



II CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS Y HUMANIDADES A NIVEL MEDIO SUPERIOR Y SUPERIOR AGRÍCOLA



MEMORIA



Departamento de Preparatoria Agrícola
Universidad Autónoma Chapingo
km. 38.5 carretera México –Texcoco, Chapingo, Estado de México



MEMORIA

Publicada en junio de 2024

El contenido de los trabajos que aquí se publican es responsabilidad de sus autores/as y coautores/as



Índice

Mesa 1: Ciencias Agronómicas		Página
Museo Regional del Suelo, Dr. Carlos Alberto Ortiz Solorio: una herramienta para la educación ambiental en los bosques de pino-encino de Zaachila, Oaxaca, México. Miriam Galán Reséndiz, Rogelio Álvarez Hernández, Patricio Sánchez Guzmán, Jacqueline Galán Reséndiz.		1
Usos múltiples y sistemas de manejo de la palma de tepejilote (<i>Chamaedora telejilote</i>) Rosa María García Núñez, Vanesa Guerrero Hernández.		8
Producción de abonos orgánicos para la producción agrícola de temporal en Tlaxcala. Sergio Cruz Hernández, Gerardo Noriega Altamirano, Alexander Martínez Hernández.		15
Producción, consumo aparente y consumo percapita de tomate verde en México. Verna Gricel Pat Fernández, Ignacio Caamal Cauch.		23
Mesa 2: Ciencias Agronómicas		
Injerto de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> del embrión de mayor tamaño en semillas poliembriónicas de cítricos. Elisa del Carmen Martínez Ochoa, Ángel Villegas Monter.		30
Evaluación técnica de una plantación forestal en Tepetzintla, Veracruz en el contexto del PRODEPLAN. Mario Castelán Lorenzo, Martín Nogales Bautista.		37
Emisiones de gases de efecto invernadero por la fertilización nitrogenada en la agricultura de temporal de Tlaxcala. Gerardo Noriega Altamirano, Sergio Cruz Hernández, Alexander Martínez Hernández, Ulises Iván López Reyes.		45
Desarrollo de un método espectrofotométrico cuantitativo para el análisis de extractos sólidos azules (esa) de índigo extraídos de las hojas del añil (<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill). Elías Jaime Matadamas Ortiz.		53
Mesa 3: Ciencias Agronómicas		
Importancia ecológica de especies asociadas a los sistemas agroforestales con palma tepejilote (<i>Chamaedora telejilote</i>). Rosa María García Núñez, Vanesa Guerrero Hernández.		63
Primer reporte de <i>Phytophthora ipomoeae</i> causando tizón tardío en papa (<i>Solanum tuberosum</i>) en el altiplano de México. Mercedes María Cuenca Condoy, Héctor Lozoya Saldaña.		70

Desarrollo de un método espectrofotométrico cuantitativo para el análisis de extractos sólidos azules (esa) de índigo extraídos de las hojas del añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.)

Elías Jaime Matadamas Ortiz

Laboratorio de Agro-recursos y Metabolitos Secundarios (AGROREMET). Área de Agronomía. Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. C.P. 56230. Chapingo, Texcoco. Estado de México. México. E-mail: ematadamaso@chapingo.mx.

Resumen

Se reporta el desarrollo de un método nuevo para el análisis espectrofotométrico cuantitativo de extractos sólidos azules (ESA) de índigo producidos por la extracción por solvente de la biomasa de añil basado en la reacción del HNO₃ concentrado y el índigo que resulta en la producción de isatina. Este método es útil para los productores de índigo del estado de Oaxaca para que tengan un control de calidad de sus extracciones y puedan saber la concentración del colorante en sus extractos sólidos, o su pureza. Resultó ser un método cuantitativo, sencillo, práctico y reproducible.

