
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL



**EXTRACCION Y CARACTERIZACIÓN DE CAROTENOIDES PRESENTES EN
FLOR DE CEMPOALXOCHITL (*Tagetes erecta L.*) MEDIANTE EL USO DE ENZIMAS
CELULOLITICAS EN MEDIO ACUOSO**

POR:

Ana Lilia Salazar González.

Tesis:

**Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de
Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Universidad Autónoma Agraria
“Antonio Narro”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL.

Extracción y caracterización de carotenoides presentes en flor de cempoalxochitl (*Tagetes erecta*) mediante el uso de enzimas celulolíticas en medio acuoso.

Por:

Ana Lilia Salazar González

Tesis

Que se somete a consideración del H. jurado examinador como requisito parcial para obtener el título profesional de:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Aprobada por el comité de tesis

Asesor principal

Co-asesor

Dr. Ramiro López Trujillo

M. C. Maria Hernández González.

Sinodal

Sinodal

M. C. Xochitl Ruelas Chacón

Dr. Baltazar Gutiérrez Rodríguez

Coordinador de la División de Ciencia Animal.

Dr. Ramón F. García Castillo
Buenavista, Saltillo, Coah, México
02 de septiembre del 2005

ÍNDICE

Índice de Cuadros	v
Índice de Figuras	vi
1. Introducción	1
2. Revisión de Literatura	3
2.1. Colorantes	3
2.1.1. Definición	3
2.1.2. Importancia	3
2.1.3. Clasificación	4
2.2. Flor de cempoalxochitl	10
2.2.1. Características	10
2.2.2. Cultivo	11
2.2.3. Localización	11
2.2.4. Importancia	11
2.3. Carotenoides	13
2.3.1. Obtención	16
2.3.2. Técnicas de extracción	16
3. Materiales y Métodos	25
3.1. Etapas del trabajo	25
3.2. Localización	25
3.3. Materia prima	25
3.4. Metodología	25
3.4.1. Análisis de los pétalos de la flor de cempoalxochitl, para la determinación del componente mayoritario	25
3.4.2. Determinación de las condiciones óptimas , relación enzima-sustrato.	26
3.4.3. Determinación del tiempo de contacto enzima-sustrato, para la máxima recuperación del pigmento	26
3.4.4. Recuperación del pigmento	27
3.4.5. Caracterización del pigmento obtenido	28
4. Resultados y discusión	29

4.1. Determinación del componente mayoritario de los pétalos de la flor de cempoalxochitl	29
4.2. Determinación de la relación enzima-sustrato.	30
4.3. Tiempo de contacto optimo para la mayor recuperación de pigmento.....	31
4.4. Comparación entre tratamientos.....	35
4.5. Caracterización del pigmento.....	37
5. Conclusiones	39
6. Resumen	40
7. Literatura Citada	41

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Colorantes permitidos en México (Diario Oficial de la Federación, en: García, 1999).....8

Cuadro 2. Distribución de los carotenoides en flores de *Tagetes erecta*. *.....13

Cuadro 3. Porcentaje de los principales componentes de los pétalos de la flor.29

Cuadro 4. Medias de las velocidades iniciales en función a la concentración inicial de enzima.31

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de los colorantes (García, 1999).....	4
Figura 2. Origen de las materias primas destinadas para colorantes naturales (García, 1999).....	9
Figura 3. Flor de Cempoalxochitl (<i>Tagetes erecta</i>) (Anónimo 3, 2005).....	10
Figura 4. Tipos de carotenoides. Cambiar tabla a español.....	15
Figura 5. Proceso de extracción de carotenos a partir de cempasúchil (García, 1999).	18
Figura 6. Modo de acción de la celulasa en sistemas enzimáticos de celulosa- celulasa (Ryu Mandels, 1980, citados por Wiseman, 1985).	22
Figura 7. Reactor para el sistema empleado en Flor de Cempoalxochitl.....	26
Figura 8 . Muestran el sistema de recuperación, filtrado y prensado de la flor hasta obtener la cantidad mínima de color.....	27
Figura 9. Formación de azúcares totales en función al tiempo.....	32
Figura 10. Formación de azúcares reductores en función al tiempo.....	33
Figura 11. Valor medio de la recuperación del pigmento en función al tiempo.....	34
Figura 12. Grafico que muestra la comparación entre tratamientos con y sin enzima.	35
Figura 13. Espectro infrarrojo de muestras en Flor de Cempoalxochitl.	37

1. Introducción

Los pigmentos son los responsables del color y se pueden encontrar en cualquier sitio, aun más, son una característica que hace mas llamativos a los alimentos. Esta es asociada con el grado de aceptación del mismo así como de las condiciones de su consumo, donde el hombre finalmente liga todo esto a la calidad comercial de un producto.

