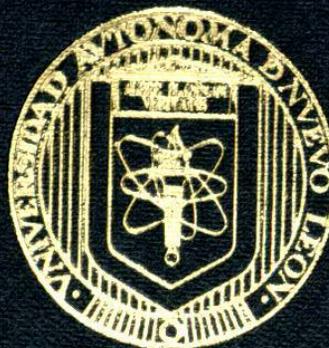


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION ESTUDIOS DE POST-GRADO



"DETERMINACION CUANTITATIVA DE
CAROTENOIDES EN HOJAS DE CINCO ESPECIES
DEL GENERO *Leucaena*"

PRESENTA

Q.F.B. MYRNA LAURA YEVERINO GUTIERREZ

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN ALIMENTOS

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE 1997

TM

QP671

.C35

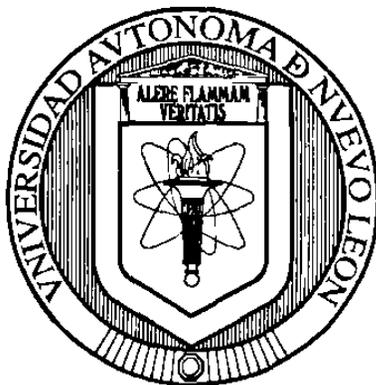
Y4

c.1



1080087088

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**“DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CAROTENOIDES
EN HOJAS DE CINCO ESPECIES DEL GÉNERO *Leucaena*”.**

T E S I S

QUE PRESENTA

Q.F.B. MYRNA LAURA YEVERINO GUTIERREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN ALIMENTOS**

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 1997

TM
QP671
.C35
Y4



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CAROTENOIDES
EN HOJAS DE CINCO ESPECIES DEL GÉNERO *Leucaena*.

DR. BALTAZAR CUEVAS HERNÁNDEZ
Presidente (Director)

DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH P.
Secretario (Co-Director)

DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ
(Asesor)

DRA. LETICIA A. HAUAD MARROQUIN
(Vocal)

DRA. MARÍA GUADALUPE ALANÍS G.
(Vocal)

Diciembre de 1997

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento A el Dr. Baltazar Cuevas Hernández, por la confianza, enseñanzas y el valioso tiempo dedicado a una servidora.

A el Dr. Rahim Foroughbakhch P. por su valiosa ayuda en el diseño y ejecución de la etapa metodológica de la fase de campo, así mismo por sus aportaciones y revisiones en lo correspondiente a la parte estadística.

A el Dr. José María Viader S. porque todo el trabajo analítico fue desarrollado en su laboratorio sin su ayuda no se hubiera concluido el trabajo y por su gran paciencia e interés para que aprendiera siempre.

A la Dra. Leticia Háuad Marroquín por las valiosas sugerencias en la revisión del manuscrito.

A la Dra. María Guadalupe Alanís G. por las enseñanzas en las aulas como cátedrática de la Maestría en Alimentos y por sus aportaciones en la revisión del manuscrito.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Secretaría Académica por la beca otorgada para la realización del presente trabajo dentro del programa de formación de profesores.

A los Directivos de la Facultad de Ciencias Químicas Director Ing. José Manuel Martínez Delgado, Subdirectora Q.F.B. Gloria Nelly Páez Garza, Jefe de la Carrera de Q.F.B. Emilia E. Vásquez Fariás por las facilidades otorgadas para la finalización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTO

Parte del presente trabajo de investigación fue realizado con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) concedido a la Dra. Leticia Amira Háuad Marroquín bajo el proyecto “Estudio Ecológico, Químico y Nutricional del género *Leucaena* en el noreste de México”, registrado bajo el número 4707N-9407, nuestro sincero agradecimiento por el apoyo recibido.

A mis padres

Juan Antonio e Irene

A mis hermanos

Irene M., Juan Antonio y César Alberto.

A mi esposo

Gabriel

A mis hijos

Gabriel y Juan Antonio

por su cariño, paciencia y apoyo

incondicional que he recibido siempre

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas
BHT	2,6-di-ter-butil-p-cresol (butilhidroxitolueno)
c	Control
cm	Centímetros
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
°C	Grados Celsius
C.V.	Coefficiente de Variación
d	Duplicado
desv.	Desviación
E.E.	Error estándar
g	Gramos
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IR	Infrarrojo
kg	Kilogramo
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
msnm	Metros sobre el nivel del mar
N	Norte
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	nanómetros
ODS	Octadecilsilano
p	Probabilidad
pH	Potencial de hidrógeno
pp.	Página

R	Rango
R_f	Factor de retención
nm	Nanómetros
t_c	“t” calculada
THF	Tetrahidrofurano
t_R	Tiempo de Retención
t₀	Tiempo muerto
UV-Vis	Ultravioleta – visible
Vit.	Vitamina
W	Oeste
μg	Microgramos
λ	Longitud de onda

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
I Introducción.....	1
II Antecedentes.....	3
2.1 Descripción y características químicas de los carotenoides.....	3
2.1.1.-Naturaleza química de los carotenoides.....	3
2.1.2-Funciones biológicas de los carotenoides.....	6
2.2 Los pigmentos en la industria.....	8
2.2.1-Industria alimentaria.....	8
2.2.2-Industria agropecuaria.....	12
2.2.3-Industria farmacéutica.....	13
2.3 Uso de la <i>Leucaena</i> como fuente de pigmentos.....	13
2.4 Obtención de pigmentos.....	14
2.4.1-Aislamiento de los carotenoides.....	14
2.4.2-Técnicas de detección.....	16
2.4.3-Técnicas de cuantificación de carotenoides.....	18
2.4.3.1-Método AOAC.....	19
2.4.3.2-Cromatografía en Capa Fina.....	19
2.4.3.3-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	20
III Objetivos.....	22
3.1 Objetivo general.....	22
3.2 Objetivos particulares.....	22
3.3 Hipótesis.....	22
IV Material y métodos.....	23
4.1 Fase de campo.....	23
4.1.1-Características del área de estudio.....	23
4.1.2-Selección de especies y el muestreo.....	24
4.1.3-Diseño estadístico.....	24
4.2 Fase de laboratorio.....	25
4.2.1-Reactivos.....	25
4.2.2-Equipo.....	25
4.2.3-Análisis cualitativo mediante la técnica de cromatografía en capa fina.....	27

4.2.4-El desarrollo del método analítico mediante la técnica de CLAR.....	28
4.2.4.1-Elaboración de estándares.....	28
4.2.4.2-Elección del tipo de detector, de columna, fases móviles y programa de elución.....	28
4.2.4.3-Análisis cualitativo mediante tiempos de retención.....	31
4.2.4.4-Preparación y tratamiento de la muestra.....	32
4.2.4.5-Cuantificación de carotenoides.....	33
4.2.4.6-Evaluación de la repetibilidad en una muestra control.....	33
4.2.4.7-Evaluación de la calidad de los resultados analíticos en las sesiones de trabajo.....	33
4.2.4.7.1-Gráficas de exactitud.....	34
4.2.4.7.2-Gráficas de precisión.....	34
V Resultados.....	35
5.1 Cromatografía en Capa Fina.....	35
5.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	36
5.2.1-Determinación de condiciones cromatográficas óptimas.....	36
5.2.2-Análisis cuantitativo.....	41
5.3 Control de calidad de la metodología por CLAR.....	41
5.3.1-Evaluación de la repetibilidad en una muestra control.....	41
5.3.2-Gráficas de control.....	44
5.4 Contenido de carotenoides en las muestras.....	48
5.5 Análisis estadístico de los datos obtenidos.....	49
VI Discusiones.....	54
6.1 Cromatografía en Capa Fina.....	54
6.2 Análisis cualitativo por CLAR.....	54
6.3 Análisis cuantitativo por CLAR.....	55
6.4 Contenido de carotenoides.....	56
VII Conclusiones.....	57
VIII Literatura citada.....	58

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA

1	Actividad de provitamina A de algunos carotenoides.....	7
2	Biopotencia de carotenoides.....	7
3	Relación del índice de pigmentación de yema de huevo con naturaleza de la dieta.....	12
4	Máxima absorbancia de carotenoides comunes.....	17
5	Fases móviles y programa de elución.....	30
6	Valores de Rf.....	35
7	Tiempos de retención para los diferentes estándares utilizados.....	40
8	Resultados de la determinación de α -caroteno y β -caroteno de la muestra control.....	43
9	Contenido de carotenoides en hojas de cinco especies de <i>Leucaena</i> durante la primavera.....	48
10	Contenido de carotenoides en hojas de cinco especies de <i>Leucaena</i> durante la primavera.....	48
11	Prueba de t Student para hojas adultas colectadas en la época de invierno para las cinco especies de <i>Leucaena</i>	50
12	Prueba de t Student para hojas adultas colectadas en la época de primavera para cinco especies de <i>Leucaena</i>	51
13	Prueba de t Student para los valores de diferencia de α -caroteno y β -caroteno en hojas adultas de las dos épocas.....	52
14	Prueba de t Student para hojas jóvenes en época de primavera.....	54

FIGURA

1	Productos de degradación de β -caroteno.....	4
2	Estructuras de carotenoides.....	5
3	Espectro de absorción de los estándares de carotenoides.....	37
4	Cromatograma obtenido de una mezcla de estándares de carotenoides.....	39
5	Cromatograma de una muestra de <i>Leucaena collinsii</i>	42
6	Gráfica de control de la exactitud de α -caroteno.....	44
7	Gráfica de control de la exactitud de β -caroteno.....	45

8	Gráfica de control de la precisión de α -caroteno.....	46
9	Gráfica de control de la precisión de β -caroteno.....	47

RESUMEN

La *Leucaena* es un género de Leguminosas que ha sido estudiado como fuente de pigmentos naturales, aunque existen pocas referencias, comparada con otras fuentes usadas para este fin como la alfalfa, resultó ser buena fuente. Sobre la base de lo anterior, el objetivo del trabajo fue determinar la variación del contenido de carotenoides en hojas de cinco especies de *Leucaena*, durante dos épocas del año y diferente estado de maduración de la hoja. La técnica utilizada fue CLAR y parte importante fue la modificación que se realizó al método analítico y que consistió en adicionar como antioxidante la combinación de ácido ascórbico y BHT. También fue el uso de extracción en fase sólida la cual trajo como beneficios la utilización de volúmenes pequeños para la extracción. Estas modificaciones no influyeron en los resultados comparados con el método normalmente usado.

Los resultados más importantes fueron: tanto para primavera como invierno existen diferencias altamente significativas para α -caroteno y β -caroteno entre las hojas adultas de las cinco especies estudiadas. Lo anterior pudiera deberse a un comportamiento distinto de las especies introducidas en el estado de Nuevo León que en su hábitat natural. La especie *shannoni* fue la que registró mayor contenido de carotenoides comparada a otras en época de invierno, sin embargo en primavera la que registró mayor contenido fue *collinsii*. En general *collinsii* y *shannoni* fueron las mejores especies comparadas con *pulverulenta* y *greggii*. Finalmente se concluye que los valores de α -caroteno fueron superiores en la época de primavera y β -caroteno más alto en invierno para todas las especies.

I-INTRODUCCIÓN

Gran parte de los matorrales xerófilos del noreste de México están constituidos por numerosas especies de la familia *Leguminosae* entre otras, encontrándose en el estado de Nuevo León 261 especies, ocupando el tercer lugar en importancia desde el punto de vista de diversidad biológica (Alanís y González, 1994). El género *Leucaena* forma parte de dicha familia y a pesar de que es una leguminosa nativa de México, no ha sido debidamente aprovechada y explotada en toda su potencialidad (Foroughbakhch y Hauad, 1989). Diferentes estudios han mostrado que las especies de *Leucaena* contienen un alto porcentaje de proteína cruda, (Gupta *et al.*, 1986) la cual en su mayoría es digestible. Dada la amplia distribución biológica del género *Leucaena* en los trópicos y subtropicos del mundo, especialmente de México, se han reportado numerosos usos como protección y recubrimiento de áreas en suelos marginales y erosionados (Foroughbakhch y Hauad, 1990; Foroughbakhch, 1992), obtención de gomas para uso farmacéutico (Anderson, 1984), preparación de concentrados proteicos (Telek, 1982) también se ha encontrado variedades de *Leucaena leucocephala* (Var. K8, K28 y K743) con altos contenidos de xantofilas 741-766 mg/ kg en base seca (D'Mello y Taplin, 1978). Diversos estudios realizados hasta la fecha indican que las especies del género *Leucaena* son una buena fuente de pigmentos naturales (Angulo, 1985). Y existen muchos factores que pueden influir en el contenido de carotenoides en los vegetales por ejemplo clima, uso de fertilizantes, pesticidas, tipo de suelo, etc. (Gross, 1991). Debido a la exigencia, cada vez mayor, de los consumidores, por evitar el uso innecesario de aditivos sintéticos en la búsqueda de una alimentación más sana y natural, en los últimos diez años se ha incrementado el uso de colorantes naturales desplazando a los sintéticos (Collins y Timberlake, 1993). Actualmente diversos estudios muestran que el 0.1% de la población es sensible al uso de tartrazina (colorante sintético amarillo 5) lo cual les provoca problemas de alergias (Blenford, 1993).

Entre los pigmentos naturales destacan los carotenoides, estos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales (Emodi, 1978), de acuerdo con Badui, (1993) hasta la fecha se han identificado más de 420 diferentes carotenoides. Los carotenoides reciben una atención especial por su importancia nutricional. (Martin, *et al.*, 1984). Se ha estudiado que bajos niveles sanguíneos de β -caroteno (valor normal 50-300 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$), aumentan el riesgo de contraer cáncer (Collins, Timberlake, 1993). Según evidencia epidemiológica hay una reducción de riesgo de contraer cáncer de cabeza, cuello, esófago, pulmón y tracto digestivo, con la ingesta de altos niveles de β -caroteno (German, 1994). Por lo tanto recientemente se han incrementado los requerimientos dietéticos diarios de ésta provitamina, considerándose que impartir color a los alimentos con β -caroteno es provechoso, pues además de utilizarse ampliamente para impartir el color amarillo-naranja, éste es identificado como provitamina A como menciona Haehnlein, (1994). En México la Ley General de Salud en el título noveno, capítulo I, artículo 690 (1996) clasifica al β -caroteno y al β -apo-8-carotenal como colorantes orgánicos naturales permitidos para el uso alimenticio y farmacéutico. Por todo lo anterior sería muy importante ampliar los estudios de la *Leucaena* en áreas de importancia química y bioquímica tomando en cuenta que aún no están cuantificados sus pigmentos. En el presente trabajo se pretende evaluar el contenido de carotenoides con la finalidad de optimizar el uso de *Leucaena* y ver la posibilidad de que pudiera explotarse económicamente para proporcionar color a los alimentos y elevar al mismo tiempo su valor nutricional.

II- ANTECEDENTES

2.1-Descripción y características químicas de los carotenoides

2.1.1-Naturaleza química de los carotenoides

Los colores rojos, amarillos y naranjas en muchos vegetales son originados por la presencia de carotenoides, este grupo se clasifica dentro de los pigmentos liposolubles. Deben su nombre al hecho de que el carotenoide β -caroteno fue aislado por primera vez de las zanahorias (*Daucus carota*) y caracterizados como derivados isoprenoides. En la actualidad se conocen aproximadamente 450 tipos diferentes de colorantes (Badui, 1993). La estructura química básica de la mayoría de estos compuestos es poliénica de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades de isopreno, cuyo arreglo se hace inverso en el centro, y pueden ser de cadena lineal o tener ciclos en los extremos. Las reglas de nomenclatura IUPAC, (1971) para los nombres semi-sistemáticos de los carotenoides se construye con la adición de 2 letras griegas como prefijo al nombre caroteno, éstos prefijos son características de los 2 grupos finales:

Letra griega (psi) para acíclico, letra griega (beta) para ciclohexano, letra griega (kappa) para ciclopentano, etc. (Gross, 1987).

