

ESTUDIO DEL CONTENIDO DE α Y β CAROTENOS EN SEIS ESPECIES DE ALGAS MARINAS DE LA COSTA ATLANTICA COLOMBIANA

Resumen del Trabajo de Tesis presentado por MARÍA INÉS SILVA y ANTONIO SANABRIA, para optar a los títulos de Químico y Químico Farmacéutico, respectivamente.

Presidentes de Tesis: LUZ STELLA O. DE NIGRINIS, Q. F. y LORENZO PANIZZO D., Q.

INTRODUCCION

El presente trabajo hace parte de un extenso programa de investigación sobre algas marinas, copatrocinado por Colciencias, en lo que se refiere al valor nutritivo de las mismas. Entre los nutrientes presentes en ellas, las vitaminas han sido consideradas de gran importancia y para iniciar su estudio se emprendió la determinación de los carotenos, que son precursores de la vitamina A.

Aunque los carotenos se encuentran en la mayoría de las plantas terrestres, su presencia en las algas marinas tiene mayor interés, debido a que en un solo alimento se pueden suministrar los principales nutrientes (proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos).

El trabajo está encaminado a encontrar un método general que permita la determinación de cada uno de los carotenos y al mejoramiento de todas las etapas involucradas en el proceso, tales como conservación del material, métodos de extracción y separación, y desarrollo de técnicas espectrofotométricas, con el fin de obtener resultados más exactos.

En la parte experimental, inicialmente se ensayaron las técnicas existentes y al no obtener por medio de éstas resultados que cumplieran con los objetivos del trabajo, se variaron algunos parámetros de las mismas, hasta encontrar un método satisfactorio.

En el transcurso del presente estudio fue necesario utilizar la cromatografía en papel, en capa delgada y en columna, pero no se juzgó necesario exponer sus aspectos teóricos por ser ésta una técnica de análisis bastante común entre nosotros, aunque sí se insiste en algunos detalles que generalmente no aparecen descritos y son fundamentales para la obtención de los resultados.

MATERIALES Y METODOS

A) MATERIALES

a) *Algas marinas*

En el presente trabajo se estudiaron algas pertenecientes a dos divisiones: algas verdes o clorofíceas y algas rojas o rodofíceas.

1. *Recolección.*

Las algas fueron recolectadas manualmente en bolsas de polietileno de color negro, luego refrigeradas en recipientes de espuma de Icopor con hielo y de esta manera transportadas a los Laboratorios de la Facultad, en un periodo de tiempo no superior a 48 horas después de su recolección. Tan pronto se encontraron las algas en el laboratorio, fueron lavadas y preparadas para el proceso de extracción.

2. *Clasificación botánica.*

Las algas recolectadas fueron clasificadas de acuerdo a Taylor (1) por el profesor Reinhard Schnetter: *

1. *Caulerpa racemosa.* (Forsskål) Agardh (Clorofíceas).
2. *Halimeda opuntia.* (Linné) Lamouroux (Clorofíceas).

* Profesor visitante asociado de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional.

3. *Penicillus capitatus*. Lamarck (Clorofíceas).
4. *Caulerpa sertularioides*. (Gmelin) Howe (Clorofíceas).
5. *Gracilaria cylindrica*. Borgesen (Rodofíceas).
6. *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rodofíceas).

3. Lugar de recolección.

Todas las especies estudiadas fueron recolectadas en la Costa Atlántica Colombiana. Las especies *C. racemosa*, *H. opuntia* y *P. capitatus* en aguas de las Islas del Rosario, en el sitio denominado Punta Brava, a una profundidad de aproximadamente 50 cm. Estas algas se encuentran generalmente sobre corales o arenas calcáreas.

Las especies *C. sertularioides*, *G. cylindrica* y *H. musciformis* fueron recolectadas en las costas de Cartagena en el sitio llamado Barlovento (El Morro), a profundidades de 0.5 a 1 m. Estas tres especies se encuentran sobre arena.

4. Fecha de recolección.

Las especies *C. racemosa*, *P. capitatus* y *H. opuntia* fueron recolectadas el 28 de abril de 1971. Las especies *C. sertularioides*, *G. cylindrica* y *H. musciformis*, el 26 de abril de 1971.

b) Plantas cultivadas en la tierra

Para comparar las cantidades y las proporciones en que se encuentran los carotenos α y β en las algas marinas, con las de otras plantas cultivadas en la tierra, se determinó el contenido de carotenos en tres vegetales de consumo cotidiano entre nosotros y los cuales son conocidos como alimentos muy ricos en provitamina A.

1. Origen.

Los vegetales fueron obtenidos en supermercados de Bogotá, trasladados al laboratorio e inmediatamente preparados para la extracción de los pigmentos.

2. Clasificación botánica.

1. *Spinacea oleracea*. Linné. Familia *Chenopodiaceae*.
Nombre común: Espinacas.
2. *Daucus carota*. Linné. Familia *Umbelliferae*.
Nombre común: Zanahoria.
3. *Cucurbita maxima*. Linné. Familia *Cucurbitaceae*.
Nombre común: Ahuyama.

B) METODOS

a) Extracción

El proceso de extracción de los pigmentos es una operación fundamental en la determinación cuantitativa de los carotenos y la precisión con que éstos sean valorados, dependerá en gran parte de que su extracción haya sido total.

1. Preparación de las muestras para la extracción.

El primer interrogante con respecto al proceso de extracción es el de si es preferible realizar esta operación a partir del material húmedo o del material seco: Aunque algunos autores extraen los pigmentos directamente del material húmedo, existen razones suficientes para afirmar que es preferible llevar a cabo el proceso de extracción a partir del material seco, a saber:

- 1) Según estudios bibliográficos, los carotenos son más estables cuando están secos que en presencia de humedad.
- 2) Es bien sabido, que la efectividad de una extracción aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas que forman el material que se somete a la extracción, de manera que se hace necesario un proceso de molienda, que se puede llevar a cabo con mayor facilidad y menos pérdidas de material cuando éste se encuentra seco.
- 3) La cantidad de muestra pesada, para someterla al proceso de extracción, debe tener siempre la misma humedad, y ésto no es posible, especialmente en el caso de las algas, por encontrarse dentro del agua.

Procedimiento.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores el material fue preparado para el proceso de extracción de la siguiente manera:

1) Algas. Las correspondientes a cada especie fueron sacadas de la nevera de espuma de Icopor, sumergidas en un recipiente con agua destilada y lavadas cuidadosamente para quitar conchas, arena y otros materiales que pueden estar acompañándolas. Luego fueron secadas con un papel de filtro, cortadas y extendidas sobre una placa de vidrio, para ser sometidas, acto seguido, al proceso de secado en una estufa a 50°C durante 36 horas. Una vez estuvieron secas las muestras, se pulverizaron sometiéndolas a molienda en un molino eléctrico de acero inoxidable. Para el proceso de extracción, sólo se utilizó el material molido que pasó a través de un tamiz Nº 40. El material así obtenido se guardó en una nevera en recipientes herméticamente cerrados y en atmósfera de nitrógeno. En adelante cuando se hable de "Material preparado para la extracción de los pigmentos", deberá entenderse el material correspondiente a cada especie de alga, sometido al proceso anteriormente expuesto.

2. *Cucurbita maxima* L. (Ahuyama): Se tomaron varias porciones de la parte comestible, es decir del mesocarpio, se fragmentaron con un cuchillo hasta donde fue posible y luego se sometieron a los procesos de secado, pulverización y conservación, tal como se hizo con las algas.

3. *Spinacea oleracea* L. (Espinacas): Las muestras fueron sometidas al proceso enunciado para las algas, excepto que el lavado fue omitido.

4. *Daucus carota* L. (Zanahoria): Una vez lavadas diez zanahorias, se tomaron de cada una tres secciones transversales (una del centro y una de cada extremo), se fragmentaron y se siguió el mismo proceso expuesto para la ahuyama.

2. Técnicas de extracción.

Con el fin de encontrar el método óptimo de extracción de los pigmentos, se ensayaron diferentes técnicas y solventes haciendo una evaluación posterior por cromatografía en capa delgada.

2.1. Técnica según Strain.

En el laboratorio se ensayó la técnica recomendada por Strain (3), durante un tiempo de 24 horas, con 5 g. del material preparado para la extracción de los pigmentos del alga *Halimeda opuntia*.

Resultados.

Después de separar el extracto del material sólido por filtración sobre papel de filtro cualitativo y agregar 50 ml. más de la solución extractora para lavar el residuo, éste todavía presentaba una coloración verde - amarilla debida a los pigmentos; por otra parte, se encontró que es casi imposible eluir completamente los pigmentos retenidos por el papel de filtro.

