Amaya (2003). Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *J. of Agricultural and Food Chem.* **51**, 2603-2607.

Kumar, A., S.K. Singh, S.K. Sharma, S.P.S. Raghava, R. L. Misra (2004) Comparison of seed-derived with micropropagated male-sterile plants of *Tagetes erecta* L. for F₁ hybrid seed production. *J. Hortic.Sci. & Biotech.* **79**, (2) 260-266.

Long, A.R. (2000). Vitamins and Other Nutrients. *En: Official methods of analysis of the association of AOAC international. Published by the Association of Official Analytical Chemists. 17th edition* (Edited by Horwitz, W. chap.45, Method 970.64. p 5-6.

Mohens, C.P., Tian, K.W.Osteryoung, D. DellaPenna (2001) Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant. Mol. Biol.* **45**, 281-293.

Niyogi, K. K., O. Björkman, A. R. Grossman (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl Acad. Sci.* **94**, 14162-14167.

Nour-Eddine, R., Y. Lemoine, (1999) Carotenoids and stress in higher plants and algae, *En: Handbook of plant and crop stress* (Edited by Pessarakli, M.), second edition, pp. 465-482. Marsel Dekker, Inc. New York, USA.

Pirker Katharina F., Thomas G. Reichenauer, Ederlinda C. Pascual, Susanne Kiefer. (2003) Steady state levels of free radicals in tomato fruit exposed to drought in ozone stress in field experiment. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:921-927.

Pogson, B., K.A.McDonald, M. Truong, G. Britton, D.DellaPenna (1996). Arabidopsis carotenoids mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *The Plant Cell* **8**, 1627-1639.

Polyakov N. E., T.V.Leshina., T.A.Konovalova, L. D. Kispert (2001). Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants?. *Free.Rad. Biol. & Med.* **31**,3: 398-404.

Rajendra, K. B., N. K. Choudhury (2003). High irradiance-induced changes in carotenoid composition and increase in non-photochemical quenching of Chl a fluorescent in primary wheat leaves. *J. of Plant Physiol.*; **160**, 1141-1146.

Rao,C.C., N.K.,Dadlani, S.R. Voleti (2002).Timing of reproduction, flower and seed yield in marigold species(*Tagetes erecta* L. and *T. patula* L.) as influenced by different sowing dates. *J. of Plant Biol.* **29**,2,133-136.

Ruban, A. V., P. Horton (1999). The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach. *Plant Physiol.* **119**, 531-542.

Schansker Gert & Jack J.S. van Rensen (1999). Performance of active Photosystem II centers in photoinhibited pea leaves. *Photosyn. Res.* **62**, 175-184.

Serrato, C. M. A. (2004). Cempoalxóchitl y Días de Muertos. *Arqueología Mexicana* XII 68: 70-73.

Siems W.G., O.Sommerburg, F.J.G.M. van Kuijk. (1999) Lycopene and β -carotene decompose more rapidly than lutein and zeaxanthin upon exposure to various pro-oxidants *in vitro*. *BioFactors*. **10**, 105-113.

Sreekala,C., S.P.S Raghava (2003) Exploitation of heterosis for carotenoid content in African marigold (*Tagetes erecta* L.) and its correlation with esterase polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* **106**, 771-776.

Styring S., C. Jergerschöld (1994). Light-induced reaction impairing electron transfer through photosystem II, en N.R. Baker, J.R. Bowyer. *Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanism to the field*. Oxford, U.K. BIOS. 51-74.

Sun, W.H., A.S. Verhoeven, R.C. Bugos., H.Y.Yamamoto (2001) Suppression of zeaxanthin formation does not reduce photosynthesis and growth of transgenic tobacco under field condition. *Photosyn. Res.* **67**, 41-50.

Teicher, B. H., B. L. Moller, H. V.Scheller (2000) Photoinhibition of photosystem I in field-grown barley (*Hordeum vulgare* L.): Induction, recovery and acclimation. *Photosyn. Res.* **64**, 53-61.

Yamamoto Harry Y., R. C. Bugos and David Hieber (1999). Biochemistry and molecular biology of the xanthophyll cycle. *En: The Photochemistry of Carotenoids* (Edited by Frank Harry A, Andrew J. Young, George Britton and Richard J. Cogdell). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. ISBN 0-7923-5942-9 293-303.

Young, A., G. Britton (1990) Carotenoids and Stress. *En: Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanism* (Edited by Alscher, R.G, J. R. Cumming), 87-112. Wiley-Liss, Winston-Salem, North Carolina,, USA.

Zapozhnikov D.I., T.A. Kyzovskaya, A.N. Maevskaya (1957). Change in the interrelationship of the basis carotenoids of the plastids of green leaves under the action of light. *Dokl Akad Nauk. USSR* 113 74-76.

12 ANEXO

ESPECTROSCOPIA RAMAN: HERRAMIENTA RÁPIDA Y NO INVASIVA PARA DETERMINAR CAROTENOIDES EN INFLORESCENCIAS DE *Tagetes erecta* L.

RAMAN SPECTROSCOPY: A RAPID, NON-INVASIVE TOOL FOR DETERMINING CAROTENOIDS IN INFLORESCENCES OF *Tagetes erecta* L.

ESPECTROSCOPIA RAMAN: HERRAMIENTA RÁPIDA Y NO INVASIVA PARA DETERMINAR CAROTENOIDES EN INFLORESCENCIAS DE *Tagetes erecta* L.

RAMAN SPECTROSCOPY: A RAPID, NON-INVASIVE TOOL FOR DETERMINING CAROTENOIDS IN INFLORESCENCES OF *Tagetes erecta* L.

J. Luis Sánchez-Millán^{1,2}, Miguel A. Serrato-Cruz³, Alma A. Del Villar-Martínez⁴, Pablo E. Venegas-Espinosa⁴, Silvia Evangelista-Lozano⁴, Antonio Jiménez-Aparicio⁴, Adrián G. Quintero-Gutiérrez⁴ y Federico A. García-Jiménez¹

¹Instituto de Química-UNAM. Circuito exterior s/n. Ciudad Universitaria. 04510. México D.F. (jlsan@correo.unam.mx). ²Cátedra de Mejoramiento de Plantas Comestibles. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan. k 2.5. ³Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. ⁴Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN. Carretera Yauatepec-Jojutla km 8.5. colonia San Isidro. 62731. Yauatepec, Morelos.

