

GranaCochinilla ColorantesNaturales

EDITORES

Celina Llanderal

Dulce H. Zetina

Ana Lilia Viguera

Liberato Portillo

Derechos reservados
Colegio de Postgraduados
Montecillo, Edo. de México. México
Registro No. 306 de la Cámara Nacional
de la Industria Editorial Mexicana

GRANA COCHINILLA Y COLORANTES NATURALES / Celina Llanderal, Dulce H. Zetina, Ana Lilia Vigueras
y Liberato Portillo.

Prohibida su reproducción parcial o total,
sin permiso por escrito del Colegio de
Postgraduados o de los editores

Impreso en México. 2008.

ISBN 978-607-7533-10-8

Fotocomposición y diseño: Leticia Arango Caballero

Para citar este libro: Llanderal, C., D. H. Zetina, A. L. Vigueras y L. Portillo. (Eds.).2008. Grana Cochinilla y
Colorantes Naturales. Colegio de Postgraduados. México. 124 p.

Portada: Fibras de lana teñidas con colorantes naturales y vistas al microscopio estereoscópico (40X).

CONTENIDO

HISTORIA

ASPECTOS HISTÓRICOS DE UN CAMINO COLORIDO	2
Emma Estrada Martínez	
LA GRANA COCHINILLA EN LA HISTORIA: LO QUE DICEN QUE DIJERON	6
Fernando Rafael Villaseñor Ulloa y Ma. de Lourdes Presas González	
COMPARTAMOS LA EXPERIENCIA DEL AÑIL COMO UN BIEN CULTURAL	10
Lorenzo Amaya-Guevara	
OAXACA, UN ESTADO DE FIBRAS TEXTILES Y COLOR	12
José Manuel Loera Fernández	

ASPECTOS BIOLÓGICOS Y AGRONÓMICOS

CONTENIDO DE ÁCIDO CARMÍNICO EN HEMBRAS DE GRANA COCHINILLA DE DIFERENTES EDADES	16
Adriana Briseño Garzón, Celina Llanderal	
EVALUACIÓN DE LOS GLÓBULOS CON ÁCIDO CARMÍNICO PRESENTES EN LA HEMOLINFA DE <i>Dactylopius Coccus</i> COSTA POR CITOMETRÍA DE FLUJO	21
Leticia Flores-Alatorre Hernández, Florencia del Carmen Salinas Pérez, Jorge Reyes Esparza, María de la Paz Zamorano Rojas, José Daniel Martínez Rodríguez, Miguel Núñez Vigueras	
UN VISTAZO AL SISTEMA CELULAR DE DEFENSA DE LA GRANA COCHINILLA	24
Sandra Caselín Castro, Celina Llanderal, Arturo Ramírez Cruz	
CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA HEMOLINFA EN LA COCHINILLA DEL NOPAL <i>Dactylopius coccus</i>	27
Fernando García-Gil, José Pablo Orduña Villalobos, Cecilia Rangel Martínez, Ignacio del Río Dueñas y Fidel de la Cruz Hernández Hernández	
COEVOLUCIÓN ENTRE ESPECIES DE <i>Dactylopius</i> (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) Y SUS BACTERIAS ENDOSIMBIOTES	29
Shamayim Tabita Ramírez Puebla, Mónica Rosenblueth, Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra, Carla Chávez Moreno, Alberto Tecante, Esperanza Martínez Romero	
DESARROLLO DEL PRODUCTO BIAADETECT®, ELABORADO A PARTIR DE LA COCHINILLA DEL CARMIN <i>Dactylopius coccus</i> PARA LA DETECCIÓN DEL OOMYCETO PATÓGENO <i>Saprolegnia</i> sp. PRESENTE EN CULTIVOS DE PECES DULCEACUÍCOLAS	33
Rocío Parra Laca, Fernando García-Gil de Muñoz, Humberto Lanz Mendoza, Ignacio del Río Dueñas, Fidel de la Cruz Hernández Hernández	
DETERMINACIÓN POR MICROSCOPIA DE LAS ESTRUCTURAS DE ACUMULACIÓN DE COLORANTES EN HOJAS DE AÑIL (<i>Indigofera suffruticosa</i> MILL.)	35
Fabiola Sandoval Salas, Guillermo Ángeles Alvarez, Carlos Méndez Carreto, León Raúl Hernández Ochoa	
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS MOLÉCULAS COLORANTES DE EXTRACTOS SÓLIDOS DE HOJAS DE AÑIL (<i>Indigofera suffruticosa</i> MILL.)	38
Elías Jaime Matadamas Ortiz	
CAPACIDAD DE DEPREDACIÓN DE <i>Chilocorus cacti</i> L. (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) EN <i>Dactylopius opuntiae</i> COCKERELL (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)	43
Guillermo Esparza Gómez, Ana Lilia Vigueras, Liberato Portillo	
<i>Salpingogaster cochinelivora</i> GUERIN-MENEVILLE (SIRPHIDAE) ENTOMÓFAGO DE DACTYLOPIIDAE Y SU CONFUSIÓN CON LOS GÉNEROS <i>Baccha</i> sp. y <i>Allograpta</i> sp.	46
Guillermo Esparza, Ana Lilia Vigueras, Liberato Portillo	
ARTRÓPODOS DEPREDADORES DE LA “COCHINILLA CARMIN” <i>Dactylopius coccus</i> COSTA (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) EN LA COSTA CENTRAL DEL PERÚ	50
Rosmarina Marín Loayza	
LOS HOSPEDEROS NORTE Y SUDAMERICANOS DE DACTYLOPIIDAE	52
Liberato Portillo	