Se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo con la estructura química: carotenoides y xantofilas. Los primeros tienen características de hidrocarburos, son solubles en éter de petróleo, tetrahidrofurano y entre ellos están α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno y licopeno. Por su parte, las xantofilas son la forma oxidada de los carotenoides y se presentan como aldehídos, ácidos, ésteres y alcoholes, son solubles en metanol y algunos ejemplos son β -criptoxantina, β -apo-8-carotenal, luteína, fucoxantina, violaxantina, etc.(Bauernfeind, 1981)

Los carotenoides son fácilmente oxidables por el gran número de dobles enlaces que posee en su estructura. La estabilidad a la oxidación de un pigmento en particular depende mucho del medio ambiente que lo rodea. Un daño físico al tejido que contiene

carotenoides o la extracción de éstos aumenta la susceptibilidad a la oxidación y se intensifica con la presencia de iones metálicos.

Durante la oxidación se forman inicialmente epóxidos y compuestos carbonilos, más tarde se producen compuestos mono y di-oxigenados de cadena corta incluyendo a la β -ionona. Las incisiones oxidativas pueden ocurrir en una gran variedad de sitios a lo largo de la cadena de carotenoides dando como resultado productos oxigenados que muchas veces no son caracterizados.

En la siguiente figura se muestra la degradación y los posibles productos que se forman cuando los carotenoides son sometidos a diferentes procesos.

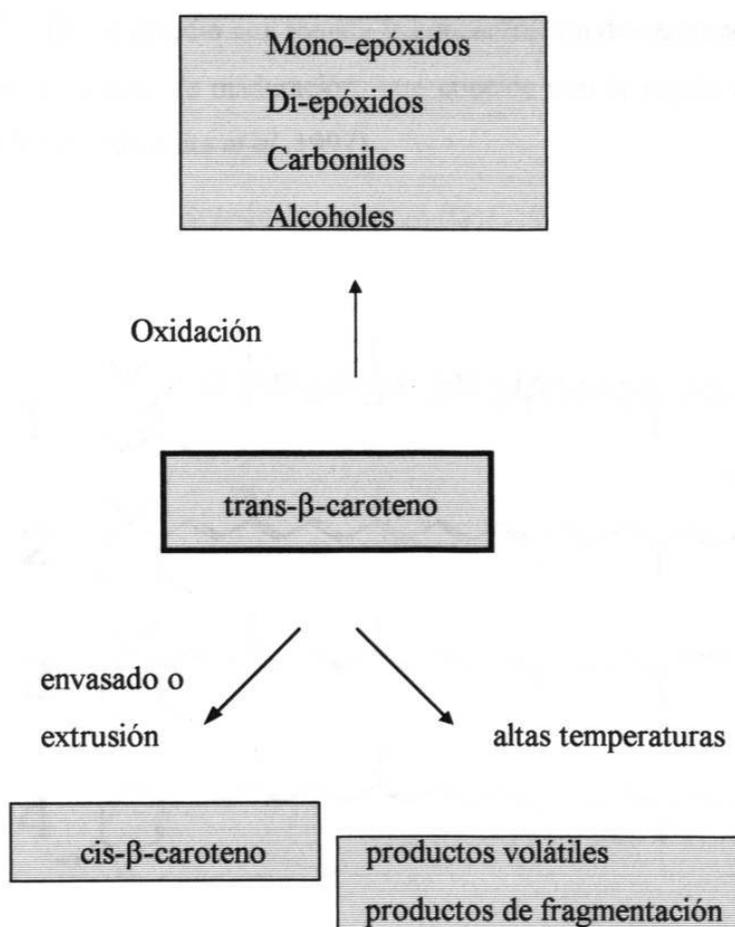


Figura 1. Productos de degradación de β -caroteno.

La degradación oxidativa también puede ser producida por la acción de enzimas, particularmente lipooxigenasa, su oxidación ocurre por mecanismos indirectos. La lipooxigenasa primero cataliza la oxidación de ácidos grasos saturados y poliinsaturados para producir peróxidos, los cuales reaccionan con los pigmentos de los carotenoides disminuyendo el color de los mismos (von Elbe y Schwartz, 1996).

Durante el proceso de maduración de muchos vegetales hay cambios característicos que, generalmente, son para incrementar el valor nutritivo, mejorar las propiedades organolépticas y favorecer la aceptación del consumidor, pero algunos micronutrientes importantes disminuyen su valor, y esto, depende directamente del proceso de maduración. En un estudio con tomate la concentración de carotenoides se incrementa en proporción al avance de maduración, que concide con la rápida acumulación del color rojo en el fruto. (Abushita *et al.*, 1997)

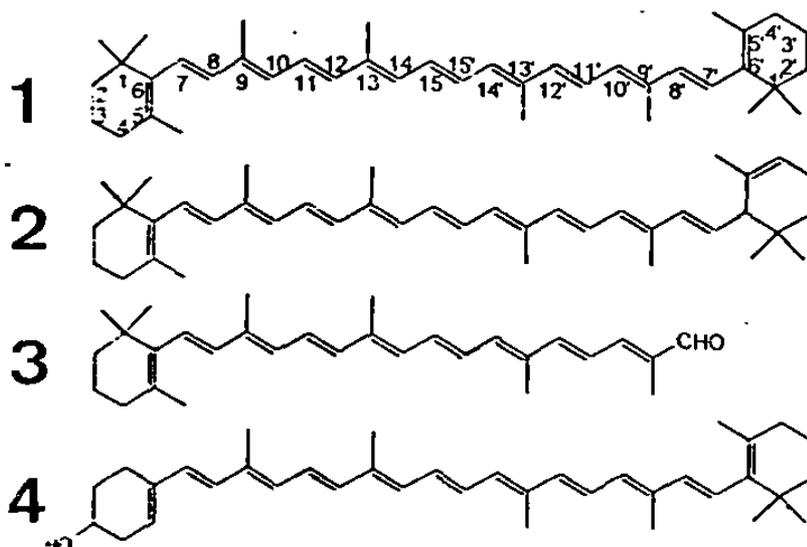


Figura 2. Estructuras de carotenoides

1. β -caroteno, 2. α -caroteno, 3. β -apo-8'-carotenal, 4. β -criptoxantina

2.1.2- Funciones biológicas de los carotenoides

Los carotenoides actúan como pigmentos antena en la captación de la energía solar en todos los tejidos que llevan a cabo el proceso de fotosíntesis y en ausencia de ellos se destruye el aparato fotosintético por fotooxidación, ya que los carotenoides tienen un efecto fotoprotector por su habilidad de inactivar oxígeno reactivo formado por exposición al aire y la luz. Además, algunos carotenoides están presentes en raíces y hojas y sirven como precursores del ácido abscísico el cual funciona como mensajero químico y regulador del crecimiento (von Elbe y Schwartz, 1996).

Algunos carotenoides sirven como precursores de vitamina A pues se transforman, con ayuda de algunas enzimas presentes en mucosa intestinal, a retinol (vitamina A) de ahí el nombre de provitaminas. El principal carotenoide es β -caroteno que se oxida mediante una enzima específica, β -caroteno-15,15'-oxigenasa para formar un peróxido. La descomposición de peróxido da como resultado 2 moléculas de retinal, (la forma aldehídica de la vitamina A), y por una reducción mediante una enzima inespecífica, que requiere NADH o NADPH, se convierte en retinol que es almacenado como éster de palmitato en el hígado (Berk, 1980; Badui, 1993).

La actividad de provitamina A de algunos carotenoides se especifica en la tabla 1 asimismo su biopotencia relativa se presenta en la tabla 2.

Tabla 1. Actividad de provitamina A de algunos carotenoides (Fuente Badui, 1993).

Carotenoide	μg correspondientes a 1 UI de vit. A
β -caroteno	0.60
β -apo-8-carotenal	0.83
criptoxantina	1.05
α -caroteno	1.13
γ -caroteno	1.43

Tabla 2. Biopotencia de carotenoides (Tomado de Bauernfeind, 1981)

Carotenoide	Biopotencia relativa (%)
β -caroteno	100
β -apo-8-carotenal	72
β -criptoxantina	57
α -caroteno	50-54
γ -caroteno	42-50
β -zeacaroteno	20-40
luteína	inactivo
licopeno	inactivo
cantaxantina	inactivo

El carotenoide β -caroteno tiene la más alta actividad de vitamina A y por lo tanto se le asignó el 100%. El asignar ésta biopotencialidad es relativo, pues están basadas en estudios con animales. El único carotenoide intensamente estudiado en humanos es β -caroteno (Erdman *et.al.*, 1988).

Otro factor importante para cuantificar β -caroteno en los alimentos y productos vegetales que lo contienen, es el demostrado por estudios recientes (Block y Langseth, 1994), los cuales han constatado que un incremento en el consumo de vegetales y frutas elevan el nivel de β -caroteno en sangre, asociándolo con la reducción del riesgo de cáncer de cabeza, cuello, esófago, pulmón y tracto digestivo. En las sociedades industrializadas el cáncer tiene el segundo lugar como causa de muerte dando un total de 2.3 millones cada año.

La actividad antioxidante del β -caroteno inhibe la acción de radicales libres que dañan el material genético de la célula o macromoléculas como lípidos y proteínas. Hay que señalar que la conversión de la forma trans a cis en β -caroteno reduce mucho la actividad antioxidante que posee trans β -caroteno (Sies, 1991). Y la actividad de provitamina A de cis β -caroteno es más baja comparada con la forma trans (Hulshof *et al.*, 1997).

2.2-Los pigmentos en la industria

2.2.1-Industria alimentaria

El color en los alimentos es un factor de calidad muy importante que influye significativamente en la aceptación de dicho alimento, y éste puede ser rechazado aunque su calidad en cuanto a sabor, aroma, textura, valor nutricional, etc., sea excelente. Por lo tanto sobre la base de lo anteriormente mencionado, actualmente ésta es una razón por lo que la industria de alimentos emplea diferentes materiales, ya sean sintéticos o naturales, para impartir color a los alimentos y hacerlos más aceptables al consumidor (Badui, 1993).

Los colores son adicionados en los alimentos por las siguientes razones:

- a) Restaurar la apariencia original del producto cuando el color natural ha sido destruido por un proceso de calentamiento.
- b) Asegurar uniformidad en tonos evitando variaciones naturales en intensidad de los mismos.
- c) Intensificar colores en alimentos donde han sido disminuidos.
- d) Como indicador visual de la calidad (Tórrez, 1997).

En el uso efectivo de los colorantes en la industria alimentaria influyen varios factores tales como: cuestiones estéticas, técnicas, regulatorias y de mercado (Meggos, 1994). Dado que el colorante juega un papel importante en la comercialización del producto se deben tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- a) Verificar las características de un buen colorante (color homogéneo, permanencia y estabilidad térmica).
- b) Fácil adquisición.
- c) Conocer avances tecnológicos y formas de aplicación del mismo.
- d) Estar al día en innovaciones y productos con más ventajas.

Desde el punto de vista empresarial, el color se convierte en elemento fundamental para el éxito o fracaso comercial de la mayoría de los alimentos, siendo, además herramienta para el desarrollo de nuevos productos.

Los carotenoides como colorantes alimenticios en pasta se utilizan mucho en productos con base grasa como queso, mantequilla, margarina, helados y aceites. En productos con base agua como las bebidas carbonatadas, se requiere de una tecnología especial para formar la emulsificación o dispersión coloidal en presencia de agentes surfactantes activos (Riber-Nielsen, 1990).

Por otra parte el incremento en la demanda del consumidor por el uso de pigmentos naturales es un hecho, disponiéndose en el mercado de tres carotenoides sintéticos, β -caroteno, β -apo-8'-carotenal y cantaxantina idénticos a los naturales y a precios razonables (Straub, 1987).

Las clases principales de los pigmentos naturales en los alimentos procesados son: los carotenoides y sus derivados cetónicos o hidroxílicos, los extractos de remolacha, las antocianinas, las riboflavinas, el carmín de la cochinilla, las clorofilas y sustancias alimenticias coloridas naturalmente como los pimientos, la cúrcuma, el azafrán y la madera de sándalo, así como los extractos concentrados de éstos materiales (Davies, 1976).

En México la Ley General de Salud, (1996) en el título noveno, capítulo I, artículo 690, define por colorante lo siguiente:

La sustancia obtenida de los vegetales, animales o minerales, o por síntesis empleada para impartir o acentuar el color en alimentos y bebidas; comprende los siguientes:

- I. Colorantes orgánicos naturales, los de origen vegetal o animal;
- II. Colorantes orgánicos sintéticos
- III: Colorantes minerales.

Art. 692 de la misma ley se especifica que los colorantes orgánicos naturales permitidos son los siguientes:

- I. Aceite de zanahoria (*Daucus carota*, L.);
- II. Achiote, annato (extracto de semillas de *Bixa orellana*);
- III. Azafrán (estigmas de *Crocus sativus*, L.);
- IV. β -apo-8-carotenal;
- V. Betabel deshidratado;
- VI. β -caroteno;
- VII. Caramelo;
- VIII: Clorofila;
- IX. Cochinilla (extracto de *Coccus cacti*, L.) o carmín;
- X. Cúrcuma (polvo y oleo-resina del rizoma de *Cúrcuma longa*, L.)
- XI. Extracto del tegumento de uva (enocianina);

- XII. Harina de semilla de algodón, cocida, tostada y parcialmente desgrasada;
- XIII. Jugos de frutas;
- XIV. Jugos de vegetales;
- XV. Pimiento;
- XVI. Pimiento oleo-resina
- XVII. Riboflavina;
- XVIII. Xantofilas: flavoxantina, rubixantina, zeaxantina y productos naturales aprobados que las contengan, y
- XIX: otros que determine la Secretaría.

En La Norma Oficial Mexicana, NOM-119-SSA, 1-1994. Bienes y servicios. Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza, los colorantes orgánicos naturales deben llevar especificaciones sanitarias.

Según la clasificación, para efectos de esta norma los colorantes orgánicos naturales permitidos son:

En alimentos: aceite de zanahoria (*Daucus carota*, L.), achiote, annato (extracto de semillas de *Bixa orellana*), azafrán (estigmas de *Crocus sativus*, L.), β -apo-8-carotenal, betabel deshidratado, β -caroteno, cantaxantina, color caramelo, clorofila, cochinilla (extracto de *Coccus cacti*, L.) o carmín, cúrcuma (polvo y oleo-resina del rizoma de *Cúrcuma longa*, L.) extracto del tegumento de uva (enocianina), harina de semilla de algodón, cocida, tostada y parcialmente desgrasada, jugos de frutas, jugos de vegetales, pimentón en polvo (*Capsicum annum*, L.), paprika, oleo-resina de pimentón, riboflavina, riboflavina-5-fosfato, éster apocarotenoico y xantofilas.