RESUMEN

La determinación de carotenoides en *Tagetes erecta* L. es fundamental en la investigación de esta planta con fines industriales, con la finalidad de obtener variedades con alto contenido de carotenoides en la inflorescencia de esta especie, pero el análisis químico clásico no es rápido y sí costoso. Utilizando inflorescencias de cuatro variedades de *T. erecta* L.: blanco, crema, amarillo y anaranjado, se aplicaron los métodos de espectroscopía RAMAN a lígulas frescas (LF) y a harina de lígulas (HL), y de análisis químico para determinar concentración de xantofilas totales a lígulas secas. Con el primer método se registraron 4.93082, 8.78653, 17.9756, 53.40643 (LF) y 42.84, 53.52, 219 y 467.65 (HL) de intensidad adimensional en la banda de 1524 cm⁻¹ de RAMAN. Con el segundo método los registros de concentración de xantofilas totales en HL fueron 0.40678, 1.03446, 3.46356 y 8.15977 g kg⁻¹. El orden de los valores corresponde a los colores blanco, crema, amarillo y anaranjado, relación verificada mediante modelos exponenciales. Relacionando los valores de RAMAN y de xantofilas totales en muestras de harinas mediante modelos exponenciales se encontró correlación lineal (R=0.97) entre resultados de ambos métodos de determinación cuantitativa de carotenoides, lo cual favorece el empleo de la técnica RAMAN por su rapidez y bajo costo.

Palabras clave: *Tagetes erecta* L., inflorescencias carotenoides, espectroscopía RAMAN.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentran en diversos sistemas, de bacterias a plantas. Estas moléculas presentan 40 átomos de carbono con anillos de seis miembros en los extremos y un esqueleto central con dobles enlaces conjugados, lo cual da a los carotenoides sus propiedades

ABSTRACT

Determination of carotenoids in *Tagetes erecta* L. is basic in researching this plant for industrial purposes, with the aim of obtaining varieties with high-carotenoid content in the inflorescences. The classic chemical analysis, however, is slow and costly. Using inflorescences of four *T. erecta* L. varieties: white, cream-colored, yellow and orange, RAMAN spectroscopy was applied to fresh ligules (LF) and to ligule powder (HL), while chemical analysis was performed on dry ligules to determine the total xanthophyll concentration. With the first method, adimensional intensity of 4.93082, 8.78653, 17.9756, 53.40643 (LF) and 42.84, 53.52, 219 and 467.65 (HL) was recorded in the RAMAN 1524 cm⁻¹ band. With the second method, the total concentrations of xanthophylls in HL were 0.40678, 1.03446, 3.46356 and 8.15977 g kg⁻¹. The order of the values corresponds to the white, cream-colored, yellow and orange varieties; the relationship was verified with exponential models. By relating the RAMAN values with total xanthophylls in the powder samples by exponential models, a linear correlation (R=0.97) was found between the results of the two methods of quantitative determination of carotenoids, making the use of RAMAN favorable as a rapid and inexpensive technique.

Key words: *Tagetes erecta* L., inflorescence, carotenoids, RAMAN spectroscopy.

INTRODUCTION

Carotenoids are isoprenoid compounds, widely distributed in nature and found in diverse systems, from bacteria to plants. These molecules have 40 carbon atoms with six-member rings on the outer extremes and a central skeleton with conjugated double bonds, which give carotenoids its chromogenic properties. These pigments are part of the photosynthetic system and are important coadjuncts of this process. Carotenoids also have other functions in plant physiology: they participate in the capture of

Recibido: Septiembre, 2006. Aprobado: Septiembre, 2007.
Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 863-871. 2007.

cromogénicas. Estos pigmentos son parte del sistema fotosintético y son coadyuvantes muy importantes en este proceso. Los carotenoides también tienen otras funciones en la fisiología de las plantas: participan en la captura de radicales libres y disipan el exceso de energía luminosa (Hirschberg, 2001).

Los carotenoides son importantes en la salud humana, pues son anticancerígenos y constituyentes del sistema macular. Además, son materia prima para industrias como la farmacológica, avícola, piscícola y cosmetológica (Hadden *et al.*, 1999; Kimura y Rodríguez - Amaya, 2003; Bosma *et al.*, 2003).

Las inflorescencias de sempoalxóchitl (*Tagetes erecta* L.) son fuente importante de xantofilas (Sreekala and Raghava, 2003; Kumar *et al.*, 2004). Para aumentar el rendimiento del peso de inflorescencias y el contenido de xantofilas se ha estudiado la nutrición vegetal, densidad de plantación, control de plagas, control de patógenos, control de maleza, sistemas de riego y mejoramiento genético (Rao *et al.*, 2002; Sreekala y Raghava, 2003; Kumar *et al.*, 2004).

En la caracterización de poblaciones de *T. erecta* se analiza un gran número de muestras para identificar materiales sobresalientes (Bosma *et al.*, 2003) que reúnan características de rendimiento y calidad de pigmentos de la inflorescencia. En este proceso es importante cuantificar el contenido de carotenoides en los progenitores que darán origen a variedades e híbridos. Así, es básico usar métodos para cuantificar carotenoides en campo donde se inicia el programa de mejoramiento.

En la mayoría de los métodos para cuantificar carotenoides se usan disolventes orgánicos para la extracción y, en algunos casos, materiales cáusticos para saponificar; además el equipo de laboratorio puede ser delicado y caro, por ejemplo cromatografía de alta eficiencia, y al menos 1 h por muestra (Hadden *et al.*, 1999; Long, 2000; Kimura y Rodríguez-Amaya, 2003). Por tanto, es recomendable de *T. erecta* métodos rápidos y baratos para determinar concentración de carotenoides en inflorescencias, y que se puedan usar fácilmente en campo y en laboratorio.

El método RAMAN es una técnica rápida y no destructiva que puede usarse *in vivo* e *in situ* para determinar del contenido de carotenoides en tejidos vivos de humanos y de animales, por ejemplo, en la mácula del ojo (Bernstein *et al.*, 2004) o en la piel humana (Hata *et al.*, 2000), así como el contenido de astaxantina y cantaxantina en músculo de salmón (*Salmo salar* L.) (Wold *et al.*, 2004). La espectroscopía RAMAN se fundamenta en la irradiación de una molécula a una longitud de onda determinada y la observación de la energía emitida por aquella a una longitud de onda mayor de acuerdo con un espectro de emisión característico de dicha molécula, el cual se observa en

free radicals and dissipate excess luminous energy (Hirschberg, 2001).

