

Rendimientos de índigo en hojas de Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) a diferentes temperaturas de extracción y con tratamiento de lavado.

Matadamas Ortiz Elías Jaime¹

Profesor-Investigador del Área de Agronomía y del Programa Nacional de Investigación en Agricultura Sustentable de la Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 carretera México-Texcoco. C.P. 56230. Chapingo, Estado de México.

Introducción

Uno de los más antiguos colorantes conocidos naturales 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 un 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) y un grupo de especies leguminosas llamadas “indigóticas” (indigotiers). 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, N.I., 1992). *Indigofera arrecta* Hoschst. es una especie nativa de Etiopía que es cultivada en Africa (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 esta especie se le ha dado diferentes nombres de acuerdo a la región y lengua. De esta manera, el nombre de *Xiquilite* o *jiquilite* fue utilizado por los mexicas hasta antes de la llegada de los españoles. En maya se le nombró como *Ch'oh* y en zapoteco *Yaga-Cohui pichacha* o *Nocuana-cohui* (Moziño, S.J.M., 1994). En la época de la colonia, el *Xiquilite* (Hierba tinta) pasó a ser el Añil. El añil comprende una especie y dos subespecies que crecen desde el centro de México hasta Guatemala, El Salvador y Perú. Sus dos subespecies son: *Indigofera suffruticosa* Mill., ssp. *Suffruticosa* e *Indigofera suffruticosa* Mill., spp. *Guatemalensis* (Kort y Thigisse, 1984). Es necesario hacer una exhaustiva caracterización de los ecotipos de añil en México ya que el autor ha realizado varias colectas en condiciones climáticas y edáficas contrastantes y presentan hábitos de crecimiento diferentes. Por ejemplo, la colecta “San Lorenzo” se desarrolla en forma silvestre en los Valles Centrales de Oaxaca; la colecta “La Maquina” fue realizada en la Costa Chica de Guerrero a nivel del mar y la colecta “Istmo de Tehuantepec” tiene un crecimiento mayor que las anteriores (Matadamas, O.E., 2005).

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, G.K., Cooke, T.D., y Hill, J.D., 1998; Gilbert, K.G., *et al.*, 2004; García, M.P., y John, P., 2004). En Alemania, los investigadores se han abocado a la cuantificación de los precursores en *Isatis tinctoria* L. (Oberthür, C. *et al.*, 2004a; Oberthür, C. *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, O.E., 2002).

El principal motivo de la investigación en el índigo natural está relacionado con su uso como alternativa al índigo sintético, el cual presenta desventajas tanto en su producción como en su utilización. El Instituto Textil de Francia ha estimado que el mercado de textiles teñidos con colorantes naturales crece a un ritmo de aproximadamente el 8% por año, lo que demanda cada vez más una producción mayor de colorantes de este tipo, y del índigo en particular (Vilarem, G., 2004). En México, la investigación sobre las especies vegetales tintóreas, y en especial, sobre la extracción del índigo es escasa y de este aspecto solo se cuenta con información que data de hace más de un siglo (Moziño, S. J.M., 1797, editado por Sarabia, V., 1994; Rosignon, J., 1884) y de los conocimientos empíricos sobre la extracción que poseen pocos productores en algunas entidades del país recopilados en algunas publicaciones (Centro de Investigación y Desarrollo Binnizá, A.C., 1999).

En nuestro país, el proceso de extracción del colorante se realiza de manera empírica, lo que resulta en diversas dificultades para obtener los máximos rendimientos a partir de determinada cantidad de material vegetal. Los productores no conocen con exactitud las épocas del año y la etapa fenológica del añil en la que se puede obtener una mayor cantidad de colorante o sus indicadores de cosecha son imprecisos y en algunos casos, son subjetivos. Ku, Q.V. (1997), después de haber evaluado desde el punto de vista agroecológico los sistemas de producción del añil y de la extracción del índigo en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, recomendó realizar estudios químicos para determinar la cantidad de índigo que contienen las plantas de añil en diferentes estados fenológicos y clarificar técnicamente el proceso de extracción del índigo.

