

NUEVA APROXIMACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA PRODUCCIÓN DEL ÍNDIGO NATURAL EN LAS HOJAS DEL AÑIL (*Indigofera suffruticosa* Mill.)

Elías Jaime Matadamas Ortiz¹

Introducción

En los últimos años, la producción del colorante índigo natural ha cobrado importancia a nivel mundial derivado del interés de su consumo por los problemas de contaminación ambiental en la producción del colorante sintético y las consecuencias a la salud humana de su uso. El índigo natural es actualmente producido en varias partes del mundo a partir de fuentes vegetales. En Europa, *Isatis tinctoria* L., es la planta que se aprovecha para la extracción de este colorante y ha sido muy reciente la reactivación de su producción alcanzado un volumen de aproximadamente 1.5 toneladas al año (Lambert, 2005). En México, el índigo natural se produce en los estados de Oaxaca y Michoacán a partir del Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) y se estima un volumen anual de 400 Kgs.

Son diversos los usos actuales de los derivados del índigo natural, siendo el más común la utilización para el teñido de prendas y especialmente los tejidos para la fabricación de los *jeans*, pero también tienen aplicaciones en la industria alimentaria, en rutinas bacteriológicas, en las ciencias ambientales y generación de energía solar y recientemente como fuente para la obtención de fármacos de nueva generación para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades (Ku, 1997; Hoessel *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2001).

Se ha aceptado que el índigo natural es un producto de la evolución de precursores incoloros que se encuentran en las células de las hojas y raíces de una serie de plantas indigóticas y que el método de extracción está determinado por la naturaleza de estos precursores (Vilarem, 1999). Mientras que la base de la extracción en *Isatis tinctoria* L., es una hidrólisis alcalina, en el caso de *Indigofera suffruticosa* Mill., es una hidrólisis enzimática. La aproximación química de la evolución de los precursores a índigo durante la extracción tiene importancia práctica para la obtención de los máximos rendimientos y la máxima pureza de los extractos. La determinación de las condiciones óptimas de extracción permitirá obtener extractos de mayor calidad que se cotizarán mejor en el mercado con la misma inversión en capital y fuerza laboral.

El objetivo de este trabajo es dar a conocer una nueva aproximación de la producción del índigo en las hojas del añil que revela aspectos básicos hasta el momento no publicados y que en el futuro serán los fundamentos para mejorar la producción del índigo natural.

¹Profesor Investigador del Área de Agronomía. Departamento de Preparatoria Agrícola. Programa Universitario de Investigación en Agricultura Sustentable. Valorización Industrial de los Agro-recursos y Sistemas Agroindustriales Sustentables. Laboratorio de Agronomía y Agro-recursos. emata993@hotmail.com

Los precursores del índigo natural

Los precursores del índigo en plantas son compuestos sin color que se encuentran en las células de tejidos de parénquima tanto de las hojas como de ciertos tallos y raíces de plantas de varias familias botánicas como: Leguminosae, Brassicaceae, Polygonaceae, Acanthaceae y Orchidaceae, entre otras (Cardon y Chatenet, 1990).

Estos precursores poseen una parte de naturaleza indólica unida a una molécula de glucosa, se trata de un glucósido o más específicamente de un heterósido (Figura 1).

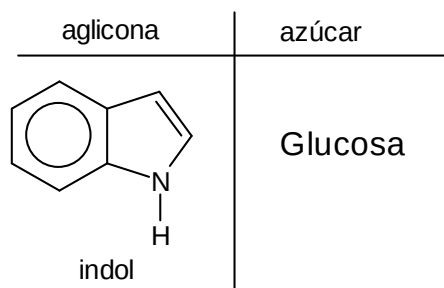


Figura 1. Estructura general de los precursores del índigo en plantas

Aunque la estructura general de los precursores es simple existen diferencias entre ellos derivadas de los tipos de enlaces entre el azúcar y la parte aglicona y la naturaleza de la glucosa. Se han identificado dos tipos de enlaces entre el carbono 3 del indol y el carbono 5 de la glucosa; el enlace éster y el enlace éter (Figura 2):

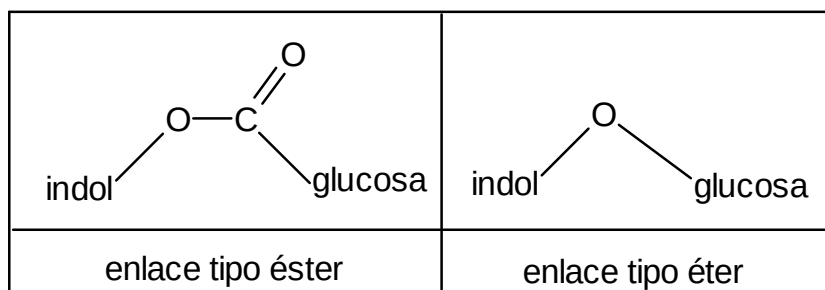


Figura 2. Tipos de unión entre la parte aglicona y el azúcar en los precursores del índigo en plantas.