Introducción

Uno de los agroecosistemas tropicales más interesantes en México se presenta en la localidad de Santiago Niltepec en el estado de Oaxaca. Se trata de la producción de plantas de añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) con fines de extraer un conocido colorante textil, el índigo. Tanto el cultivo, como la extracción del tinte resultan procesos muy complejos, no obstante; lo llevan a cabo desde tiempos inmemoriales campesinos del sur de nuestro país. Actualmente solo productores de la localidad citada practican estos procesos y enfrentan problemas diversos. A nivel de extracción del índigo, como todo proceso artesanal, la calidad del producto final es variable de una extracción a otra, y de un productor a otro. Esto lo han notado los productores cuando la cantidad de los extractos sólidos azules (ESA) varían a lo largo de los años y también entre las extracciones, aun y cuando se trate de la misma parcela y el mismo año. Más importante aún, los productores no hacen análisis cuantitativos de la concentración de índigo en sus extractos sólidos, es decir, no conocen la pureza de su producto. En la literatura no hay

referencia alguna sobre una metodología para cuantificación del índigo natural en extractos sólidos que pueda ser utilizada por los productores, como tampoco existen laboratorios que brinden este servicio. Este trabajo de investigación se abocó al desarrollo de un método de análisis cuantitativo del índigo en extractos sólidos azules (ESA) destinado a que los productores puedan conocer el grado de pureza de los mismos y estar en condiciones de negociar en mejores condiciones su producto.

Los extractos sólidos azules (ESA)

Al término de la extracción de las hojas del añil, los productores obtienen un líquido espeso de color azul oscuro que filtran en telas de algodón y lo dejan escurrir por algunos días. Posteriormente, lo ponen a secar al ambiente sobre tejas al abrigo de los rayos del sol, lo que resulta en unos trozos azules los que los productores denominan como “piedra de añil”. Por nuestra parte le llamamos extractos sólidos azules (ESA). El rendimiento de extracto sólido varía en cada extracción como también su concentración de índigo y éste es cuantificable al pesar la cantidad de producto obtenido. Por otra parte, el rendimiento de índigo, que está relacionado con la pureza del extracto, no se puede determinar, y por lo tanto los productores no están en condiciones de conocer la calidad final de su producto.

Sandoval-Salas et al., (2006) reporta un método de análisis de extractos sólidos de índigo por medio de técnicas de cromatografía de capa fina de alto desarrollo (HPTLC) y densitometría, desarrollado originalmente por Matadamas (2002) en el Laboratorio de Química Agroindustrial del Instituto Nacional Politécnico de Toulouse, Francia para analizar extractos líquidos de índigo provenientes de hojas de Woad (*Isatis tinctoria* L.). Esta es una metodología compleja, laboriosa y que requiere de un equipo instrumental y materiales onerosos, por lo que difícilmente podría implementarse en nuestro medio. De acuerdo a lo anterior, es necesario contar con un método sencillo, económico y que se pueda realizar en cualquier laboratorio de investigación o de servicio.

El presente estudio consistió en desarrollar un método espectrofotométrico analítico cuantitativo del índigo en extractos sólidos azules de hojas de añil sustentado científicamente, que sea sencillo de operar y reproducible en sus resultados.



Figura 1. Extracto sólido azul de añil.

Consideraciones teóricas del método

Este método se basa en la reacción del ácido nítrico (HNO_3) y el índigo natural, que como resultado se producen 2 moléculas de isatina por cada una de índigo. Descubierta en Francia por Laurent y de forma independiente también por Erdmann en 1841 (Manchala, L., et al., 2022; Sonam, V. y Kakkar, R., 2019) (Figura 2):

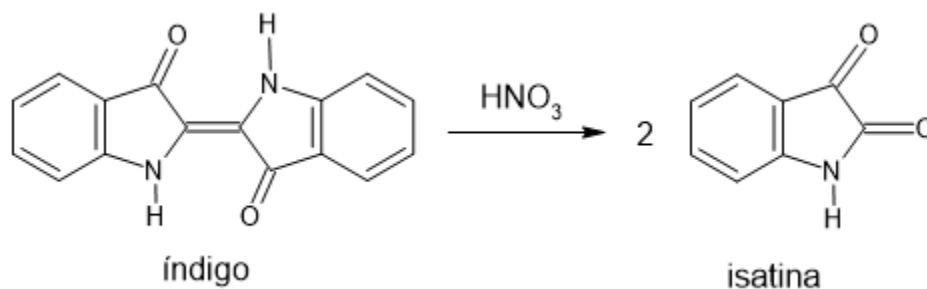


Figura 2. Reacción de oxidación del índigo por el ácido nítrico.