La química del índigo

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, G. 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, E., *et al.*, 1967; Zhi-Qiang, X., y Meinhart, H.Z., 1992; Maugard, T., *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 [2]**, 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 [4]**, el cual es una especie altamente reaccional que se isomeriza y se condensa a otra molécula similar para formar el índigo o **indigotina [5]** en presencia de oxígeno en el ambiente. El indoxilo puede también oxidarse y forma **isatina [6]** que al unirse a una molécula de indoxilo, produce la **indirubina [7]**. Este último compuesto es un isómero estructural del índigo, pero posee un color rojo (Stoker, G. K., *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, Y., *et al.*, 1997).

Tomando en consideración la ruta de biosíntesis del índigo en algunas especies estudiadas, se propone a continuación una posible vía de la producción del índigo en añil.

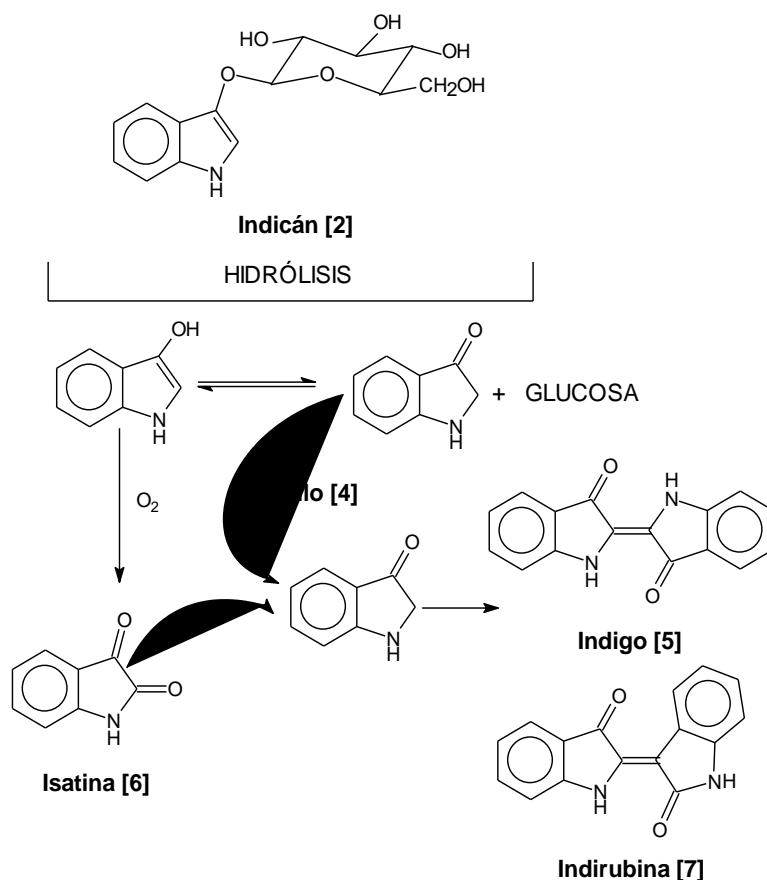


Figura 1. Posible vía biosintética del índigo y de la indirubina en las hojas del añil.

En el presente artículo se reportan los resultados del efecto de la temperatura de extracción y de un tratamiento de lavado de hojas previo a la extracción en el rendimiento de índigo en hojas del añil.

Materiales y Métodos

Material vegetal.- Se cosecharon hojas de añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) de la colecta “La Maquina” sembradas en Chapingo, México y se llevaron al Laboratorio de Agronomía de la Universidad Autónoma Chapingo donde se desarrollaron los experimentos.

Extracción.- Para la obtención de un extracto acuoso de índigo a partir de las hojas de añil se emplearon 28 g de hojas frescas (recién colectadas de las plantas) por tratamiento y se pusieron en un recipiente. Se agregaron 500 ml de agua deionizada a temperaturas de 23, 40, 80 y 100° C. En estas condiciones, se dejaron macerar las hojas por un tiempo de 24 horas. L. Para cada tratamiento de temperatura de extracción se tuvieron dos modalidades, una con lavado de hojas y la otra sin lavado de hojas.