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS MOLÉCULAS COLORANTES DE EXTRACTOS SÓLIDOS DE HOJAS DE AÑIL (*Indigofera suffruticosa* Mill)

Elías Jaime Matadamas-Ortiz

Programa Universitario de Investigación en Agricultura Sustentable (PUIAS). Línea de investigación: Valorización Industrial de los Agrorrecursos y Sistemas Agroindustriales Sustentables (VIASIS). Universidad Autónoma Chapingo. Apartado Postal 56230, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, México. emata993@hotmail.com

Introducción

Uno de los más antiguos colorantes naturales conocidos y utilizados por las grandes civilizaciones del mundo obtenido a partir de fuentes vegetales y animales, es el índigo (Clark *et al.*, 1993; Galian y Gilles, 1993). En Mesoamérica, los Mayas lo utilizaron para la elaboración del “azul maya”, que actualmente se sabe es una nanoestructura en cuya composición está involucrada una arcilla de la península de Yucatán y el principio tintóreo del añil (Tourbe, 1996; Yacaman *et al.*, 1996). Los derivados indigóticos tintóreos pueden ser obtenidos de al menos una docena de familias vegetales, dentro de las cuales se encuentran: Leguminosae, Brassicaceae, Polygonaceae, Acanthaceae, Orchidaceae, Apocynaceae y Asclepiadaceae (Cardon y Chatenet, 1990). De estas familias se han estudiado alrededor de cincuenta especies. No obstante la gran cantidad de especies, las que más se han utilizado, y en la actualidad han llamado la atención de los investigadores han sido: *Isatis tinctoria* L. (Woad o Pastel), *Polygonum tinctorium* Ait. (Hierba de los teñidores), *Baphicacanthus cusia* Ness., y un grupo de especies leguminosas llamadas “indigóticas” (*indigotiers*) (Matadamas, 2005).