Carotenoids are important in human health; they help to prevent cancer and constitute part of the macular system. Also, they are raw material for pharmaceutical, broiler chicken, pisciculture, and cosmetology industries (Hadden *et al.*, 1999; Kimura and Rodríguez-Amaya, 2003; Bosma *et al.*, 2003).

Tagetes erecta L. inflorescences are an important source of xanthophylls (Sreekala and Raghava, 2003; Kumar *et al.*, 2004). To increase yield in weight of the inflorescences and in xanthophyll content, studies on plant nutrition, pathogen control, weed control, irrigation systems and breeding have been conducted (Rao *et al.*, 2002; Sreekala and Raghava, 2003; Kumar *et al.*, 2004).

In the characterization of *T. erecta* populations, a large number of samples are analyzed to identify outstanding materials (Bosma *et al.*, 2003) in which the inflorescence traits of yield and pigment quality converge. In this process it is important to quantify the content of carotenoids in the progenitors that will give rise to varieties and hybrids. Thus, it is of fundamental importance to quantify carotenoids in the field where breeding programs begin.

In most of the quantifying methods, organic solvents are used to extract carotenoids and, in some cases, caustic materials are used to saponify. Also, laboratory equipment can be fragile and expensive, for example, high resolution chromatography, and take at least 1 h per sample (Hadden *et al.*, 1999; Long, 2000; Kimura and Rodríguez-Amaya, 2003). Therefore, methods to determine carotenoid concentration in *T. erecta* inflorescences should be fast, inexpensive and easily used in the field and laboratory.

The RAMAN method is a fast, non-destructive technique that can be used *in vivo* and *in situ* to determine carotenoid content in live human and animal tissues, for example, in the eye macule (Bernstein *et al.*, 2004) or on human skin (Hata *et al.*, 2000) as well as astaxanthin and cantaxanthin content in salmon muscle (*Salmo salar* L.) (Wold *et al.*, 2004). RAMAN spectroscopy is founded on irradiating a molecule with a determined wavelength and the observation of the emitted energy by the molecule at a longer wavelength, in accordance with emission spectrum characteristic of that molecule, which is observed in the infrared region (666 cm^{-1} to 3500 cm^{-1}) (Ferraro and Nakamoto, 1994).

This technique has been used in studies of distribution and concentration of carotenoids in plant leaves and fruits (Schulz *et al.*, 2005; Baranski *et al.*, 2005; Baranska *et al.*, 2006a). However, Bhosale *et al.* (2004) obtained controversial data of measurements of lycopene in tomato cuticle since its thickness affected

la región del infrarrojo (666 cm^{-1} a 3500 cm^{-1}) (Ferraro y Nakamoto, 1994).

En plantas, esta técnica se ha usado en estudios sobre la distribución y concentración de carotenoides en hojas y en frutos (Schulz *et al.*, 2005; Baranski *et al.*, 2005; Baranska *et al.*, 2006a). Pero Bhosale *et al.* (2004) obtuvieron datos controversiales en las mediciones de licopeno en la cutícula de jitomate, pues su grosor afectó la penetración del láser del equipo RAMAN. No se encontraron trabajos donde se utilice el método RAMAN para cuantificar de carotenoides en lígulas y harinas de inflorescencias de *T. erecta*, y sólo en forma exploratoria en otras especies (Schulz *et al.*, 2005). Considerando una frecuencia de irradiación necesaria para excitar a las moléculas de carotenoides, el objetivo de este trabajo fue determinar si la espectroscopía RAMAN puede ser una herramienta útil, por rapidez y bajo costo, para medir el contenido de carotenoides en lígulas frescas y harina de *T. erecta*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se usaron cuatro variedades experimentales de *T. erecta* proporcionadas por el Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Estas variedades (inflorescencias básicas) eran de color blanco, crema, amarillo, anaranjado (Figura 1). Este material biológico corresponde a una generación avanzada seleccionada para porte bajo, que se estableció como plántulas en macetas (6 pulgadas) con mezcla de sustrato: tierra de hoja (50%), turba canadiense (30%) y agrolita (20%) y fertilización con el producto comercial Peters 20-10-20 (1 g L^{-1}) dos veces por semana. El trasplante a macetas en invernadero de cristal se efectuó en enero de 2006 y la floración duró de abril a junio de ese año. Además de las inflorescencias básicas, usadas como puntos de referencia para la concentración de carotenoides (en especial las variedades blanco y anaranjado), se incluyeron 10 muestras de plantas con inflorescencias intermedias respecto de las inflorescencias básicas, que corresponden a germoplasma mexicano establecido en Chapingo, México, en 2006.

Análisis RAMAN

De cada una de las cuatro variedades básicas se tomaron al azar cinco lígulas frescas de diferentes partes de una inflorescencia y se colocaron en un equipo RAMAN (Perkin Elmer Limited, System 2000, NIR FT-RAMAN, Inglaterra), con el lado más colorido en dirección al láser del RAMAN. También se prepararon muestras de harina de lígulas (HL) (lígulas de inflorescencias deshidratadas y maceradas hasta atravesar malla # 40) de cinco inflorescencias de cada planta de las inflorescencias básicas. Se hicieron 32 lecturas en cada muestra con el equipo RAMAN (láser de criptón a 1000 mW).

penetration of the RAMAN laser equipment. No work has been found where carotenoids in ligules and powder made from *T. erecta* inflorescences were quantified using RAMAN methodology; some have explored its use in other plant species (Schulz *et al.*, 2005). Considering an irradiation frequency necessary to excite carotenoid molecules, the objective of this study was to determine whether RAMAN spectroscopy can be useful, because of its speed and low cost, to measure the carotenoid content in fresh ligules and powder of *T. erecta*.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Four experimental varieties of *T. erecta* used were provided by Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. These varieties (basic inflorescences) were white, cream-colored, yellow, and orange (Figure 1). This biological material corresponds to the advanced generation selected for its low stature. The plants were transplanted as seedlings into pots (6 inches) with a mixed substrate: peat moss (50%), Canadian peat (30%) and Agrolite (20%); plants were fertilized with the commercial product Peters 20-10-20 (1 g L^{-1}) twice a week. Transplant was performed in January 2006 in a glass greenhouse and flowering lasted from April to June of that year. Besides the basic inflorescences used as reference points for carotenoid concentration (especially the white and orange varieties), 10 samples of plants with intermediate colored inflorescences with respect to the basic inflorescences were included, corresponding to Mexican germplasm established in Chapingo, Mexico, in 2006.