Es una reacción de oxidación, exotérmica y espontánea que se produce a temperatura ambiente y de acuerdo a Sánchez-Viesca y Gómez (2018) sigue las siguientes etapas:

- a) Inicialmente se produce una reacción de adición electrofílica del ácido nítrico que ataca al doble enlace con hibridación Sp^2 y se produce la introducción de un ion nitronio a la molécula de índigo, es decir una nitración (Figura 3):

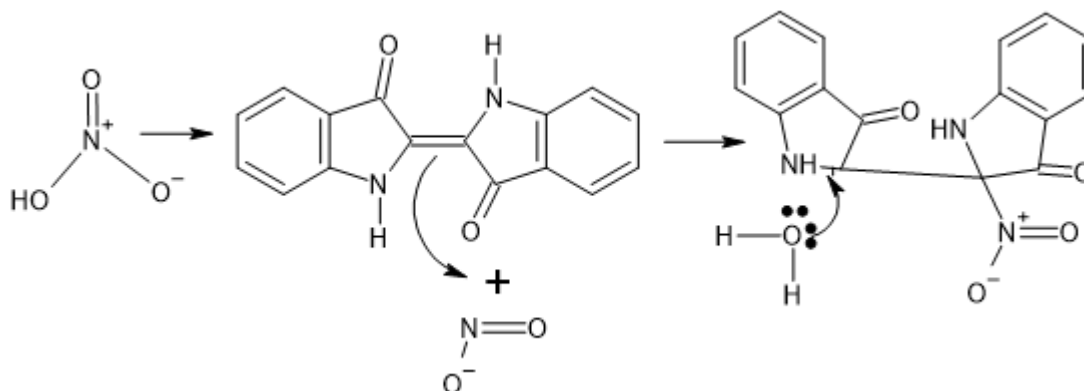


Figura 3. La nitración del índigo por el ion nitronio.

El agua transfiere un protón a la molécula del índigo en una reacción de protólisis y se produce una reacción redox en la que resulta la formación de ácido nitroso y un éter cíclico formado por un átomo de oxígeno unido a dos átomos de carbono unidos entre sí mediante un enlace covalente:

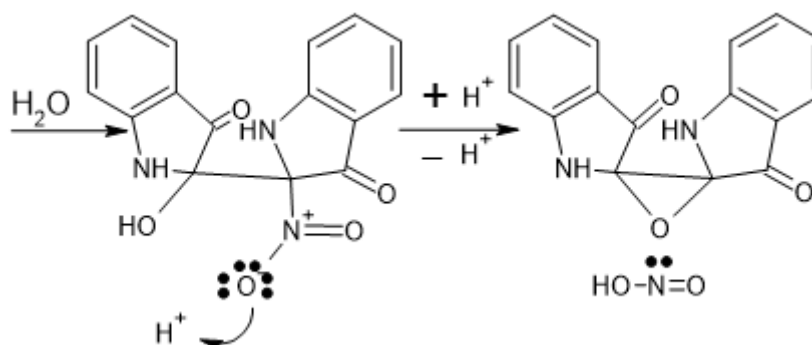


Figura 4. Protólisis de la molécula de índigo y la producción de ácido nitroso y un epóxido.