Las leguminosas indigóticas son especies productoras de índigo pertenecientes al género *Indigofera* que se desarrollan en condiciones tropicales de diferentes países del mundo (Cannon *et al.*, 1994). En Asia, la especie conocida como “planta verdadera de índigo” es *Indigofera tinctoria* L., y es originaria de la India (Vavilov, 1992); *Indigofera arrecta* Hoschst., es una especie nativa de Etiopía que es cultivada en África (Cannon *et al.*, 1994). En América, se tiene reportada una especie que se desarrolla desde el centro de México hasta Sudamérica, *Indigofera suffruticosa* Mill. A la llegada de los españoles a México esta planta fue nombrada *Añil* (Moziño, 1994). La producción de índigo de fuentes vegetales representó una base económica importante entre los siglos XIV y XIX en Europa, especialmente en el sureste de Francia. El índigo contenido en esferas cuidadosamente elaboradas (*cocañas*) a partir de hojas de *Isatis tinctoria* L., eran comercializadas exitosamente en Inglaterra, España e Italia, produciendo un auge económico sin precedente para la región de Toulouse, Albi y

Carcassonne (Brumont *et al.*, 1995). Hacia 1560 llega por primera vez a España la primera producción de índigo extraído del añil proveniente de México y Centroamérica. Este producto presentaba varias ventajas competitivas con respecto al índigo producido en Europa a partir de *Isatis tinctoria*. Era comercializado por un mercado monopolístico, era producido a bajos costos por los nativos americanos y tenía una mejor calidad que el índigo del pastel (Matadamas, 2005). Los efectos de la competencia mermaron poco a poco el cultivo del pastel en Europa y la producción del colorante azul declinó a principios del siglo XVIII. La síntesis del índigo artificial provocó casi el abandono de la producción del de origen natural.

En la actualidad en varios países, sobre todo de Europa, se han intensificado los estudios de los métodos de extracción y de análisis del índigo de especies que lo producen. En Inglaterra se han llevado a efecto trabajos de investigación enfocados a optimizar las condiciones de extracción, a la obtención de un extracto sólido con alta concentración del colorante y al análisis de los precursores del índigo y del propio colorante (Stoker *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2004; García y John, 2004). En Alemania, los investigadores se han abocado a la cuantificación de los precursores en *Isatis tinctoria* L. (Oberthür *et al.*, 2004a; Oberthür *et al.*, 2004b). En Francia, los trabajos de investigación han permitido la producción a escala comercial del índigo a partir de las hojas de *Isatis tinctoria* L. (Matadamas, 2002). El principal motivo del relanzamiento de la producción del índigo natural, sin duda, han sido los problemas de salud para el ser humano que representa su homólogo sintético y la nueva valorización industrial de las moléculas colorantes derivadas del índigo de origen vegetal. Las nuevas aplicaciones del índigo natural y sus derivados están relacionadas con el avance en la tecnología del teñido y métodos de reducción, la utilización del azul vegetal en la industria alimenticia y electrónica y los recientes estudios sobre las propiedades farmacológicas de la indirubina en la regulación del ciclo celular que han permitido explorar su utilización como un potente inhibidor antitumoral de última generación en tratamientos contra el cáncer y enfermedades degenerativas (Beauchard *et al.*, 2006; Easton *et al.*, 2006).



La producción de índigo en México la llevan a cabo organizaciones de campesinos tanto en la región del Istmo Oaxaqueño, como en la región de la Huacana en el Estado de Michoacán. Los volúmenes de producción de este colorante natural en México alcanzan el orden de 400 kg al año, y se comercializan en pequeña escala en mercados regionales, aunque en contadas ocasiones se han exportado cantidades no significativas a Francia y a Alemania (comunicación personal).

La química del índigo en plantas. En todos los casos de las plantas productoras de índigo natural, nada hace suponer que sus partes vegetativas contengan alguna sustancia que posea alguna propiedad colorante. Sin embargo, luego de una cuidadosa extracción, paulatinamente aparece el característico color azul del índigo en el medio reaccional. Esto es posible gracias a la presencia de precursores glucósidos incoloros en las células, especialmente de las hojas, los que en condiciones específicas evolucionan a índigo (Vilarem, 1999). Existen en general tres precursores del índigo que se producen en las diversas especies indigóticas. El isatán B, el isatán C y el indicán (Epstein *et al.*, 1967; Zhi-Quiang y Meinhardt, 1992; Maugard *et al.*, 2001). En el caso

