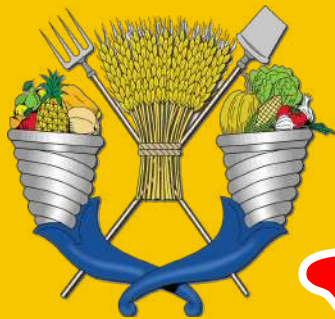




*Jornadas de presentación
de avances y resultados
de investigación en
Preparatoria
Agrícola*

XII

M

E

M

O

R



I

**ENCUENTRO DE
INVESTIGADORES 2001**

A

HOTEL CAMPESTRE " EL OCOTAL"
ATLACOMULCO, EDO. DE MEXICO
27 y 28 de Septiembre del 2001



U A C h

Preparatoria Agrícola

Subdirección de Investigación y Servicio

EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MOLÉCULAS COLORANTES DEL AÑIL (*Indigofera suffruticosa* Mill.).

Matadamas Ortíz Elías Jaime¹

INTRODUCCIÓN.

Los colorantes de origen natural han sido utilizados por el hombre desde tiempos muy remotos, a fin de expresar sus creencias y sus relaciones con la naturaleza o con otros hombres ¹. A nivel social, los colorantes cobraron una gran importancia. Al principio las materias colorantes fueron extraídas de minerales pulverizados, los que constituyen una fuente asequible, pero pronto el hombre descubrió el poder colorante de algunos animales y especialmente de las plantas ².

Estos descubrimientos constituyeron una verdadera revolución, gracias a la calidad de los colorantes vegetales y animales. No obstante que son de mas difícil extracción que los minerales, los colorantes vegetales presentan numerosas ventajas.

Todas las civilizaciones en el pasado tuvieron predilección por los colores y por ciertas fuentes naturales ³. Está ampliamente documentado que los fenicios comenzaron la extracción del pigmento comúnmente llamado “Púrpura Real” o “Púrpura de Tiria”, a partir de las glándulas hipobranquiales de moluscos del género *Murex* y *Purpura* ⁴. Este exclusivo colorante era utilizado por los romanos para teñir las capas de la nobleza ^{5,6,7}.

En nuestro país, ha existido una conocida tradición por la producción y utilización de colorantes de origen natural. La extracción del carmesí de la “Grana cochinilla”⁸ que se remonta al siglo X de nuestra era, es atribuido a los toltecas⁹. Otro ejemplo del desarrollo tecnológico en la producción de colorantes, es el perdurable, *Azul maya* ¹⁰. De acuerdo a recientes investigaciones, este pigmento resistente a los ácidos, tales como el ácido acético, nítrico, clorhídrico y sulfúrico, así como a los álcalis y a la biodegradación, está compuesto de una arcilla natural (paligorskita) y un pigmento orgánico natural (índigo) ^{11,12}.

Existen numerosas plantas que proporcionan pigmentos que prácticamente cubren todo el espectro de colores que pueden ser percibidos por el ojo humano. En esta diversidad, se encuentran las plantas llamadas *Indigóticas*, las cuales contienen sustancias precursoras del índigo. El índigo es una molécula con propiedades tintoriales que imparte una coloración azul, ampliamente utilizada en la industria textil ¹³.

La síntesis de la *muveína* en 1886, marcó uno de los más grandes progresos de la industria química, pero también produjo el desplazamiento de los pigmentos naturales ¹⁴. A principios del siglo XX, la producción del índigo sintético a una escala industrial, estableció el inicio del auge de los sintéticos y el abandono total de los pigmentos naturales ¹⁵. Actualmente, cada vez son más los reportes sobre los riesgos a la salud por la utilización de aditivos sintéticos, no solo en la industria de alimentos , sino también en la de la cosmetología, farmacéutica y del vestido ¹⁶. Como consecuencia de lo anterior, los colorantes naturales han sido objeto de múltiples trabajos, con el fin de estudiar sus propiedades, su forma de extracción y análisis, para de nuevo difundir su uso. Este artículo resume una parte de los trabajos realizados con colorantes naturales, de los estudios de doctorado del autor en el Laboratoire de Chimie Agroindustrielle, de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse, Francia.

ANTECEDENTES .