2.2. Técnica según Quackenbush.

Se empleó el método de extracción utilizado por Quackenbush et al (4) tratando 5 g. de material preparado para la extracción de los pigmentos del alga *Halimeda opuntia* con 40 ml. de la mezcla extractora. Para separar el extracto del material sólido, en lugar de papel de filtro se usó un pequeño trozo de lana de vidrio colocada en el embudo. En las demás operaciones sólo se trabajó con la décima parte de las cantidades de solventes que aparecen en la técnica original.

Resultados.

Este método se encontró inconveniente debido al largo tiempo requerido para la extracción como también a la presencia de agua, la cual puede descomponer los carotenos.

2.3. Otras técnicas ensayadas.

De la misma manera como se expuso anteriormente, en el laboratorio fueron realizadas otras cinco técnicas de extracción sin obtener resultados satisfactorios, motivo por el cual se ensayaron una serie de solventes o mezclas de estos, con el fin de encontrar un método en el que el consumo de solventes y el tiempo de extracción fueran mínimos y, a su vez, prevenir al máximo la descomposición de los carotenos.

2.3.1. Solventes ensayados.

.1. Eter de petróleo.

- .2. Metanol.
- .3. Acetona.
- .4. Ciclohexano.
- .5. Eter etílico.
- .6. Eter de petróleo - acetona 30:70 v/v.
- .7. Eter de petróleo - acetona 50:50 v/v.
- .8. Eter de petróleo - acetona 70:30 v/v.

2.3.2. *Muestras.*

Las cantidades indicadas en cada caso, del material preparado para la extracción de los pigmentos de las siguientes especies de algas:

- .1. *Halimeda opuntia* 4 g.
- .2. *Gracilaria cylindrica* 4 g.

2.3.3. *Proceso general.*

Se ensayó la extracción de los pigmentos con los distintos solventes, en un representante de cada una de las dos divisiones de algas estudiadas.

Halimeda opuntia de las clorofíceas y *Gracilaria cylindrica* de las rodofíceas.

.1. Para cada especie se pesaron exactamente 4 g. de material preparado para la extracción de los pigmentos, se mezclaron en un Erlenmeyer de vidrio antiactínico con 50 ml. del solvente ensayado y se dejó en maceración bajo atmósfera de nitrógeno, en la oscuridad y a temperatura ambiente, durante diferentes períodos de tiempo (6, 15 y 24 horas), con el fin de encontrar el mínimo tiempo necesario, para que la extracción de los pigmentos fuera cuantitativa.

.2. Para determinar si la extracción de los carotenos había sido completa, se efectuó una segunda maceración sobre el residuo de la primera, con 30 ml. de una mezcla de éter de petróleo - acetona 70:30 v/v y durante 15 horas; se verificó la presencia de carotenos en el segundo extracto, mediante cromatografía en capa delgada sobre sílica gel G y desarrollándola con éter de petróleo - acetona 75:25 v/v (tal como se explicará ampliamente cuando se trate este tema).

Se encontró que los resultados de la extracción son óptimos empleando la mezcla de éter de petróleo - acetona 50:50 v/v y durante un tiempo de 15 horas. Por esta razón de ahora en adelante todas las extracciones serán realizadas con la mezcla anterior y de acuerdo a la siguiente técnica:

Pesar exactamente una cantidad de material preparado para la extracción de los pigmentos, comprendida entre 0,1 y 5,0 g. (la cantidad depende del contenido de carotenos en la muestra), transferirla a un Erlenmeyer de vidrio antiactínico, agregar 50 ml. de una mezcla de éter de petróleo - acetona 50:50 v/v, agitar por cinco minutos, aplicar una corriente de nitrógeno durante cinco minutos, inmediatamente taparlo herméticamente y guardarlo en la obscuridad y a temperatura ambiente durante 15 horas. Separar el material sólido de la mezcla, filtrando sobre un embudo, en el cual previamente se ha colocado un trozo de lana de vidrio y lavar el residuo con 4 porciones de 10 ml. de la mezcla extractora. Transferir el filtrado a un embudo de decantación y adicionar 80 ml. de una solución acuosa de cloruro de sodio al 10 por ciento, con el fin de extraer la acetona y que todos los pigmentos queden solubilizados en el éter de petróleo; descartar la capa inferior y lavar tres veces más con porciones de aproximadamente 40 ml. de agua para extraer la acetona remanente y algunos materiales insolubles en éter de petróleo; descartar las capas acuosas y transferir los pigmentos solubilizados en éter de petróleo a un vaso de precipitados de 50 a 100 ml., colocarlo en un baño de arena a 50° C y aplicar una corriente continua de nitrógeno hasta obtener un extracto completamente seco. En el transcurso del presente trabajo cuando se hable de "extracto seco", deberá entenderse el obtenido en las condiciones anteriormente anotadas.

b) Métodos de separación de los carotenos

Con el estudio de los métodos de separación, se pretende encontrar uno que permita aislar cuantitativamente los carotenos de los demás pigmentos (clorofilas y xantofilas) presentes en los vegetales y determinar con exactitud y separadamente los carotenos α y β . Para lograr tales objetivos, en el transcurso del alto número de investigaciones realizadas al respecto, se han utilizado métodos que comprenden la partición entre dos solventes inmiscibles, la cromatografía sobre papel, en capa delgada y en columna.

1. Partición entre dos solventes inmiscibles.

Desde hace algún tiempo se ha afirmado (5) que si se coloca un extracto de pigmentos de plantas verdes en una mezcla de partes iguales de éter de petróleo y metanol acuoso (90:10 v/v), las clorofilas y las xantofilas que posean por lo menos dos oxígenos en su estructura, quedarán disueltas en la capa metanólica (hipofase), mientras que los carotenos y demás xantofilas permanecerán en la capa de éter de petróleo (epifase).

La operación anterior fue realizada en el laboratorio sobre un extracto seco proveniente de 5 g. de material preparado para la extracción de los pigmentos del alga *Halimeda opuntia* con el fin de aislar especialmente las clorofilas presentes en el extracto, las cuales por su abundancia pueden interferir en la separación cromatográfica de los carotenos.

Resultados

Después del tratamiento con diferentes porciones de metanol acuoso, fue detectada la presencia de clorofilas en la capa de éter de petróleo, hecho que pone de manifiesto la no conveniencia de utilizar esta operación preliminar.

2. Cromatografía sobre papel.

Aunque la cromatografía sobre papel no ha sido un método muy empleado para la separación de los pigmentos de las plantas, existen investigaciones en las cuales se manifiesta haber obtenido magníficos resultados; por ejemplo, Jensen (6) afirma que empleando la cromatografía circular sobre papel obtiene resultados más altos en la determinación de la mezcla de los carotenos α y β que por la cromatografía en columna. En todos los trabajos realizados utilizando esta cromatografía hay un hecho, y es que en ninguno se ha logrado la separación de los isómeros α y β , y es así como Jeffrey (7) haciendo uso de la cromatografía bidimensional sobre papel, logra separar todos los pigmentos presentes en varias especies de algas marinas, excepto la mezcla de los carotenos α y β .

Además se puede anotar que algunos de estos trabajos han sido ejecutados empleando papel de filtro impregnado con tierra de "diatomáceas" o con alúmina.

Con el fin de verificar lo encontrado en la bibliografía se llevaron a cabo algunos ensayos que se exponen a continuación:

2.1. Cromatografía ascendente.

En este método se emplearon tiras de papel Whatman Nº 3 de 25 cm. de largo por 10 cm. de ancho. Los solventes ensayados fueron:

1. Eter de petróleo - etanol 96:4 v/v.
2. Cloroformo - éter de petróleo 30:70 v/v.

Los ensayos se efectuaron sobre extractos secos de los pigmentos del alga *Caulerpa racemosa* y de las hojas de *Spinacea oleracea*, como también sobre una solución patrón de β - caroteno.

Resultados.

La separación no es aceptable con ninguno de los dos solventes y las bandas que se presentan no son bien nítidas.

2.2. Cromatografía circular.

Para este ensayo se emplearon las mismas muestras utilizadas para la cromatografía ascendente sobre papel. Se trabajó sobre papel Whatman Nº 3 para cromatografía circular, ensayando los siguientes solventes:

1. Eter de petróleo.
2. Eter de petróleo - acetona 90:10 v/v.
3. Eter de petróleo - acetona 80:10 v/v.

2.2.1. Resultados.

El cromatograma presentó una serie de bandas coloreadas circulares con los tres solventes empleados. Con el solvente éter de petróleo - acetona 80:20 se obtuvo una mejor separación y bandas más angostas.