del añil, por las características de la extracción del índigo, se cree que el precursor mayoritario es el **indicán** [1], aunque no hay resultados que lo confirmen. Se ha observado que en general en las plantas productoras de índigo, una vez que los precursores del índigo sufren hidrólisis, al separarse la glucosa de este compuesto se libera el **indoxilo** [2], el cual es una especie altamente reaccional que se condensa a otra molécula similar para formar el **índigo** o **indigotina** [3] en presencia de oxígeno en el ambiente. El indoxilo puede también oxidarse y formar **isatina** [4] que al unirse a una molécula de indoxilo, produce la **indirubina** [5]. Este último compuesto es un isómero estructural del índigo, pero posee un color rojo (Stoker *et al.*, 1998). Cuando se ha encontrado como precursor al indicán, la hidrólisis se lleva a efecto por medios enzimáticos por la enzima **indicán-β-glucosidasa**. Tanto la enzima como su sustrato, el indicán, se encuentran en forma compartimentalizada, es decir, que se encuentran separados dentro de la célula. Se tienen evidencias en *Polygonum tinctorium* Ait., que el indicán se encuentra posiblemente en la vacuola celular, mientras que su correspondiente β-glucosidasa se encontró concentrada en el estroma de los cloroplastos de las células del mesófilo (Minami *et al.*, 1997). Tomando en consideración la ruta de biosíntesis del índigo en algunas especies estudiadas y con base en algunos ensayos experimentales de la extracción de esta planta, se propuso una posible vía de la producción del índigo en añil (Figura 1).

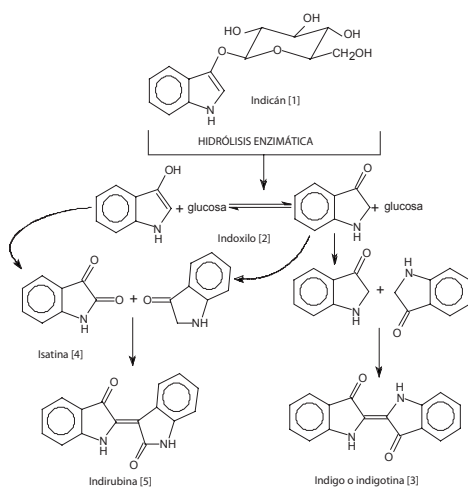


Figura 1. Posible vía biosintética de los compuestos colorantes del añil (Matadamas, 2005).

Al realizar la caracterización química de los extractos sólidos azules obtenidos a partir de hojas de añil por métodos instrumentales como espectrofotometría UV-Visible, espectrometría de infrarrojo y resonancia magnética nuclear protónica, se pudo concluir que las materias colorantes presentes en estos extractos son la indigotina (índigo) y la indirubina (Figura 2).

En Francia se desarrolló un método por Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC) y densitometría, para determinar la concentración de índigo y de indirubina y se observó que los extractos

sólidos de índigo de *Isatis tinctoria* L., contienen entre el 4 y 18% de indigotina y 0.15 y 0.5% de indirubina. Además, se encontró que las condiciones de extracción favorecen la producción de estas moléculas, principalmente el pH, el tiempo de extracción y la temperatura. Mientras que a valores de pH ácido y temperaturas entre 50 y 70 °C promueven la producción de indigotina, los valores de pH básicos y temperaturas cercanas a 90

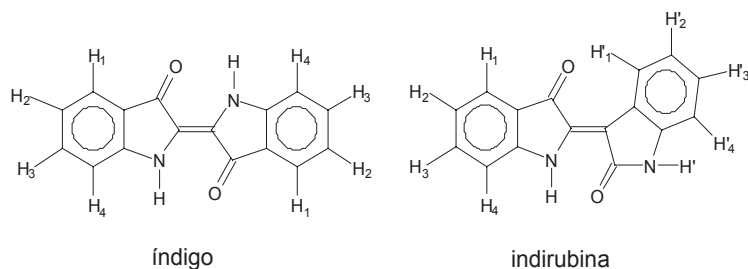


Figura 2. Moléculas colorantes encontradas en los extractos sólidos de las hojas de añil (Matadamas, 2007).