El tipo de enlace de las estructuras básicas del precursor tendrá un significado importante ya que este determina el mecanismo de hidrólisis y la consecuente

liberación del indoxilo. Mientras que el enlace éster es atacado por ácidos o bases, el enlace éter es más resistente y de forma natural solo es hidrolizado por vía enzimática. Existen las formas furanosa y piranosa de la β -D-glucosa en estos glucósidos (Figura 3):

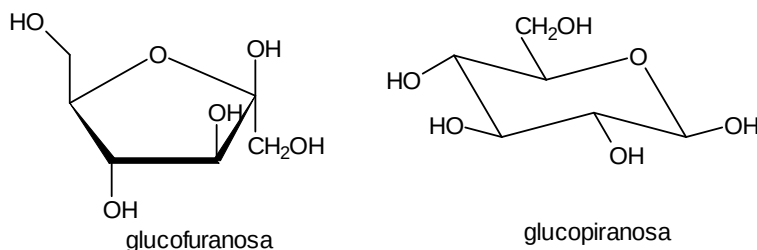


Figura 3. Formas furanosa y piranosa en los precursores del índigo en plantas.

En 1855, Schunck describió un compuesto que consideró ser el precursor del índigo tanto para *Isatis tinctoria* L., como para *Polygonum tinctorium* Ait., y especies del género *Indigofera*, al que llamó **indicán**. Este autor observó que al evolucionar este precursor con el tratamiento de las hojas de varias plantas indigóticas daba lugar al índigo. Pero no fue sino hasta el año de 1900 que Hoogerwerff y Meulen determinaron la estructura del indicán identificándolo como indoxil- β -D-glucósido y confiriéndole la fórmula estructural de $C_{14}H_{17}NO_6$ (Figura 4):

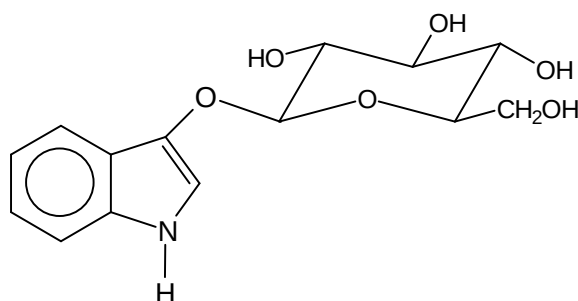


Figura 4. Indoxil- β -D-glucósido o indicán.

También estos autores establecieron que no observaron diferencias entre el indicán de *Indigofera leptostachya* y de *Polygonum tinctorium*, concluyendo que se trata del mismo compuesto.

En ese mismo año de 1900, Beijerinck presentó los resultados de sus investigaciones relacionadas con los precursores del índigo de *Isatis tinctoria*, *Indigofera leptostachya* y

Polygonum tinctorium y planteó por primera vez la posibilidad de que existieran dos precursores diferentes. Para este autor *Indigofera leptostachya* y *Polygonum tinctorium* son “plantas con indicán” e *Isatis tinctoria* es una “planta con indoxilo”. El argumento de Beijerinck fue que los extractos de *Isatis* sólo producen índigo cuando son tratados con una base, mientras que el indoxil- β -D-glucósido es estable aún en presencia de bases fuertes y son hidrolizados por enzimas glucosidasas de la propia planta o de microorganismos. A su vez, cuando estas enzimas se incubaron con extractos de *isatis* no produjeron índigo.

Epstein *et al.*, (1967), aisló e identificó el precursor de *Isatis* anunciado años atrás por Beijerinck y lo nombró indoxil-5-cetogluconato o **isatán B** propuso la siguiente estructura (Figura 5):

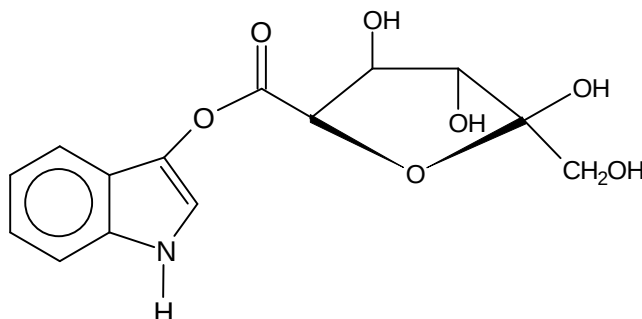


Figura 5. Indoxil-5-cetogluconato o isatán B.