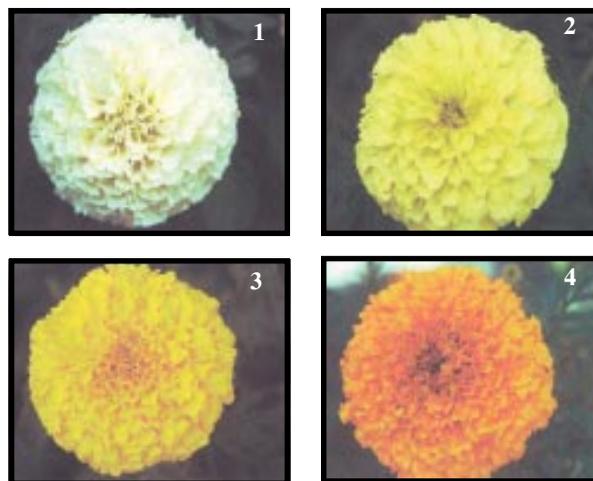


Figura 1. Inflorescencias de variedades experimentales de *T. erecta* con gradiente de color: 1, blanco; 2, crema; 3, amarillo; 4, anaranjado, utilizadas en este trabajo.

Figure 1. Inflorescences of the *T. erecta* experimental varieties with differing degrees of color: 1, white; 2, cream; 3, yellow; 4, orange, used in this study.

Los espectros fueron registrados y graficados cerca de la señal de 1524 cm^{-1} (Baranski *et al.*, 2005), dado que esta señal está relacionada con movimientos de encogimiento y relajación de enlaces del tipo del esqueleto central de la molécula de los carotenoides (Boshale *et al.*, 2004; Baranski *et al.*, 2005). Todos los espectros se midieron con una resolución de 1 cm , desde 100 a 3500 cm^{-1} .

Análisis químico

En las muestras de HL se determinó la concentración de xantofilas. Cada muestra correspondiente a cada variedad o plantas, se separó en cuatro submuestras que se sometieron al mismo tratamiento para determinar el contenido total de xantofilas. Se usó la técnica de la AOAC (Long, 2000) con la siguiente modificación: se pesaron 50 mg de HL y se colocaron en matraces Erlenmeyer, se agregó de una mezcla de hexano, etanol, acetona y tolueno (HEAT), proporción 10:6:7:7 (v/v/v/v) y se agitó por 1 min . El matraz se conectó a un condensador en reflujo en un baño de agua a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 min y se enfrió a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se reajustó el nivel de HEAT y se añadió 2 mL de potasa metanólica al 40% , se agitó por 1 min y se reconectó al condensador por 20 min . Se enfrió la solución como ya indicó, se añadieron 30 mL de hexano, la mezcla se transfirió a un matraz volumétrico (100 mL), se aforó con sulfato de sodio (10% en agua), y se agitó por 1 min . Esta mezcla se transfirió a un embudo de separación por 1 h en oscuridad y se recolectó la fase superior. Cada una de las submuestras así extraídas se procesó en un espectrofotómetro (UV-3101-PC-SHIMADZU, Japón) con una lectura por submuestra para determinar la concentración de carotenoides y se usó la ecuación de Lambert-Beer (Silverstein, 1974b).

En cada muestra se determinó la concentración de carotenoides con la técnica cuantitativa descrita y se correlacionó con su respectiva señal RAMAN. Se incluyeron las 10 muestras de harinas (analizadas mediante ambos métodos) de las inflorescencias intermedias. Se determinaron de promedios, desviación estándar, regresión lineal y correlación, y se aplicaron modelos matemáticos de tipo crecimiento exponencial. Para lo anterior se usó el programa de cómputo OriginPro versión 7 (Origin Company, 2006).

RESULTADOS

Las señales RAMAN de lígulas frescas (LF) y de HL incrementaron en intensidad en la banda de 1524 cm^{-1} de acuerdo con el color de las inflorescencias, que resulta en un incremento de anaranjado de las muestras (Figuras 2 y 3). Por ejemplo, las intensidades 4.93082 , 8.78653 , 17.9756 , 53.40643 (LF) (banda 1524 cm^{-1} RAMAN; Figura 3) corresponden con los colores blanco, crema, amarillo y anaranjado.

Los resultados RAMAN de lígulas frescas tuvieron buen ajuste con un modelo exponencial de crecimiento:

$$y = A_1 e^{(x/t_1)} + y_0; A_1 = 0.40449; t_1 = 0.83247; y_0 = 3.76434; R = 0.99 \text{ (Figura 2).}$$

RAMAN analysis

Five fresh ligules were taken randomly from different parts of one inflorescence of each of the four basic varieties and placed in the RAMAN equipment (Perkin Elmer Limited, System 2000, NIR FT-RAMAN, England), with the RAMAN laser directed toward the most colorful side. Besides, samples of ligule powder (HL) (made from dehydrated inflorescence ligules macerated until the powder passed through a #40 mesh), from five inflorescences of each of the basic inflorescence plants. With the RAMAN equipment (krypton laser at 1000 mW) 32 readings were taken of each sample. Spectra were recorded and graphed near the 1524 cm^{-1} signal (Baranski *et al.*, 2005), since this signal is related to movements of contraction and relaxation of the bonds of central skeleton of the carotenoid molecules (Boshale *et al.*, 2004; Baranski *et al.*, 2005). All of the spectra were measured with a resolution of 1 cm , from 100 to 3500 cm^{-1} .

Chemical analysis

Xanthophyll concentrations were determined in HL samples. Each sample, corresponding to each variety or plant, was separated into four sub-samples that were subjected to the same treatment to determine the total content of xanthophylls. The AOAC technique (Long, 2000) was used with the following modification: 50 mg HL was weighed and placed in Erlenmeyer flasks; a mixture of hexane, ethanol, acetone, and toluene (HEAT) was added in the proportion 10:6:7:7 (v/v/v/v) and shaken for 1 min . The flask was connected to a reflux condenser in a water bath at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 min and cooled to $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The level of HEAT was re-adjusted, and 2 mL of 40% methanol potash was added; the mixture was shaken for 1 min and re-connected to the condenser for 20 min . The solution was cooled, as indicated above, and 30 mL of hexane was added. The mixture was transferred to a graduated beaker (100 mL), gauged with sodium sulfate (10% in water), and shaken for 1 min . This mixture was transferred to a separation funnel for 1 h in darkness and the upper phase was collected. Each of the sub-samples extracted in this manner was processed in a spectrophotometer (UV-3101-PC-SHIMADZU, Japan) and a reading of each sub-sample was taken to determine carotenoid concentration, using the Lambert-Beer equation (Silverstein, 1974b).