La clasificación de los colorantes puede hacerse de diferentes formas, una de estas lo hace en función a su origen donde se pueden distinguir los sintéticos o artificiales y los naturales; esta ultima denominación es atractiva en el área de los alimentos, ya que la palabra “natural” genera un prejuicio favorable (Multon , 2000).

Los pigmentos más importantes de origen vegetal son los carotenoides, dicha familia se encuentra formando diferentes compuestos químicos, como la luteína que esta esterificada con varios ácidos grasos presentes en la flor de cempoalxochitl, contenidos en los pétalos de la misma (Badui, 1988).

Actualmente estas flores son utilizadas como complemento del alimento de aves de corral para alcanzar las pigmentaciones requeridas por el consumidor (Delgado, 1997).

El pigmento de la flor se extrae como una sustancia de origen lipídico, con solventes orgánicos, este proceso reporta perdidas del pigmento (50%). Lo anterior aunado al considerable problema ambiental y otros riesgos que implica el uso de solventes orgánicos, han llevado a la utilización de procedimientos de extracción acuosa y/o con un pre-tratamiento enzimático, que permitan incrementar los rendimientos de extracción y eliminar el uso de los mismos. Estos procedimientos han demostrado ser funcionales en la extracción de pigmentos, aunque todavía no a

nivel industrial (Ávila y col., 1990 ; Christensen , 1989; Williams, 1992; Pommer, 1994; Rosenthal y col., 1996; citados por Delgado,1997).

Debido a esto se ha propuesto en el desarrollo de este trabajo la implementación de un pre-tratamiento enzimático con celulasas que permita la degradación de la celulosa contenida en los pétalos de la flor de cempoalxochitl, para así obtener una mayor recuperación del pigmento mediante procesos de filtrado y de prensado, obteniendo de esta manera un producto libre de agentes tóxicos y de contaminantes.

Objetivo General:

Evaluar un método de biolixiviación enzimática en medio acuoso como alternativa en la extracción de pigmento de la flor de cempoalxochitl.

Objetivos específicos:

- Realizar el análisis del sustrato (flor) para obtener componentes mayoritarios, y así determinar la factibilidad del uso de enzimas específicas.
- Evaluar condiciones óptimas para la realización de la hidrólisis enzimática.
- Realizar la recuperación del pigmento extraído mediante filtrado y prensado del sustrato digerido.
- Caracterizar el pigmento obtenido mediante espectroscopia Infrarrojo.

2. Revisión de Literatura

2.1. Colorantes

2.1.1. Definición.

Los colorantes son importantes en la industria alimenticia, pues son utilizados como aditivos. De acuerdo a la definición proporcionada por la *Food and Drugs Administration* (FDA, 1986) es cualquier colorante, pigmento u otra sustancia obtenida por síntesis, o extraída, aislada o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente, y que cuando esta es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos, cosméticos u otra fuente, el cuerpo humano o cualquier parte, por si misma es capaz (solo a través de la reacción con otra sustancia) de impartir color (Rodríguez, 2002; Fennema, 2000).

2.1.2. Importancia

El color es muy importante ya que es el primer contacto que existe entre el producto y el consumidor; donde este último juzga por su apariencia y posteriormente por su textura y sabor, es ahí donde toma gran importancia. La mayoría de los alimentos, tanto en forma natural como procesada, tienen una pigmentación característica por la cual el consumidor los identifica; es por ello que muchos fabricantes normalizan sus productos, con la ayuda de estos aditivos para evitar que el consumidor tenga cierto grado de desconfianza al encontrar variación en estos (Badui, 1988).

La coloración constituye entonces un factor decisivo en la elección de un alimento. Esta propiedad se relaciona con la madurez, con la presencia de impurezas, con la puesta en marcha apropiada o defectuosa de un tratamiento tecnológico, con las condiciones apropiadas o no de almacenamiento, alteración microbiana, etc. Esta información persuasiva ligada a la publicidad es la que modifica el comportamiento del comprador, y éste tiende a evitar productos con un color inhabitual; se puede decir también que en el espíritu del consumidor, el color esta asociado al sabor o al aroma del alimento (Multon, 2000).

2.1.3. Clasificación

La clasificación de los colorantes puede hacerse de diferentes formas: a partir de su característica fundamental, según el color; de acuerdo a su naturaleza química, en función a su solubilidad en base a su certificación, por su grupo cromóforo, y por su origen, donde se pueden distinguir los sintéticos y los naturales (Multon, 2000; García, 1999).