Posteriores estudios comprobaron que varias especies de *Isatis* contienen tanto indicán como isatán B, estando éste último en mayor cantidad en las hojas en relación al indicán; y en las raíces se presenta una mayor cantidad de indicán que de isatán B (Strobel y Groger, 1989). A partir de estos estudios se admite que especies de *Isatis* contienen los dos precursores, siendo mayoritario el isatán B, y en especies del género *Indigofera* y en *Polygonum tinctorium* solo contiene indicán.

Zhia-Qiang y Meinhardt (1992) aislaron el indicán de *Isatis tinctoria*, *Polygonum tinctorium*, *Baphicacanthus cusia* y *Calanthe veratrifolia*. De acuerdo al conocimiento hasta este momento se establece que solo el pastel (*Isatis* sp.) contiene los dos precursores y todas las demás plantas indigóticas contienen solo indicán. Por lo tanto no existe reporte de la presencia de isatán B en la mayoría de las especies productoras del colorante.

Maugard *et al.*, (2001) reportó un nuevo precursor del índigo en las hojas de *Isatis tinctoria*, al que llamó **isatán C**. Este precursor fue tentativamente identificado como

dioxindol éster con un peso molecular de 395.0 y una posible fórmula molecular $C_{20}H_{13}O_8N$ (Figura 6).

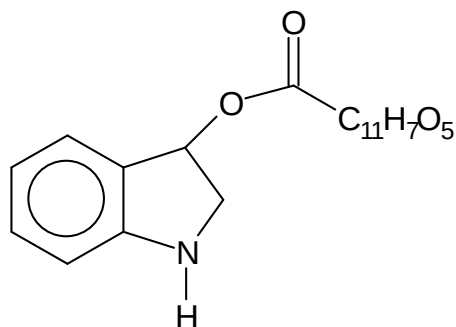


Figura 6. Dioxindol éster o isatán C.

Oberthür *et al.*, (2004) extrajo y estudió precursores con mayor polaridad que las del indicán e isatán B en hojas de *Isatis tinctoria* en la Universidad de Jena, Alemania. Identificó un nuevo precursor al que llamó **Isatán A** (1*H*-indol-3- 6'-*O*-(carboxiacetil)- β -D-ribohex-3'ulopiranosido). Además, rectificó la estructura del isatán B; en lugar de indoxil-5-cetogluconato resultó ser 1*H*-indol-3-il β -D-ribohex-3-ulopiranosido (Figura 7).

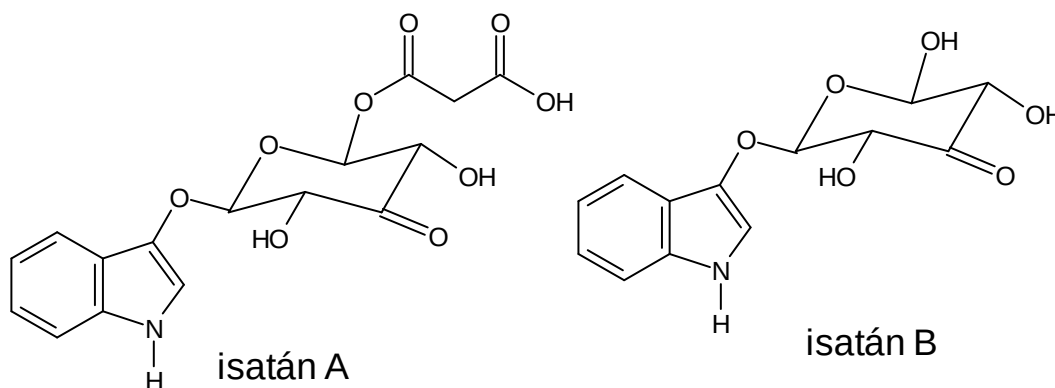


Figura 7. El isatán A y la nueva estructura del isatán B de Oberthür.

En estos trabajos, el isatán A resultó ser el precursor mayoritario y al igual que el isatán B produjeron índigo bajo un tratamiento con bases o ácidos. Además se plantea la hipótesis que el indicán puede transformarse en isatán B por medio de una enzima oxidoreductasa.