Carotenoid concentration was determined in each sample with the quantitative technique described above and values were correlated with the respective RAMAN signal. Ten samples of powder made from intermediate inflorescences were included (analyzed with both methods). Averages, standard deviation, linear regression and correlation were calculated and exponential-growth-type mathematical models were applied. The computer software OriginPro version 7 (Origin Company, 2006) was used for this analysis.

RESULTS

RAMAN signals from fresh ligules (LF) and from ligule powder (HL) increased in intensity in

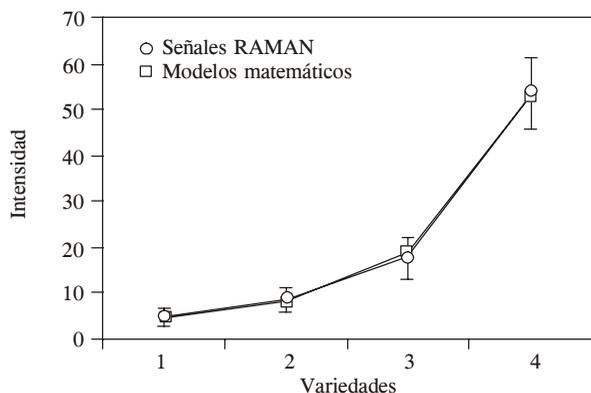


Figura 2. Señales RAMAN (1524 cm^{-1}) de lígulas frescas de *T. erecta*.

Figure 2. RAMAN signals (1524 cm^{-1}) from fresh *T. erecta* ligules.

Las señales RAMAN de las muestras HL (42.84-blanco, 53.52-crema, 219-amarillo y 467.65-anaranjado) también presentaron buen ajuste pero con un modelo de crecimiento exponencial: $y=y_0+A_1e^{((x-x_0)/t_1)}+A_2e^{((x-x_0)/t_2)}$; con los estimadores siguientes: $y_0=-23.07235$; $A_1=6.73407$; $x_0=0.20714$; $t_1=4.3651\times 10^{118}$; $A_2=23.43323$; $t^2=1.25005$ y $R=0.99$ (Figura 3).

El contenido total de xantofilas en HT aumentó (0.40678 , 1.03446 , 3.46356 y 8.15977 g kg^{-1}) con el color de las lígulas de las variedades básicas, mostrando crecimiento exponencial descrito por el modelo:

$$y=A_1e^{(x/t_1)}+y_0; A_1=0.31926; t_1=1.21426; y_0=-0.42576 \text{ y } R=0.99 \text{ (Figura 4).}$$

El comportamiento de las señales RAMAN de lígulas deshidratadas y la respectiva concentración de xantofilas totales presentaron valores altos en función del color de las inflorescencias de las variedades experimentales (Figura 5). Después de observar la alta correlación entre la concentración de xantofilas y sus respectivas señales RAMAN de las variedades básicas, se adicionaron las concentraciones de xantofilas y señales RAMAN de las variedades intermedias para aumentar el número de puntos a 14 y establecer una ecuación de correlación, entre concentración de xantofilas y señal RAMAN, con el modelo lineal siguiente: $y=a+bx$; con los siguientes estimadores: $a=0.62368$, $b=0.01568$ y $R=0.98$ (Figura 6). Es decir, hubo correlación lineal entre la intensidad de las señales RAMAN (emisividad) y la concentración de xantofilas.

DISCUSIÓN

La determinación de carotenoides en plantas mediante la técnica RAMAN se ha logrado con señales

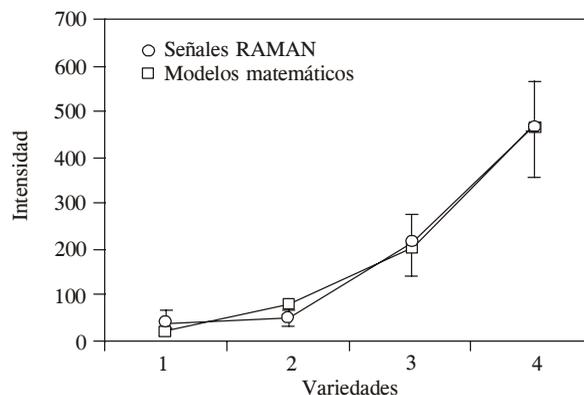


Figura 3. Señales RAMAN (1524 cm^{-1}) de harina de lígulas de *T. erecta*.

Figure 3. RAMAN signals (1524 cm^{-1}) from *T. erecta* ligule powder.

the 1524 cm^{-1} band, according to the color of the inflorescences, which resulted in an increase of orange in the samples (Figures 2 and 3). For example, intensities of 4.93082, 8.78653, 17.9756, 53.40643 (LF) (RAMAN 1524 cm^{-1} band; Figure 3) correspond to the colors white, cream, yellow and orange.

The RAMAN results of fresh ligules fit well with an exponential growth model:

$$y=A_1e^{(x/t_1)}+y_0; A_1=0.40449; t_1=0.83247; y_0=3.76434; R=0.99 \text{ (Figure 2).}$$

The RAMAN signals of the HL samples (42.84-white, 53.52-cream, 219-yellow and 467.65-orange) also fit well, but with an exponential growth model: $y=y_0+A_1e^{((x-x_0)/t_1)}+A_2e^{((x-x_0)/t_2)}$; with the estimators $y_0=-23.07235$; $A_1=6.73407$; $x_0=0.20714$; $t_1=4.3651\times 10^{118}$; $A_2=23.43323$; $t^2=1.25005$ y $R=0.99$ (Figure 3).