En productos de perfumería y belleza: achiote, annato (extracto de semillas de *Bixa orellana*), β -caroteno; cochinilla (extracto de *Coccus cacti*, L.) o carmín, color caramelo, guaiazuleno, guanina, y henna. Estos colorantes orgánicos naturales deben cumplir con las especificaciones físicas, químicas, de identidad y pureza que menciona dicha Norma.

2.2.2-Industria agropecuaria

Desde hace muchos años se han fabricado dietas para aves conteniendo xantofilas con el propósito de obtener una coloración amarilla de la piel y yema de huevo. Los pigmentos se mezclan en la dieta en niveles muy variables (Lackey, 1961). En la siguiente tabla se muestra como influye la dieta conteniendo carotenoides con el nivel de pigmentación de la yema de huevo.

Tabla 3. Relación del índice de pigmentación de yema de huevo con naturaleza de la dieta

Índice de pigmentación de yema de huevo	Naturaleza de la dieta
2	Dieta Libre de Pigmento (dlp)
14	DLP + 0.125 % (pétalos de cempasúchil)
16	DLP + 0.250 % (pétalos de cempasúchil)
10	DLP + 2.5 % (alfalfa)
11	DLP + 5.0 % (alfalfa)
7	DLP + 0.5 % (achiote)
10	DLP + 1.0 % (achiote)

(Fuente: Lackey, 1961)

2.2.3-Industria farmacéutica

En la industria farmacéutica, los carotenoides en especial β -caroteno se aprovecha y se usa más en complementos vitamínicos por sus propiedades nutricionales que por sus propiedades como colorante. El principal uso farmacéutico de los carotenoides es la prevención y corrección de la deficiencia de vitamina A en los humanos (Goodwin, 1980).

El Departamento de Agricultura de E.U.A. y el Instituto Nacional del Cáncer sugiere una ingesta de 5 a 6 mg por día, desafortunadamente muchas dietas incluyen solamente 1.5 mg por día (Henkel, 1995). German, (1990) ha publicado que es necesario una ingesta diaria de β -caroteno de 6-10 mg para gozar de buena salud y disminuir riesgos de algunas enfermedades como cáncer y enfermedades cardiovasculares.

2.3-Uso de la *Leucaena* como fuente de pigmentos

En un estudio realizado por D' Mello y Taplin, (1978) determinaron un alto contenido de xantofilas en las hojas de la *Leucaena leucocephala*, el cual fue reportado con valores de 741-766 mg/kg de materia seca, posteriormente, otro estudio realizado por Wood *et al.*, (1983) reporta contenidos de carotenos y xantofilas de 446-865 mg/kg en base seca. Por lo tanto, la *Leucaena* puede utilizarse como fuente de pigmentos para impartir color a pollos y yema de huevo. Estudios llevados a cabo por D'Mello y Acamovic, (1985) indican que una pequeña proporción de 50 g de hoja de *Leucaena* por kg de alimento para pollos es 10 veces más efectiva que la misma cantidad de maíz amarillo utilizado para pigmentación. De acuerdo con Vernon *et al.*, (1996) y Carter *et al.*, (1994) existen varios estudios de la utilización de otras fuentes de carotenoides como pétalos de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y chile ancho (*Capsicum annum*), en la dietas para camarón blanco (*Panaeus vannamei*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus myriis*)

donde se obtuvieron buenos resultados de depósito de pigmentos, principalmente β -caroteno en exoesqueleto del camarón y piel en trucha .

En un estudio realizado con vegetales consumidos en Indonesia encontraron que el grado de madurez es una variante a considerar en cuanto al contenido de carotenoides, pues mostró que el contenido de provitamina A fue significativamente más alto en hojas maduras (24% de la media) que en hojas jóvenes, y que el nivel de provitamina A fue significativamente más bajo en hojas de vegetales adquiridos en el mercado comparadas con hojas cosechadas (19 % de la media). Los vegetales adquiridos del mercado tienden a tener niveles más bajos de luteína, α -caroteno, trans β -caroteno, cis β -caroteno y de carotenoides totales comparados con las cosechadas (Hulshof *et al.*, 1997). La *disminución del contenido de carotenoides en las muestras del mercado se puede atribuir a una degradación post-cosecha de los carotenoides debido a un fotoescaldado.* (Young y Britton, 1990)

2.4-Obtención de pigmentos

2.4.1-Aislamiento de los carotenoides

Según Groos, (1987) el aislamiento de carotenoides involucra los siguientes pasos:

1. Extracción
2. Saponificación
3. Separación

1) La extracción de los carotenoides consiste en remover los carotenoides hidrofóbicos del medio hidrofílico. Los solventes no polares son de poco uso en la extracción de carotenoides porque limitan su penetración en la masa hidrofílica que rodea el pigmento. Por otra parte, los solventes polares disuelven muy poca cantidad de

carotenos. Puede decirse como postulado que la extracción de carotenoides debe comenzar por una reducción de la cantidad de agua a muy bajo nivel y posteriormente la extracción con solventes no polares en presencia de solventes polares. La mayoría de los métodos de extracción se basa en este principio (Howard, *et al.*, 1994).

Un método para la extracción de carotenoides utilizado por Bureau y Bushway, (1986) tiene como ventaja que no necesita de una saponificación y consiste básicamente en utilizar THF estabilizado con BHT como solvente para extraer carotenoides.

Los métodos de extracción con éter de petróleo en Soxhlet o Goldfisch son poco eficientes porque existe gelatinización de almidones, caramelización de azúcares y desnaturalización de las proteínas que forman alrededor de los lípidos (carotenoides) una capa resistente al éter de petróleo y por lo tanto no puede solubilizarlos (De Ritter y Purcell, 1981). Otro método más innovador para extracción de los carotenoides y limpieza del extracto es una extracción en fase sólida que consiste en una cromatografía de líquidos en pequeñas columnas y tiene como ventajas reducir los volúmenes de solventes utilizados para la extracción, además de que hace innecesaria la saponificación como procedimiento de purificación del extracto en la cual podría haber pérdidas de analitos; finalmente son innecesario altas temperaturas de calentamiento para concentrar los carotenoides (Eskins y Dutton, 1979).

2) La saponificación Gross (1987) la define como un procedimiento de purificación para remover los lípidos no deseados y las clorofilas, hidrolizar los ésteres del carotenol (Kimura *et al.*, 1990) y liberar a las xantofilas esterificadas. (Lietz y Henry, 1997). Posteriores estudios, de Ng y Tan, (1988) demuestran que la saponificación de los extractos de carotenoides si influye en los resultados pues puede destruir y transformar estructuralmente a algunos carotenoides y empezar una *cis* isomerización de los carotenoides durante la extracción. El isomerismo de los pigmentos de los carotenoides empieza tan pronto como son solubilizados y no puede ser detenido por el almacenamiento en frío. (Lesellier *et al.*, 1993). Además, según Pesek (1990), la isomerización de β - caroteno es mayor en solventes clorados.

En la investigación de Khachik *et al.*, 1986 la saponificación (tratamiento alcalino) en los carotenoides en vegetales verdes analizados por CLAR y su evaluación cuantitativa

mostró que es acompañada de una pérdida significativa de xantofilas, particularmente epoxicarotenoides, y que los carotenos no sufren una pérdida considerable.

Es bien conocido que las pérdidas de carotenoides pueden reducirse por el uso de antioxidantes durante la saponificación y el BHT es muy usado para éste propósito (Lietz y Henry, 1997).

Algunos investigadores (Khachik *et al.*, 1986, Kimura *et al.*, 1990, Craf y Granado-Lorencio 1992) han encontrado pérdidas significativas de carotenoides después de la saponificación. Para minimizar éstos efectos el método de CLAR utilizado para la determinación de carotenoides en aceite de palma ha sido modificado usando una lipasa de *Candida cylindracea* para la hidrólisis. La lipasa microbiana de *C. Cylindracea* no específica (Macrae, 1983) hidroliza preferentemente ácidos grasos saturados y monoinsaturados de 14 a 18 átomos de carbono (Lie y Lambertsen 1986). Como el aceite de palma consiste de 44% de C₁₆ y 39% de C_{18:1} (May, 1994) la lipasa de *C. cylindracea* es una buena herramienta para hidrolizar el aceite de palma. (Lietz y Henry, 1997)

3)En el método de Groos (1987), después de la saponificación le procede la separación, en donde el contenido de la saponificación es mezclado con éter en un matraz de separación disolviéndose en él los carotenoides no saponificados, enseguida se realizan lavados continuos hasta que el extracto esté libre de álcali, y posteriormente es secado al vacío para su concentración. La diversidad de los carotenoides en los extractos de algunas plantas dificulta la separación de éstos por un procedimiento de un solo paso; y por lo general estos procedimientos son más complicados. (Abushita *et al.*, 1997)

2.4.2-Técnicas de detección

Como los carotenoides son compuestos coloreados con una alta proporción de dobles enlaces conjugados es factible utilizar un detector UV/Vis con arreglo de diodos. Los detectores espectrofotométricos de UV/Vis más potentes que existen son instrumentos de diodos, que permiten recoger los datos de un espectro completo en,

aproximadamente, un segundo. De esta forma los datos espectrales para cada pico cromatográfico se pueden recoger y almacenar a medida que van saliendo de la columna y presentar los datos en una gráfica tridimensional que resulta útil para la identificación de los carotenoides eluidos y seleccionar las condiciones más adecuadas para la determinación cuantitativa (Skoog y Larny, 1994), también contribuye en gran medida, a la validación del método (De Leenheer y Nelis, 1992; Greenfield y Southgate, 1992; Ben-Amotz, 1995).

En muchos casos los carotenoides son identificados por comparación de gráficos de absorbancia máxima de longitud de onda con estándares (Zonta *et al.*, 1987). Cada carotenoide es caracterizado por su espectro de absorción, en donde generalmente aparecen 3 bandas que están en función del número de dobles enlaces. La posición de la máxima absorción es afectada por la longitud del cromóforo, la naturaleza de los dobles enlaces de la cadena o el anillo y la aparición de un doble enlace conjugado en el anillo o su eliminación por oxidación.

La máxima absorción de carotenoides más comunes se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 4. Máxima absorbancia de carotenoides comunes de acuerdo con Davies, (1976).

Carotenoide	λ	λ	λ
α -caroteno	423	444	473
β -caroteno	425	450	478
γ -caroteno	380	400	424
licopeno	447	472	504
zeaxantina	427	451	480
fitoflueno	331	348	367
violaxantina	418	440	470
anteraxantina	420	444	472
mutatoxantina	404	427	453
β -citraurina	402	424	450

Mercadante *et al.*, 1997) opinan que se puede realizar una identificación provisional de los carotenoides con el uso de tiempo de retención, co-inyección de estándares de carotenoides y con el espectro de absorción visible obtenido mediante el detector de arreglo de diodos, pero que la identificación puede ser confirmada por espectrometría de masas (ión molecular, patrones de fragmentación, intensidad relativa m/z), y que el uso correcto de éstos otros parámetros puede proveer una fuerte evidencia para la identificación de los carotenoides más comunes.

Una técnica más de detección, es la espectroscopia de IR que se basa en que cada molécula presenta un espectro característico e individual en el rango de las frecuencias IR de la radiación electromagnética, y puede utilizarse para detectar e identificar carotenoides (Mayo *et al.*, 1989).

2.4.3-Técnicas de cuantificación de carotenoides

Existen varias técnicas para cuantificación de carotenoides, y muchos más métodos descritos de los cuales son ampliamente utilizados los de la AOAC, CLAR, (Simpson, 1983; Bureau y Bushway 1986; Greenfield y Southgate 1992; Craft y Granado-Lorencio 1992; Howard. *et al.*, 1994)

2.4.3.1-Método AOAC (1990)

El método oficial de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC,1990) consiste en una extracción, una saponificación en caliente o en frío, una cromatografía en columna y la elución de carotenoides, para su posterior determinación cuantitativa que es espectrofotométrica y se basa en que la densidad óptica de volúmenes y cantidades conocidas de carotenoides es leída a longitud de onda específica. El caroteno de la muestra es calculado y se expresa como β -caroteno.

Algunos autores opinan que el método del AOAC para el análisis de carotenoides es tedioso y potencialmente inadecuado porque al hacer la saponificación de los extractos de carotenoides hay pérdida de éstos y los resultados no representan verdaderamente la composición que existe en los tejidos vegetales. (Simpson, 1983, Bureau y Bushway 1986, Howard. *et al* 1994)

Según Francis e Isaksen, (1988) las técnicas para el análisis de carotenoides más usadas son:

Cromatografía en capa fina (CCF), Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y espectrofotometría.

2.4.3.2-Cromatografía en capa fina.

De las citadas anteriormente, la cromatografía en capa fina tiene como ventajas; que es una técnica sensible, sencilla, rápida, de bajo costo y no requiere de operadores especializados como la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Los sistemas para cromatografía en capa fina de carotenoides consisten en:

Una técnica de cromatografía de fase normal usando una fase estacionaria polar (cromatofolios de alúmina o sílica) y una fase móvil no polar como hexano, éter de petróleo o benceno y un compuesto orgánico más polar que los mencionados anteriormente como acetona, cloroformo o metanol; que nos dará por consiguiente una amplia variedad de sistemas con diferentes solubilidades para separaciones especializadas de carotenoides con diferentes solubilidades.

Por muchos años se ha utilizado la cromatografía fase normal usando mezclas de acetona-éter de petróleo (de punto de ebullición 40-60° C) como fase móvil y cromatofolios de sílica como fase estacionaria. Pero éstas mezclas de eluentes no separan bien a los carotenoides sustituidos. Este método fue utilizado para la separación de carotenoides por Jensen y Liaaen-Jensen, (1959) utilizándose como adsorbente sílica gel y un solvente o mezcla de ellos, no es necesario utilizar un método de revelado pues los carotenoides son coloreados. Una mejor separación de carotenoides se puede realizar usando una cromatografía en sílica gel y un sistema de solventes éter de petróleo-acetona (70:30). (Gross, 1987)

Recientemente, Anderton *et al.*, (1997) utilizaron la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) combinada con densitometría para la cuantificación de licopeno en bebidas alcohólicas y no alcohólicas siendo este un método preciso. Los autores concluyen que fue un buen método en el caso de licopeno y recomiendan sea probado en otros carotenoides.

2.4.3.3-Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

De las técnicas comúnmente utilizadas para la cuantificación de carotenoides está la cromatografía de líquidos de alta resolución cuyas ventajas son las siguientes:

- a) Es una técnica muy precisa.
- b) Detecta mínimas cantidades de analito.
- c) Posee buena resolución para compuestos de polaridad semejante.

El potencial de esta técnica para la separación y cuantificación de carotenoides ha sido demostrado desde hace varios años; Stewart y Wheaton, (1971) usaron columnas de óxido de magnesio para separar carotenos y carbonato de zinc para xantofilas. La técnica de CLAR usando columnas de C18 puede ser utilizada para investigar compuestos carotenoides de muestras naturales y separar carotenoides de un amplio rango de polaridad (xantofilas, dioles, hidrocarburos y ésteres de carotenoides).

Las técnicas de extracción y de inyección juegan un papel central en el análisis, en este sentido, Craft y Granado-Lorencio (1992) utilizaron como solvente para la extracción de carotenoides una mezcla de éter dietílico y éter de petróleo. Además de lo anterior, el solvente utilizado para la inyección en el CLAR debe de ser cuidadosamente seleccionado ya que solventes para la inyección como cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, benceno y tolueno pueden distorsionar los picos de los carotenoides en los cromatogramas, si existe incompatibilidad de éstos con la fase móvil (Khachik *et al.*, 1988). Por lo anterior, es muy importante tener presente las propiedades de solubilidad y polaridad, tanto del solvente de inyección como de los utilizados como fase móvil. Con lo que se concluye que las propiedades de inyección del solvente y fase móvil deberán ser compatibles.