Modelo químico de la producción de índigo en plantas

Con los conocimientos generados hasta el momento se ha establecido un modelo químico que pretende explicar la evolución de los precursores a las moléculas colorantes derivadas del índigo. Se parte de la formación de los precursores a partir del indol los cuales durante la extracción sufren una hidrólisis para liberar indoxilo y glucosa. Esta hidrólisis se efectúa para el caso de los precursores ésteres (isatán A, isatán B e isatán C) por la vía alcalina en hojas de especies de *Isatis*, mientras que la hidrólisis del indicán (en *Indigofera sp.*, *Polygonum tinctorium* y otras plantas indigóticas) se realiza por vía enzimática.

Minami *et al.*, (1996) aisló una enzima β -glucosidasa de hojas de *Polygonum tinctorium* que hidroliza al indicán, aunque también encontró que ataca otros β -glucósidos. Esta enzima presentó una alta actividad a un rango de pH de 5.5 a 7.5, y ésta disminuyó drásticamente a un pH de 5.0, lo que indica que este catalizador tiene diferentes propiedades dado que la mayoría de glucosidasas su rango de pH es de 4.0 a 5.5. La termoestabilidad de esta enzima también fue determinada, encontrándose que a una temperatura de 37°C por un tiempo de 25 minutos o a 0°C por una hora, su actividad cayó en un 50%. A una temperatura de 60°C por 5 minutos su actividad desapareció completamente. Por otra parte, algunos cationes divalentes, , tales como Cu^{2+} , Ag^{+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} , inhibieron la actividad de la enzima de *P. tinctorium* al igual que en la mayoría de las β -glucosidasas.

De acuerdo con lo anterior es posible establecer que los métodos de extracción están determinados por el tipo de hidrólisis de los precursores mayoritarios en cada una de las especies productoras de índigo. El método de extracción para el pastel es por vía alcalina y para las demás especies se realiza por vía enzimática. Esta diferenciación radica en las características químicas de los precursores.

Como resultado de la hidrólisis de los precursores, dependiendo de la especie, se libera **indoxilo**. Cuando se condensan dos moléculas de indoxilo se forma de manera espontánea una molécula de **índigo** o **indigotina**. El indoxilo también puede oxidarse para convertirse en **isatina** y luego reaccionar con una molécula de indoxilo y producir una molécula de **indirubina**. El isatán C, por su parte, una vez hidrolizado se oxida a dioxindol y luego a isatina que al unirse al indoxilo forma finalmente también indirubina. La indigotina y la indirubina son isómeros estructurales que tienen propiedades físicas y químicas diferentes (Figura 8).

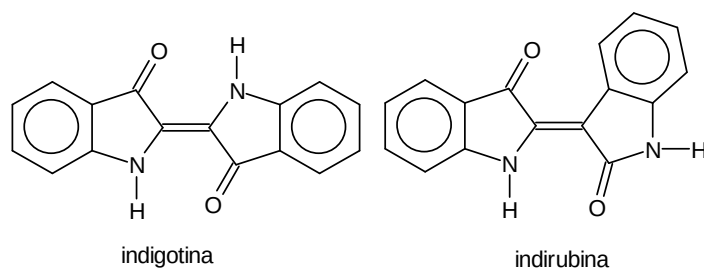


Figura 8. Moléculas derivadas del índigo.