The total content of xanthophylls in HT increased (0.40678 , 1.03446 , 3.46356 and 8.15977 g kg^{-1}) with the ligule color of the basic varieties, exhibiting exponential growth described by the model:

$$y=A_1e^{(x/t_1)}+y_0; A_1=0.31926, t_1=1.21426, y_0=-0.42576 \text{ and } R=0.99 \text{ (Figure 4).}$$

The behavior of the RAMAN signals of dehydrated ligules and the respective total concentrations of xanthophylls have high values in function of the color of the inflorescences of the experimental varieties (Figure 5). After observing the high correlation between xanthophylls concentration and their respective RAMAN signals of the basic varieties, concentrations of xanthophylls and RAMAN signals were added to increase the number of points to 14 and to establish a correlation equation between xanthophyll concentration

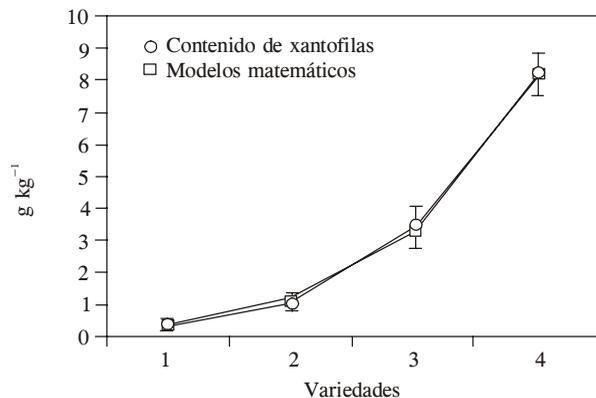


Figura 4. Contenido total de xantofilas en harina de lígulas de *T. erecta*.

Figure 4. Total xanthophyll content in *T. erecta* ligule powder.

ubicadas entre las bandas de 1400 y 1600 cm^{-1} , ya que en estos valores se han detectado los movimientos de encogimiento y estiramiento entre enlaces dobles carbono-carbono del esqueleto central de los carotenoides (Withnall, 2003). En el presente trabajo, la detección de xantofilas en inflorescencias frescas o secas de *T. erecta* se hizo en la banda de 1524 cm^{-1} , conformando así el primer antecedente para ese tipo de tejidos y especie. Este resultado está muy cercano a los valores reportados por Baranska *et al.* (2005) quienes determinaron señales RAMAN de 1520 y 1156 cm^{-1} para α -carotenos (p. e. luteína) y β -carotenos (en raíces de zanahoria). Al respecto, se ha establecido una correlación negativa aceptable entre el número de dobles enlaces en el esqueleto central de los carotenoides y las bandas de señales RAMAN, es decir, a mayor número de enlaces dobles conjugados las señales RAMAN presentan un valor menor en cm^{-1} (Withnall, 2003). Así mismo, los modelos matemáticos de ajuste exponencial definidos para las muestras, frescas o secas, analizadas mediante RAMAN, también constituyen las primeras referencias para trabajos posteriores, ya que en el presente estudio se encontró un aumento en la intensidad de las señales RAMAN en proporción directa a la concentración de carotenoides en las muestras de *T. erecta*. Al respecto, es importante indicar que las mediciones en RAMAN se hicieron a 1 Watt de potencia del láser, pues la intensidad de las señales puede variar respecto a la potencia usada.

Los diferentes modelos y parámetros encontrados para las dos clases de muestras es un resultado que, previo a este trabajo, no se había comunicado. Se propone que tales diferencias posiblemente se relacionen con las características fisicoquímicas de los tejidos y esto quizá afecte la penetración del haz de luz del equipo RAMAN, como Boshale *et al.* (2004) lo reportaron en cutícula de jitomate.

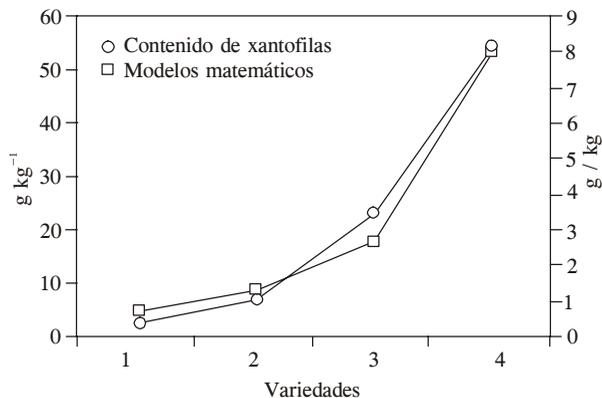


Figura 5. Comportamiento de señales RAMAN (1524 cm^{-1}) de lígulas deshidratadas de *T. erecta* y la respectiva concentración de xantofilas.

Figure 5. Behavior of RAMAN signals (1524 cm^{-1}) from dehydrated *T. erecta* ligules and their respective concentrations of xanthophylls.

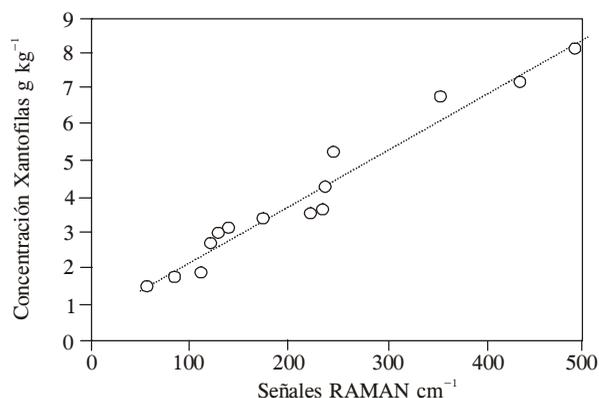


Figura 6. Correlación entre concentración de xantofilas y señales RAMAN de lígulas deshidratadas de *T. erecta*.

Figure 6. Correlation between xanthophyll concentration and RAMAN signals from dehydrated *T. erecta* ligules.

and RAMAN signal with the following linear model: $y=a+bx$, with the following estimators: $a=0.62368$, $b=0.01568$ and $R=0.98$ (Figure 6). That is, there was a linear correlation between RAMAN signal intensity (emissivity) and xanthophylls concentration.

DISCUSSION

Determination of carotenoids in plants using the RAMAN technique has been achieved with signals located between the 1400 and 1600 cm^{-1} bands since in this range of values contraction and stretching movements have been detected between double carbon-carbon bonds of the central skeleton of the carotenoids (Withnall, 2003). In our study, detection of xanthophylls in fresh or dried inflorescences of *T. erecta* was accomplished in the 1524 cm^{-1} band, making this the

La relación proporcional entre las señales RAMAN, así como la concentración de xantofilas totales con el color de las inflorescencias, sugiere que colores anaranjados en un gradiente de amarillo a anaranjado pueden contener más carotenoides. Esto se confirma con el trabajo de Reddy *et al.* (2005) pero aplicando métodos químicos para determinar xantofilas en inflorescencias de *T. erecta*. Lo anterior implica la alta correlación entre la señal RAMAN y la concentración de los pigmentos y su aplicación para una correlación positiva.