Ultimamente, Hulshof *et al.*, (1997), en estudios con vegetales cuantificaron los carotenoides por comparación con estándar externo y seis niveles de calibración se inyectaron antes de la corrida de cada muestra. Las muestras fueron inyectadas por duplicado y la elución de los carotenoides se monitoreó a 450 nm incluyendo un blanco de solvente en cada corrida. Los carotenoides fueron identificados por comparación con sus tiempos de retención de los estándares, así como por su análisis espectral para la medición de la pureza de picos. La concentración de cada carotenoide fue determinada de la media de 2 análisis y el área de pico fue seleccionada para la determinación de la concentración de cada compuesto.

III- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GENERAL

Determinar la variación del contenido de carotenoides en hojas de cinco especies del género *Leucaena*, durante diferentes épocas del año y estado de maduración de la hoja.

3.2- OBJETIVOS PARTICULARES

Conocer la fluctuación en el contenido de carotenoides en cinco especies del género *Leucaena*.

Evaluar los niveles de carotenoides en dos estados de maduración de las hojas del género *Leucaena*.

Determinar el efecto de dos épocas del año sobre los niveles de carotenoides en cinco especies del género *Leucaena*.

3.3- HIPOTESIS

El contenido de carotenoides de diferentes especies varía entre las especies, estaciones del año y componentes de la planta.

IV- MATERIAL Y MÉTODOS

La etapa experimental se dividió en una fase de campo y otra de laboratorio.

4.1-Fase de campo

4.1.1-Características del área de estudio

El trabajo de campo para la recolección del material de estudio se efectuó en el campus universitario de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L. ubicado en el municipio de Linares, N.L. con coordenadas geográficas de 24° 47' N / 99° 32' W, con una altitud de 370 msnm. El clima prevaleciente en la región es semicálido-subhúmedo, el suelo es de origen aluvio-coluvial profundo, con un alto contenido en arcilla, bajo en materia orgánica y deficiente en fósforo y nitrógeno, el pH del suelo es moderadamente alcalino (Foroughbakhch y Heiseke, 1985).

La plantación de especies y de las variedades de las especies del género *Leucaena* se efectuó en 1983 en un matorral mediano sabinerme espinoso y ahí se efectuó el muestreo de la vegetación.

4.1.2- Selección de especies y el muestro

La selección de especies de *Leucaena* se basó en un estudio previo donde se llevó a cabo la deshidratación de las hojas de diferentes especies utilizando prensas botánicas y papel periódico. Después de este proceso el color aparente de las hojas deshidratadas fue mi factor principal de la selección. El muestro del material vegetal se llevó a cabo en el campo experimental aplicando un muestreo aleatorio simple de acuerdo con Cochran, (1990) donde se seleccionó de 3 a 5 árboles en forma aleatoria sobre los cuales se efectuó la colecta de las hojas jóvenes (creciente) y adultas. Las especies seleccionadas fueron: *Leucaena collinsii*, *L. greggii*, *L. leucocephala*, *L. pulverulenta* y *L. shannoni*.

Todo el material colectado fue pesado en el campo y conservado en bolsas de papel.

4.1.3- Diseño estadístico

Para el análisis de datos en la cuantificación de carotenoides se utilizó la prueba “t” de Student para muestras pequeñas para las cinco especies en estudio, donde se estimó los valores promedios, la varianza, la desviación estándar y los intervalos de confianza para cada especie.

Para detectar diferencias significativas entre el contenido de carotenoides de las especies en dos épocas del año (primavera e invierno) se efectuó un análisis de Wilcoxon para las diferencias de valores (Zar, 1996).

4.2-Fase de laboratorio

4.2.1-Reactivos

1. Solventes.

Se utilizaron metanol, acetonitrilo y cloruro de metileno grado HPLC de marca Sigma-Aldrich para la técnica de CLAR.

Para la técnica de CCF se utilizó como eluentes: acetona, éter de petróleo (35-60°C) y metanol grado analítico de marca Mallinckrodt.

2. Carotenoides.

Se utilizaron como estándares α -caroteno de marca Sigma tipo V: de zanahorias libre de β -caroteno, β -caroteno de marca Sigma-Aldrich tipo II sintético con pureza de 95 % mínimo (CLAR); β -criptoxantina y β -apo-8-carotenal fueron donados por Productos Roche ambos con una pureza de 99.7 %.

3. Agente de evaporación de solventes.

Se empleó nitrógeno gaseoso grado cromatográfico marca INFRA

4. Antioxidantes.

Se usó butilhidroxitolueno (BHT) marca Productos Monterrey y ácido ascórbico marca Merck

5. Celite marca Merck

4.2.2-Equipo

1. Cromatofolios de soporte de plástico con sílica gel 60 F 254 Marca Merck.

2. Cartuchos de extracción en fase sólida

Se emplearon cartuchos empacados con 500 mg de fase C-18 (Supelclean LC-18 de Supelco) de 6 mL de capacidad.

3. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Beckman System Gold equipado con un módulo de solventes programable modelo 126, un detector de arreglo de diodos modelo 168 , un inyector de loop de 20 μ l y una computadora personal system/2 modelo 50Z marca IBM con el software System Gold 5.1 para el manejo del cromatógrafo y de la información resultante.

4. Columna

Se empleó una columna analítica con las siguientes características: ODS Ultrasphere marca Beckman de una longitud de 150 mm, diámetro interno de 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m.

5. Filtros

Filtros de disco Durapore (Millipore) de 13 mm y 47 mm de diámetro, ambos de 0.45 μ m de tamaño de poro.

6. Bomba de vacío

Bomba de vacío marca Muffler.

7. Agitador

Agitador Thermolyne modelo Cimarec 2.

8. Agitador Baxter modelo S/P.

4.2.3- Análisis cualitativo mediante la técnica de Cromatografía en Capa Fina.

La extracción de los carotenoides se efectuó según el método de Bureau y Bushway (1986) utilizado para el análisis de carotenoides en frutas y vegetales comunes de Estados Unidos de América. Se pesaron aproximadamente 10 g de muestra (hojas secas, molidas y tamizadas) en un matraz erlenmeyer obscuro para evitar la descomposición de carotenoides por la luz y se agregaron 10 g de sulfato de sodio anhidro, 1 g de carbonato de sodio y 75 mL de tetrahidrofurano, se agitó y enfrió en hielo por 5 min y se filtró utilizando un matraz Buchner y papel filtro Whatman #42 de 11 cm de diámetro. Con los extractos obtenidos de ésta manera se procedió a realizar la cromatografía en capa fina, probando diferentes fases móviles.

Para el análisis de las diferentes fases móviles se utilizó como fase estacionaria cromatofolios con soporte plástico con sílica gel 60 F 254, de espesor 0.2 mm marca Merck sin activar.

Las fases móviles que se analizaron fueron las siguientes:

- 1) éter de petróleo: acetona (70:30)
- 2) acetona: metanol: agua (15:5:1)
- 3) acetona: metanol (2:1)
- 4) éter de petróleo: acetona (1:2)

Los cromatofolios se cortaron a 10 cm de longitud x 16 cm de ancho, en los cuales con la ayuda de un capilar dividido a la mitad para que funcione como micropipeta, se colocaron tres gotas de cada uno de los extractos y de los estándares disueltos en THF dejando secar completamente entre cada una de las aplicaciones.

Las cámaras cromatográficas se prepararon con 20 mL de la fase móvil a probar, saturándolas previamente con papel filtro #2 cuyo extremo se introdujo a la fase móvil; recortado para que abarque la longitud y ancho de la cámara cromatográfica.

Una vez saturada la cámara cromatográfica se procedió a introducir los cromatofolios y se dejó correr la cromatografía en forma ascendente hasta un centímetro anterior del extremo superior para lograr la mayor separación posible.

Al terminar, los cromatofolios se retiraron de la cámara cromatográfica, se secaron al medio ambiente y se procedió a medir los Rf de cada mancha. No fue necesario utilizar algún revelador porque los carotenoides son coloreados (amarillos o naranjas) y se distinguen perfectamente.

4.2.4- El desarrollo del método analítico mediante la técnica de CLAR

4.2.4.1-Elaboración de estándares

Los estándares de α -caroteno, β -caroteno, β -apo-8-carotenal y β -criptoxantina fueron pesados y disueltos completamente en 10 ml de tetrahidrofurano con 0.04 % de BHT para la preparación de la solución stock. Se tomaron alícuotas de cada uno de los estándares y se aforó con acetonitrilo:cloruro de metileno 80:20 con 0.04 % de BHT y 0.04% de ácido ascórbico. Los estándares preparados fueron de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y 0.05 $\mu\text{g/mL}$, se guardaron a temperatura de -4°C y en obscuridad.

4.2.4.2-Elección del tipo de detector, de columna, fases móviles y programa de elución

Dentro del desarrollo del método analítico mediante la técnica de CLAR se involucra la elección del tipo de detector, como los carotenoides es una familia de compuestos coloreados debido a la alta proporción de dobles enlaces conjugados es factible utilizar un detector de UV/Vis con arreglo de diodos. Para el trabajo se usó un detector de arreglo de diodos marca Beckman modelo 168.

Para determinar la longitud de onda óptima se realizó un espectro de absorción, en el intervalo de longitud de onda de 190-700 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU- 70 para los estándares de β -apo-8-carotenal, β -criptoxantina, β -caroteno y α -caroteno previamente disueltos en THF (grado HPLC). Se determinó en 460 nm la longitud de onda de uno de los máximos de absorción, y fue la utilizada en el detector del cromatógrafo de líquidos de alta resolución para la determinación cuantitativa de los carotenoides.

Como los compuestos carotenoides son moléculas pequeñas y solubles en solventes no-polares (hidrofóbicos) se eligió el modo cromatográfico de fase reversa, específicamente NARP de las siglas en inglés (Non-Aqueous Reversed Phase) por lo que se empleó una columna Ultrashere-ODS (Beckman) de 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro interno y longitud de 150mm con fases móviles descritas en la tabla 5 y compuestas por una mezcla binaria o ternaria de solventes orgánicos.

Todos los eluentes fueron previamente filtrados y desgasificados utilizando para ello filtros de disco Durapore (Millipore) tipo HVLP y 0.45 μ m de tamaño de poro, una bomba de vacío marca Muffler y un agitador Thermolyne modelo Cimarec 2.

Buscando los parámetros cromatográficos de picos (resueltos, simétricos y estrechos) se procedió a determinar de las condiciones cromatográficas óptimas, realizando modificaciones al programa de elución cuando los picos cromatográficos no estuvieron resueltos. Para esto en cada corrida se inyectó una mezcla de los 4 estándares utilizados (α -caroteno, β -caroteno, β -apo-8-carotenal y β -criptoxantina) disueltos en BHT a una concentración de 50 μ g/mL, probándose distintas fases móviles no acuosas a un flujo de 1 mL/min con diferente programa de elución las cuáles se muestran a continuación en la siguiente tabla.

Tabla 5. Fases móviles y programa de elución

Ensayo	Fase móvil A	Fase móvil B	Elución
1	CH ₃ OH	THF	isocrático: 50% A y 50% B
2	CH ₃ OH	THF	isocrático: 75% A y 25% B
3	CH ₃ OH	THF	gradiente: 0-25% B en 2.5 min, 75% B por 4 min, 25-0 % B en 2.5 min
4	CH ₃ OH	THF	gradiente: 0-25% B en 5 min, 75% B por 4 min, 25-0 % B en 5 min
5	CH ₃ CN:THF (95:5)	CH ₃ OH:THF (95:5)	isocrático: 50% A y 50% B
6	CH ₃ CN:THF (95:5)	CH ₃ OH:THF (95:5)	gradiente: 0-25% B en 5 min, 75% B por 4 min, 25-0 % B en 5 min
7	CH ₃ CN:THF (95:5)	CH ₃ OH:THF (95:5)	gradiente: 0-50% B en 5 min, 50% B por 12 min, 50-0 % B en 5 min
8	CH ₃ CN:THF (95:5)	CH ₃ OH:THF (95:5)	gradiente: 0-50% B en 5 min, 50% B por 6 min, 50-0 % B en 5 min
9	CH ₃ CN:THF (99:1)	CH ₃ OH:THF (99:1)	gradiente: 0-100% B en 10 min, 100% B por 3 min, 100-0% B en 10 min
10	CH ₃ CN:THF (99:1)	CH ₃ OH:THF (99:1)	isocrático: 50% A y 50% B
11	CH ₃ CN:THF (99:1)	CH ₃ OH:THF (99:1)	gradiente: 0-50% B en 5 min, 50% B por 6 min, 50-0 % B en 5 min

Ensayo	Fase móvil A	Fase móvil B	Elución
12	CH ₃ CN:THF (99:1)	CH ₃ OH:THF (99:1)	gradiente: 0-50% B en 5 min, 50% B por 15 min, 50-0 % B en 5 min
13	CH ₃ CN	CH ₂ Cl ₂	isocrático: 50% A y 50% B
14	CH ₃ CN	CH ₂ Cl ₂	gradiente: 0-50 % B en 6 min, 50 % B por 5 min, 50-0 % B en 5 min
15	CH ₃ CN	CH ₂ Cl ₂	gradiente: 20-50 % B en 3 min, 50 % B por 3 min, 50-20 % en 3 min
16	CH ₃ CN	CH ₂ Cl ₂	gradiente: 20-45% B en 6 min, 45 % B por 5 min, 45-20 % B en 3 min
17	CH ₃ CN	CH ₂ Cl ₂	gradiente: 20-36 % B en 4 min, 36 % B por 10 min, 36-20 % B en 2 min
18	CH ₃ CN	CH ₂ Cl ₂	gradiente: 20-30 % B en 8 min, 30 % B por 5 min, 30-20 % B en 5 min

4.2.4.3 -Análisis cualitativo mediante tiempos de retención

De los cromatogramas que se obtuvieron de la inyección de cada estándar inyectado individual en las condiciones de elución del ensayo 18 mostrado en la tabla 5, se compararon los tiempos de retención con los obtenidos del cromatograma cuando se inyectó la mezcla de los 4 estándares de carotenoides para determinar el orden de elución. También se identificaron los carotenoides por medio de coinyecciones, esto es, agregando una cantidad extra de uno de los estándares a la mezcla de carotenoides y comparar el incremento del área o altura del pico en el cromatograma del estándar al que se le agregó una mayor cantidad.

Para evaluar la repetibilidad en los tiempos de retención, se inyectaron por cuadruplicado la mezcla de los cuatro estándares (α -caroteno, β -caroteno, β -apo-8-carotenal y β -criptoxantina) para su análisis en una misma sesión de trabajo, se determinaron los t_R y el error estándar con la siguiente fórmula:

$E.E. = s / \sqrt{n}$, donde s es la desviación estándar y n es el número de inyecciones.

4.2.4.4-Preparación y tratamiento de la muestra

Las hojas deshidratadas fueron separadas de los tallos manualmente, se molieron en una licuadora y tamizaron a malla 40. El material así preparado fue guardado en la obscuridad para su extracción. Se utilizó como tratamiento de muestra una extracción en fase sólida usando cartuchos de extracción empacados con 500 mg de fase C-18 (Supelclean LC-18 de Supelco) de 6 mL de capacidad.