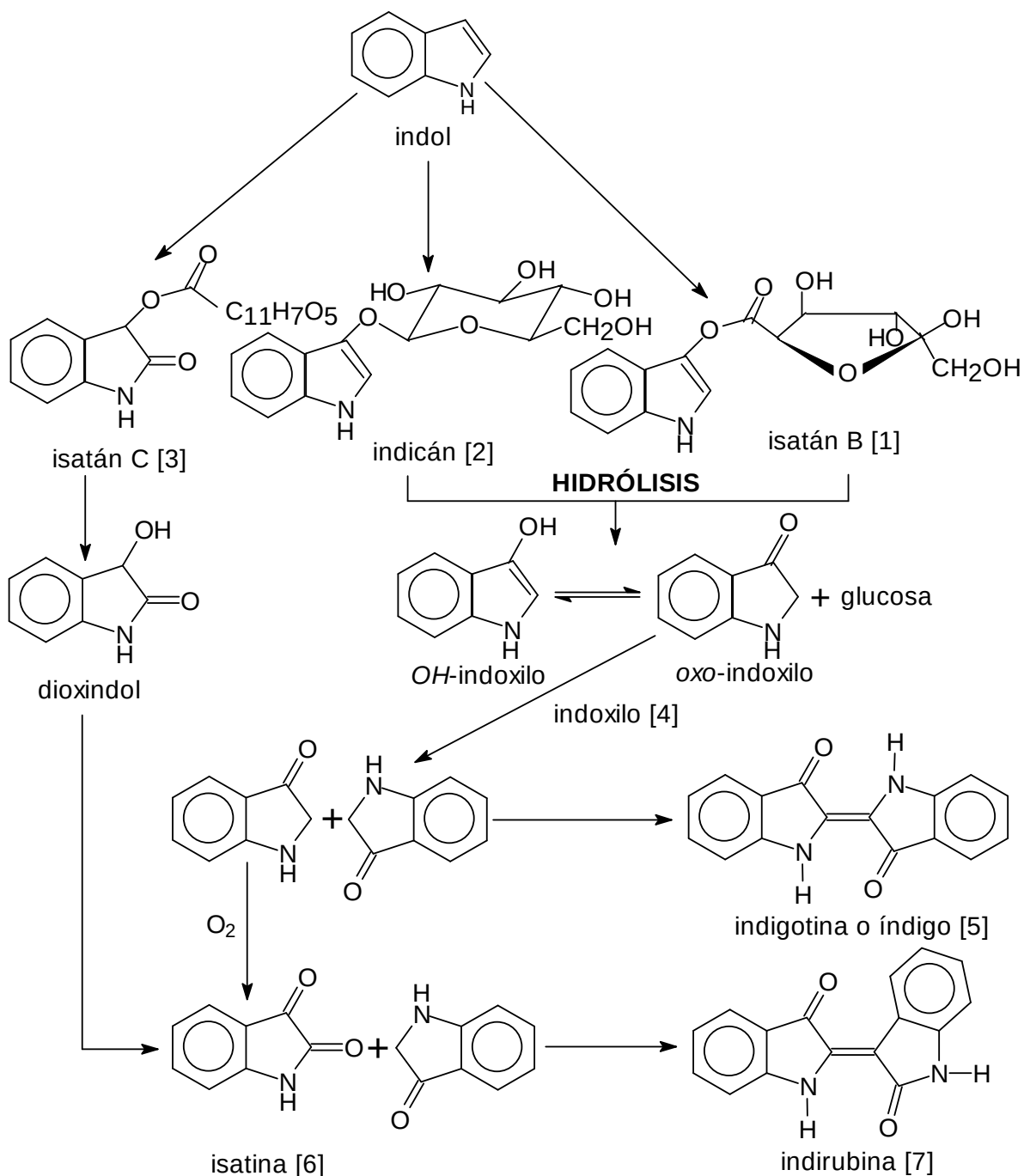


Figura 9. Modelo químico de la formación de moléculas colorantes del índigo (Kokubun *et al.*, 1998; Stoker *et al.*, 1998a; Stoker *et al.*, 1998b; Maugard *et al.*, 2001) .

Método de extracción del índigo a partir de hojas de pastel

Stoker *et al.*, (1998) propuso un método comercial de extracción del índigo a partir de hojas de pastel. Este consiste en cosechar las hojas y transferirlas a un tanque al cual se le agrega agua a una temperatura aproximada de 38°C y el pH se ajusta a un valor de 3.5. Se dejan macerar por un tiempo de 24 horas para después recuperar el líquido de extracción y se ajusta el pH a 9-10. El índigo se forma al cambio de pH y como respuesta al medio alcalino y a la presencia del oxígeno del aire. Las consideraciones teóricas de este método se basan en las propiedades del isatán B, que es el precursor mayoritario en el pastel. Este precursor posee una unión éster y un azúcar furanosa, lo que posibilita su hidrólisis alcalina. Durante la maceración, el isatán B sale de las células y tejidos de las hojas al agua resultando en un extracto rico en precursor que a su vez será hidrolizado por la base liberando el indoxilo que evolucionará a materias colorantes.

Método de extracción del índigo a partir de hojas de añil

El método tradicional de extracción de índigo a partir de hojas de añil utilizado en regiones de Oaxaca y Michoacán en México consiste en colocar tallos y hojas de añil en cubas a las que se les agrega agua a temperatura ambiente y se deja macerar por un tiempo de 15 a 18 horas, para después trasvasar el extracto a otra cuba y proceder a una agitación por medio de remos por un tiempo de 6 a 8 horas. En este momento el extracto adquiere una tonalidad verde oscuro y una muestra de éste nos permite observar pequeños gránulos de índigo azul (Binniza, 1999). Para el caso del añil, el único precursor existente en las hojas, de acuerdo a la literatura es el indicán que es un glucósido con un enlace de tipo éter y un azúcar piranosa. El indicán se resiste a la hidrólisis alcalina y la participación de una enzima β -glucosidasa se hace necesaria para la liberación del indoxilo y posterior transformación a índigo e indirubina. Podemos pensar que existen dos etapas en la extracción del añil; la primera es la salida del indicán al medio reaccional, y la segunda, es durante la agitación cuando se da la hidrólisis y la liberación del indoxilo.