Una de las clasificaciones anteriormente citadas hace referencia a su origen y los divide en: naturales y sintéticos, los cuales a su vez pueden tener un origen orgánico e inorgánico. Los pigmentos naturales deben provenir de organismos vivos o de seres inanimados de la naturaleza, en tanto que los colorantes artificiales son sintetizados en el laboratorio (Deman, 1980; Bauerdfeld, 1981; citados por Delgado, 1997). En la Figura 1 se muestra la clasificación.

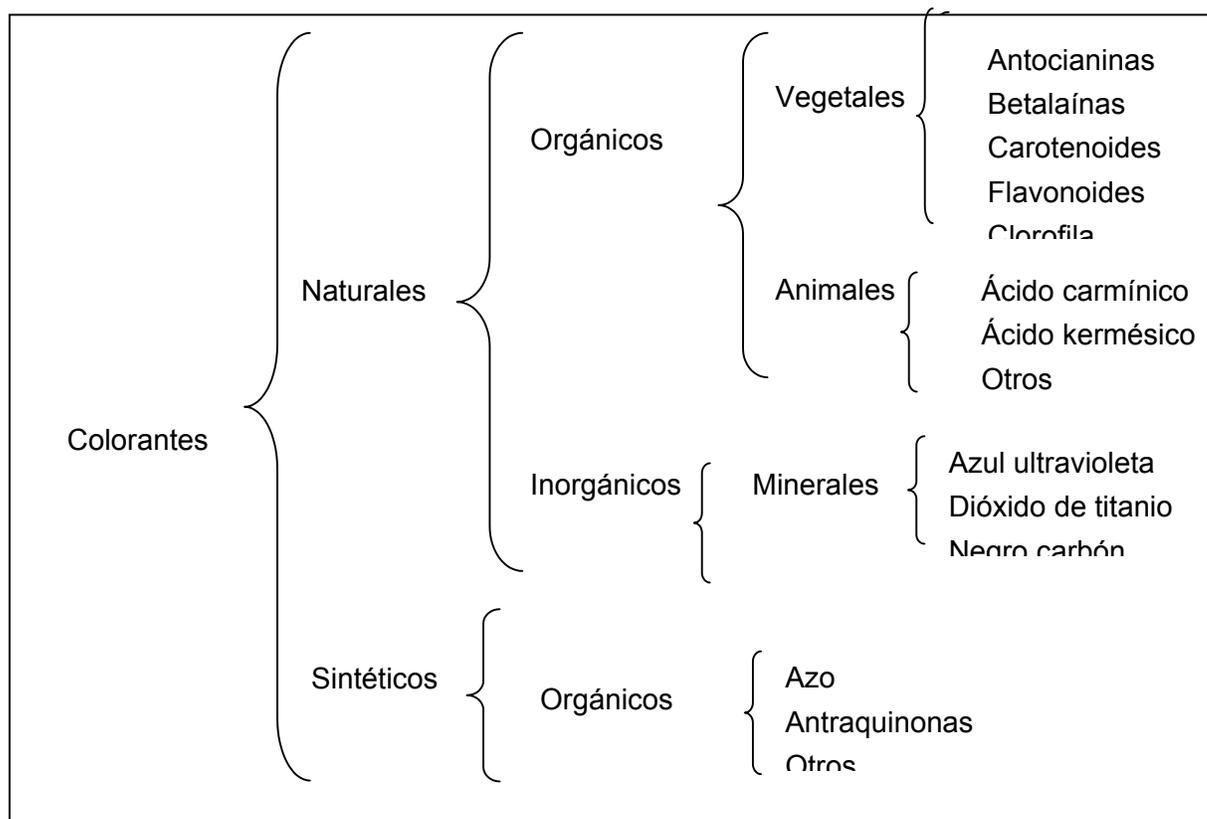


Figura 1. Clasificación de los colorantes (García, 1999).

La clasificación con base en su certificación, los agrupa en dos bloques; Los colorantes que no requieren certificación y los que la requieren . Los primeros incluyen a los colorantes naturales y los segundos a sustancias químicamente sintetizadas con alto grado de pureza (García, 1999).

2.1.3.1. Colorantes de origen químico

2.1.3.1.1. Definición

De acuerdo a su origen y procedencia, los colorantes producidos por síntesis química y con un alto grado de pureza, se les consideran sintéticos (García, 1999).

En 1856 el químico Inglés Perkin descubrió el primer colorante orgánico sintético de importancia comercial, llamado *mauve*, púrpura de anilina o púrpura de Tiro. Este descubrimiento permitió el incremento de investigaciones sobre otros colorantes sintéticos (García, 1999).