Se pesaron 0.25 g de muestra (seca, molida y tamizada anteriormente) y se le agregó 2 mL de metanol al 70 % (conteniendo 0.8 % de BHT y 0.8 % de ácido ascórbico) para la extracción, se agitó por 5 min. El homogenizado se pasó a un cartucho de extracción en fase sólida previamente acondicionado con 6 mL de metanol y 6 mL de agua desionizada. El homogenizado se lavó en el cartucho de extracción en fase sólida con 6 mL de metanol al 70 % y se eluyeron los pigmentos de interés con 12 mL de cloruro de metileno recogiendo los eluatos en 0.5 mL de cloruro de metileno y con 1.16 % de BHT. Se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso y se recuperó con acetonitrilo:cloruro de metileno 80:20 desgasificados aforando en matraces volumétricos de 5 mL. Se homogenizó bien agitando en un agitador Baxter modelo S/P. y se filtraron utilizando filtros de 13 mm de diámetro y 0.45 μ m Durapore. El filtrado se colocó en tubos eppendorf de 2 mL protegidos con papel aluminio y guardados inmediatamente en el congelador hasta su inyección en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Todos los solventes utilizados en esta etapa de la metodología fueron desoxigenados previamente burbujeando nitrógeno por 10 min.

4.2.4.5- Cuantificación de carotenoides

Con la metodología descrita anteriormente, se procedió con cada una de las muestras de *Leucaena* para su análisis en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución, utilizando el programa de elución gradiente, con el que se obtuvieron las condiciones cromatográficas óptimas.

Se determinó el contenido de α -caroteno y β -caroteno por comparación de las áreas de los picos cromatográficos en la recta de calibración para obtener $\mu\text{g/mL}$, con ese dato según la siguiente fórmula se obtiene $\mu\text{g/g}$ de muestra. La ecuación es la siguiente:

$$\mu\text{g/g} = (\mu\text{g/mL}) (5 \text{ mL}) / \text{g de muestra}$$

4.2.4.6-Evaluación de la repetibilidad en una muestra control

Se escogió una muestra la cual fue *Leucaena collinsii* de época de invierno, a la que se le llamó muestra control y se analizó 6 veces en el mismo día para la determinación de la repetibilidad del análisis de α -caroteno y β -caroteno.

4.2.4.7-Evaluación de la calidad de los resultados analíticos en las sesiones de trabajo.

La precisión y exactitud del método de CLAR para los carotenoides encontrados α -caroteno y β -caroteno se realizó por medio de gráficas de control tipo Shewhart (Garfield, 1991). En estas gráficas se representan secuencialmente los resultados obtenidos y por lo tanto permiten monitorear el control de calidad del proceso analítico. Para construir los gráficos se procedió a analizar una muestra 6 veces (a la que se llamó muestra control), se calculó su media, rangos o recorrido y desviación estándar.

4.2.4.7.1-Gráficas de exactitud

Se realizó una gráfica de las medias de duplicados de la muestra control con respecto al tiempo. En la gráfica, se marca una línea central que corresponde a la media de la muestra control analizada previamente seis veces, paralela a esta línea también se marcan otras líneas llamadas límites de alerta y límites de acción. Para las gráficas de exactitud los límites de alerta corresponden a ± 2 la desviación estándar de la muestra analizada seis veces, y que corresponde al 95% de los datos; los límites de acción se marcan a ± 3 desviaciones estándar de la muestra analizada previamente, y que corresponde al 99 % de los datos.

4.2.4.7.2-Gráficas de precisión

Para construir una gráfica de precisión se representa la media del rango del duplicado de una muestra control en función del tiempo. En la gráfica se marca la línea central que es la media aritmética de los rangos calculados de una muestra control obtenida de seis repeticiones. Las líneas paralelas llamadas límites de alerta y acción son múltiplos de la media del rango de la muestra control analizadas seis veces. Para muestras por duplicado los límites de alerta se sitúan a $\pm 2.51R$ (rango) y los límites de acción a $\pm 3.27R$ (rango).

V-RESULTADOS

5.1-Cromatografía en Capa Fina

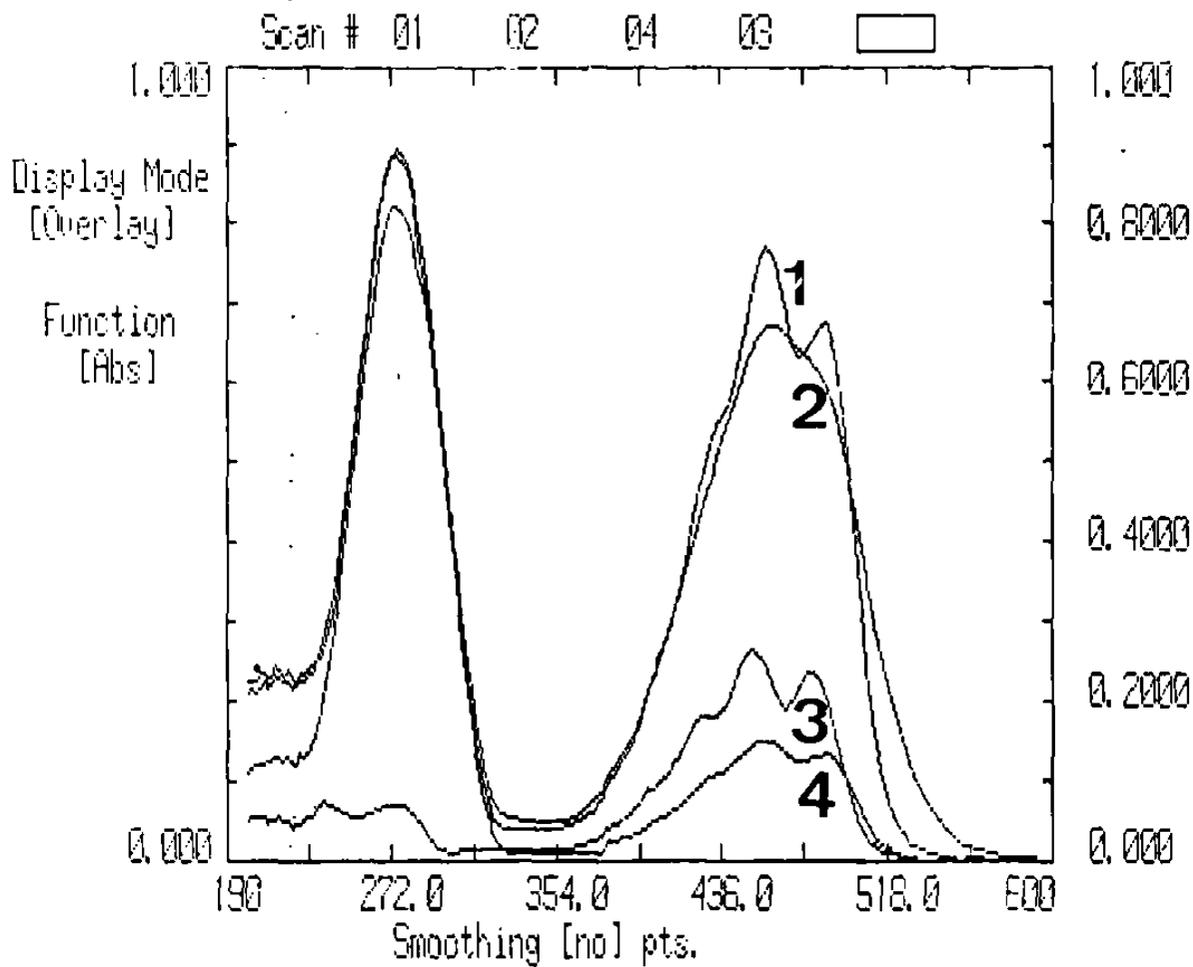
En la metodología utilizada para la técnica de cromatografía en capa fina se probaron distintas fases móviles:

Con el primer sistema de elución se lograron obtener siete manchas bien definidas, con el sistema 2, cinco manchas y con los sistemas de eluentes 3 y 4 solo se observaron tres manchas, todo lo anterior para la misma muestra. Por lo que se puede concluir que con el sistema 1 se logra una mejor separación. Los Rf obtenidos para los estándares evaluados con este sistema de elución se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de Rf *

MUESTRA	Rf
α -caroteno	0.94
β -caroteno	0.94
mezcla de α y β -caroteno	0.91
β -criptoxantina	0.73
β -apo-8-carotenal	0.82

*obtenidos con éter de petróleo: acetona 70:30 como fase móvil y sílica gel 60 F 254 marca merck como fase estacionaria.



ABS SOURCE 09:46
 777.0 -0.0150 Vis:UV 05/29/96

Figura 3. Espectro de absorción de los estándares de carotenoides.

1. β -criptoxantina, 2. β -apo-8'-carotenal, 3. α -caroteno, 4. β -caroteno

Previo ensayo de las diferentes condiciones cromatográficas que se analizaron se dedujo que las condiciones óptimas fueron las siguientes:

Utilizando una columna ultrashere-ODS (Beckman) de 5 μm de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro interno y longitud de 150mm: elución en gradiente con un eluyente A (acetonitrilo) y un eluyente B (cloruro de metileno), 20-30 % B en 8 min, 30 % por 5 min y 30-20 % B en 3 min. A un flujo de 1 mL/min y detección a 460 nm. Se obtuvo una buena resolución de todos los picos cromatográficos, lográndose la separación de β -criptoxantina, β -apo-8-carotenal, α -caroteno y β -caroteno. Con la fase móvil metanol : THF no se logró la separación de los cuatro carotenoides pues solo se observaron 2 picos cromatográficos; los ensayos de las demás fases móviles de la tabla 5 corresponden a las distintas modificaciones que se realizaron para separar de la mejor manera al α -caroteno y β -caroteno. En la figura 4 se muestra un cromatograma de estándares de carotenoides realizado a las condiciones óptimas de elución y los tiempos de retención para los carotenoides estudiados se muestran en la tabla 7.

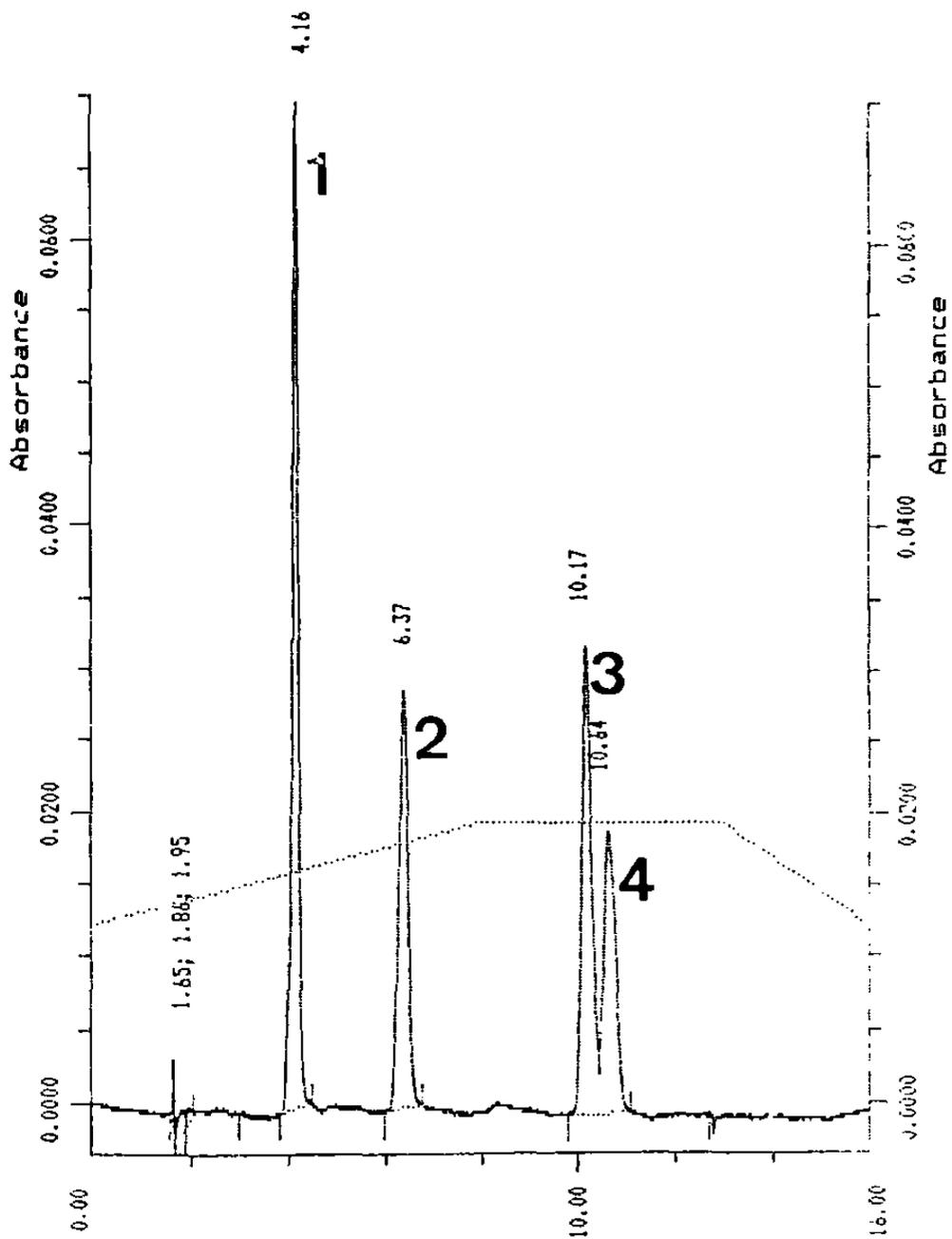


Figura 4. Cromatograma obtenido de una mezcla de estándares de carotenoides.

1. β -apo-8'-carotenal, 2. β -criptoxantina, 3. α -caroteno, 4. β -caroteno

Tabla 7. Tiempos de retención para los diferentes estándares utilizados

CAROTENOIDE	$t_{R \pm E.E.}$ (min)
β -apo-8-carotenal	4.21 \pm 0.07
β -criptoxantina	6.39 \pm 0.03
α -caroteno	10.18 \pm 0.08
β -caroteno	10.65 \pm 0.10

*Los t_R son el promedio de las cuatro inyecciones.

Al tiempo de 4.16 min se observó el pico cromatográfico que correspondió al β -apo-8'-carotenal que es el analito analizado más polar, enseguida a los 6.37 min se observó el pico cromatográfico de la β -criptoxantina y finalmente a los 10.17 y 10.64 min. se resuelven α -caroteno y β -caroteno, respectivamente. El BHT se agregó como antioxidante a las muestras y su pico cromatográfico se observa al tiempo muerto (t_0) por lo tanto se separa muy bien y no interfiere en el análisis del resto de los analitos.

Como se observa en los valores de la tabla 7, se obtuvo una buena repetibilidad en el tiempo de retención de los carotenoides estudiados en cada sesión de trabajo, aunque en diferentes sesiones podía variar.

5.2.2-Análisis Cuantitativo

Para la determinación cuantitativa de los carotenoides se utilizó el área del pico cromatográfico para correlacionarlo con la concentración del analito en la muestra. Como las áreas de los picos cromatográficos de las muestras quedaron comprendidas entre las áreas de los picos cromatográficos de los estándares, e incluso algunos próximos al estándar más diluido se decidió utilizar solo esos dos estándares para determinar la ecuación de la recta y por ende su concentración.