Consideraciones para el establecimiento de un nuevo modelo de la evolución del índigo en plantas

En base a los resultados de ensayos de extracción del índigo tanto con hojas de *Isatis tinctoria* L., (pastel) como de *Indigofera suffruticosa* Mill., (añil), hemos llegado a la conclusión que el modelo químico actual no explica completamente el comportamiento de los precursores y no permite la optimización de las condiciones de extracción y por lo tanto el aprovechamiento de la totalidad de precursores en las hojas de las plantas indigóticas no ha sido posible. Lo que actualmente se sabe sobre la ruta biosintética es parcial y cada vez se vuelve más complejo con la aparición de un mayor número de precursores en el pastel. Las siguientes consideraciones nos han conducido a plantear una nueva aproximación en este tema:

1. La producción de índigo a partir de las hojas del pastel por el método tradicional de la elaboración de "cocañas". El método tradicional hasta finales del siglo XIX en Europa

consistió en el molido del material foliar de esta crucífera, con lo cual se obtenía una pasta (de ahí el nombre de pastel o *pâte*) que sufría una serie de fermentaciones, humectaciones y secados controlados. Con este material se elaboraban unas esferas que recibieron el nombre de *cocagnes* o cocañas que se dejaban secar y contenían una cantidad determinada de materias colorantes. Los teñidores al disponerse a utilizar este material lo trituraban y obtenían un molido llamado *agranate*, el cual era utilizado en las cubas de reducción para el teñido de prendas. Existen suficientes evidencias que en ningún momento para la elaboración de las cocañas se utilizara un álcali, por lo que la hidrólisis del precursor mayoritario no era de naturaleza básica. Este método por sí mismo no permite explicar la naturaleza del isatán B.

2. *La inestabilidad del isatán B.* Los diferentes investigadores que han estudiado al isatán B han observado su alta inestabilidad, lo que pone en duda su calidad de precursor. Se observó también que el rendimiento de índigo disminuye de manera notable con el método actual de extracción del pastel según la edad de las hojas. Las hojas frescas presentan rendimientos mayores, pero hojas de pastel con 15 días de cosechadas y almacenadas a 7°C pierden hasta un 70% de índigo.

3. *La producción de fécula de índigo a partir de hojas de pastel sin la agregación de álcalis.* Ensayos de extracción en los que hojas de *Isatis tinctoria* se pusieron a macerar en agua por un tiempo de 14 horas para luego separar el material vegetal y agitar por 10 horas resultaron en la producción de índigo sin la necesidad de la adición de alguna base.

4. *La extracción de índigo alcalina de hojas del añil.* Ensayos de extracción de índigo de hojas de añil utilizando el método de extracción para el pastel produjeron un extracto al cual se le agregó una base y se produjo de manera espontánea el índigo. Hasta el momento no hay reportado en la literatura la extracción alcalina en el añil.

Nueva aproximación fisicoquímica de la producción de índigo en el añil

Este enfoque se basa en las siguientes consideraciones:

a) El material vegetal en el momento de la extracción está vivo y por lo tanto el metabolismo a nivel celular es activo con importantes alteraciones causadas por su manejo y manipulación durante el transporte y extracción.

b) Los precursores del índigo son metabolitos secundarios cuya función, se cree, es la de defensa de la planta contra depredadores. Es decir, la producción natural de índigo en una planta viva representaría un mecanismo de defensa contra herbívoros u otros riesgos físicos. Se requiere, entonces, una reacción rápida de formación de la sustancia protectora y una reacción enzimática sería tan lenta que no cumpliría con este rol de protección.

c) Hasta el momento no se ha reportado la identificación de una β -glucosidasa específica para el isatán B. Y en tal caso, las hojas del pastel debieran contener también glucosidasas para el isatán A e isatán C.

d) La mayoría de las especies vegetales productoras de índigo tienen por único precursor al indicán, y la excepción es *Isatis tinctoria* L., en la que se han reportado hasta tres precursores ésteres.

De acuerdo a lo anterior se plantea la siguiente aproximación:

1. En el caso del añil el único precursor es el indoxil- β -D-glucósido o indicán, y es posible que en todas las plantas productoras de índigo contengan solo este precursor, incluyendo a *Isatis tinctoria* L.

2. El índigo es un artefacto de la extracción y sus condiciones determinarán el grado de evolución de los precursores a materias colorantes.