°C promueven una mayor producción de indirubina (Matadamas, 2002). En otras palabras, los extractos sólidos azules (índigo natural) de origen vegetal están constituidos por una proporción variable de dos materias colorantes, la indigotina y la indirubina. La primera es mayoritaria y es responsable del color azul de los extractos y la segunda de color rojo le da un matiz morado a los textiles teñidos. El resto de la materia de los extractos no posee propiedades colorantes y posiblemente resulten de la degradación de las paredes celulares, de las membranas, de la clorofila y del contenido citoplasmático en el momento de la extracción. En todo caso, ésta proporción llega a ser importante y representa una fracción indeseable por ser impurezas, aunque podría tener un papel como matriz en la estructuración de las moléculas indigóticas en el extracto (Matadamas, 2008, datos no publicados). Por lo anterior, es posible decir que el valor comercial de los extractos depende directamente de la concentración de las fracciones colorantes y no solo del hecho de que su origen sea natural. No obstante, a nivel mundial los productores que comercializan el índigo natural tienen suficiente precaución para evitar proporcionar estos importantes datos y pueden caer en la tentación de decir que su producto es puro para no desacreditarlo. Al respecto, Hill (1997) menciona que una de las empresas pioneras en la producción y comercialización de índigo natural en Europa es "Bleu de Lectoure" (Francia) y que promocionaba su producto como "puro" pero no precisaba el contenido del colorante en sus extractos. Años más tarde, simultáneamente que se realizaron extracciones industriales de índigo a partir de *Isatis tinctoria* en el sureste de Francia con la participación de esta empresa de M. Henry Lambert, se desarrolló un método de cuantificación en la Escuela Nacional Superior de Química de Toulouse, Francia con los resultados mencionados más arriba (Matadamas, 2002). No obstante, en la literatura no hay muchos datos disponibles sobre el contenido de índigo e indirubina a fin de hacer comparaciones y determinar la calidad de los extractos. Quian *et al.* (2005) determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) que el contenido de índigo y de indirubina fue de 2.65 y 0.15%, respectivamente en extractos sólidos de *Baphicacanthus cusia* Ness. La variación en la concentración de los derivados del índigo en extractos en las diferentes especies indigóticas podría explicarse por varios factores dentro de los cuales estarían: especie y variedad genética de los vegetales, etapa fenológica de las plantas, manejo agronómico del cultivo, condiciones ambientales y las condiciones de cosecha, manejo y de extracción de las hojas. Con base en lo anterior

es posible partir de la hipótesis de que la calidad de los extractos de añil puede variar entre regiones, entre años de cosecha y entre extracciones de un mismo año y por lo tanto su cotización puede variar. En México aún no existe una norma de calidad para los extractos de añil, a pesar de que sabe que se han comercializado pequeños volúmenes a Europa y anualmente hay un comercio, aunque incipiente, cada vez más importante a nivel nacional y regional.

El objetivo de este trabajo fue el de hacer la determinación de los contenidos de indigotina (índigo) e indirubina de extractos sólidos de añil de las principales regiones productoras del país para establecer las bases de una norma de calidad relacionados con los contenidos de moléculas colorantes.

Metodología

Se obtuvieron muestras de extractos sólidos de índigo de añil de la región del Istmo de Tehuantepec del Estado de Oaxaca y de la Huacana en el Estado de Michoacán. Estos extractos fueron obtenidos por los métodos tradicionales de extracción de añil en cubas de maceración.

Método de análisis cuantitativo. El método analítico fue por espectrofotometría UV-Visible en el Laboratorio de Agronomía y Agreos recursos (LABAAGRO) del Área de Agronomía del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Estándares. El estándar de indigotina o índigo que se utilizó en la cuantificación fue índigo sintético de la empresa SIGMA-ALDRICH y el de indirubina fue obtenido por extracción y purificación de indirubina de un extracto de sólido de añil del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, por cromatografía en columna abierta.