Las ecuaciones de la recta determinadas fueron:

para α -caroteno $y = 27.7563 x - 1.04355$

para β -caroteno $y = 31.36857 x - 1.39432$

5.3- Control de calidad de la metodología por CLAR

5.3.1- Evaluación de la repetibilidad en una muestra control

En la figura 5 se muestra un cromatograma de una muestra de *Leucaena collinsii*. Se obtuvieron picos a los tiempos de retención que corresponden al α -caroteno y β -caroteno (10.10 y 10.49 min, respectivamente) que fueron identificados adicionalmente como estos carotenoides realizando coinyecciones de la muestra con estándares.

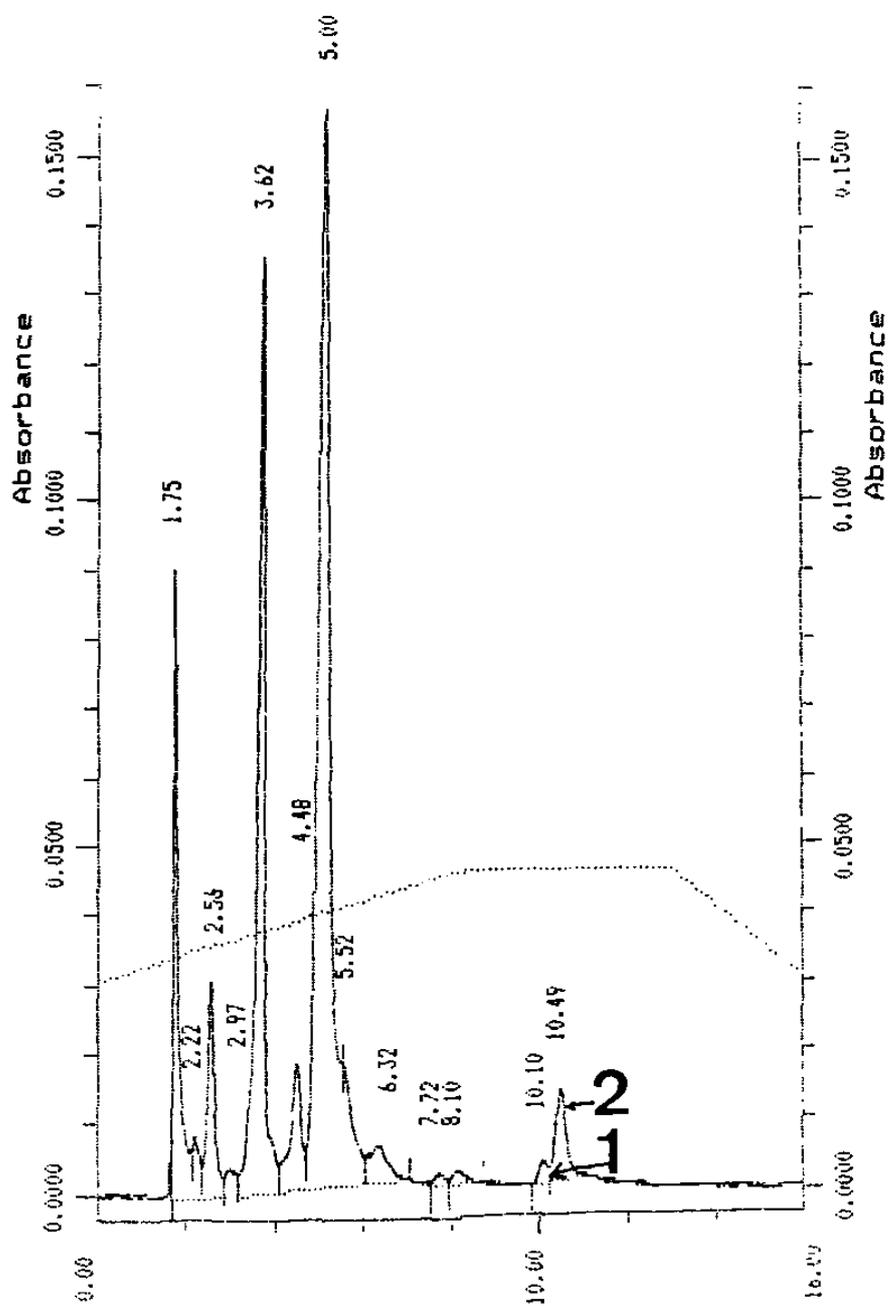


Figura 5. Cromatograma de una muestra de *Leucaena collinsii*

1. α -caroteno, 2. β -caroteno

Para establecer el control de calidad la metodología por CLAR se analizó una muestra 6 veces en el mismo día y se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la determinación de α -caroteno y β -caroteno en la muestra control (*Leucaena collinsii*)

determinaciones	α -caroteno ($\mu\text{g/g}$)	β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)
1)	1.36	2.83
2)	1.33	2.68
3)	1.35	2.71
4)	1.28	1.54
5)	1.36	1.47
6)	1.21	1.73
valor promedio	1.31	2.16
desv. estándar	0.05	0.64
mediana	1.34	2.21
interv. de confianza media ($\alpha=0.05$)	1.2543-1.3736	1.4769-2.8374
interv. de confianza varianza ($\beta=0.1$)	0.0014-0.01409	0.1896-1.8327

5.3.2- Gráficas de control

Las presentes gráficas fueron utilizadas como una guía para garantizar que los resultados obtenidos por la metodología empleada fueron confiables, ya que los datos obtenidos de los duplicados de las muestras analizadas en cada sesión de trabajo nunca rebasaron el límite de acción. Las sesiones de trabajo están determinadas en las gráficas por fechas, en las cuales se trabajaron junto con la muestra control, muestras de las cinco especies de *Leucaena*.

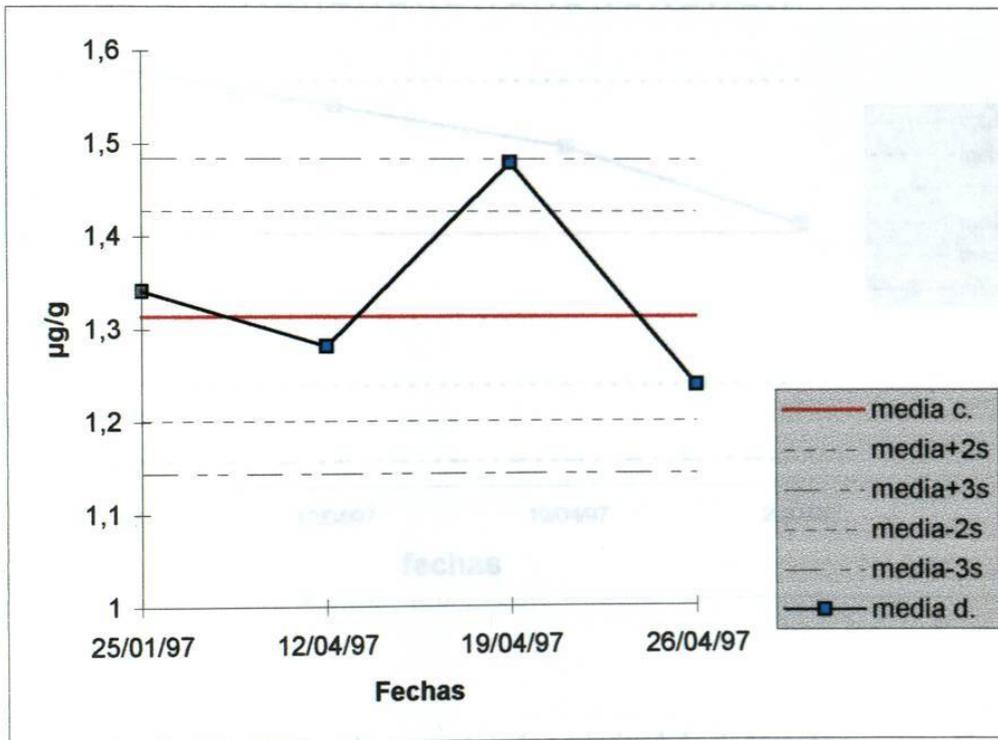


Figura 6. Gráfica de control de la exactitud de α -caroteno

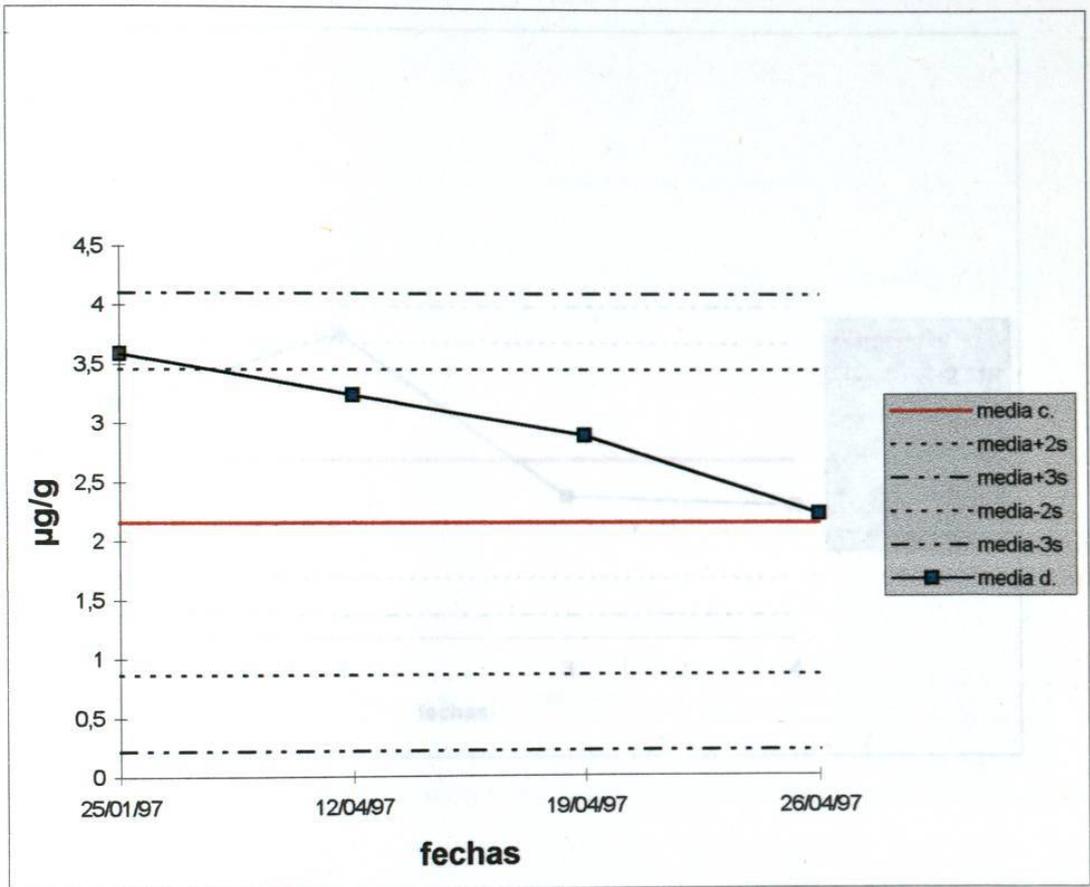


Figura 7. Gráfica de control de la exactitud de β -caroteno

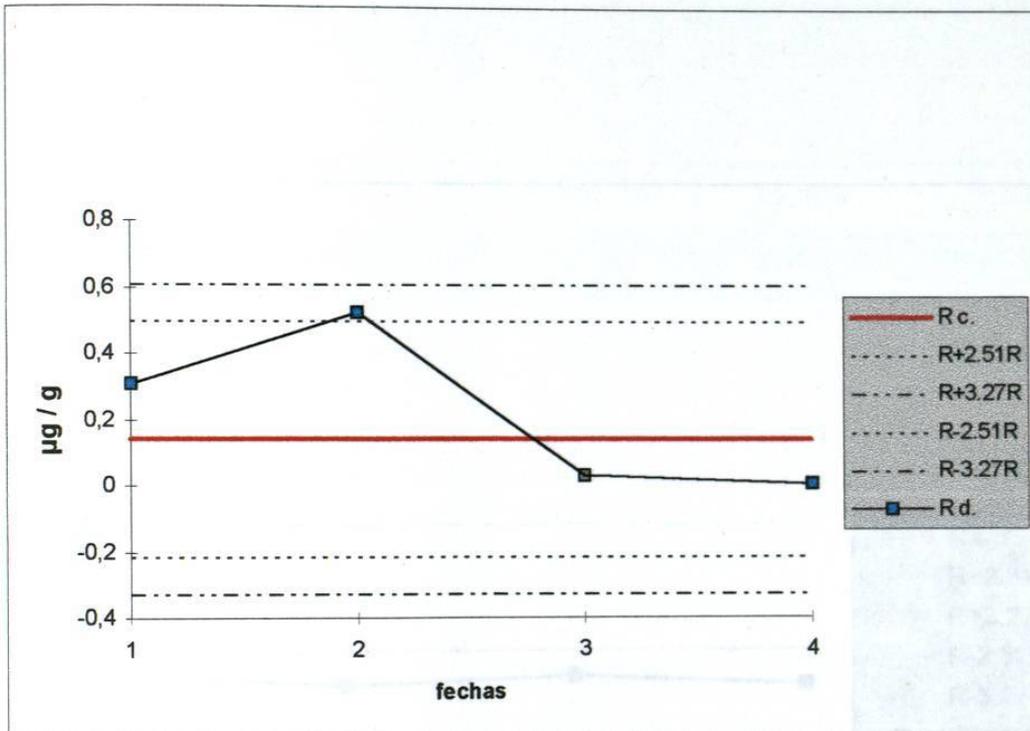


Figura 8. Gráfica de control de la precisión de α -caroteno

Figura 9. Gráfica de control de la precisión de β -caroteno

5.4- Contenido de carotenoides en las muestras

En las tablas 9 y 10 se muestran los resultados de la determinación de carotenoides en cinco especies de *Leucaena*.