2.2.2. Identificación de los carotenos.

Las bandas que presentaron algún interés se sometieron a un proceso de elución con una mezcla de benceno - acetona 50:50 v/v y fueron llevadas posteriormente a sequedad aplicando una corriente de nitrógeno.

Los eluatos secos se disolvieron en éter de petróleo y utilizando el espectrofotómetro se obtuvieron los espectros de absorción

de estas soluciones entre 380 y 550 milimicras. Esta operación se repitió empleando cloroformo.

Resultados.

De acuerdo a la Tabla I, las longitudes de onda a las cuales se presentan los máximos de absorción del eluato del alga *Caulerpa racemosa*, tanto en éter de petróleo como en el cloroformo, son intermedias a aquellas que presentan los carotenos α y β , hecho que hace suponer que en el eluato está presente la mezcla de α y β carotenos y que por el proceso cromatográfico empleado no se puede obtener ninguno de los dos carotenos en estado puro.

TABLA I

Longitudes de onda a las cuales presentan los máximos de absorción los eluatos y soluciones patrones de β -caroteno.

<i>Compuesto</i>	<i>Longitud de onda en milimicras a la cual presenta el máximo de absorción.</i>			
	<i>Eter de petróleo</i>	<i>Cloroformo</i>		
β -caroteno según Karrer	452	483,5	466	497
α -caroteno según Karrer	447,5	478	454	485
β -caroteno patrón	451	478	463	485
β -caroteno patrón (eluato)	451	478	463	485
Eluato de <i>Caulerpa racemosa</i>	448	475	457	479

3. Cromatografía en capa delgada.

Por las ventajas que ofrece esta técnica de separación sobre la cromatografía en papel y en columna, especialmente por ser un proceso más rápido, en los últimos años se le ha utilizado en numerosos trabajos como un medio para la separación de los pigmentos de las plantas (8, 9, 10).

Aunque la mayoría de los investigadores no encuentran inconvenientes en la separación de los pigmentos por cromatografía en capa delgada, otros se han preocupado de la estabilidad de los mismos durante el proceso y así, Strain y Sherma (11), encontraron que en la separación de los pigmentos por cromatografía

en capa delgada, empleando como soporte derivados del silicio, hubo un aumento considerable del número de zonas amarillas, verdes y grises, hecho que atribuyeron a una reacción entre el adsorbente y los pigmentos; Stahl (12) afirma que en la cromatografía de los carotenoides sobre sílica gel, éstos se conservan mejor preparando las placas con una solución al 3 por ciento de hidróxido de potasio en agua.

En la bibliografía se encuentra muy poco en cuanto a la separación de los carotenos α y β por este método, de manera que los ensayos que se exponen a continuación tuvieron como finalidad conseguir esta separación y ver la posibilidad de utilizar este método para la determinación cuantitativa de los mismos.

3.1. *Muestras.*

Extractos secos de los materiales preparados para la extracción de los pigmentos, provenientes de las siguientes cantidades de muestra y llevados a un volumen de 10 ml. con éter de petróleo.

1. 1 g. de las hojas de *Spinacea oleracea*.
2. 1 g. del alga *Caulerpa racemosa*.
3. 6 g. del alga *Halimeda opuntia*.
4. 5 g. del alga *Gracilaria cylindrica*.

3.2. *Reactivos.*

3.2.1. *Solución patrón de β -caroteno sintético de concentración 1 mg./ml.*

3.2.2. *Adsorbentes.*

1. Sílica Gel H.
2. Sílica Gel G.
3. Oxido de magnesio.
4. Hidróxido de calcio.

3.2.3. *Solventes para la cromatografía.*

1. Eter de petróleo.
2. Eter de petróleo - benceno 50:50 v/v.
3. Benceno - acetona 90:10 v/v.

4. Eter de petróleo - etanol 96:4 v/v.
5. Eter de petróleo - benceno - acetona 40:40:20 v/v.
6. Eter de petróleo - acetona 60:40 v/v.
7. Eter de petróleo - acetona 90:10 v/v.
8. Eter de petróleo - acetona 70:30 v/v.
9. Eter de petróleo - acetona 80:20 v/v.
10. Eter de petróleo - acetona 75:25 v/v.

3.3. *Procedimiento.*

3.3.1. *Preparación de las placas cromatográficas.*

3.3.1.1. Para cubrir una superficie de 110 x 20 cm. (la de la plantilla) se emplearon en cada caso los adsorbentes y el agua en las siguientes cantidades:

1. Sílica gel G - agua 30:60 (p/v).
2. Sílica gel G - Solución de hidróxido de potasio en agua al 1% 30:60 (p/v).
3. Sílica gel H - agua 30:70 (p/v).
4. Sílica gel G - Oxido de magnesio - agua 20:10:70 (p/v).

Cada una de las mezclas anumeradas anteriormente se trasladaron a un Erlenmeyer, se agitaron fuertemente y acto seguido se transfirió la suspensión formada al extendedor, y con éste se aplicó sobre las placas una capa de 0,25 mm. de espesor.

Para cromatografía preparativa, se elaboraron placas con el adsorbente, de 0,5 mm. de espesor.

Una vez extendido el adsorbente se dejaron sobre la plantilla por media hora y luego se activaron en la estufa a una temperatura de 120°C durante dos horas.

Se dejaron enfriar en la estufa y en seguida fueron utilizadas.

3.3.2. *Separación de los pigmentos.*

Las manchas fueron aplicadas a 2 cm. de la base de la cromatoplaca y a una distancia de 4 cm. entre sí. Una vez aplicadas las manchas, las cromatoplacas fueron colocadas en una cámara de tal manera que formaran con la base de la misma un ángulo de aproximadamente 60° y se dejaron desarrollar en la oscuridad has-

ta que el solvente recorrió una distancia de 18 cm.; esta etapa duró aproximadamente 45 minutos.

Las cromatoplacas elaboradas con sílica gel G fueron ensayadas con todos los solventes para la cromatografía (3.2.3.) utilizando cualquiera de las muestras.

Las cromatoplacas obtenidas con los otros cuatro adsorbentes sólo fueron ensayadas con el solvente para la cromatografía (éter de petróleo - acetona 75:25 v/v).

3.3.3. Identificación espectrofotométrica de los carotenos.

Proceso de elución.

En los chromatogramas obtenidos de cada una de las cromatografías preparativas fueron eluidas las bandas que presentaron un R_f similar al de la banda de una solución de β -caroteno patrón, procediendo por duplicado con cada una de las muestras.

Espectros en la región visible de las bandas eluidas.

1. A uno de los eluatos secos obtenidos de cada muestra, se le adicionó 5 ml. de éter de petróleo y al otro 5 ml. de cloroformo, se transfirieron a celdas de cuarzo de 1 cm. de espesor y se les determinó el espectro de absorción entre 380 y 520 milimicras, empleando como blanco el solvente utilizado para la disolución del eluato seco.

2. Los eluatos de β -caroteno patrón se llevaron a un volumen exacto de 10 ml., el primero con éter de petróleo y el segundo con cloroformo, y a estas soluciones se les determinó el espectro de absorción como en el punto anterior.

3.4. Resultados y discusión.

3.4.1. Separación de los pigmentos.

1. Con el solvente para cromatografía, éter de petróleo - acetona 75:25 v/v y empleando como soporte sílica gel G, se obtuvo una mejor separación de la banda que presentó un R_f y un color similares a los del β -caroteno patrón. Una concentración mayor de acetona, por ejemplo, éter de petróleo - acetona 60:40 v/v da lugar a que la banda de los carotenos aparezca mezclada con una banda gris. En cambio una proporción menor de acetona, por ejemplo, éter de petróleo - acetona 85:15 v/v, trae como consecuencia que

la banda de los carotenos se extienda demasiado, es decir, se forman "colas".

2. Con todos los adsorbentes utilizados se observó que los pigmentos conservan su color cuando el cromatograma se encuentra en desarrollo; una vez la cromatoplaca se seca, comienzan a desaparecer los colores. En el caso concreto del β - caroteno, se apreció que una mancha que contiene 5 mcg. de este compuesto perdió totalmente su color en 2 a 3 horas, cuando se expuso a la luz solar difusa y en aproximadamente 12 horas cuando se guardó en la obscuridad.