Obtención del estándar de indirubina. La obtención de la referencia de indirubina se realizó en los laboratorios de Productos Naturales (LAPRONAN) y de Agronomía y Agreos recursos (LABAAGRO), ambos del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. El método generado para este fin consistió en pulverizar una muestra de extracto sólido de añil y hacer una extracción con equipo SOXHLET con acetona por 24 horas. El extracto acetónico se concentró en el rotavapor hasta obtener un extracto café oscuro que posteriormente se pasó por una columna de fase inversa de sílica gel (C-18) y se eluyó con metanol. Las primeras fracciones recuperadas de la salida de la columna se eliminaron, ya que contenían compuestos polares y las fracciones rojas



se recuperaron. Estas fracciones rojas se unieron y se concentraron en el rotavapor. Se obtuvieron cristales que luego se pasaron a otra columna de cromatografía en fase normal, en la que se utilizó un sistema de elusión compuesto de acetato de etilo – metanol (9:1 v/v). Las fracciones a la salida de esta segunda columna fueron controladas en placas de cromatografía de capa fina, hasta identificar el compuesto rojo puro. De acuerdo a la literatura, la relación frontal (*R_f*) de este único compuesto rojo sobre las placas de cromatografía coincide con el de la indirubina (0.70). Las fracciones puras de indirubina fueron concentradas al rotavapor y se hizo un último control con cromatografía de capa fina, disolviendo una cantidad de los cristales obtenidos en acetona y utilizando como fase móvil un sistema de acetato de etilo – acetona (1:1 v/v).

Análisis de las muestras. Para el análisis del índigo se tomaron 5 mg de una muestra de extracto de añil del Istmo de Tehuantepec y de dos muestras de extracto de añil de la Huacana y se diluyeron en 200 ml de *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) y 2,6-di-ter-butilo-4-metilfenol (BHT) al 0.5% y se pasaron al espectrofotómetro para leerse a $\lambda = 610$ nm. Por cada muestra se hicieron tres repeticiones. Para analizar la indirubina se pesó un gramo de cada una de las muestras y una vez pulverizado se pasó al equipo SOXHLET para una extracción con acetona. El extracto acetónico se filtró y el filtrado se aforó a 50 ml para luego correrlo al espectrofotómetro y registrar la absorbancia a $\lambda = 524$ nm. También por cada muestra se hicieron tres repeticiones.

Cuadro1. Contenido de indigotina e indirubina en extractos sólidos de hojas de añil de las regiones del Istmo de Tehuantepec, Oax., y de la Huacana, Mich.

Procedencia de la muestra	Contenido de moléculas colorantes (% p/p)	
	indigotina	indirubina
Huacana, Mich., 1	31.24c	0.36a
Huacana, Mich., 2	38.15b	0.14c
Istmo de Tehuantepec, Oax.	48.98a	0.29b

Las literales diferentes significan que existen diferencias significativas a un nivel de $\alpha = 0.01$ por la prueba de Tukey.

Elaboración de las curvas de calibración del índigo y de la indirubina. Una vez contando con los estándares de referencia se procedió a elaborar las curvas de calibración. Para el caso del índigo se disolvieron 5 mg de indigotina de síntesis en 200 ml de un sistema de diluyentes compuesto de *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) y 2,6-di-ter-butilo-4-metilfenol (BHT) al 0.5% y se obtuvo una solución madre de la que a partir de sucesivas diluciones se obtuvieron cinco soluciones con concentraciones en un intervalo de 0.025 a 0.003 g/l. Se tomaron 10 ml de cada solución y se colocaron en la celda de un espectrofotómetro UV-Visible SPECTRONIC GENESYS y se registró la absorbancia a una longitud de onda analítica de $\lambda = 610$ nm. Para el caso de la indirubina, se tomaron 5.5 mg de estándar y se diluyeron en 100 ml de acetona grado espectrofotométrico, obteniéndose una solución madre con una concentración de 0.055 g/l, que luego fue diluida para finalmente obtener cinco soluciones con concentraciones en el rango de 0.0011 hasta 0.055. Cada una de las disoluciones se pasó al espectrofotómetro y se registró su absorbancia a una longitud de onda analítica de $\lambda = 524$ nm. Las ecuaciones de concentración contra absorbancia fueron $y = 0.0136x - 0.0002$ ($R^2 = 0.9999$) y $y = 0.0678x - 0.0029$ ($R^2 = 0.9999$) para el índigo y la indirubina, respectivamente.