Figura 9. Control de la precisión de carotenoides en hojas de cinco especies de *Leucaena* durante

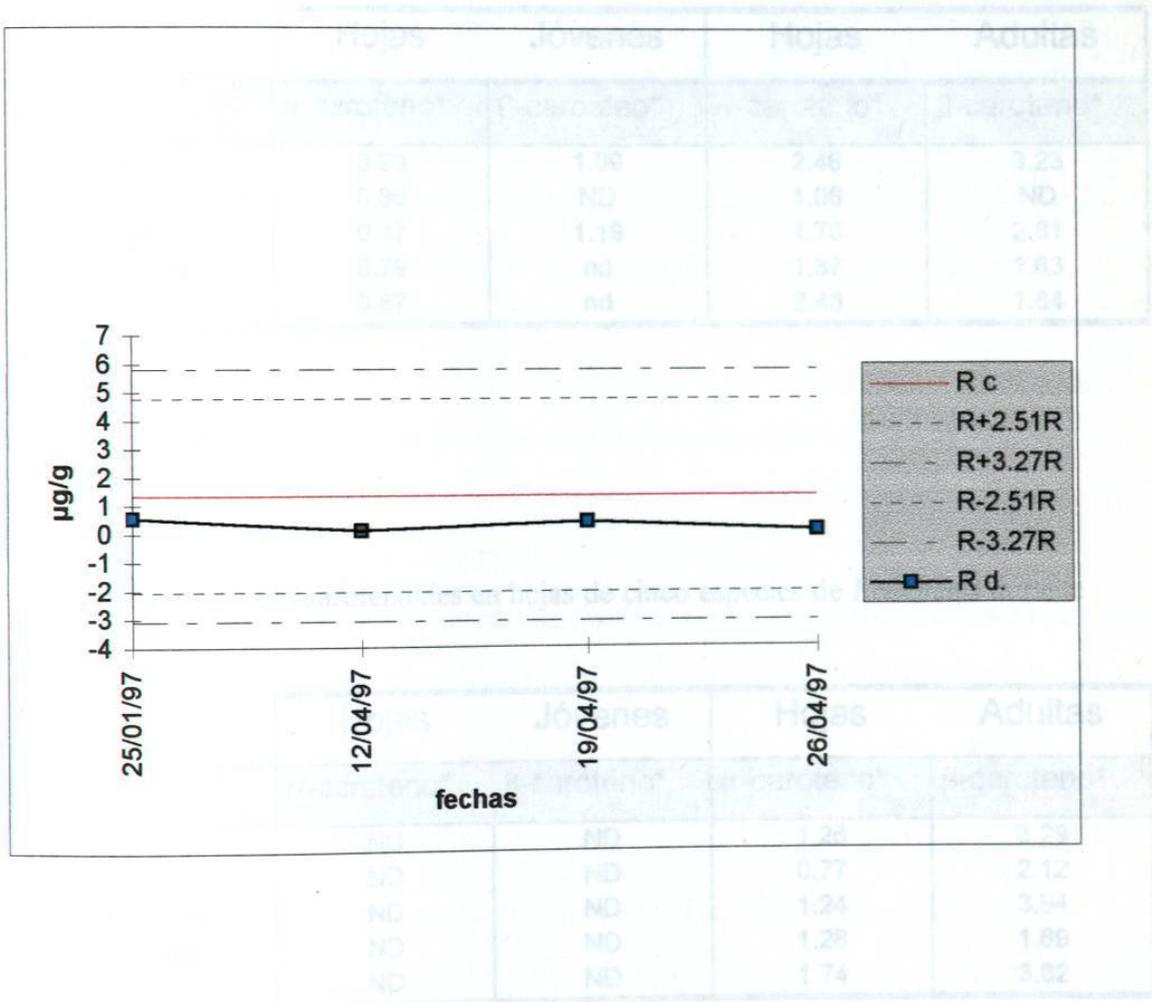


Figura 9. Gráfica de control de la precisión de β -caroteno

5.4- Contenido de carotenoides en las muestras

En las tablas 9 y 10 se muestran los resultados de la determinación de carotenoides en cinco especies de *Leucaena*.

Tabla 9. Contenido de carotenoides en hojas de cinco especies de *Leucaena* durante la primavera

especie	Hojas	Jóvenes	Hojas	Adultas
	α -caroteno*	β -caroteno*	α -caroteno*	β -caroteno*
<i>L.collinsii</i>	0.90	1.09	2.46	3.23
<i>L.greggii</i>	0.86	ND	1.08	ND
<i>L.leucocephala</i>	0.77	1.19	1.70	2.81
<i>L.pulverulenta</i>	0.79	nd	1.37	1.63
<i>L.shannoni</i>	0.87	nd	2.43	1.64

* $\mu\text{g/g}$ muestra
 nd : no detectado
 (<0.2 $\mu\text{g/g}$)
 ND no determinado

Tabla 10. Contenido de carotenoides en hojas de cinco especies de *Leucaena* durante el invierno

especie	Hojas	Jóvenes	Hojas	Adultas
	α -caroteno*	β -caroteno*	α -caroteno*	β -caroteno*
<i>L.collinsii</i>	ND	ND	1.26	3.29
<i>L.greggii</i>	ND	ND	0.77	2.12
<i>L.leucocephala</i>	ND	ND	1.24	3.94
<i>L.pulverulenta</i>	ND	ND	1.28	1.69
<i>L.shannoni</i>	ND	ND	1.74	3.82

* $\mu\text{g/g}$ muestra
 nd: no detectado
 (<0.2 $\mu\text{g/g}$)
 ND no determinado

En la época de invierno solo se analizaron hojas adultas, ya que para esa fecha no existen en las plantas de *Leucaena* hojas jóvenes (hojas crecientes).

Según los resultados del análisis de los cromatogramas para todas las muestras de *L. collinsii*, *L. gregii*, *L. leucocephala*, *L. pulverulenta* y *L. shannoni* no se detectó β -criptoxantina ni β -apo-8'-carotenal que eran los otros dos carotenoides con propiedades como provitamina A que se analizaron.

5.5-Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Los resultados sobre el contenido tanto de α -caroteno como β -caroteno mostraron diferencias inter e intra especie con una probabilidad inferior al 5 %. Se detectó diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) para α -caroteno y β -caroteno entre las muestras de *L. collinsii*. Dichas diferencias posiblemente se atribuyen a la proporción de hojas jóvenes y adultas y a la posición vertical (distribución vertical) de ramas o ramillas de diferentes plantas. Como el muestreo provino de diferentes plantas puede ser otro factor influyente en el contenido de carotenos. (Tabla 8).

Como indican los resultados el intervalo de confianza es mayor para β -caroteno en comparación a α -caroteno, esto indica que el grado de variabilidad es mayor para β -caroteno que para α -caroteno.

Sobre la base de la variabilidad interespecie, los resultados pone en evidencia diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) tanto para β -caroteno como α -caroteno entre las cinco especies del género *Leucaena* estudiadas, para hojas adultas tanto en primavera como en invierno. (Tablas 11 y 12)

Dicha diferencia se debe a las características biológicas y ecológicas de las especies, tomando en cuenta que casi la mayoría (*L. shannoni*, *L. gregii*, *L. collinsii*) de las especies son consideradas como introducidas en el sureste del estado de Nuevo León las cuales manifiestan comportamiento distinto al de su hábitat natural.

Los resultados de la tabla 11 demuestran que la especie *shannoni* es la que muestra mayor contenido en la época de invierno tanto en α -caroteno como β -caroteno en comparación con las especies *greggii* y *pulverulenta*, las cuales presentaron un contenido muy bajo (0.767 y 1.692 $\mu\text{g/g}$) en α -caroteno y β -caroteno respectivamente. Las mismas tendencias no se observaron para la colecta de primavera, siendo al contrario la especie *collinsii* fue la mejor en el contenido de α -caroteno y β -caroteno en comparación con las especies *greggii* y *pulverulenta*. Se puede destacar que las especies *collinsii* y *shannoni* fueron las mejores en el contenido de α -caroteno y β -caroteno mientras que las especies *greggii* y *pulverulenta* las más bajas.

Al comparar los resultados de la tabla 12 se observó una diferencia altamente significativa ($p=0.002$) en el contenido de α -caroteno entre las especies para la época de primavera en hojas adultas. Siendo mayor para *L. collinsii* y menor para *L. greggii*.

Tabla 11. Prueba de t Student para hojas adultas colectadas en la época de invierno para las cinco especies de *Leucaena*

especie	α -caroteno	β -caroteno
1) <i>L. collinsii</i>	1.256	3.290
2) <i>L. greggii</i>	0.767	2.115
3) <i>L. leucocephala</i>	1.238	3.937
4) <i>L. pulverulenta</i>	1.278	1.692
5) <i>L. shannoni</i>	1.743	3.821
valor promedio	1.2564	2.971
desv. estándar	0.3454	1.0156
mediana	1.256	3.29
interv. de confianza media ($\alpha=0.05$)	0.8274-1.68537	1.70949-4.2325
tc	8.1346	6.5411
significancia	$p<0.001$	$p=0.003$

Tabla 12. Prueba de t Student para hojas adultas en época de primavera para cinco especies de *Leucaena*

especie	α -caroteno $\mu\text{g/g}$	β -caroteno $\mu\text{g/g}$
1) <i>L. collinsii</i>	2.455	3.226
2) <i>L. greggii</i>	1.082	0.001
3) <i>L. leucocephala</i>	1.699	2.808
4) <i>L. pulverulenta</i>	1.366	1.631
5) <i>L. shannoni</i>	2.434	1.640
valor promedio	1.8072	1.8612
desv. estándar	0.6215	1.2571
mediana	1.699	1.64
interv. de confianza media ($\alpha=0.05$)	1.0353-2.5791	0.2997-3.4227
tc	6.5026	3.31057
significancia	$p=0.002$	$p=0.030$

Tomando en cuenta los valores de las diferencias entre primavera e invierno, se observó resultados contradictorios para α -caroteno y β -caroteno. (Tabla 13). Los resultados presentan diferencias significativas ($p=0.04$) entre primavera e invierno para α -caroteno con un intervalo de confianza para la media de 0.025-1.079; mientras que dichas diferencias no se detectaron efectos significativos ($p>0.05$) para el β -caroteno. Se puede concluir que los valores de α -caroteno fueron superiores en primavera en comparación al de invierno; al contrario β -caroteno fue más alto en el invierno que la primavera para todas las especies en estudio.

También para α -caroteno en hojas adultas se observó que existe una diferencia significativa entre primavera e invierno en las cinco especies de *Leucaena* estudiadas siendo mayor el contenido para la época de invierno ($p=0.04$). Tabla 13.

Respecto al contenido de β -caroteno entre las dos estaciones (primavera e invierno) en hojas adultas para las cinco especies de *Leucaena* no se detectó diferencia significativa ($p>0.05$) tabla 13. Sin embargo para la época de primavera e invierno en

hojas adultas se encontró una diferencia altamente significativa ($p= 0.03$ y $p=0.003$ respectivamente). Tabla 11 y 12.

Tabla 13. Prueba de t Student para los valores de diferencia de α y β -caroteno en hojas adultas de las dos épocas (primavera e invierno)

especie	α -caroteno	β -caroteno
1) <i>L. collinsii</i>	1.199	-0.064
2) <i>L. greggii</i>	0.315	-2.110
3) <i>L. leucocephala</i>	0.461	-1.129
4) <i>L. pulverulenta</i>	0.088	-0.061
5) <i>L. shannoni</i>	0.700	-2.181
valor promedio	0.5526	-1.109
desv. estándar	0.4243	1.0419
mediana	0.461	-1.129
interv. de confianza media ($\alpha=0.05$)	0.02553-1.0796	-2.4031-0.1851
tc	2.91194	-2.38016
significancia	$p=0.043$	$p>0.05$

Con respecto a las hojas jóvenes (hojas crecientes) los resultados de la tabla 14 demuestran que el contenido de α -caroteno fue significativamente inferior ($p<0.01$) a los contenidos de primavera y de invierno de hojas adultas. El bajo contenido de α -caroteno y posiblemente de β -caroteno de hojas jóvenes respecto a las hojas desarrolladas se debe probablemente a que en muchos vegetales la carotenogenesis se lleva a cabo con mayor intensidad en la etapa de maduración.

Con relación al contenido de α -caroteno para la época de primavera en hojas jóvenes se encontró una diferencia altamente significativa ($p=0.001$), siendo mayor el contenido para *L. collinsii* y menor para *L. leucocephala* Tabla 14.

Tabla 14. Prueba de t Student para hojas jóvenes en época de primavera

α-caroteno	
especie	
1) <i>L. collinsii</i>	0.897
2) <i>L. greggii</i>	0.858
3) <i>L. leucocephala</i>	0.769
4) <i>L. pulverulenta</i>	0.791
5) <i>L. shannoni</i>	0.873
valor promedio	0.8376
desv. estándar	0.0549
mediana	0.858
interv. de confianza media ($\alpha=0.05$)	0.76935-0.9058
tc	34.0882
significancia	$p=0.001$

VI- Discusiones

6.1- Cromatografía en capa fina

En la técnica de cromatografía en capa fina al analizar los Rf de α -caroteno y β -caroteno se encontró que ambos tenían el mismo valor (0.94) lo anterior se debe a las estructuras tan similares y propiedades fisicoquímicas casi idénticas que poseen (Merck Index, 1976, Badui, 1993). Esto fue observado aun al variar el tipo y proporción de solventes de la fase móvil. Por otra parte, al comparar las muestras de *Leucaena* con los estándares de β -criptoxantina y el β -apo-8'-carotenal, no se observaron manchas en las placas cromatográficas que coincidieran con esos estándares, y en la metodología por CLAR tampoco se detectaron estos carotenoides lo cual aun a este nivel de detección se observó el mismo comportamiento. Por otra parte, se observaron manchas de pigmentos amarillos más polares que los estándares (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina y el β -apo-8'-carotenal) por lo que suponemos que se trata de otros carotenoides y en cantidades abundantes.

6.2-Análisis cualitativo por CLAR

Los tiempos de retención para cada carotenoide estudiado presentó poca variación durante el mismo día de análisis (C.V. < 0.17%), es decir tuvieron repetibilidad, pero cabe señalar que los tiempos de retención pueden variar en función de la temperatura ambiente, variante que se puede eliminar si se cuenta con un accesorio de control de temperatura de la columna. Para asegurar que los picos cromatográficos fueran los correctos, se realizaron siempre coinyecciones. (Howard *et al.*, 1994). Con respecto a la resolución de los picos cromatográficos entre alfa y beta caroteno, es difícil debido a que estructuralmente, sólo difieren en la posición de un

doble enlace en el anillo. Para lograr una mejor separación, se realizó una modificación al método que consistió en utilizar como fase móvil acetonitrilo:cloruro de metileno (80:20) en lugar de acetonitrilo:metanol:agua (55:20:25) (Norman, *et al.*, 1990). Al mismo tiempo se observó una ventaja con ésta modificación ya que el tiempo de corrida fue solamente de 16 minutos comparado con otros métodos comunes que varía de 35 hasta 53 minutos, lo anterior además de ahorrar tiempo ahorra recursos económicos. (Norman, *et al.*, 1990; Barth, *et al.*, 1995 y Levy, *et al.*, 1995). Otra modificación importante fue la de utilizar la misma fase móvil como solvente para la inyección en lugar del THF comúnmente usado (Bureau y Bushway, 1986; Howard, *et al.*, 1994). La ventaja de esta modificación fue que los picos cromatográficos no mostraron distorsión como se observaba con el THF.

6.3-Análisis cuantitativo por CLAR

Al aplicar la metodología para cuantificar los carotenoides, se estableció un control de la precisión y exactitud por medio de las gráficas de control tipo Shewhart aprobado por la AOAC (Grafield, 1991), lo anterior fue necesario ya que no se contaba con material suficiente para las repeticiones individuales de cada muestra. Esta metodología es permitida y se recomienda cuando se aplica el mismo análisis, el mismo operador, bajo las mismas condiciones de análisis, el mismo tipo de muestra. El C.V. para el análisis de α -caroteno fue de 3.8% y para el análisis de β -caroteno fue de 30%.

6.4-Contenido de carotenoides

Se observó que las hojas maduras de *Leucaena* presentaron mayor concentración de carotenos que en las hojas jóvenes, esto concuerda con los resultados de Hulshof *et al.*, 1997 cuyos trabajos demostraron que las hojas maduras de algunos vegetales contienen aproximadamente el 24 % más que las hojas jóvenes. La especie de *Leucaena* que presentó mayor cantidad de α -caroteno fue la *collinsii* (hojas adultas y época de primavera) con 2.45 $\mu\text{g/g}$ y más alta comparada con plantas verdes como el brócoli que tiene 0.01 $\mu\text{g/g}$ y lechuga con 0.04 $\mu\text{g/g}$ (Bureau y Bushway, 1986).