3. Con las cromatoplacas preparadas utilizando sílica gel G con una solución de hidróxido de potasio, se obtuvo la misma separación que con las placas no alcalinizadas, pero en cuanto a la estabilidad del β - caroteno, se apreció que una vez se ha evaporado el solvente de la cromatoplaca, en las condiciones anotadas en el punto anterior, se necesitó aproximadamente el doble de tiempo para que desapareciera el color de una mancha de β - caroteno.

3.4.2. Estudio espectrofotométrico.

1. En la Tabla II se puede apreciar que los eluatos de las hojas de *Spinacea oleracea* y del alga *Gracilaria cylindrica* tienen sus máximos de absorción a longitudes de onda muy similares a las cuales los presenta el β - caroteno patrón, tanto en éter de petróleo como en cloroformo, por lo cual se puede suponer que los eluatos de estas dos plantas contienen β - caroteno puro.

2. Los eluatos de las algas *Halimoda opuntia* y *Caulerpa racemosa* tienen sus máximos de absorción a longitudes de onda intermedias a aquellas a las cuales los presentan los carotenos α y β aisladamente. (Ver Tablas I y II). De lo anterior se puede afirmar que por medio de la cromatografía en capa delgada tampoco es posible la separación de los carotenos α y β .

TABLA II

Longitud de onda a la cual presentan los máximos de absorción diferentes eluatos después de una cromatografía en capa delgada.

<i>Eluato</i>	<i>Longitudes de onda en milímicras a las cuales presentan los máximos de absorción.</i>			
	<i>Eter de petróleo</i>	<i>Cloroformo</i>		
β - caroteno patrón	451	478	463	485
<i>Spinacea oleracea</i>	450	477	463	484
<i>Caulerpa racemosa</i>	448	475	457	479
<i>Gracilaria cylindrica</i>	450	476	462	484
<i>Halimeda opuntia</i>	447	475	456	479

4. Cromatografía en columna.

Tal vez el primer experimento cromatográfico fue llevado a cabo en 1906 por el biólogo ruso Tswett, quien indicó que si se pone en lo alto de una columna de vidrio rellena con sulfato de calcio finamente dividido un extracto verde de plantas y a continuación se agrega éter de petróleo, aparecen una serie de bandas de distintos colores.

Hacia 1928, Karrer *et al.* iniciaron la tarea de determinar la estructura de los carotenos y para separar los carotenos α y β , emplearon columnas con hidróxido de calcio desarrollándolas con éter de petróleo.

Con el transcurso del tiempo se aumentó el número de solventes y adsorbentes usados para la separación de los carotenoides por cromatografía en columna y así Goodwin (5) menciona los siguientes:

Solventes: Eter de petróleo, éter etílico, benceno, acetona, cloroformo, etanol, metanol, agua y ácido acético glacial.

Adsorbentes: Almidón, sacarosa, carbonato de calcio, fosfato de calcio, carbonato de zinc, carbonato de magnesio, hidróxido de calcio, óxido de magnesio y óxido de aluminio (alúmina).

De todo lo anterior se puede ver que es bastante lo que se ha investigado con respecto a la separación de los carotenoides; sin embargo de todos los estudios realizados, para efectos del presente trabajo, sólo se encuentran dos conceptos bien claros:

1) Que la mezcla de los carotenos α y β se puede separar de los demás pigmentos por cromatografía en columna sobre óxido de aluminio, empleando para desarrollar éter de petróleo.

2) Que la mezcla de los isómeros α y β se puede separar sobre una columna con hidróxido de calcio desarrollada con éter de petróleo.

Generalmente como solventes cromatográficos se emplean mezclas de un solvente polar con uno no polar y de todas estas la más utilizada ha sido la de éter de petróleo - acetona, motivo por el cual esta mezcla en diferentes proporciones fue ensayada con algunos de los adsorbentes.

4.1. *Reactivos.*

4.1.1. Solución patrón de β - caroteno sintético en éter de petróleo de concentración 1 mg./ml.

4.1.2. *Adsorbentes cromatográficos.*

1. Oxido de aluminio activado neutro (alúmina).
2. Hidróxido de calcio activado a 150°C durante 2 horas.
3. Oxido de magnesio activado a 120°C durante 2 horas.

4.1.3. *Solventes cromatográficos.*

1. Eter de petróleo.
2. Eter de petróleo - acetona 70:30 v/v.
3. Eter de petróleo - acetona 80:20 v/v.
4. Eter de petróleo - acetona 90:10 v/v.
5. Eter de petróleo - acetona 95:5 v/v.
6. Eter de petróleo - acetona 97:3 v/v.
7. Eter de petróleo - acetona 93:7 v/v.

4.2. *Muestras.*

Extractos secos de los materiales preparados para la extracción de los pigmentos provenientes de las siguientes cantidades de muestra :

1. 0,20 g. del alga *Caulerpa racemosa*.
2. 0,80 g. del alga *Caulerpa sertularioides*.
3. 3,00 g. del alga *Halimeda opuntia*.
4. 4,00 g. del alga *Penicillus capitatus*.

5. 5,00 g. del alga *Hypnea musciformis*.
6. 4,00 g. del alga *Gracilaria cylindrica*.
7. 0,10 g. de las hojas de *Spinacea oleracea* (espinacas).
8. 0,10 g. de los tubérculos de *Daucus carota* (zanahoria).
9. 0,50 g. del mesocarpo de *Cucurbita maxima* (ahuyama).

4.3. Procedimiento.

Preparación de las columnas cromatográficas.

Se utilizaron columnas como la que se muestra en la figura 1, elaboradas con un tubo de vidrio de 12 mm. de diámetro interno y 250 mm. de longitud.

Con la ayuda de una varilla de vidrio se introdujo un trozo de lana de vidrio que impide la salida del adsorbente. Estando la llave cerrada, se adicionó el respectivo solvente cromatográfico hasta una altura aproximada de 18 cm. Con una varilla de vidrio se golpeó verticalmente (sobre la lana de vidrio) para remover las burbujas de aire presentes y durante 5 minutos se hizo burbujeante en el solvente una corriente muy suave de nitrógeno.

Por medio de un embudo se agregó una porción de aproximadamente 1 g. de adsorbente y se golpeó el tubo de vidrio con una espátula de caucho hasta que el adsorbente se depositó homogéneamente en el fondo de la columna. De la misma manera se siguieron agregando más porciones del adsorbente hasta que éste alcanzó una altura de 17 cm. Se abrió la llave de la columna, se aplicó el vacío producido por una trompa de agua y se dejó salir el solvente hasta que la altura del mismo en la columna no excedió en más de 2 o 3 mm. la altura del adsorbente. Se protegió de la luz la parte de la columna ocupada por el adsorbente con una tira de papel de aluminio.

En este momento la columna quedó lista para aplicar la muestra por separar.

Separación de los carotenos.

a) Sobre alúmina activada (13).

Con este adsorbente no hubo necesidad de aplicar vacío y el eluato fue recibido en un vaso de precipitados de 100 ml.

1. Fueron ensayados todos los solventes cromatográficos, en el mismo orden en que aparecen en la lista, siguiendo para cada caso la siguiente técnica:

Teniendo la columna preparada, se disolvió la muestra 4.2.3. en la menor cantidad posible del respectivo solvente cromatográfico y con una pipeta fue agregada gota a gota en la columna; para transferir toda la muestra a la columna hubo necesidad de lavar el vaso de precipitados (que contenía la muestra) con 3 o 4 porciones de 1 ml. del mismo solvente, las cuales fueron adicionadas a la columna como se indicó anteriormente y procurando que la altura del solvente no sobrepasara la del adsorbente en más de 1 cm., una vez agregada toda la muestra, en forma continua se siguió adicionando el solvente cromatográfico, evitando que superara la altura del adsorbente en más de 2 cm.; en el momento en que

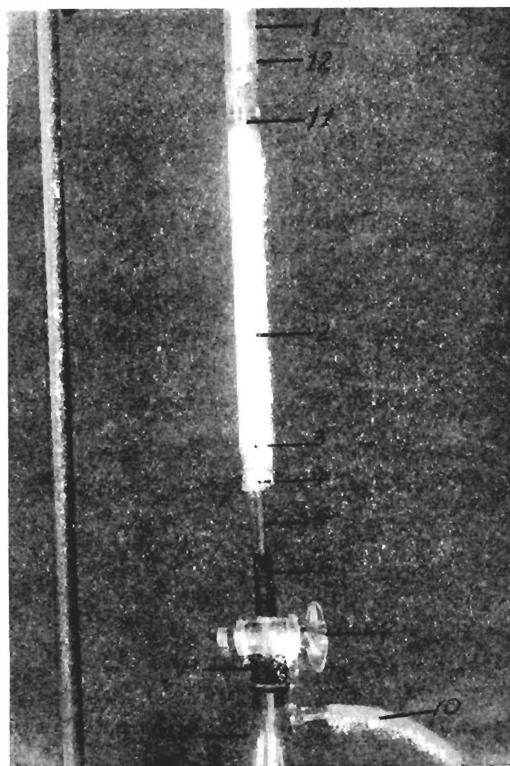


Figura N° 1. — 1) Tubo de vidrio. 2) Adsorbente.
3) Lana de vidrio. 4) Tapón de corcho perforado.
5) Tubo de vidrio. 6) Tubo de caucho. 7) Llave.
8) Tubo de caucho. 9) Erlenmeyer con tubula-
dora lateral. 10) Tubo de caucho. 11) Extracto.
12) Solvente.

la banda amarilla estuvo cerca de la lana de vidrio, se cambió el recipiente en que se estaba recibiendo, por un vaso de precipitados de 100 ml. seco y se dejó salir la solución amarilla hasta que dicha banda fue eluída completamente.