De gran importancia como actividad económica en estados del sureste de México en el pasado reciente, el cultivo del añil y la extracción de sus materias colorantes, solo se practica actualmente en pocas regiones del país. Este es el caso de la región del Istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca, donde se persiste en su conservación en la localidad de Santiago Niltepec ¹⁷. La producción del colorante actualmente alcanza cifras de 500 kg anuales, los cuales son vendidos en el mercado interno y en el extranjero. No obstante la visible calidad del producto, su comercialización es difícil. En México no existen estudios sobre su caracterización, grado de pureza y composición; por lo que su venta es limitada, especialmente en los mercados internacionales. La comercialización como materia prima es una restricción para los productores en cuestión de precios, ya que es en los países importadores que se le da un valor agregado al emplearlo en la manufactura de productos de alta cotización, como son, la alta costura, la cosmetología y los consumibles para el arte (lacas, tintas, lápices, etc.). Nuestro estudio persigue contribuir en el conocimiento químico del producto de la extracción del añil, con el propósito de establecer

¹ Profesor Investigador de la UACH. Dpto. P.A.

los estándares de calidad necesarios para su exportación y sus posibles aplicaciones.

1. EL ÍNDIGO DEL AÑIL.

En la naturaleza existen mas de 200 especies vegetales que producen el índigo, de entre ellas, *Isatis tinctoria* L., o Woad; *Polygogunum tinctorium*, *Baphicacanthus cusia*, *Calante veratrifolia* y diversas especies del género *Indigofera*, son las más conocidas¹⁸. El añil de México pertenece a este género, y su nombre científico es *Indigofera suffruticosa* Mill., y es una especie de la familia de las leguminosas.

A simple vista nada parece indicar que existe en la planta del añil algún compuesto que produzca un colorante azul. Esto es porque el índigo se produce durante la extracción a partir de precursores incoloros que están contenidos dentro de las células del mesófilo de las hojas. Estos precursores son glucósidos constituidos por glucosa, y la parte aglicona es un núcleo indólico¹⁹. En la actualidad se han identificado dos precursores, el **Indoxilo-5-Cetogluconato** [1] o Isatan B, el cual se encuentra mayoritariamente en las hojas *Isatis tinctoria* L., y el **Indoxilo-β-D-glucosido** [2] o Indican que se encuentra en las hojas del añil²⁰. Estos precursores son productos del metabolismo secundario de las plantas indigóticas y posiblemente tengan alguna función específica contra el ataque de depredadores. Debido a que el enlace que une la glucosa y el núcleo indólico es de tipo éter, su hidrólisis es difícil como una reacción espontánea o por efecto de ácidos o bases, y es necesaria la intervención de una enzima β-Glucosidasa. No está aún claro si esta enzima está presente en el protoplasma celular, pero si en diferente lugar que el sustrato, en un fenómeno de compartimentalización o es proporcionada por los microorganismos²¹. En cualquier caso, al hidrolizarse el indican, se libera el **Indoxilo** [3]. En forma espontánea al contacto con el aire, dos moléculas de indoxilo se condensan para formar el **Índigo** [5]. El indoxilo en un medio rico en oxígeno puede oxidarse y convertirse en **Isatina** [4]; esta última al unirse con una molécula de indoxilo da lugar a una molécula de **Indirubina** [6]²². La indirubina es un isómero del índigo de color rojo. El índigo y la indirubina son las materias colorantes hasta la fecha identificadas en los extractos sólidos del añil; su contenido es variable y depende del contenido de precursores en las hojas, derivado a su vez de las condiciones de cultivo y de las del

medio ambiente, así como de los métodos de extracción²³.

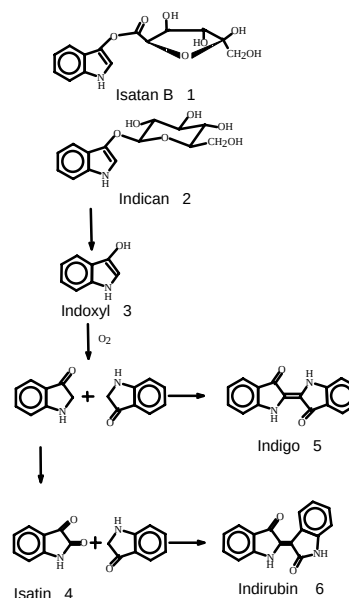


Figura 1. Formación de los pigmentos del añil a partir del indican contenido en sus hojas.