El ácido nítrico abre el anillo produciendo un alcohol y un nitrato unido al átomo de carbono:

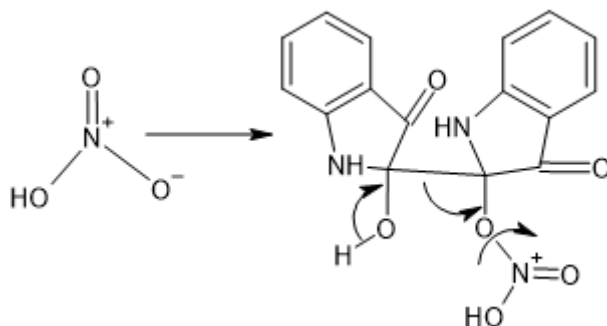


Figura 5. Oxidación por el ácido nítrico y la producción de un C-nitrato.

La transferencia de protones produce ácido nitroso y a los dos grupos carbonilo producto de la fisión del original enlace C=C:

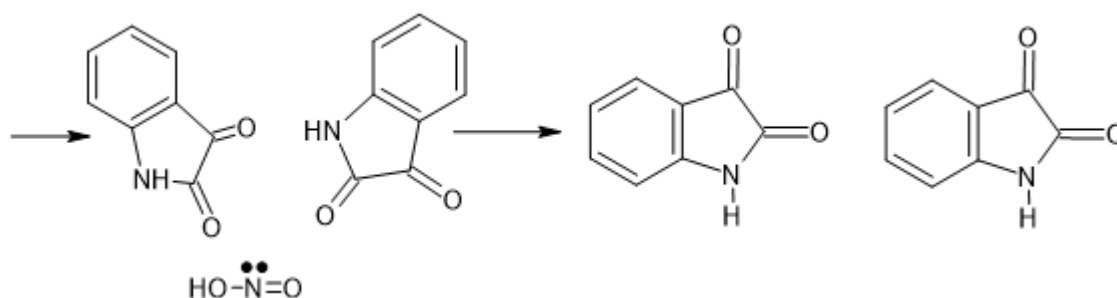


Figura 6. Formación de dos grupos carbonilo y la producción de dos moléculas de isatina.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Agro-recursos y Metabolitos Secundarios (AGROREMET) del Área de Agronomía del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Ensayos preliminares de la reacción

Se hicieron ensayos preliminares de la reacción del ácido nítrico, tanto con estándar de índigo sintético estándar (SIGMA-ALDRICH), como con índigo natural extraído en el laboratorio de hojas de añil. El producto de la reacción es una sustancia viscosa de color amarillo con matices café claro. Una porción del producto se diluyó en etanol y se corrió

al espectrofotómetro (MILTON ROY GENESYS 5) y se obtuvo su espectro UV-Visible de 290 a 700 nm. Se observó que su absorción máxima es a $\lambda=420$ nm.

Procedimiento para la elaboración de una curva de calibración

En vasos de precipitados se pesaron 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg del estándar de índigo en una balanza analítica OHAUS, en cada uno de los vasos se adicionó 2 ml de ácido nítrico concentrado (69%, MERCK) y se dejó reaccionar por un tiempo de 10 minutos. Se aforó a 100 ml con etanol, se filtró en papel filtro y se pasó al espectrofotómetro para la lectura de la absorbancia a $\lambda=420$ nm. Se hicieron 3 repeticiones y con la media de cada cantidad de índigo se elaboró una curva de calibración.

Análisis de varianza de los resultados de los ensayos

En base a las mediciones de absorbancia de cada una de las cantidades de estándar utilizado y sus repeticiones se hizo un análisis de varianza para aceptar o rechazar la hipótesis nula ($H_0=\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots\mu_n$). Se hizo una prueba de medias de Tukey para determinar la variación entre medias.

Determinación del coeficiente de correlación

Se determinó el coeficiente de correlación (R^2) entre los valores de las medias y la absorbancia y se obtuvo la ecuación del método cuantitativo.

Ensayos de control

Con cantidades conocidas del estándar de índigo se hicieron cuatro ensayos de control con 6.3, 7.8, 13.1 y 25.3 mg, posteriormente se hizo un análisis de correlación con los valores resultantes del análisis y los valores calculados a partir de la ecuación de la curva de calibración.