2. Se llevó a cabo la técnica anterior con la muestra 4.2.7. y empleando el solvente cromatográfico éter de petróleo - acetona 97:3.

3. Empleando para el desarrollo el mismo solvente cromatográfico se aplicó en la columna 30 μl . de la solución patrón de β - caroteno y se recogió el eluato como en los casos anteriores.

4. Cada uno de los eluatos obtenidos fue llevado a sequedad colocando los vasos sobre un baño de arena a 50°C y aplicando una corriente de nitrógeno.

5. Los eluatos secos fueron transferidos con éter de petróleo a un balón aforado de 10 ml. y luego se completó a volumen con el mismo solvente.

6. Se desarrolló el punto anterior sustituyendo el éter de petróleo por cloroformo.

7. En el espectrofotómetro se determinó el espectro de absorción entre 350 y 520 $\text{m}\mu$. de las soluciones obtenidas en 5 y en 6.

b) Sobre hidróxido de calcio activado (13).

1. Se preparó con este adsorbente una columna cromatográfica tal como se indicó anteriormente empleando como solvente éter de petróleo.

2. Se aplicó en la columna el eluato obtenido en el paso 4 con la muestra 4.2.3. observando las mismas precauciones anotadas para la cromatografía sobre alúmina y se siguió agregando éter de petróleo hasta que una primera banda amarilla fue eluída totalmente, momento en que el Erlenmeyer fue cambiado y se adicionó en la columna el solvente éter de petróleo - acetona 90:10, hasta que la banda amarilla que había sido retenida por el adsorbente, fue eluída completamente. La elución de las dos bandas demoró 5 horas.

3. Se procedió como en los puntos anteriores agregando en la columna 30 μl . de la solución patrón de β - caroteno.

4. Cada uno de los eluatos obtenidos en 2 y 3 se transfirió a un vaso de precipitados de 100 ml. y se llevó a sequedad colocándolo sobre un baño de arena a 50°C y aplicando una corriente de nitrógeno.

5. Cada eluato, una vez seco, se transfirió con éter de petróleo a un matraz aforado de 10 ml. y se completó a volumen con el mismo solvente.

6. Se llevó a cabo el punto anterior empleando cloroformo en lugar de éter de petróleo.

7. En el espectrofotómetro se determinó el espectro de absorción entre 350 y 520 m μ . de las soluciones obtenidas en 5 y en 6.

c) Sobre óxido de magnesio activado.

1. Para preparar las columnas cromatográficas con este adsorbente se procedió exactamente como se indicó anteriormente.

2. Las distintas muestras fueron introducidas en las columnas tal como se describió para la cromatografía sobre óxido de aluminio.

3. Aplicando la muestra 4.2.1. fueron ensayados todos los solventes cromatográficos para desarrollar el cromatograma y se observó en cada caso de qué manera separaron las distintas bandas, especialmente las que se supuso pertenecían a los carotenos α y β .

4. Los carotenos de las muestras 4.2.1. y 4.2.3. fueron separados empleando para desarrollar el cromatograma el solvente éter de petróleo - acetona 95:5 v/v. De esta manera, se obtuvieron dos bandas separadas de los demás pigmentos, los cuales permanecieron en la parte superior de la columna, una banda inferior de color amarillo y unos 5 cm. por encima de ésta, otra de color rosado. Se siguió agregando el mismo solvente y cuando la primera banda (la amarilla) estuvo cerca de la lana de vidrio se cambió el Erlenmeyer por uno nuevo en el cual se recogió el eluato de dicha banda hasta que el solvente salió completamente incoloro, momento en que se cambió otra vez el recipiente para recibir el eluato correspondiente a la segunda banda (la rosada). El proceso de elución y separación de las dos bandas demoró entre 2,5 y 3,5 horas. Cada eluato fue transferido cuantitativamente a un vaso de precipitados y llevado a sequedad colocándolo sobre un baño de arena a 50°C y

aplicando una corriente de nitrógeno. Los eluatos secos fueron llevados con éter de petróleo a un volumen de 10, 25 o 50 ml., de tal manera que las soluciones así obtenidas tengan valores de porcentaje de transmitancia, a longitudes de onda a las cuales presentan su máximo de absorción, comprendidos entre 20% y 70%. A las soluciones así obtenidas de los diferentes eluatos se les determinó el espectro de absorción entre 350 y 520 m μ . utilizando como blanco éter de petróleo.

5. Se procedió como en el punto anterior, excepto que para tomar el espectro de absorción se utilizó cloroformo en lugar de éter de petróleo.

6. Trabajando simultáneamente con cinco columnas cromatográficas y procediendo como en el punto 4., se determinó el contenido de los carotenos α y β de la muestra 4.2.1. leyendo en el espectrofotómetro el valor de porcentaje de transmitancia a 446 m μ . para el eluato en éter de petróleo de la banda amarilla (α - caroteno) y 451 m μ . en el mismo solvente para la banda rosada (β - caroteno).

7. Tal como se hizo en el punto anterior, se determinó el contenido de los carotenos α y β en cada una de las ocho muestras restantes.

8. Se prepararon cinco columnas cromatográficas con tubos de 25 mm. de diámetro y procediendo como en 4. en cada una fueron separados los carotenos α y β provenientes de 1 g. de material preparado para la extracción de los pigmentos de *Daucus carota*. Tanto los cinco eluatos de α - caroteno como los cinco del isómero β fueron transferidos en Erlenmeyers de 125 ml. y luego llevados a sequedad colocándolos sobre un baño de arena a 50°C y aplicando una corriente de nitrógeno. Estos eluatos fueron utilizados para efectuar la cristalización de los carotenos.

4.3.3. Identificación de los carotenos α y β .

Posición y coloración en la columna cromatográfica.

Forma cristalina.

Proceso de cristalización, (14).

Se ensayaron varias técnicas para obtener los carotenos en estado cristalino y entre éstas, la siguiente condujo a los mejores resultados, tanto para el isómero α como para el β :

1. Sobre el eluato seco de cada caroteno obtenido, se agregó gota a gota la mínima cantidad posible de benceno para solubilizarlo, sobre esta solución se adicionó lentamente una cantidad de metanol de aproximadamente cinco veces su volumen y luego, 3 a 5 gotas de agua.

2. La solución anterior fue introducida durante 1 hora en una mezcla de hielo picado - cloruro de sodio (sal común) 3:1. De esta forma aparecen los primeros cristales del caroteno.

3. La suspensión obtenida se llevó a tres veces su volumen con metanol, se le aplicó una corriente de nitrógeno, se tapó herméticamente y se dejó en el congelador de una nevera durante 24 horas.

4. Al cabo de este tiempo se filtró la suspensión así obtenida sobre un papel de filtro y los cristales retenidos por éste fueron secados con una corriente muy suave de nitrógeno.

Observación microscópica de los cristales.

Con un aumento de 450 veces su tamaño original se hicieron las siguientes observaciones en el microscopio:

Los cristales de β - caroteno, obtenidos de *Daucus carota* y los del patrón sintético del mismo compuesto se observaron tanto con luz corriente (luz de día) como con luz polarizada y los cristales obtenidos de α - caroteno con luz corriente únicamente.

Espectros de absorción.

Visible.

En éter de petróleo y en cloroformo fueron determinados los espectros de absorción del β - caroteno sintético, de los isómeros α y β obtenidos a partir de las muestras y de la mezcla de los dos carotenos.

Infra - rojo, (15).