3. La liberación del indoxilo del indicán es por una hidrólisis oxidativa que se produce en los tejidos de las hojas.

4. Los agentes oxidantes que participan en esta hidrólisis oxidativa son las llamadas *especies de oxígeno reactivas (reactive oxygen species, ROS)*: $^1\text{O}_2$, O_2^- y H_2O_2 y ^-OH .

5. La producción de agentes oxidantes promotores de la hidrólisis oxidativa del indicán se da por efecto del sometimiento de las hojas a condiciones de estrés causadas por: disminución de niveles de CO_2 , bajas temperaturas, altas temperaturas, alta incidencia de luz, interrupción de la fotosíntesis, asfixia, contaminación de la atmósfera de la planta, solventes orgánicos, solución acuosa con pH ácidos o básicos, etc.

6. La producción de agentes oxidantes también degradan las membranas celulares facilitando la salida de los contenidos celulares de hojas aún en agua a temperaturas de 0-5°C, por mecanismos como la peroxidación de lípidos y la esterificación de ácidos grasos.

7. El indoxilo liberado resultante de la hidrólisis oxidativa se difunde al medio reaccional donde reacciona con otros compuestos o puede oxidarse para formar índigo.

8. El indoxilo se oxida a mayor velocidad en medio básico, por lo que la adición de una base permite una más rápida formación del índigo.