Resultados y Discusión

La concentración de indigotina en la muestra del Istmo de Tehuantepec es más alta que de las dos muestras de la Huacana entre un 11 y 18% (Cuadro 1). Esto podría ser el efecto de la variación de las condiciones ambientales de las dos regiones productoras (suelo, clima, etc.), aunque también sería atribuible al tipo de añil utilizado, tomando en cuenta que existen al menos dos subespecies de *Indigofera suffruticosa* cultivables en México y se han observado tipos silvestres en zonas de los Estados de Oaxaca, Guerrero, Morelos, Yucatán y Querétaro. Por otra parte, es posible que el manejo del material vegetativo y las condiciones de extracción hayan influido en la concentración de indigotina. El contenido de indirubina es más alto en la muestra 1 del Estado de Michoacán, luego en la muestra del Istmo de Tehuantepec y menos en la muestra 2 de Michoacán. Estudios en *Isatis tinctoria* indican que la concentración de indirubina está relacionada con las condiciones de extracción y que no existe proporción entre las concentraciones de indigotina e indirubina (Matadamas, 2002).

Conclusiones

Existen diferencias en la concentración de indigotina



e indirubina en los extractos sólidos provenientes de las dos regiones productoras de índigo en México que pueden ser atribuidas a las condiciones ambientales y edafológicas y al genotipo de añil cultivado. Extractos sólidos de índigo de añil con una concentración de 31 al 48% resultan de una calidad muy superior a los extractos de índigo de *Isatis tinctoria* L. (4 – 25%) obtenidos a nivel comercial en Europa o a los obtenidos experimentalmente en *Baphicacanthus cussia* Ness. (2.65%). Con estas referencias de concentración de indigotina es posible establecer primeras bases para la generación de una norma de calidad para la comercialización de extractos de índigo natural.

Agradecimientos

A los productores de añil de la Huacana por proporcionarnos las muestras de extractos sólidos de añil y al Dr. Benito Reyes Trejo, director del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma Chapingo, por su colaboración en la purificación de la indirubina.

Literatura Citada

Beauchard, A., Y. Ferandin, S. Frère, O. Lozach, M. Blairvacq, L. Meijer, V. Thiéry and T. Besson. 2006. Synthesis of novel 5-substituted indirubins as protein kinases inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14: 6434-6443.

Brumont, F., B. Benjelloun et M. Delmas. 1995. Le pastel d'hier et d'aujourd'hui. *Fréquence Chimie* 21 (2): 4-9.

Cannon, M., J. Cannon and G. Dalby-Quenet. 1994. *Dye Plants*. Ed. The Herbert Press Ltd. The Royal Botanic Gardens, Kew. Londres. 8 p.

Cardon, D. and G. Chatenet. 1990. *Guide des teintures naturelles. Plantes – Lichens, Champignons, Mollusques et Insectes*. Ed. Delachaux et Niestlé. Paris, Francia. p.110-120.

Clark, R., C. Cooksey, M. Daniels and R. Withnall. 1993. Indigo, woad, and tyrian purple: important vat dyes from antiquity to the present. *Endeavour* 17 (4): 191-199.

Easton, C.J., J. B. Harper, and S. F. Lincoln. 2006. A molecular reactor for synthesis of indirubin and related compounds. In: *Indirubin, the red shade of indigo*. Ed. Meijer L., Guyard N., Skaltsounis L. and Eisenbrand G. Francia. p. 127-134.

Epstein, E., W. Nabors and B. Stowe. 1967. Origin of Indigo of Woad. *Nature* 216 (11): 547-549.