2. EXPERIMENTAL.

2.1. EXTRACCIÓN.

Las hojas de añil fueron recolectadas del campo, en la localidad de San Lorenzo Etla, Oaxaca, en el verano de 1998. Este tipo de añil fue marcado y caracterizado por el autor como “Añil San Lorenzo”, para fines de diferenciación con otros tipos encontrados en el Estado de Oaxaca. Se pesaron 300 g de material vegetal y se colocaron en un recipiente. Se agregaron 3 L de agua destilada y se dejó macerar a una temperatura de 30°C por un tiempo de 24 h, hasta que se percibió una fermentación de las hojas y el agua se tornó de una coloración azul y sobre su superficie se observó una película cobriza. En este momento, se separó el material vegetal del extracto. Este último se pasó a un recipiente de cristal transparente y se dejó reposar por espacio de 5 h hasta que se formó un precipitado de color azul. El precipitado fue recuperado por filtración con papel filtro y se metió a secar a una estufa a 50 °C por un tiempo de 36 h. De la superficie del papel filtro se recuperó un polvo de color azul, el cual se puso en un frasco de vidrio de color ámbar para protegerlo de la luz. Este extracto bruto fue llevado al Laboratorio de Química Agroindustrial en Toulouse Francia para su estudio.

2.2. SEPARACIÓN.

La separación de las moléculas tintoriales del extracto bruto se hizo por medio de tres técnicas, por Cromatografía de Capa Fina (TLC), por Cromatografía Líquida Sólida (SLC) en columna abierta y por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).

4.2.1. SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN POR CROMATOGRFIA DE CAPA FINA.

Se pesaron 150 mg del extracto bruto y se diluyeron en 300 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF). Se realizaron depósitos de aproximadamente 2 µl sobre placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (MERCK). La fase móvil estuvo compuesta de una mezcla de benceno: acetona (97: 3). También se hicieron depósitos de índigo de síntesis (SIGMA), y de indirubina sintetizada en el laboratorio a partir del acetato de indoxilo. Después de un desarrollo de 20 min en un cuva de cromatografía saturada del sistema de elusión, se observaron dos bandas, una superior de color azul, y otra de color rojo. La banda superior de color azul coincidió perfectamente con la banda del índigo de síntesis, y la banda roja tuvo el mismo *R_f* de la banda de la indirubina de síntesis. Con ésta fase móvil, los valores de *R_f* obtenidos fueron los siguientes: 0.54 para las bandas azules y 0.42 para las bandas rojas. Por razones de toxicidad el benceno fue sustituido por el tolueno, obteniéndose prácticamente los mismos resultados de separación.

4.2.2. SEPARACIÓN POR CROMATOGRFIA LÍQUIDA -SÓLIDA.

Para la separación por cromatografía líquida-sólida en columna abierta, se seleccionó como sistema de elusión, una mezcla de cloroformo/acetato de etilo. La fase estacionaria fue el sílice con una granulometría de 230-400 mesh. La mejor relación másica del sílice/extracto bruto fue de 18 g/30mg. Utilizamos una columna de cristal abierta con un diámetro de 1.6 cm, y el gasto del eluante fue de 8.6 mL/min. La muestra a separar se diluyó en una porción de la fase móvil antes de ser puesta en la columna. El gradiente de elusión de 5, 10, 15 y 20%, comenzando por el cloroformo, fue el que dio los mejores resultados. Cada fracción fue controlada por Cromatografía de Capa Fina, y las fracciones de pigmento azul y rojo fueron concentradas en rotavapor.

4.2.3. SEPARACIÓN POR HPLC.

Utilizamos una columna C18 de 250 x 4.6 mm. La inyección se efectuó con una jeringa de 25 µL. El gasto fue de 1.0 mL/min, y la longitud de onda analítica fue de 292 nm. El sistema de elusión estuvo compuesto de A= metanol, B= agua, C= 50g/L de ácido fosfórico en agua. De 0 a 10 min, 50 A/40 B/ 10C; 70 A/ 20B /10C, después de 10 min; 80 A/ 10B / 10C, a los 20 min y después de 25 min, se regresó a las condiciones de partida. La muestra inyectada se disolvió en piridina.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS MATERIAS TINTORIALES DEL AÑIL.