Lavado de hojas antes de la extracción.- A fin facilitar la salida tanto del precursor como de su enzima se realizó un tratamiento de lavado para eliminar la capa de ceras de la parte superior de la cutícula. Este tratamiento consistió en una inmersión de las hojas en hexano por un tiempo de 5 segundos.

Separación y recuperación del extracto acuoso de índigo.- Pasado el tiempo indicado se separaron las hojas del extracto por filtración en papel filtro y se procedió a recuperar el filtrado el cual fue calentado a 37.5 °C y luego fue sometido a oxidación en un agitador eléctrico. Una vez que

apareció una capa de espuma de color azul en la superficie del extracto se dejó reposar por un tiempo de 2 horas. Se agregaron 20 ml de una solución de HCl al 5 M y se diluyó el extracto con agua para completar 520 ml.

Análisis espectrofotométrico.- Para determinar la cantidad de índigo en muestras acuosas fue necesario elaborar una curva de calibración con una serie de soluciones de concentraciones conocidas de índigo SIGMA [482-89-3] en 1-metil-2-pirrolidona (NMP) [872-50-4] y 2,6-di-tert-butilo-4- metilfenol (BHT) [128-37-0] al 0.5% en un espectrofotómetro UV-Vis SPECTRONIC GENESYS.

Se tomó una alícuota de 2.4 ml y se pasó a un matraz volumétrico con una capacidad de 40 ml y se aforó con NMP conteniendo 0.5% de BHT. Esta dilución se pasó al espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a una longitud de onda analítica de $\lambda = 610 \text{ nm}$.

Resultados

Los rendimientos de los tratamientos de temperatura y lavado de hojas se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Rendimientos de índigo con varias temperaturas de extracción y lavado de hojas.

Temperatura de extracción °C	mg de índigo/ 100 g de hojas verdes	
	Sin lavado de hojas	Con lavado de hojas
23	67.7 _c	89.7 _b
40	98.3 _b	131 _a
80	97.4 _b	122 _a
100	0.00 _d	0.00 _d

Diferente literal significa que no son iguales a un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

Los efectos de la temperatura de extracción y del tratamiento de lavado de hojas se ilustran en la figura 2.

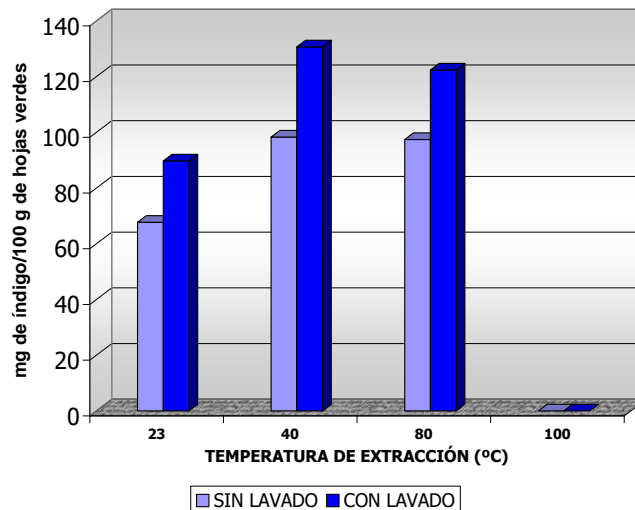


Figura 2. Rendimientos de índigo en hojas de añil a diferentes temperaturas de extracción y con lavado.

Los mejores rendimientos se obtuvieron a temperaturas de 40 y 80 °C, con tratamiento de lavado de hojas con un promedio de 126.5 mg de índigo/100 g de hojas. Se obtiene igual rendimiento de índigo (95 mg/100 g de hojas) a una temperatura ambiente de 23 °C con tratamiento de lavado y a temperaturas de 40 y 80 °C sin tratamiento de lavado de hojas. A una temperatura de 23 °C y sin tratamiento de lavado se obtuvo un rendimiento de 68 mg/100 g de hojas. Finalmente, a una temperatura de 100 °C, no se obtuvo cantidad alguna de índigo, tanto con o sin tratamiento de lavado.