9. El indicán también es atacado por microorganismos que pueden hidrolizarlo.

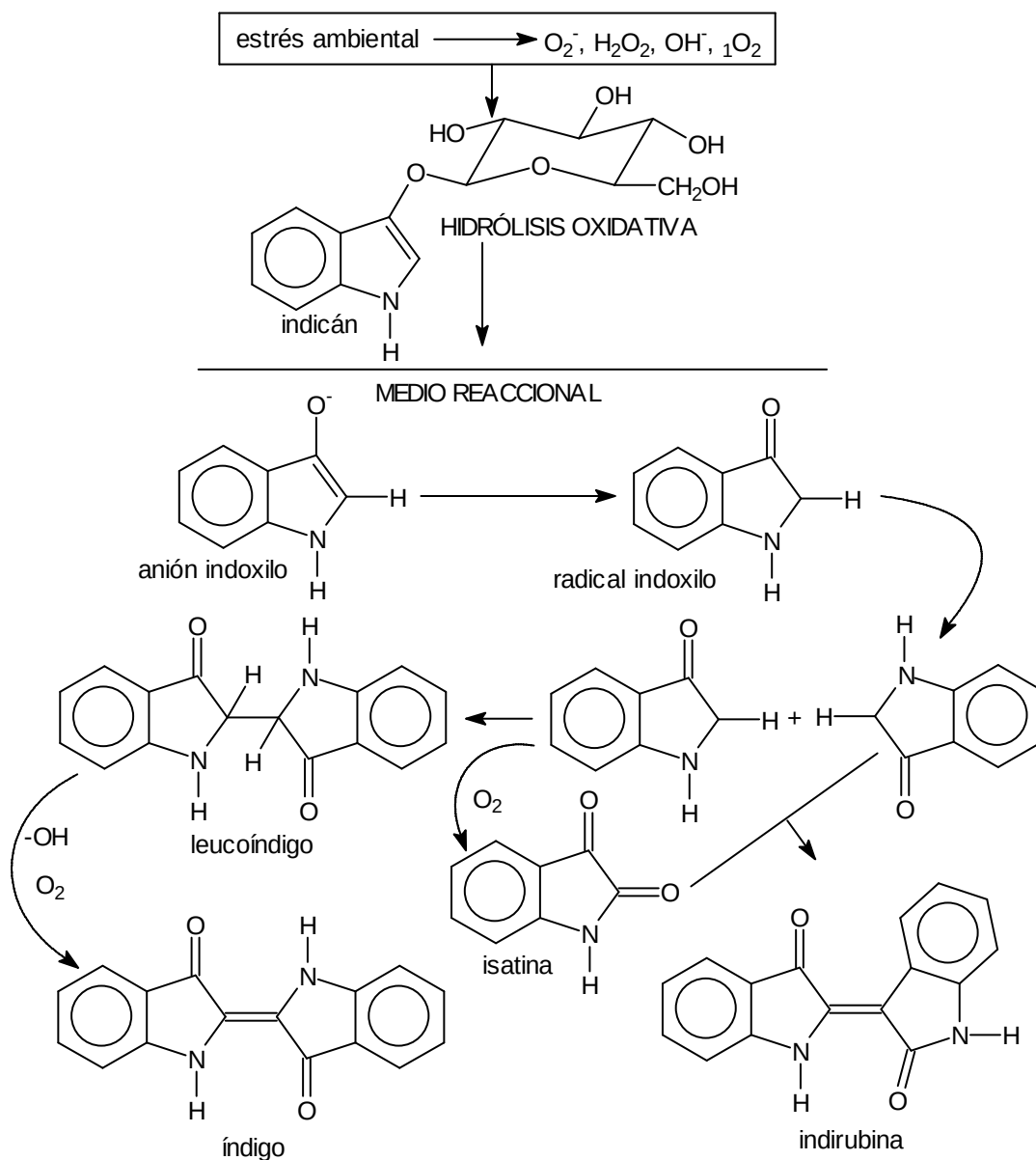


Figura 10. Nuevo modelo fisicoquímico de la producción del índigo natural de las hojas del Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.)

Avances en la comprobación del modelo fisicoquímico

Se han realizado ensayos sobre la hidrólisis del estándar de indicán (SIGMA), así como la extracción a diferentes temperaturas del índigo y la obtención de un extracto crudo de indicán que se ha sometido a diferentes tratamientos con agentes oxidantes.

Conclusión preliminar

Los resultados de los ensayos de extracción se ajustan más al modelo fisicoquímico propuesto. Es necesario completar los experimentos de oxidación del indicán de las hojas del añil para comprobar nuestras hipótesis. No obstante es posible plantear que existen dos vías de la hidrólisis del indicán. La primera es por efecto de las especies de oxígeno reactivas (ROS) producidas por el estrés ambiental, y la segunda es por acción de microorganismos que atacan a los extractos de indicán.

Bibliografía citada

- Beijerinck, M. K. 1899. The production of indigo from woad (*Isatis tinctoria*). *Nature* 61(1568):71.
- Binniza, A.C. Centro de Investigaciones y Desarrollo. 1999. El Añil en Oaxaca. En: *El Tecolote*. Boletín de la Comisión de Defensa Ecológica. Año VI. 3ª. Época. No. 1 pp-2-7. Oaxaca, México.
- Cardon, D. et Chatenet, G. 1990. Guide des Teintures Naturelles- Plantes, Lichens, Champignons, Mollusques et Insectes. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris, 400 p.
- Epstein, E., Nabors, M.W. and Stowe, B.B. 1967. Origin of indigo of woad. *Nature* 216(11):547-549.
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J., Noble, M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G. and Meijer, L. 1999. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology* 1:60-67.
- Hoogewerff, S. and Meulen, H. 1900. Contribution to the knowledge of indican. *Proc. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences* 2, 1899-1900:520-525.
- Kokubun, T., Edmonds, J. and Jhon, P. 1998. Indoxyl derivatives in Woad in relation to medieval indigo production. *Phytochemistry* 49(1):79-87.
- Ku, Q. V. 1997. El añil en el sur del Istmo oaxaqueño. Perspectivas de sustentabilidad de los sistemas agrícolas actuales. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 87 p.
- Lambert, H. 2005. Résumé de l'intervention au Congrès International Indigo et colorants naturels. En: *Les Travaux de L'Académie des Arts & des Sciences du Pastel* No. 01- Juin 2005, Toulouse, France, pp-4-5.
- Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, L.G., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G. and Meijer, L. 2001. Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* 276(5):251-260.
- Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P. and Legoy, D. 2001. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry* 58:897-904.
- Minami, Y., Kanafuji, T. and Miura, K. 1996. Purification and characterization of a β -Glucosidasa from *Polygonum tinctorium*, Which catalyses preferentially the hydrolysis of indican. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(1):147-149.
- Oberthur, C., Schneider, B., Graf, H., and Hamburger, M. 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 & Biodiversity* 1:174-182.

- Strobel, J. und Groger, D. 1989. Über das Vorkommen von Indigovorstufen in *Isatis*-Species. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 184:321-327.
- Stoker, K.G., D.T. Cooke and D. J. Hill. 1998a. Influence of light on natural indigo production from woad (*Isatis tinctoria*). *Plant Growth Regulation* 25:181-185.
- Stoker, K.G., D.T. Cooke and D. J. Hill. 1998b. An Improved Method for the Large-Scale Processing of Woad (*Isatis tinctoria*) for Possible Commercial Production of Woad Indigo. *J. Agric. Engng. Res* 71:315-320.
- Shunck, E. 1855. X. On the formation of indigo-blue. Part I. *Philosophical Magazine Serie 4* 15(97):73-95.
- Vilarem, G. 1999. La chimie du Pastel. *Espaces pour Demain* 61:16-17.
- Zhi-Qiang, X. and Meinhart, H.Z. 1992. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31(8):2695-2697.