Planteamiento del modo de operación del método

Con base a los resultados se hizo el planteamiento del procedimiento o modo de operación de la rutina del método.

Resultados y discusión

Espectro del producto de la reacción del ácido nítrico y el índigo

En la siguiente Figura se presenta el espectro del producto de la reacción entre el ácido nítrico y el índigo estándar:

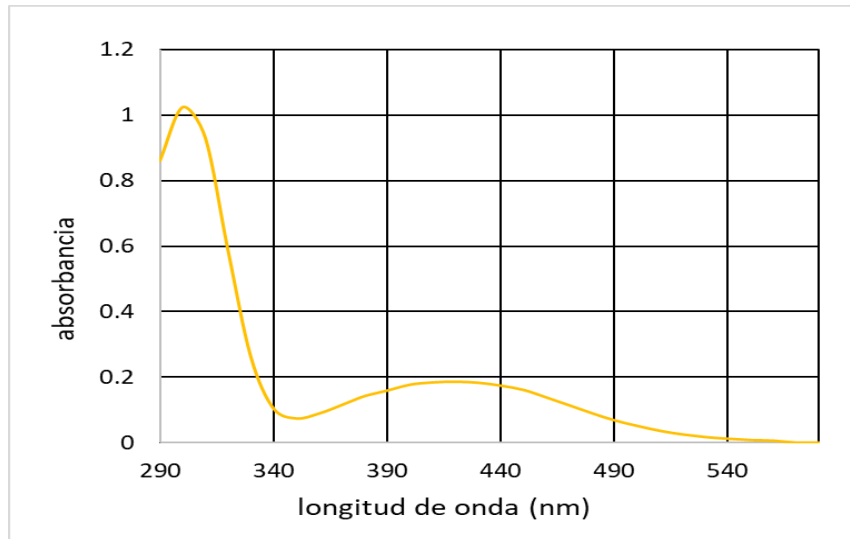


Figura 7. Espectro UV-Visible de la isatina resultante de la reacción del ácido nítrico y el índigo.

Curva de calibración

En la Figura se puede observar la curva de calibración resultante de las medias de los valores de absorbancia contra las cantidades de índigo estándar utilizado como sustrato:

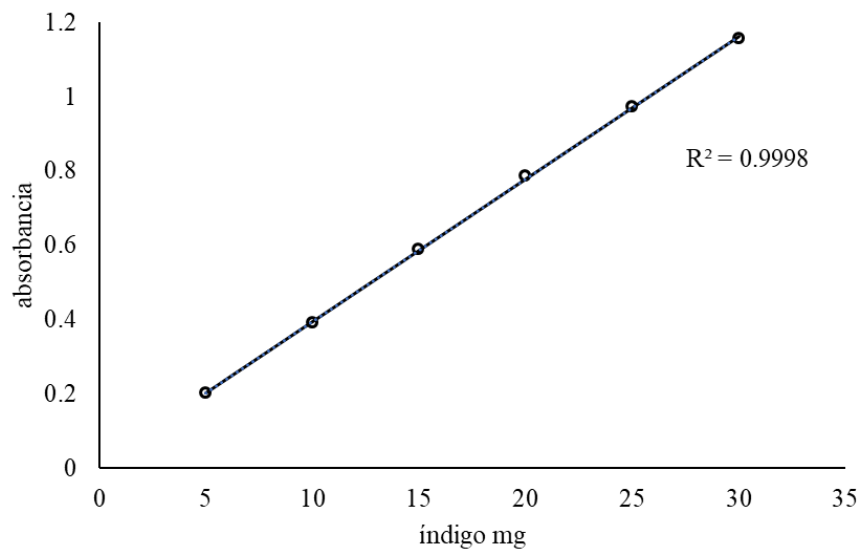


Figura 8. Curva de calibración resultante de las lecturas al espectrofotómetro.