Galian, M. y A. Gilles. 1993. La renaissance du Pastel en pays de cognac. *Bulletin de l'union des physiciens* 87 (757): 1229-1252.

García-Macias, P. and J. Philip. 2004. Formation of natural indigo derived from woad (*Isatis tinctoria* L.) in relation to product purity. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7891-7896.

Gilbert, K., G. Maule, B. Rudolph, M. Lewis, H. Vandenburg, E. Sales, S. Tozzi, and D. Cooke. 2004. Quantitative analysis of indigo and indigo precursors in leaves of *Isatis* spp. and *Polygonum tinctorium*. *Biotech. Prog.* 20: 1289-1292.

Hill, D. 1997. Are there a future for natural dyes? *Rev. Prog. Coloration* 27:18-25.

Matadamas, E. J. 2002. *Étude et caractérisation des matières colorantes du Pastel (Isatis tinctoria L.)- Détermination des conditions optimales d'extraction pour leur utilisation à l'échelle industrielle*. Tesis Ph. D. Op. Réactivité des Agroressources. Institut National Polytechnique. École Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et

Technologiques de Toulouse. Francia. 275 p.

Matadamas, E. J. 2005. Oro azul: el índigo. Propiedades, fuentes y métodos de extracción. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. México. 124 p.

Matadamas, E. J. 2007. Caracterización de las moléculas colorantes del Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) por espectrofotometría UV-Visible, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN ¹H). In: *Memorias del 14º. Encuentro de Investigadores en Preparatoria Agrícola*. Universidad Autónoma Chapingo. México. p. 33-41.

Maugard, T., E. Enaud, P. Choisy and D. Legoy. 2001. Identification of a precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry* 58: 897-904.

Minami, Y., H. Takao, T. Kanafuji, K. Miura, M. Kondo, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura and H. Matsubara. 1997. β-Glucosidase in the Indigo Plant: Intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant Cell Physiol.* 38 (9): 1069-1074.

Mozifo, M. 1994. Tratado del Xiquilite y Añil de Guatemala. In: *La grana y el añil. Técnicas tintóreas en México y América Central*. Ed. Publicaciones de la Escuela de Estudios Hispano-Americanos de Sevilla. 374. Editora Ma. Justina Sarabia Viejo. Sevilla, España. 325 p.

Oberthür, C., B. Schneider, H. Graf and M. Hamburger. 2004. The elusive indigo precursors in woad (*Isatis tinctoria* L.)- Identification of the major indigo precursor, Isatan A, and a structure revision of Isatan B. *Chemistry and Biodiversity* 1: 174-182.

Oberthür, C., H. Graf and M. Hamburger. 2004. The content of indigo precursors in *Isatis tinctoria* leaves – a comparative study of selected accessions and post-harvest treatments. *Phytochemistry* 65: 3261-3268.

Quian, B., P. Panichayupakaranant, A. Sirikatitham, P. Zhang, Y.D. Guo and Q. Wu. 2005. Quantitative HPLC determination of indigotin and indirubin in indigo naturalis. *Ars Pharm.* 46 (4): 429-438.

Stoker, K., D. Cooke and D. Hill. 1998. An improved method for the large-scale processing of woad (*Isatis tinctoria*) for possible commercial production of woad indigo. *J. Agric. Eng. Res.* 71: 315-320.

Tourbe, C. 1996. Le secret du bleu maya. *Sciences et Avenir* 823: 90.

Vavilov, I.N. 1992. *Origin and geography of cultivated plants*. Cambridge University Press. Londres, R.U. p. 324-346.

Vilarem, G. 1999. La chimie du pastel. *Espaces pour demain* 61 (3): 16-18.

Yacaman, J.M., L. Rendon, J. Arenas and M. C. Serra-Puche. 1996. Maya blue paint: An ancient nonostructured material. *Science* 273: 223-225.

Zhi-Quiang, X. and Z. Meinhart. 1992. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31(8): 2695-2697.