En el espectrofotómetro se tomaron para este fin los espectros infra - rojo en fase sólida, entre 2,5 y 15 micrones, de los carotenos α y β cristalinos obtenidos de *Daucus carota* y uno del β - caroteno sintético.

La tableta preparada por compresión de una mezcla de 1 mg. de caroteno y 300 mg. de bromuro de potasio, a 20.000 libras durante 20 minutos, la cual presentó un diámetro de 12 mm. y

un espesor de 2 mm., se colocó en el espectrofotómetro, en una celda desmontable, dejando actuar libremente el haz luminoso de compensación.

4.5.4. Preparación de la curva de calibración del β -caroteno.

Para efectuar los cálculos del β -caroteno presente en las muestras se preparó una curva de calibración con el patrón de dicho compuesto, sometiéndolo a las etapas de extracción y cromatografía en columna sobre óxido de magnesio, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

1. Un ml. de la solución patrón de β -caroteno, recientemente preparada, fue sometido a un proceso de extracción simulado, similar al seguido para la extracción de los pigmentos en cualquier muestra de material vegetal, obteniéndose una solución de β -caroteno patrón en éter de petróleo de concentración teórica de 20 mcg./ml.

2. Con la solución obtenida anteriormente se prepararon otras tres diluciones de concentración 1, 2 y 3 mcg./ml., a las cuales se les determinó en el espectrofotómetro el porcentaje de transmitancia a 451 m μ . empleando como blanco éter de petróleo. Estos datos fueron utilizados para calcular la cantidad de caroteno que se pierde durante el proceso de extracción.

3. Se prepararon columnas cromatográficas con óxido de magnesio y desarrollándolas con éter de petróleo - acetona 95:5 se aplicaron, en las mismas, volúmenes exactos de la solución de β -caroteno obtenida en 1., comprendido entre 0,1 y 2 ml., y que contenían teóricamente 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0; 22,5; 25,0; 27,5; 30,0; 32,5 y 35,0 mcg. de β -caroteno.

4. Cada uno de los catorce eluatos obtenidos en el punto anterior fue transferido a un vaso de precipitados de 100 ml., se secó en la forma habitual, se llevó con éter de petróleo a un volumen de 10 ml. en un balón aforado y a esta solución se le determinó en el espectrofotómetro el porcentaje de transmitancia a 451 m μ ., empleando como blanco éter de petróleo. Los datos obtenidos de esta manera fueron utilizados para construir la curva de calibración (Figura 2-A).

5. Se obtuvo una segunda curva patrón, leyendo a 451 m μ . el porcentaje de transmitancia que presentaron las soluciones re-

cientemente preparadas de β - caroteno sintético en éter de petróleo que tenían las siguientes concentraciones: 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 1,75; 2,0; 2,25; 2,50; 2,75; 3,0; 3,25; 3,50; 3,75 y 4,0 mcg./ml. (Figura 2-B).

RESULTADOS Y DISCUSION

En esta sección tratamos los aspectos más importantes de los resultados obtenidos en cada método, con el fin de discutirlos y al mismo tiempo lograr una idea global del presente trabajo.

A) EXTRACCION

a) *Preparación de las muestras para el proceso de extracción.*

La consideración de algunos factores como la estabilidad de los carotenos, la toma de la muestra y la efectividad del proceso de extracción, dió lugar a que las muestras (algas marinas y otros vegetales), fueran preparadas para la extracción de los pigmentos, sometiéndolas primero a una etapa de secado en una estufa a 50°C, durante 36 horas, luego pulverizadas en un molino de acero inoxidable, tamizadas (por tamiz Nº 40) y finalmente conservadas bajo atmósfera de nitrógeno en recipientes herméticamente cerrados guardados en una nevera.

b) *Proceso de extracción.*

Se llevaron a cabo una serie de ensayos, en los cuales se emplearon diferentes solventes o mezclas de éstos, encaminados a obtener una extracción cuantitativa de los pigmentos, evitando en lo posible la descomposición de los mismos.

Entre todos los ensayos realizados, se obtuvo una extracción muy completa de los pigmentos mediante una maceración del material vegetal seco y pulverizado, con una mezcla de éter de petróleo - acetona 50:50 v/v, durante 15 horas, bajo atmósfera de nitrógeno y en la obscuridad.

B) SEPARACION DE LOS CAROTENOS

a) *Partición entre dos solventes inmiscibles.*

Se encontró que no es aconsejable separar las clorofilas y algunas xantofilas, de los demás pigmentos (carotenos y otros carotenoides), mediante el reparto del extracto total de los pigmentos de un vegetal en una mezcla de partes iguales de éter de petróleo y metanol acuoso (90:10 v/v), debido a que los carotenos son parcialmente solubles en el metanol acuoso, hecho demostrado mediante cromatografía en capa delgada.

b) *Cromatografía sobre papel.*

Por cromatografía ascendente sobre papel no se obtuvo una buena separación de los carotenos, especialmente porque las bandas de los pigmentos se presentaron demasiado extendidas, motivo por el cual se insistió poco en este método.

Por cromatografía circular sobre papel fue posible la separación de la mezcla de los carotenos α y β de los demás pigmentos, pero no se pudieron aislar los dos isómeros entre sí.

Además se estableció que si se pretende evaluar la mezcla de los carotenos α y β por este método, se debe tener en cuenta que durante la cromatografía y el proceso de elución, se pierde aproximadamente un 30 por ciento de los carotenos.

c) *Cromatografía en capa delgada.*

Mediante el ensayo de diferentes adsorbentes y solventes, se encontró que por este método cromatográfico, empleando como soporte sílica gel G y como solvente una mezcla de éter de petróleo - acetona 75:25 v/v, fue separada perfectamente la mezcla de los carotenos α y β de los demás pigmentos, pero no fue posible aislar los dos carotenos entre sí.

Se estableció que los carotenos se conservaron mejor durante el proceso cromatográfico, cuando las cromatoplacas de sílica gel fueron preparadas con una solución al 1% de hidróxido de potasio en agua.

También se puso en evidencia que cuando se pretende evaluar la mezcla de los carotenos α y β por este método, durante la cromatografía y el proceso de elución, se pierde aproximadamente un 35 por ciento de los carotenos.

En general se puede afirmar que este método sólo presenta interés para obtener una valoración aproximada de la mezcla de los carotenos α y β , o para estudiar cualitativamente los demás carotenoides.

d) *Cromatografía en columna.*

1. *Sobre alúmina activada neutra.*

Empleando la cromatografía en columna sobre este adsorbente y desarrollándola con una mezcla de éter de petróleo - acetona 97:3 v/v, se pudo separar la mezcla de los carotenos α y β de los demás pigmentos presentes en los vegetales, lo cual se comprobó al hacer un estudio espectrofotométrico de los eluatos obtenidos.

Por utilización de un patrón de β - caroteno, se estableció que aunque el proceso cromatográfico no demora más de hora y media, durante el mismo se pierde aproximadamente el 25% del β - caroteno.

Este método solo es aplicable para evaluar la mezcla de carotenos α y β , de una manera aproximada.

2. *Sobre hidróxido de calcio activado.*

Se encontró que la cromatografía en columna sobre este adsorbente, empleando para desarrollarla éter de petróleo, solo es útil para separar la mezcla de los carotenos α y β entre sí, cuando dicha mezcla ha sido previamente aislada de los demás pigmentos.

La determinación cuantitativa de los carotenos α y β , utilizando primero una columna con alúmina y luego una con hidróxido de calcio, no es aconsejable, debido a que durante estos dos procesos se pierde aproximadamente el 55% de los carotenos, hecho comprobado al pasar por estas dos columnas una solución de β - caroteno sintético.

3. *Sobre óxido de magnesio activado.*

3.1. *Separación de los carotenos.*

Después de ensayar sobre este adsorbente varios solventes cromatográficos, se encontró que con una mezcla de éter de petróleo-acetona 95:5 v/v, es posible la separación perfecta de los carotenos

α y β de los demás pigmentos y la de estos dos isómeros entre sí, resultado que satisface el principal objetivo de este trabajo, ya que permite evaluar aisladamente cada uno de los dos carotenos.

3.2. Identificación de los carotenos.

Los carotenos α y β fueron identificados mediante el estudio de las siguientes propiedades:

Coloración y posición en la columna cromatográfica.

Espectro de absorción en la región visible en éter de petróleo y en cloroformo. En la Tabla III se muestran las longitudes de onda de máxima absorbancia de los eluatos obtenidos.

Observación microscópica, con luz diurna y luz polarizada, de la coloración y forma de los cristales de dichos compuestos.