Análisis de varianza

Del análisis de varianza de los valores de absorbancia de las cantidades de índigo empleadas y sus repeticiones se obtuvo que el valor de $F_0 = 337.2$ y la F crítica=5.06, por lo que rechazamos la H_0 y podemos concluir que entre las medias se presentan diferencias con una significancia de $\alpha=0.01$. Después de realizar una prueba de Tukey se observó que todas las medias son diferentes a un nivel de significancia de $\alpha= 0.01$.

Coefficiente de correlación

El coeficiente de correlación entre las cantidades de índigo estándar utilizado como sustrato y los valores de absorbancia del producto de la reacción fue de $R^2= 0.9998$. Lo que significa que el modelo de correlación lineal es adecuado. La ecuación que resulta es:

$$y = 26.053 (x) - 0.3203$$

Donde y es la cantidad de índigo en un rango de 5 a 30 mg y x es el valor de la absorbancia resultante de la corrida al espectrofotómetro.

Ensayos de control

Los resultados de los ensayos de control se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Valores de absorbancia experimentales y calculados en los ensayos de control.

No. ensayo	Índigo estándar (mg)	Valores de absorbancia experimentales	Valores de absorbancia calculados	Error absoluto
1	6.3	0.249	0.254	0.005
2	7.8	0.308	0.311	0.003
3	13.1	0.519	0.515	0.004
4	25.3	0.986	0.983	0.003

Por las cuatro mediciones de la absorbancia se observó un promedio de error absoluto de 0.00375, que no afecta la precisión del método.

Procedimiento del método propuesto

A continuación, describiremos la rutina de análisis del método propuesto:

1. Pesar una muestra de entre 5 y 30 mg de extracto sólido azul.
2. Colocarlo en vaso de precipitados y adicionarle 2 ml de ácido nítrico concentrado y dejarlo reaccionar por 10 minutos.
3. Aforar a 100 ml con etanol.
4. Filtrar la dilución con papel filtro.
5. Con una pipeta Pasteur tomar el filtrado y vaciar en la celda del espectrofotómetro.
6. Colocar la celda en el sitio del espectrofotómetro y tomar la lectura de la absorbancia a $\lambda = 420$ nm. El valor de la absorbancia (x) resultante se sustituye en la ecuación:

$$y = 26.053 (x) - 0.3203$$

7. El resultado es la cantidad de miligramos de índigo contenido en la muestra analizada.
8. Determinar la concentración de índigo en el extracto sólido azul con la siguiente formula:

$$\% \text{ de índigo} = \frac{(\text{mg de índigo})}{(\text{peso de la muestra})} \times 100$$

Conclusiones

El método de análisis propuesto es sencillo de realizar, económico y reproducible y puede ser de utilidad para los productores mexicanos de añil y de extractos sólidos azules (ESA) de otras fuentes vegetales, así como también podría ser adoptado por los laboratorios de investigación y servicio como rutina de análisis.

Bibliografía citada

Manchala, L, Reddy, T. M., Andole S., Manda, S., Devarakonda, K.P., Arukula, R. & Gangarapu, K. (2022). Synthesis and biological evaluation of new bis isatin derivatives for CNS activity. *Materials Today: Proceedings*. 64, 903–908.

- Matadamas, O. 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. Thesis Ph. D. Op. Réactivité des Agroressources. Institut National Polytechnique. École Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de Toulouse. France. 278 p.
- Sánchez-Viesca, F. & Gómez, R. (2018). On the Baeyer-Emmerling Synthesis of Indigo. *World Journal of Organic Chemistry*, 6(1),6-12.
- Sandoval-Salas, F., Gschaedler, M.A., Vilarem, G. & Mendez-Carreto, C. (2006). Efecto del tiempo de cosecha sobre la producción de colorantes de *Indigofera suffruticosa* Mill. *Agrociencia*, 40(5) 585-591.
- Sonam, V. & Kakkar, R. (2019). Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. *MedChemComm*. 10, 351-368.