Con relación al β -caroteno, la especie de *Leucaena* con mayor cantidad fue *leucocephala* esto en época de invierno (3.94 $\mu\text{g/g}$) comparada con plantas verdes como brócoli que tiene 7.62 $\mu\text{g/g}$, lechuga 3.24 $\mu\text{g/g}$ y espinaca con 9.00 $\mu\text{g/g}$ estaría considerada como fuente regular de este tipo de caroteno (Bureau y Bushway, 1986) y (Konings y Roomans, 1997).

Los resultados muestran mayores cantidades de carotenoides en la época de primavera para todas las especies lo anterior en parte se debe a que la naturaleza y cantidad de los carotenoides en los tejidos de la planta está usualmente en función de la madurez y pueden variar de un tejido a otro. (Gross, 1981). El mismo autor encontró que la temperatura óptima para la carotenogenesis en plantas es de alrededor de 20°C. Sin embargo el autor, además de lo anterior, concluye que la síntesis de ciertos pigmentos es sensible a la temperatura y esa sensibilidad varía de planta a planta.

Además de lo anterior la variación de carotenoides en las hojas se puede deber a la oxidación, Raymundo *et al.*, 1976, encontraron que en muchos frutos el proceso de madurez incluye la carotenogenesis y continua después de la cosecha, algunas frutas al madurarse fuera del árbol sintetizan más carotenoides que cuando se maduran en el árbol y el proceso es independiente a la luz.

VII-CONCLUSIONES

Se logró desarrollar un método para la cuantificación de carotenoides combinando las técnicas de extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos de alta resolución.

De los resultados de Cromatografía en Capa Fina se observó la separación de otros pigmentos coloreados de amarillo más polares que α -caroteno y β -caroteno que no se identificaron. Pero se sabe que no son β -apo-8-carotenal, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno. Sería muy importante identificarlos.

β -apo-8'-carotenal y la β -criptoxantina no se registraron con la metodología utilizada por lo que concluimos que de existir estos tipos de carotenoides sea en cantidades tan mínimas no detectables por el método, y no existen datos bibliográficos al respecto.

Los valores de α -caroteno en primavera fueron superiores en comparación a la época de invierno. Los resultados de β -caroteno fueron más altas en el invierno en comparación a la primavera para todas las especies estudiadas.

Con relación a las hojas jóvenes el contenido de α -caroteno fue inferior a los contenidos que mostró en la primavera e invierno en hojas adultas, este efecto probablemente se deba a que en algunos vegetales la carotenogenesis se lleva a cabo en mayor proporción en la etapa de maduración.

Las especies que mostraron mayores contenidos de α -caroteno y β -caroteno fueron *collinsii* y *shannoni*, mientras que por lo contrario las de menor contenido fueron *greggii* y *pulverulenta*.

VIII-LITERATURA CITADA

Abushita, A.A., E.A. Hebshi, H.G. Daood y P.A. Biacs. 1997. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. Food Chem 60 pp. 207-212

Anderton, S.M., C.D. Incarvito y J. Sherma. 1997. Determination of natural and synthetic colors in alcoholic and non-alcoholic beverages by quantitative HPTLC. J. Liquid Chromatography & Related Tech. 20 (1) pp. 101-110

Alanís G. y González M. 1994. Las leguminosas y su importancia como recurso natural en Nuevo León, Memorias de la Tercera Reunión Científica y Tecnológica forestal y Agropecuaria en el estado de Nuevo León. Monterrey, N.L. pp. 40

Anderson, D.M.W. 1984. Gum exudation by *Leucaena leucocephala*. Nitrogen Fixing Tree Res. Reports. 2 pp. 24

Angulo, I. 1985. Preliminary evaluation of the pigment value of two *Leucaena* varieties in the layer diet. Leucaena Res. Reports 6 pp. 99

Anónimo. 1996. Ley General de Salud. 11ed. Editorial Porrúa, S.A. México, D.F. pp. 291

AOAC. 1990. "Official Method of Analysis", Association of Official Chemists, Washington, D.C. 15 th ed. pp. 1045-1047

Badui, S. 1993. Química de los Alimentos. 3 ed. Editorial Alhambra Mexicana, S.A. México, D.F. pp. 381

Barth M., C. Zhou, K. Kute y G. Rosenthal. 1995. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue. *J. Agric. Food Chem.* 43 pp.2876-2878.

Bauernfeind, J.C. 1981. *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic press, New York.

Ben-Amotz, A. 1995. Simultaneous profiling and identification of carotenoids, retinols, and tocopherols by high performance liquid chromatograph equipped with three-dimensional photodiode array detection. *J. Liq. Chromatogr.* 18 pp. 2813-2825

Berk, Z. 1980. *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos* de J.B.S. Braverman . Editorial El Manual Moderno, S.A. México D.F. pp. 207-218.

Blenford, D. 1993. Food allergies and intolerances. *Int. Food Ing.* 6 pp. 23-26

Block, G. y L. Langseth, 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol.* 7 pp. 80-84

Bureau J.L. y R.J. Bushway, 1986. HPLC. Determination of carotenoids in fruits and vegetables in United States. *J. Food Sci.* 51pp. 128-130

Carter, J ; J. Ponce y R. Pedroza, 1994. Bioensayo de pigmentación de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con extractos de chile ancho (*Capsicum annuum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.* Vol 44 # 4 pp. 252-255

Cohran, W., 1991. *Técnicas de muestreo*. Octava Edición, Editorial Continental, S.A., México, D.F. pp. 513.

Collins, P. y C. Timberlake 1993. Recent developments of natural food colours. Int.Food Ing. 6 pp. 32-38

Craf N E. y F. Granado-Lorencio.1992. Effect of sample separation on fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations. Presentado en Experimental Biology Meeting. 25 de marzo a 2 de abril 1992. New Orleans, USA

Davies, B.H. 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigments. De.T.W. Goodwin.Academic Press,New York.pp. 38-165

De Leenheer, A.P. y H.J. Nelis. 1992. Profiling and quantitation of carotenoids by High Performance Liquid Chromatography and photodiode array detection.In Methods in Enzymology, Carotenoids Part A. vol.213, Packer, L. editor Academic Press Inc. San Diego Ca. USA.

De Ritter,E. y A.E. Purcell, 1981. Carotenoids analytical methods. Academic Press, New York pp. 815-923.

Diario Oficial de la Federación, viernes 20 de octubre de 1995.NOM-119-SSA1-1994. Bienes y servicios. Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes orgánicos naturales. pp. 31-58

D'Mello,F. y T. Acamovic,.1985. *Leucaena* as a source of xanthophyll pigments for poultry. Leucaena Res.Reports 6 pp. 76-77

D'Mello,J.P. y D.F. Taplin. 1978. *Leucaena leucocephala* in poultry diets for the tropics. Wld.Rev. Anim. Prod. 14 pp. 41-47

Emodi,A. 1978. Carotenoids, properties and application. Food Techol. 32(5) pp. 38-40

Erdman, J.W., Ch. L. Poor, y J.M. Dietz,. 1988. Factors affecting the bioavailability of vit.A, carotenoids and vit.E. Food Technol. 42 pp. 214-221

Eskins, K. y H.J. Dutton,.1979. Sample preparation for HPLC of higher pigments. Anal Chem. 51(11) pp. 1885-1886

Francis, G.W.y M. Isaksen,. 1988. Thin-layer chromatography of carotenoids with tertiary alcohol-petroleum ether solutions as developing solvents. J. Food Sci.53:3 pp.979,980

Foroughbakhch, R., 1992. Establishment and growth potential of fuel wood species in northeastern México. Agroforestry Systems. 19 pp. 95-108.

Foroughbakhch,R. y L. Hauad,.1989 . Potencial forrajero de tres especies de *Leucaena* en el noreste de México.Reporte Científico # 12 Fac. De C. Forest. U.A.N.L.Linares, N.L. México pp. 25

Foroughbakhch,R. y L.Hauad,.1990 .Comparative performance of fourteen species and varieties of *Leucaena* in northeastern México. Leucaena Res. Reports 11 pp. 79-80

Foroughbakhch, R y D. Heiseke, 1985. El matorral como recurso forestal. Reporte Científico N° 1 pp.1-28, Fac. de Ciencias Forestales, UANL, Linares, N.L.

Garfield, F.M. 1991. Quality assurance principles for analytical laboratories by AOAC International.USA.

Germann, I. 1990. Antioxidant vitamins and cardiovascular diseases. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland.

Germann, I. 1994. Beta-carotene inducer of cell-cell communication. Int. Food Ing. 4 pp. 21-25

Goodwin, T.W. 1980. Functions of carotenoids, vol. 1 Chapman and Hall, New York, pp. 77-95.

Greenfield, H. y D.A.T. 1992. Southgate. Food composition data, production, management and use; Elsevier Science Publishers. London, U.K.

Gross, J. 1987. Food science and technology of pigments in fruits. Academic Press, Great Britain. pp. 87-186

Gross, J. 1991. Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids. Van Nostrand Reinhold, New York.

Gupta, V.K., N. Kewalramani, K.S. Ramachandra, y V.S. Upadhyay, 1986. Evaluation of *Leucaena* species and hybrids in relation to growth and chemical composition. *Leucaena Res. Reports*. 7:43-45

Haehnlein, W.F. 1994. Vitamins and carotenoids- their physiological functions and technological. Resúmenes del X Congreso Latinoamericano de Nutrición. Caracas, Ven. pp. 28

Henkel . 1995. Carotenoids, information and facts. Lagrange, Ill. U.S.A.

Howard, L.R., R.T. Smith, A.B. Wagner, B. Villalon, y E.E. Burns, 1994. Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed jalapeños. J. Food Sci. 59 pp. 327-328

Hulshof, P.J., X. Chao, P. van de Bodenkamp, Muhilal y C.E. West. 1997. Application of a validated method for the determination of provitamin A carotenoids in Indonesian foods of different maturity and origin. J. Agric. Food Chem. (45) pp. 1174-1179

IUPAC. 1971. Tentative rules of the nomenclature of carotenoids. In "Carotenoids" (O. Isler, ed) pp. 851-864

Jensen, A. y S. Liaaen-Jensen. 1959. Quantitative paper chromatography of carotenoids. Acta Chem. Scand. 13 pp. 1863-1868.

Khachik, F., G.R. Beecher y N.F. Whitaker 1986. Separation, identification, and quantification of the major carotenoids and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. J. Agric. Food Chem 34 pp. 603-616

Khachik, F., G.R. Beecher, J.T. Vanderlice y G. Furrow. 1988. Liquid chromatographic artefacts and peak distortion. Sample solvent interactions in separation of carotenoids. Anal Chem. 60 pp. 807-811

Kimura, M., D.B. Rodriguez-Amaya y H.T. Godoy 1990. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. Food Chem 35 pp. 187-195

Konings E.J. y H.S. Roomans.1997. Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit. Food Chem. 59 (4) pp. 599-603

Lackey,G.1961. Feed and pigments containing xantophyll U.S. Appl. Aug. 1961. pp. 4

Lesellier, E. A. Tchaplá, C. Marty y A. Lebert, 1993. Analysis of carotenoids by high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. J. Chromatogr.633 pp. 9-23

Levy A., S.Harel, D. Palevitch, B. Akiri, E. Menagem y J. Kanner.1995. Carotenoids pigments and β -carotene in paprika fruits (*Capsicum spp.*) with different genotypes. J. Agric. Food Chem. 43 pp. 362-366.

Lie,O y G. Lamertsen 1986. Fatty acid specificity of *Candida cylindracea* lipase. Fette Seifen Anstrichm. 88 (9) pp. 365-367.

Lietz G. y J.K. Henry. 1997. A modified method to minimise losses of carotenoids and tocopherols during HPLC analysis of red palm oil. Food Chem. (60) pp. 109-117

Macrae, A.R. 1983 Lipase catalysed interesterification of oils and fats. J. Am. Oil. Chem. Soc. (60) pp. 291

Martin, D., P. Meyes, y V. Rodwell, V. 1984. Bioquímica de Harper. 9 de. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. pp. 566

May, C.Y. 1994. Palm oil carotenoids. Food Nutr.Bull.,15 (2) pp.130-137

Mayo, D.W., R.M. Pike, y S.S. Butcher,.1989. Microscale Organic Laboratory, 2nd ed. Wiley, New York.

Meggos, H.N. 1994. Effective utilization of food color. Food Technol. 48 pp.112.

Mercadante A.Z., D.B. Rodríguez-Amaya y G. Britton. 1997. HPLC and Mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. J. Agric. Food Chem. (45) pp. 120-123.

Ng, J.H. Y B. Tan. 1988. Anaysis of palm oil carotenoids by HPLC with diode-array detection. J. Chromatogr.Sci. (26) pp. 463-469

Norman S., V. Maier y D. Pon. 1990. Abscisic acid accumulation and carotenoid and chlorophyll content in relation to water stress and leaf age of different types of citrus. 1990.J. Agric. Food Chem. 38 pp. 1326-1334.

Pesek, C.A., J.J. Warthesen y P.S. Taoukis.1990. A kinetic model for equilibration of isomeric carotenes. J. Agric. Food Cem.(38) pp. 41-45

Raymundo L.C, C.O. Chichester, y K.L. Smpson.1976. Light dependent carotenoid synthesis in tomato fruit. J. Agric.Food Chem.24 pp. 59-64

Riber-Nielsen, M. 1990. Natural beta-carotene as a food color. European food and drink review. pp. 113-115

Sies, H. 1990. Oxidative stress: oxidant and antioxidant. Academic Press. London U.K.

Simpson,K.L.1983. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. Proc.Nutr.Soc.42 pp. 7-17

Skoog,D.A y J.J.Learny,. 1994. Análisis Instrumental. 4a. ed.Mc. Graw Hill, España

Stewart, I. y T.A. Wheaton,. 1971. Continuous separation of carotenoids by liquids chromatography. *J. Chromatogr.* 55 pp. 325-336

Straub,O.1987.Key to carotenoids, 2nded. Birkhauser Verlag,Boston,USA.

Telek,L.1982. Preparation of leaf protein concentrates from *Leucaena leucocephala*. *Leucaena Res. Reports* 3 pp. 93

The Merk index. 1976. 9^aed. Published by Merck and Co. Inc.

Tórrez J.,1997. De la vista nace...Tecnología de alimentos,industria y mercado.vol.32 (2) pp. 26-34

Vernon, E., J. Ponce y R. Pedroza,1996. Pigmentación del camarón blanco del pacífico (*Panaeus vannamei*) utilizando extractos de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) como fuente de carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.Órgano oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Vol. 46 (3) pp. 243-246

von Elbe J y S. Schwartz.1996 Food Chemistry de. Owen R. Fennema. 3ed. Marcel Dekker, Inc.New York.

Wood,J.F, P.M. Carter, y R. Savory, 1983. Investigations into the effects of processing on retention of carotenoid fraction of *Leucaena leucocephala* during storage, and the effects of processing on mimosine concentration. *Anim. Feed Sci. Technol.* 9(4) pp. 307-317

Young, A. y G. Britton. Carotenoids and stress.1990. *Plant Biology* vol.12 Wiley-Liss Inc. New York.

Zonta, F., B. Stancher, y G.P. Marletta,. 1987. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of free carotenoids and carotenoid esters. *J. Chromatogr.* 40 pp. 207-215

Zar, J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd.ed. Printice-Hall Inc. Englewood. Cliff. New Jersey pp. 668 y anexos