Espectros infra - rojo en fase sólida.

TABLA III

Longitudes de onda a las cuales se encuentran los máximos de absorción de los carotenos α y β , obtenidos por separación cromatográfica en columna sobre óxido de magnesio, desarrollada con una mezcla de éter de petróleo - acetona 95:5 v/v.

Compuesto	Longitud de onda en milímicras a la cual presenta el máximo de absorción.			
	Eter de petróleo	Cloroformo		
β - caroteno patrón	451	478	463	485
β - caroteno obtenido del alga <i>C. racemosa</i>	451	478	463	485
α - caroteno obtenido del alga <i>C. racemosa</i>	446	473	452	475

3.3. Curvas de calibración.

En la figura 2 se muestran las curvas de calibración. La curva A fue construida después de someter las soluciones de diferente concentración de β -caroteno patrón a los procesos de extracción y de cromatografía en columna sobre óxido de magnesio. La curva B fue obtenida con soluciones de β -caroteno recientemente preparadas.

Mediante una curva de Ringbom trazada con los mismos valores de concentración y de absorbancia con los cuales se construyó la curva B de la figura 21, se encontró que el error en las lecturas espectrofotométricas es mínimo para valores de porcentaje de transmisión comprendidos entre 20% y 70% (0,70 y 0,15 de absorbancia).

Por comparación de las pendientes de las curvas A y B de la figura 2, se encontró que durante los procesos de extracción y de cromatografía en columna sobre óxido de magnesio se pierde un 20% del β -caroteno, porcentaje de pérdida que se tuvo en cuenta para hacer los cálculos de α -caroteno presente en la muestra.

De acuerdo a los valores de absorbancia obtenidos, se determinó que durante el proceso de extracción se pierde un 5 por ciento del β -caroteno.

3.4. Determinación cuantitativa de los carotenos α y β .

Una vez separados los carotenos α y β de los materiales vegetales, fueron determinados espectrofotométricamente, efectuando para cada muestra cinco determinaciones, con el fin de verificar la precisión del método empleado.

3.3.1. Contenido de α y β -carotenos y de vitamina A en las muestras analizadas.

En la Tabla IV se presenta un resumen de los principales resultados obtenidos en el presente trabajo, los cuales serán discutidos a continuación.

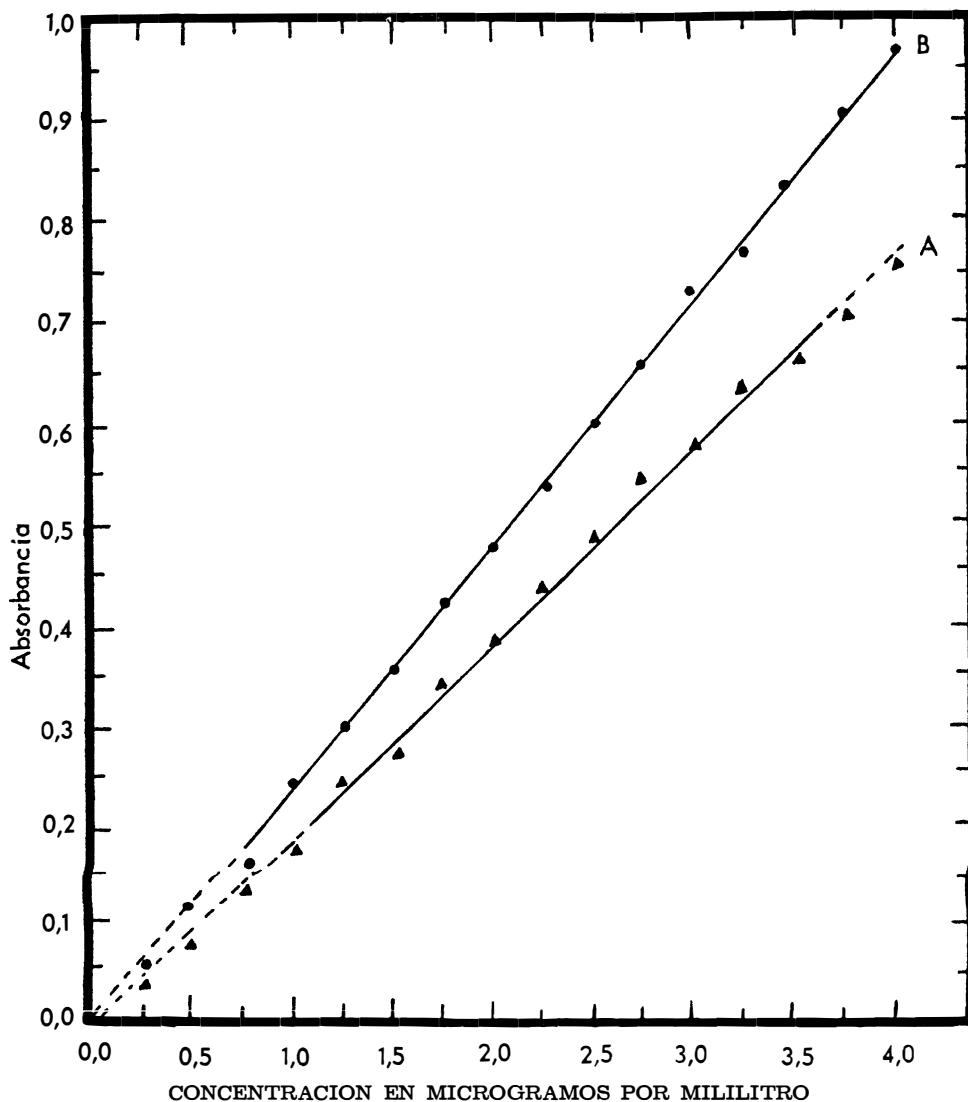


Figura N° 2. — Curva de calibración del β - caroteno en éter de petróleo. A) Solución de β - caroteno sintético suministrado por Hoffmann - La Roche sometida a los procesos de extracción y cromatografía en columna. B) Solución recientemente preparada del mismo patrón. Longitud de onda: 451 milimicras. Blanco: Eter de petróleo. Espectrofotómetro: Hitachi Perkin - Elmer Mod. 139. Celda de cuarzo de 1 cm. de espesor.

TABLA IV

Proporción de α y β -carotenos y contenido de vitamina A en los vegetales estudiados.

<i>Material vegetal</i>	$C\alpha$ mcg./100 g.	% α	$C\beta$ mcg./100 g.	% β	Vit. A * u.i./100 g.
<i>Caulerpa racemosa</i> . . .	12.920	65	7.150	35	22.250
<i>Caulerpa sertularioides</i> .	2.708	69	1.184	31	4.220
<i>Halimeda opuntia</i>	797	67	392	33	1.320
<i>Penicillus capitatus</i>	226	46	265	54	560
<i>Hypnea musciformis</i>	137	18	631	82	1.170
<i>Gracilaria cylindrica</i> . . .	Trazas	<5	354	>95	590
<i>Spinacea oleracea</i>	Trazas	<5	7.320	>95	12.200
<i>Daucus carota</i>	22.340	29	54.820	71	110.000
<i>Cucurbita maxima</i>	1.650	22	5.744	78	10.950

* 1 u. i. de vitamina A = 0,6 mcg. de β -caroteno.

1 u. i. de vitamina A = 1,2 mcg. de α -caroteno.

Las cuatro especies de algas verdes estudiadas (*C. racemosa*, *C. sertularioides*, *H. opuntia* y *P. capitatus*), contienen entre el 46% y 69% de α -caroteno; en cambio, en las dos especies de algas rojas (*H. musciformis* y *G. cylindrica*), el contenido de α -caroteno es inferior al 20%. Las consideraciones anteriores, indican una tendencia a mayor contenido de α -caroteno en las algas verdes que en las algas rojas.

La alta proporción de α -caroteno en la mayoría de los vegetales estudiados, pone de manifiesto la importancia de determinar separadamente los carotenos α y β , si se tiene en cuenta que el β -caroteno tiene el doble de actividad vitamínica A que el α -caroteno.

En cuanto al contenido de vitamina A, se puso en evidencia la enorme superioridad de los tubérculos de *Daucus carota*, con respecto a los demás vegetales estudiados. Sin embargo, es muy significativo que el alga *Caulerpa racemosa*, contenga aproximadamente el doble de vitamina A que las hojas de *Spinacea oleracea* (espinacas) y que el mesocarpio de *Cucurbita maxima*; las dos últimas, conocidas como alimentos muy ricos en vitamina A.