La caracterización e identificación de las materias tintoriales del añil se hizo por Espectroscopía de Absorción UV-Visible y Espectroscopía de absorción en el Infrarrojo.

4.3.1. ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE.

Con las fracciones recuperadas de la separación en columna abierta de los pigmentos azul y rojo, se procedió a identificarlas. Los espectros de absorción de las fracciones azul y roja se obtuvieron con el espectrofotómetro y después se compararon con los del índigo SIGMA y el de la indirubina sintetizada y purificada en el laboratorio.

4.3.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN EN INFRARROJO.

Los espectrogramas de fracciones sólidas de los pigmentos azul y rojo se obtuvieron a partir de pastillas elaboradas con KBr. Los espectros de las muestras fueron comparadas con los de los estándares.

4.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO.

Para la cuantificación del contenido de índigo y de indirubina en el extracto bruto resultante de la extracción, se procedió a diluir de 10 a 20 mg de la muestra en 25 mL de *N,N*- dimetilformamida. Las muestras fueron depositadas en placas de gel de sílice 60 PF₂₅₄ (MERCK). Estos depósitos se hicieron con un aplicador automático DESAGA AS30. También fueron depositados sobre la placa una serie de concentraciones estándares. Se desarrollaron las placas con un sistema compuesto de tolueno – acetato de etilo (3:2). Después de la

separación de los pigmentos, las placas fueron leídas en un densitómetro DESAGA/ HEIDELBER CD 60. Se hicieron tres lecturas de cada muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La extracción de los pigmentos contenidos en las hojas del añil se realizó mediante una fermentación en agua a 30 °C , lo que significa que el indican fue hidrolizado por los microorganismos. Un característico olor de fermentación se comenzó a percibir a las cinco horas de maceración y el extracto comenzó a tornarse azul después de 10 h. El rendimiento en extracto bruto fue de 3 mg . g⁻¹ de peso fresco. Este extracto presentó una intensa coloración azul. La separación por CCF fue efectiva y se pudo apreciar que las bandas pigmentadas tuvieron un ΔR_f de 0.12. Al comparar las bandas coloreadas de las muestras con los estándares de índigo e indirubina, pudimos observar una exacta coincidencia, lo que nos permitió deducir que se trataba de estos compuestos. Esta técnica cromatográfica también nos permitió purificar cantidades apreciables de los pigmentos. Con el mismo sistema de elusión se realizaron ensayos de Cromatografía de Capa Fina Preparativa. La separación en columna abierta dio buenos resultados, obteniéndose por este medio las fracciones purificadas que se utilizaron para la fase de identificación. La separación por Cromatografía Liquida de Alta Presión (HPLC), se produjo satisfactoriamente, como lo muestra el cromatograma y las condiciones de desarrollo fueron las óptimas. Esta técnica es adecuada para el análisis cualitativo de muestras de textiles u otro material teñido. Los espectros de absorción de radiación UV-Visible e Infrarroja, coinciden con los de las fracciones separadas, lo que significa que realmente se trata del índigo y la indirubina.

El análisis cuantitativo de los pigmentos en el extracto bruto por Cromatografía de Capa Fina-Densitometría reveló que el contenido de índigo en el extracto bruto es del orden de 12.4 a 14.6% y de indirubina de 0.5 a 0.8%. Los rendimientos obtenidos son mejores que los obtenidos por el que escribe en *Isatis tinctoria* L., lo que indica que el añil es más productivo industrialmente.

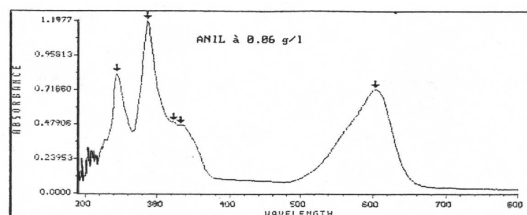


Figura 2. Espectro de absorción UV-V de la fracción azul del extracto bruto del añil.