Los modelos exponenciales correspondientes a los resultados de espectroscopía y espectrofotometría de las muestras de inflorescencias con gradiente de color, se relacionan directamente con la Ley de Lambert-Beer: $\log(I_0/I) = kcb = A$; donde, I_0 = intensidad de luz incidente, I = la intensidad de la luz después de atravesar un medio absorbente, A = absorbancia (en espectroscopía RAMAN sería emisividad) que es una función de la concentración del soluto (c) y de la longitud de la celda (b) (Silverstein, 1974). Por tanto, esta ley se puede aplicar a determinaciones analíticas cuantitativas, como se hizo en este estudio.

La alta correlación ($R = 0.97$) entre las señales de espectroscopía RAMAN y las concentraciones de xantofilas determinadas por espectrofotometría obtenidos en este trabajo supera recientes registros de correlación ($R = 0.89-0.91$) entre métodos RAMAN y químicos, aplicados para determinar concentración de carotenoides en jitomate (Baranska *et al.*, 2006b). Lo anterior sustenta el uso de la técnica espectroscópica en investigación de *T. erecta* para medir el contenido total de xantofilas en lígulas frescas y en lígulas deshidratadas, donde es necesario analizar numerosas muestras (e. g. más de 100 inflorescencias) en forma rápida, no invasiva y barata. Esta técnica no requiere disolventes orgánicos ni costoso equipo de laboratorio; sólo se requiere una estufa para deshidratar lígulas y el equipo RAMAN. Cada muestra se analiza en 2 a 3 min, mientras que el método químico para contenido de xantofilas totales necesita lo menos 1 h por muestra (Long, 2000). Esta técnica evita pero no sustituye, el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o espectroscopía UV-VIS, pues es recomendable establecer muestras estándar que se usan en ajustes al método RAMAN. Hay equipos RAMAN portátiles que se pueden usar en campo, lo que permite analizar *in situ* e *in vivo* cantidades masivas de muestras de inflorescencias de *T. erecta*. Los precios de estos equipos dependen de las características de portátiles y de precisión, pero un equipo semi-portátil puede costar aproximadamente de \$200 000 M.N., que puede ser mayor al de un espectrofotómetro, pero se debe añadir el costo de reactivos y material de laboratorio

first precedent for this type of tissue and species. This result is similar to that reported by Baranska *et al.* (2005) who determined RAMAN signals of 1520 and 1156 cm^{-1} for α -carotenes (for example, lutein) and β -carotenes (in carrot roots). In this respect, an acceptable negative correlation has been established between the number of double bonds in the central skeleton of carotenoids and the RAMAN signal bands, that is, the larger the number of conjugated double bonds, the lower the value of RAMAN signals cm^{-1} (Withnall, 2003). Also, the mathematical models of exponential fit defined for the fresh or dried samples analyzed with RAMAN also constituted one of the first references for future studies, since in our study there was an increase in the intensity of RAMAN signals in direct proportion to the carotenoid concentrations in the *T. erecta* samples. In this respect, it is important to indicate that measurements in RAMAN were performed at 1 Watt laser power since signal intensity can vary depending on the power used.

The different models and parameters found for the two types of samples is a result that has not been communicated previous to our study. It is proposed that these differences are possibly related to the physicochemical characteristics of the tissues and this may affect the penetration of the light beam from the RAMAN equipment, as Boshale *et al.* (2004) reported for tomato cuticle.

The relationship of the RAMAN signals, as well as the concentration of total xanthophylls, to inflorescence color suggests that orange colors in a gradient between yellow and orange contain more carotenoids. This is confirmed with the work of Reddy *et al.* (2005), who applied chemical methods to determine xanthophylls in *T. erecta* inflorescences. This implies a high correlation between RAMAN signals and pigment concentration and, thus its application in a positive correlation.

The exponential models corresponding to the results from spectrometry and RAMAN spectroscopy for samples of inflorescences with varying degrees of color are related directly to the Lambert-Beer Law: $\log(I_0/I) = kcb = A$; where I_0 = incident light intensity, I = light intensity after crossing through an absorbent medium, A = absorbance (emissivity, in the case of RAMAN spectroscopy), which is a function of the concentration of the solute (c) and of cell length (b) (Silverstein, 1974). Therefore, this Law can be applied to quantitative analytical determinations, as was done in our study.

The high correlation ($R = 0.97$) between the RAMAN spectroscopy signals and xanthophyll concentrations determined by spectrophotometry obtained in our study surpass recent reports of correlation ($R = 0.890-0.91$) between RAMAN and

y entrenamiento del personal. Por tanto, los equipos RAMAN aplicados a cuantificación de carotenoides pueden ser mas baratos (Taylor, 2006).

En la literatura se encontraron pocos trabajos de aplicación de la técnica RAMAN en plantas y algunos de ellos son cualitativo (Baranski *et al.*, 2005). Así, el uso de RAMAN a inflorescencias de *T. erecta*, para determinar la concentración de carotenoides es novedoso, aunque es una técnica conocida desde hace tiempo. Es importante señalar que para fines prácticos sólo se recomienda usar valores de concentración de xantofilas en el intervalo reportado en este trabajo. En otros estudios se deberá medir muestras con concentraciones superiores de xantofilas ($> 10 \text{ g kg}^{-1}$).

CONCLUSIONES

La correlación lineal encontrada entre los resultados de espectroscopía RAMAN con los de espectrofotometría de xantofilas totales utilizando lígulas frescas y harina de lígulas de inflorescencias de *T. erecta*, posibilita el empleo de la espectroscopía RAMAN para determinar carotenoides en esta especie, en forma rápida y sin usar reactivos químicos.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo es parte de la tesis de doctorado del primer autor, la cual se realizó en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

Se agradece infinitamente al Instituto de Química, UNAM, por la facilidades para realizar este trabajo.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al primer autor, registro: 144636.