El alga *Caulerpa racemosa* presenta una cantidad de vitamina A muy elevada con respecto a las demás especies de algas estudiadas; así, por ejemplo, contiene cinco veces más vitamina A que el alga *Caulerpa sertularioides*, la cual ocupa el segundo lugar en cuanto a dicho contenido.

Control estadístico.

En la Tabla V se presenta la desviación "standard" porcentual para la determinación de carotenos α y β en las nueve muestras estudiadas. En dicha Tabla se aprecia que los valores de desviación "standard" porcentual están comprendidos entre 2,0% y 8,2%; valores que no son elevados si se tiene en cuenta que cada determinación demora alrededor de 24 horas y si se considera además que se trabaja con material biológico inestable.

TABLA V

Desviación "standard" porcentual para la determinación de α y β carotenos.

Material vegetal	Desviación "standard" porcentual % S	
	α - Caroteno	β - Caroteno
<i>Caulerpa racemosa</i>	2,0%	2,8%
<i>Caulerpa sertularioides</i>	3,1%	4,9%
<i>Halimeda opuntia</i>	2,9%	8,2%
<i>Penicillus capitatus</i>	3,7%	3,6%
<i>Hypnea musciformis</i>	7,3%	3,0%
<i>Gracilaria cylindrica</i>	—	3,4%
<i>Spinacea oleracea</i>	—	2,9%
<i>Daucus carota</i>	3,1%	3,6%
<i>Cucurbita maxima</i>	5,9%	2,6%

Se encontró que todas las determinaciones de α y β carotenos en las nueve muestras analizadas, presentan sus valores dentro del intervalo $\bar{X} \pm 2 S$.

Recuperación.

Se encontró que las pérdidas de β - caroteno durante el proceso son elevadas (20%), pero éstas fueron corregidas, construyendo una curva de calibración con soluciones de β - caroteno patrón sometidas a los mismos procesos de extracción y separación cromatográfica, tal como se hizo con las algas. Para el α - caroteno se tuvo en cuenta el mismo porcentaje de pérdida encontrado para el isómero β .

CONCLUSIONES

A) Mediante la combinación de la cromatografía en columna y la espectrofotometría, fue encontrado un método que permite evaluar con precisión y exactitud aceptables, los carotenos α y β presentes en cualquier vegetal.

B) No fue posible la separación de los carotenos α y β por cromatografía sobre papel o en capa delgada, aunque se pudo aislar la mezcla de estos dos compuestos de los demás pigmentos. También se advirtió la no conveniencia de emplear estos dos procedimientos cromatográficos para la determinación cuantitativa de los carotenos, debido a la alta descomposición de los mismos durante el proceso.

C) La cromatografía en capa delgada se encontró aconsejable para el análisis cualitativo de los pigmentos de las plantas.

D) El método de cromatografía en columna utilizado en este estudio, puede ser aplicado para la separación y evaluación de la mayoría de los carotenoides presentes en los vegetales, con sólo incrementar gradualmente la polaridad del solvente con el cual se desarrolla el cromatograma.

E) Dentro de las especies de algas estudiadas, en el alga *Caulerpa racemosa*, se encontró una cantidad de carotenos α y β muy superior a la hallada en plantas cultivadas en la tierra (a excepción de la zanahoria), conocidas como alimentos ricos en estos compuestos.

F) En las especies de algas verdes estudiadas, se encontró una proporción de α - caroteno muy superior al contenido del mis-

mo en algas rojas y los tres vegetales estudiados (espinacas, ahu-yama y zanahoria).

G) El método para el análisis cuantitativo de los carotenos, mejorado en el presente trabajo, puede tener aplicación para determinar a qué edad o en qué período del año, el contenido de carotenos en las plantas es máximo.

De la misma manera, el método puede ser aplicado para establecer cómo varía la proporción de carotenos α y β de acuerdo a la maduración de los frutos o a la edad de las plantas.

RESUMEN

Con el propósito de determinar separadamente y con precisión aceptable el contenido de carotenos α y β en algas marinas, fue necesario mejorar todas las etapas involucradas en la determinación, tales como la extracción de los pigmentos, la separación de los carotenos por métodos cromatográficos y la determinación espectrofotométrica de los mismos.

Para separar los carotenos α y β de los demás pigmentos fueron ensayados métodos cromatográficos (sobre papel, en capa delgada y en columna). Por cromatografía sobre papel y en capa delgada, solo se obtuvo la separación de la mezcla de los carotenos α y β de los demás pigmentos. Mediante la utilización de la cromatografía en columna, empleando como soporte óxido de magnesio activado y desarrollándola con una mezcla de éter de petróleo - acetona 95:5 v/v, fue posible eluir aisladamente los carotenos α y β . La identificación se llevó a cabo mediante un estudio comparativo de los espectros de absorción en las regiones del visible y del infrarrojo, observación microscópica de los cristales y posición que ocupan en la columna cromatográfica. Finalmente, fueron valorados espectrofotométricamente.

SUMMARY

In order to determine separately and with acceptable precision the amount of α and β carotenoids in marine algae it was necessary to improve the method of extraction of the pigments, their

isolation by chromatographic methods and their spectrophotometric determination.

Several chromatographic methods (paper, TLC and column) were evaluated. The α and β carotenes were separated from the other pigments by paper chromatography and TLC.

These compounds were also separated by column chromatography on activated magnesium oxide using petroleum ether: acetone (95:5 v/v) as the solvent.

Their identification was based on the visible and IR spectra, the examination of the crystals under the microscope and the position of the compounds in the chromatographic column. The amount of each compound was determined by spectrophotometry.

RÉSUMÉ

Nous avons revisé et précisés les méthodes de détermination de l' α carotène et du β carotène dans les algues marines.

Par chromatographie sur papier ou en couche mince, les deux formes sont séparées simultanément des autres pigments. Par contre, par chromatographie sur colonne de MgO et élution par un mélange d'éther de pétrole - acétone 95:5 on sépare les deux composés. On les identifie par leurs spectres d'absorption dans le visible et l'IR, par la forme microscopique des cristaux et par leur position relative dans la colonne. Finalement on détermine les teneurs par spectrophotométrie.

BIBLIOGRAFIA

1. TAYLOR, W. R. 1960. Marine algae of the Eastern tropical and subtropical Coasts of the Americas. The ann. arbor. University Michigan Press.
2. CORE, E. L. 1964. Plant taxonomy. Englewood Cliffs, N. Y. Prentice Hall INC. 458 p.
3. STRAIN, H. H. 1966. Fat-soluble chloroplast pigments (En Biochemistry of chloroplast. T. W. Goodwin). Academic Press. London and New York. Vol. 1. p. 387.
4. QUACKENBUSH, F. W.; FIRCH, J. G.; RABOURN, W. J.; MCKQUISATN, M.; PETZOLD, E. N. y KARGL, T. E. Analysis of carotenoids in corn grain. J. Agr. Food Chem. 9, 132 (1961).

5. GOODWIN, T. W. 1955. Carotenoids. (En el volumen III de Modern Methods of Plant Analysis. K. Paech y M. V. Tracey Eds.). Springer, Berlin, p. 293.
6. JENSEN, A. y JENSEN, L. Cuanitative paper chromatography of carotenoids. *Acta Chem. Scand.* 13, 1862 (1959).
7. JEFFREY, S. W. Paper - chromatographyc separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochem. J.* 80, 336 (1961).
8. BJORN, L. y HAUG, A. Caroteno isomers in some red algae. *Acta Chem. Scand.* 10, 470 (1956).
9. HIYAMA, T.; NICHIMURA, M. y CHANCE, B. Determination of carotenes by thin - layer chromatography. *Anal. Biochem.* 29, 339 (1969).
10. RAI, H. y LEE, G. F. Separation of Planktonic algal pigments by thin-layer chromatography.
11. STRAIN, H. H. y SHERMA, J. Alteration of chloroplast pigments by chromatography with siliceous adsorbens. *Anal. Chem.* 39, 926 (1967).
12. STAHL, E. 1969. Thin - Layer Chromatography. Springer - Verlag Berlin. Heidelberg. New York. p. 266.
13. STROHECKER, R. y HENNING, H. M. 1967. Análisis de vitaminas. Traducido del alemán por F. Mayor. Ed. Paz Montalvo. Madrid. p. 73.
14. WALDMANN, H. 1958. Vitamines liposolubles et caroténoïdes. Une contribution de la recherche scientifique Swicce.
15. LUNDE, K. y ZECHMEISTER, L. Infrared spectra and cis - trans configurations of some carotenoid pigments. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1647 (1955).