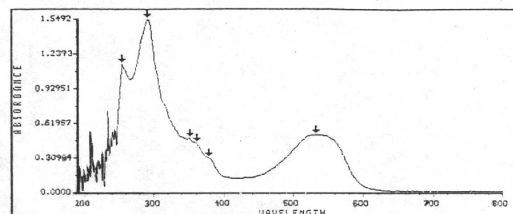


Figura 3. Espectro de absorción UV-V de la fracción roja que coincide con el de la indirubina de síntesis.

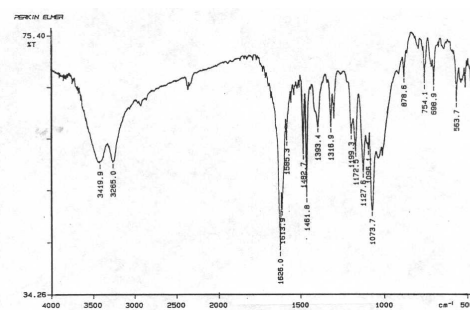


Figura 4. Espectro de absorción infrarroja de la fracción azul del añil.

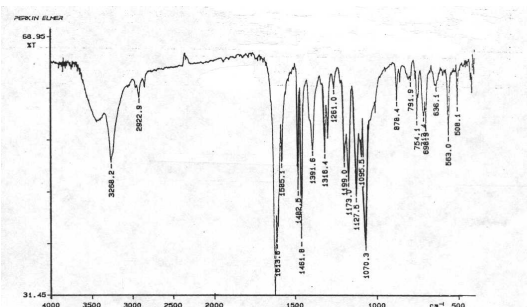


Figura 5. Espectro de absorción infrarroja del índigo de síntesis.

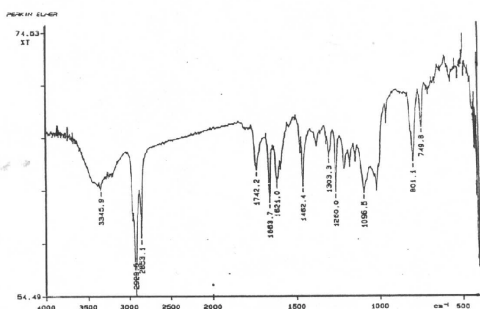


Figura 6. Espectro de absorción infrarroja de la fracción roja del añil.

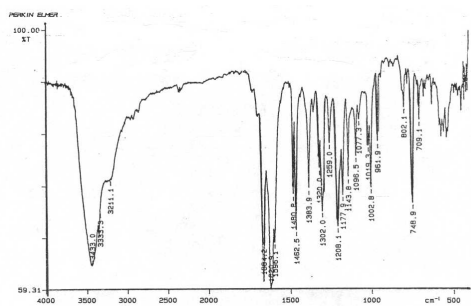


Figura 7. Espectro de absorción infrarroja de la indirubina de síntesis.

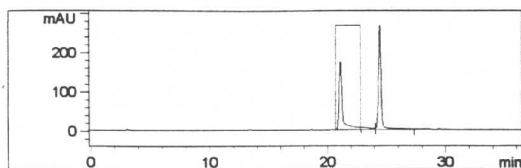


Figura 8. Cromatograma de la separación por HPLC mostrando los tiempos de retención del indigo y de la indirubina.

CONCLUSIONES.

Las técnicas de extracción, separación, caracterización y análisis cuantitativo de las materias colorantes del añil, desarrolladas en este estudio permiten establecer que las moléculas presentes en el extracto bruto son, el índigo y la indirubina. Por primera vez se reporta que el contenido de índigo es del orden del 12.4 al 14.6 % , y el de la indirubina del 0.5 al 0.8 %. La metodología desarrollada para el estudio del añil es aplicable para el control de calidad del añil producido en forma tradicional en el estado de Oaxaca y establece un parámetro de rendimiento industrial.

LITERATURA CITADA.