Discusión

En base a los resultados reportados y a experiencias preliminares podemos identificar que existen dos etapas críticas en el proceso de extracción del índigo de las hojas del añil. La primera de las cuales está relacionada con la facilidad de entrada del solvente a los tejidos vegetales y al interior de la célula, la solubilidad de los compuestos celulares con el solvente y a la salida del glucósido precursor (indicán) como de la enzima (indicán- β -glucosidasa) al medio acuoso. Las barreras físicas que presentan resistencia a la entrada del agua al interior de la célula y a la salida de estos compuestos lo representan, la cutícula y las paredes y membranas celulares. Una temperatura mayor de 80 °C puede hacer disminuir esas resistencias al romper la estructura y disposición de los compuestos hidrofóbicos o ceras que se encuentran en la parte superior de la cutícula. Esto puede facilitar la entrada del solvente de extracción y aumentar la solubilidad de éste con el sustrato y con su enzima, y asimismo su salida. La otra etapa crítica se relaciona con el momento de la hidrólisis del indicán para la liberación del indoxilo y la evolución final a índigo, una vez que la enzima y su sustrato se encuentran fuera del tejido vegetal. El medio acuoso reaccional debe presentar ciertas condiciones de temperatura, pH, densidad, composición, etc., para que la enzima pueda reaccionar con eficiencia con el sustrato, y de igual manera para que la enzima no tienda a degradarse. Minami, Y., *et al.*, (1996) reportó que la enzima indicán- β -glucosidasa, responsable de la hidrólisis del indicán en *Polygonum tinctorium* presentó una alta actividad a un pH entre 5.5 y 7.5. A un pH menor de 5.0 su actividad fue baja. Estos investigadores también determinaron la termoestabilidad de esta enzima encontrando que cuando ésta fue sometida a una temperatura de 37 °C por un tiempo de 25 min o a 0 °C por una hora, en ausencia de indicán; su actividad disminuyó aproximadamente en 50%. Cuando fue incubada a 60 °C por un tiempo de 5 minutos, su actividad desapareció totalmente. En este estudio, se pudo observar que una temperatura de 80 °C y el tratamiento de lavado de hojas tuvieron un efecto en la facilidad de entrada del solvente al interior de los tejidos vegetales y en la salida del precursor y de la enzima al medio reaccional. El tratamiento de lavado con un solvente no polar elimina las ceras depositadas en la cutícula, permitiendo la entrada y salida del agua de los tejidos del añil. Sin embargo, una temperatura por encima de los 80 °C al principio de la maceración provoca la degradación térmica de la enzima y por consecuencia la nula hidrólisis del precursor. Lo anterior explica porque no hay producción de índigo en los ensayos a una temperatura de 100 °C.

Conclusiones

El tratamiento de lavado de las hojas de añil y una temperatura límite de 80 °C al inicio de la maceración, facilitan la entrada del solvente a las células de las hojas y asimismo la salida del indicán y de la indicán- β -glucosidasa. Temperaturas de extracción mayores de 80 °C, tienden a degradar la enzima, con la consecuente disminución en la tasa de hidrólisis y en el rendimiento de índigo. No se obtiene índigo a una temperatura de extracción de 100 °C.

Bibliografía

1. CANNON, M., CANNON, J., and DALBY-QUENET, G. 1994. **Dye Plants**. Ed. The Herbet Press Ltd. The Royal Botanic Gardens, Kew. London. 8 p.
2. CARDON, D., et CHATENET, G. 1990. **Guide des teintures naturelles. Plantes – Lichens , Champignons, Mollusques et Insectes**. Ed. Delachaux et Niestlé. Paris, Francia.

3. CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO BINNIZA, A.C. 1999. **El Añil en Oaxaca**. En : *El Tecolote*. Boletín de la Comisión de Defensa Ecológica. Año VI. 3a. Época, No. 1, 2-7. México.
4. CLARK, J.H.R., COOKSEY, J. C., DANIELS, A.M.M. and WITHNALL, R.1993. **Indigo, Woad, and Tyrian Purple : important vat dyes from antiquity to the present**. *Endeavour*, **17**(4) : 191-199.
5. EPSTEIN, E., NABORS, M.W., and STOWE, B.B. 1967. **Origin of Indigo of Woad**. *Nature*. **216**(11), 547-549.
6. GALIAN, M., et GILLES, A. 1993. **La renaissance du Pastel en pays de cocagne**. *Bulletin de l'union des physiciens*, **87**(757) : 1229-1252.
7. GARCIA-MACIAS, P., and PHILIP, J. 2004. **Formation of Natural Indigo Derived from Woad (*Isatis tinctoria* L.) in Relation to Product Purity**. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7891-7896.
8. GILBERT, K.G., MAULE, H.G., RUDOLPH, B., LEWIS, M., VANDENBURG, H., SALES, E., TOZZI, S., and COOKE, T.D. 2004. **Quantitative Analysis of Indigo and Indigo Precursors in Leaves of *Isatis* spp. and *Polygonum tinctorium***. *Biotech. Prog.* **20**, 1289-1292.
9. KORT, I., and THIGISSE, G. 1984. **A Revision of the Genus *Indigofera* (Leguminosae-Papilionoideae)**, in S.E. Asia. *Blumea*, **30**, 89-151.
10. KU, Q.V. 1997. **El Añil en el Sur del Istmo Oaxaqueño. Perspectivas de sustentabilidad de los sistemas agrícolas actuales**. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. México.
11. MATADAMAS-ORTIZ, 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.
12. MATADAMAS, O.E.J., 2005. **Oro azul: el índigo. Propiedades, fuentes y métodos de extracción**. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. México. 124 p.
13. MAUGARD, T., ENAUD, E., CHOISY, P., and LEGOY, D. 2001. **Identification of an precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad)**. *Phytochemistry*. **58**, 897-904.
14. MINAMI, Y., KANAFUJI, T., and MIURA, K. 1996. **Purification and Characterization of a β -Glucosidase from *Polygonum tinctorium*, Which Catalyses Preferentially the Hydrolysis of Indican**. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**(1), 147-149.
15. MINAMI, Y., TAKAO, H., KANAFUJI, T., MIURA, K., KONDO, M., HARA-NISHIMURA, I., NISHIMURA, M., and MATSUBARA, H. 1997. **β -Glucosidase in the Indigo Plant : Intracellular Localization and Tissue Specific Expression in Leaves**. *Plant Cell Physiol.* **38**(9), 1069-1074.
16. MOZIÑO, S.F.J.M. 1994. **Tratado del Xiquilite y Añil de Guatemala**. En: **La grana y el Añil. Técnicas Tintóreas en México y América Central**. Ed. Publicaciones de la Escuela de Estudios Hispano-Americanos de Sevilla. N°. general catalogo 374. Editora Ma. Justina Sarabia Viejo. Sevilla, España.
17. 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.
18. OBERTHUR, C., GRAF, H., and HAMBURGER, M. 2004. **The content of indigo precursors in *Isatis tinctoria* leaves – a comparative study of selected accessions and post-harvest treatments**. *Phytochemistry*. **65**, 3261-3268.
19. ROSIGNON, J. 1884. **Manual del cultivo del añil y del nopal y la extracción del índigo**. Ed. Boletín de la Sociedad Agrícola Mexicana. México. 232 p.
20. STOKER, G.K., COOKE, T. D., and HILL, J.D. 1998. **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.
21. TOURBE, C. : **Le secret du bleu maya**. 1996. *Sciences et Avenir*. No.823. p-90.
22. VAVILOV, I.N. 1992. **Origin and Geography of Cultivated Plants**. Cambridge University Press. 324-346.
23. VILAREM, G. 1999. **La chimie du pastel**. *Espaces pour demain*. No. 61. 3^{ème} Trimestre, 16-17. Toulouse, Francia.
24. VILAREM, G. 2004. **Plant Dyes: Production, Extraction, and Applications. An experience in the South-West of France**. www.ienica.net/specchemseminar/vilarem/pdf.
25. YACAMAN, J.M., RENDON, L., ARENAS, J., and SERRA-PUCHE, M.C. 1996. **Maya Blue Paint : An Ancient Nonstructured Material**. *Science*. **273**, 223-225.
26. ZHI-QUIANG, X., and MEINHART, H.Z. 1992. **Biosynthesis of Indigo Precursors in Higher Plants**. *Phytochemistry*. **31**(8), 2695-2697.