LITERATURA CITADA

- Baranska, M., H. Schulz, R. Baranski, and T. Nothnagel. 2005. In situ simultaneous analysis of polyacetylenes, carotenoids and polysaccharides in carrot roots. *J. Agric. Food Chem* 53: 6565-6571.
- Baranska, M., R. Baranski, H. Schulz, and T. Nothnagel. 2006a. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* 224: 1028-1037.
- Baranska, M., W. Shütze, and H. Schulz. 2006b Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR and NIR spectroscopy. *Annal. Chem.* 78: 8456-8461.
- Baranski, R., M. Baranzska, and H. Schulz. 2005. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped *in situ* using NIR-FT RAMAN spectroscopy. *Planta* 222: 448-457.
- Bernstein, P. S., Da-Y. Zhao, M. Sharifzadeh, I. V. Ermakov, and W. Gellermann. 2004. Resonance RAMAN measurement of macular carotenoids in the living human eye. *Arch. Biochem. Biophys.* 430 (2):163-169.
- Bhosale, P., I. V. Ermakov., M. R. Ermakova., W. Gellermann, and P. S. Bernstein. 2004. Resonance RAMAN quantification

chemical methods applied to determination of carotenoid concentrations in tomatoes (Baranska *et al.*, 2006b). These findings support the use of spectroscopy in research on *T. erecta* to measure total content of xanthophylls in fresh and dehydrated ligules, for which is necessary to analyze numerous samples (more than 100 inflorescences), in a rapid, non-destructive, inexpensive manner. The technique does not require organic solvents or costly laboratory equipment; only an oven for dehydrating ligules and RAMAN equipment are required. Each sample is analyzed in 2 to 3 min, while the chemical method requires at least 1 h per sample to measure total xanthophyll content (Long, 2000). This technique avoids, but does not substitute, the use of high-precision liquid chromatography (HPLC) or UV-VIS spectroscopy, which are recommendable for establishing standards to be used in adjusting the RAMAN method. There is portable RAMAN equipment that can be used in the field, allowing analyses *in situ* and *in vivo* of massive quantities of *T. erecta* inflorescence samples. Prices of this equipment depend on its characteristics, whether it is portable and the precision desired, but semi-portable equipment can cost approximately \$200 000 pesos. This may be higher than a spectrophotometer, but the cost of reactivos, laboratory material and personnel training must be added to its cost. Therefore, RAMAN equipment applied to the quantification of carotenoids can be less expensive (Taylor, 2006).

Few studies were found in the literature on the application of the RAMAN technique in plants, and of these some were qualitative (Baranski *et al.*, 2005). Thus the use of RAMAN on *T. erecta* inflorescences to determine carotenoid concentration is novel, although it is a technique that has been known for some time. It is important to point out that, for practical ends, it is recommended that only those values of xanthophyll concentration within the range reported in this study be used. In other studies, samples with concentrations above 10 g xanthophylls per kg must be measured.

CONCLUSIONS

The linear correlation found between the results from RAMAN spectroscopy and those from spectrophotometry for total xanthophylls using fresh ligules and ligule powder of *T. erecta* inflorescences points to the use of RAMAN spectroscopy to determine carotenoids in this species in a rapid manner without use of chemical reactivos.

—End of the English version—



- of nutritionally important carotenoids in fruits, vegetables, and their juices in comparison to high-pressure liquid chromatography analysis. *J. Agric. Food Chem.* 52(11): 3281-3285.
- Bosma, T. L., J. M. Dole, and N. O. Maness. 2003. Optimizing marigold (*Tagetes erecta* L.) petal and pigment yield. *Crop Sci.* 43(6): 2118-2124.
- Ferraro, J. R., and K. Nakamoto. 1994. Basic theory. *In*: Ferraro, J. R., and K. Nakamoto (eds). *Introductory RAMAN Spectroscopy*. Academic Press. San Diego, CA. USA. pp: 1-94.
- Hadden, W. L., R. H. Watkins, L. W. Levy, E. Regalado, D. M. Rivadeneira, R. B. van Breemen, and S. J. Schwartz. 1999. Carotenoid composition of Marigold (*Tagetes erecta*) flowers extract used as nutritional supplement. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 4189-4194.
- Hata, T. R., T. A. Scholz, I. V. Ermakov, R. W. Mclane. F. Khachik, W. Gallermann, and L. K. Pershing. 2000. Non-invasive RAMAN spectroscopic detection of carotenoids in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 115 (3): 441-448.
- Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Op. Plant Biol.* 4:210-218.
- Long, A. R. 2000. Vitamins and other nutrients. *In*: Horwitz, W. (ed). *Official Methods of Analysis of the Association of AOAC International*. Association of Official Analytical Chemists. New Jersey, USA. pp: 5-6.
- Kimura, M., and D. B. Rodríguez-Amaya. 2003. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2603-2607.
- Kumar, A., S. K. Singh, S. K. Sharma, S. P. S. Raghava, and R. L. Misra. 2004. Comparison of seed-derived with micropropagated male-sterile plants of *Tagetes erecta* L. for F1 hybrid seed production. *J. Hort. Sci. Biotech.* 79 (2): 260-266.
- Origin Company. 2006. OriginPro version 7. (www.OriginLab.com). Consultado el 15 de julio del 2006.
- Reddy, K. M., C. C. Rao, G. Padmaja, and P. V. Gound. 2005. Screening of African marigold (*Tagetes erecta* L.) cultivars for flower yield and carotenoid pigments. *Indian J. Hort.* 62:3: 276-279.
- Rao, C. C., N. K. Dadlani, and S. R. Voleti. 2002. Timing of reproduction, flower and seed yield in marigold species (*Tagetes erecta* L. and *T. patula* L.) as influenced by different sowing dates. *J. Plant Biol.* 29:2:133-136.
- Schulz, H., M. Baranska, and R. Baranski. 2005. Potential of NIR-FT-RAMAN spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers* 77(4): 212-221.
- Silverstein, R. M. 1974. Ultraviolet spectrometry. *In*: Silverstein, R. M., and G. C. Bassler (eds). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. pp: 234.
- Sreekala, C., and S. P. S Raghava. 2003. Exploitation of heterosis for carotenoid content in African marigold (*Tagetes erecta* L.) and its correlation with esterase polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 106:771-776.
- Withnall, R., B. Z. Chowdhry, J. S. Howell, G. M. Edwards, and L. F. C. de Oliveira. 2003. RAMAN spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta* 59: 2207-2212.
- Wold J. P., B. J. Marquardt, B. K Dable, D. Robb, and B. Hatlen. 2004. Rapid quantification of carotenoids and fat in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by RAMAN spectroscopy and chemometrics. *Appl. Spectr.* 58(4): 395-403.
- Taylor S.A. de C.V. Proveedor especializado. (www.taylor.com.mx). Consultado en enero de 2007.