1. PIERRISNARD, C. 1994. Le Rouge et le Bleu, ou l'Importance des colorants dans l'évolution de la Chimie. These de la Université Montpellier I. Francia. pp.15-35.
2. EDMONDS, J. 1996. The History of Woad and the Medieval Woad Vat. Historic Dyes Series No.1. Ed. J. Edmonds. Reino Unido. 33p.
3. GUARINO, C., CASORIA, P., y MENALE, B. 2000. Cultivation and Use of *Isatis tinctoria* L., in Southern Italy. *Economic Botany*. 54(3), 395-400.
4. BOUCHILLOUX, S., y ROCHE, J. 1995. Contribution a l'Etude Biochimique de la Purpure des Murex. *Bulletin de l'Institut Océanographique*. Paris, Francia. 23p.
5. ZIDERMAN, I. 1983. Biblical Dyes of Animal Origin. *Chemistry in Britain*. 412-421.
6. CARDON, D. 1990. Guide des teintures naturelles. Ed. Delachaux et Niestlé. Paris, Francia. 325P.
7. CLARK, J.H.R., COOKSEY, J.C., DANIELS, M.A.M., y WITHNALL, R. 1993. Indigo, Woad and Tyrian Purple: important vat dyes from antiquity to the present. *Endeavour*. 17(4), 191-199.
8. SARABIA, V.M.J. 1994. La grana y el añil. Técnicas Tintóreas en México y América Central. Escuela de Estudios Hispano-Américanos de Sevilla. España. 74 p.
9. SANTIBÁÑEZ, M.T. 1992. El cultivo de la grana cochinilla. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca. Casa de la Cultura Oaxaqueña. Colección :Como Hacemos No.2. 126p. México.
10. TOURBE, C. 1996. Le secret du Bleu Maya. *Sciences et Avenir*, p 90.
11. POLETTE, L., UGARTE, N., y CHIANELLI, R. 2000. In-Situ Identification of Palygorskite in Maya Blue samples Using Synchrotron X-ray Powder Diffraction. Workshop on Synchrotron Radiation in Art and Archaeology. University of Texas. US.
12. YACAMAN, M.J., RENDON, L., ARENAS, J., y SERRA, P.M.C. 1996. Maya Blue Paint: An Ancient Nanostructured Material. *Science*. 273, 223-225.
13. DUVIGNEAUD, L. 1997. Ces plantes qui nous firent Don de la Couleur. Les Plantes Tintoriales de chez nous. Centre Duvigneaud de Documentation Ecologique, ASBL. Bruxelles, Belgica. 180p.
14. WAHL, H. 1956. Précis des Matieres Colorantes Synthetiques. Collection Euclide. Press Universitaires de Francia. 74 p.
15. DESCHILDRE-LESCUREUX, V. 1994. Teintures et colorants d'origine végétale. These pour le diplome d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Lille II. Francia. 56-78 p.
16. HILL, J. 1997. Are there a future for the Natural Dyes?. *Rev. Prog. Coloration*. 27, 18-25.
17. CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO BINNIZÁ A.C. 1999. El Añil. El Tecolote. Boletín de la Comisión Oaxaqueña de Defensa Ecológica. Méx., p 5-8.
18. CANNON, M., y CANNON, J. 1998. Dye Plants and Dyeing. Ed. The Royal Botanic Gardens, Kew. Reino Unido. 13 p.
19. VILAREM, G. 1999. La chimie du Pastel. Espaces pour Demain. Paris, Francia., p 14.
20. MINAMI, Y., KANAFUJI, T., y MIURA, K. 1996. Purification and Characterization of a β -Glucosidase from *Polygonum tinctorium*, Which Catalyzes preferentially the Hydrolysis of Indican. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(1), 147-149.
21. CONN, E.E. 1993. β -Glucosidases in Plants: Substrate Specificity. β -Glucosidases, Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Asim Ensen. ACS Symposium Series 533., p 15-59.
22. KOKUBUM, T., EDMONDS, J., y JOHN, P. 1998. Indoxyl Derivatives in Woad in to Medieval Indigo Production. *Phytochemistry*. 49(1), 79-87.
23. VILAREM, G., BAREAU, I., y MATADAMAS ORTIZ, E. 2000. Extraction and Análisis of Plant Dyes for Industrial Use. 1st. World Conference and Exhibition on Biomass for Energy and Industry. Sevilla, España. 4 p.