2.1.3.1.2. Usos y ventajas.

Los colorantes sintéticos han sido muy usados, por las ventajas que estos representan sobre los naturales, como: uniformidad, valor tintóreo, gran variedad de colores, firmeza del color, amplio intervalo de tinte, bajo costo en su uso, alta efectividad, baja variación de lote a lote, inodoro e insaboro (Madrid,1994). Sin embargo muchos causan problemas para la salud. La FDA (*Food and Drugs Administration*) en la cláusula Delaney incorporada en 1958, se basa en la determinación de cierto riesgo de cáncer por algunos aditivos coloridos y establece la prohibición de que ningún aditivo puede ser utilizado si se comprueba que induce el cáncer, cuando es ingerido por el hombre o por algún animal (García, 1999).

Algunos otros causan al parecer daños menores como alergias, por ejemplo urticaria. La tartrazina, causa reacciones adversas como el asma o rinitis, además, también parece agravar síntomas de hiperactividad, especialmente en niños (Walford, 1980; García, 1999).

Los colorantes artificiales han perdido popularidad porque se requiere de productos con mejor calidad nutricional y sin problemas técnicos al momento de mezclarlos con otras sustancias.

2.1.3.2. Colorantes naturales

2.1.3.2.1. Definición

Los pigmentos o colorantes naturales, pueden provenir de dos tipos de fuentes orgánica e inorgánica, ambos se pueden encontrar en plantas, animales, microorganismos y minerales (Deman 1980; Bauernfeind, 1981, citado por Delgado,1997).

La mayoría de los colorantes naturales se encuentran en el protoplasma de las células vegetales, dentro de los plástidos, y en algunos casos cuando éstos son solubles en agua, se encuentran dentro de las vacuolas de las células (Badui, 1989).

Sin duda existe una gran variedad de colores en los alimentos que se consumen, esto debido a ciertos compuestos orgánicos, se citan a los carotenoides en primer lugar por considerarse de mayor importancia tecnológica en el área de alimentos. Aún cuando existe una gran variedad de pigmentos como: la clorofila, las antoncianinas, los flavonoides, los taninos, las betalainas, la mioglobina y la hemoglobina, por mencionar a los principales grupos de pigmentos naturales.

2.1.3.2.2. Usos

Existe hoy en día un considerable interés mundial en el desarrollo de los colorantes naturales (Santos, 1988). Esto se debe a la necesidad de expansión de la variedad de colorantes y a la implicación de éstos que al ser naturales son seguros (Marmion, 1979).

2.1.3.2.3. Legislación

Los colorantes de origen natural así como los idénticos a ellos, no requieren certificación, pero deben cumplir con las siguientes especificaciones:

Contenido de arsénico: no más de 3 mg/kg

Contenido de plomo: no más de 10 mg/kg.

Contenido de mercurio: no más de 1 mg/kg.

Contenido de pérdidas por desecación: no más de 0.2%.

Contenido de residuos de ignición: no más de 0.2%.

Contenido de colorantes orgánicos naturales por cromatografía sobre papel, cepa fina y de columna.

Estas especificaciones se encuentran aún como anteproyecto en las Normas Oficiales Mexicanas (CANACINTRA, 1988).

Dependiendo del país existe una legislación diferente para el uso de colorantes, ya sea naturales o sintéticos. En nuestro país no existe un reglamento específico que regule la utilización de estos (Tafoya, 1999; en García, 1999).

A continuación se muestran los colorantes permitidos en México (Cuadro 1).

Cuadro 1. Colorantes permitidos en México (Diario Oficial de la Federación, en: García, 1999).

<p>1. Colorantes orgánicos naturales.</p> <ul style="list-style-type: none"> Aceite de zanahoria (<i>Daucus carota</i>). Achiote, annato (extracto de semillas de <i>Bixa orellana</i>) Azafrán, (estigmas de <i>Crocus sativus L.</i>). β-apo-8carotenol Betabel deshidratado β-caroteno Caramelo Clorofila Cochinilla (extracto de <i>Coccus cacti L.</i> O carmin) Curcuma (polvo y oleoresina del rizoma de <i>Curcuma longa</i>). Extracto de tegumento de uva (enocianina). Harina de semilla de algodón cocida y tostada (parcialmente desengrasada). Jugos de frutas Jugos de vegetales Pimiento Riboflavina Xantofilas, flavoxantina, rubixantina, zeaxantina y los productos naturales aprobados que las contengan y otros.
<p>2.- Colorantes orgánicos sintéticos o artificiales.</p> <ul style="list-style-type: none"> Amarillo N° 5 (tartrazina) Azul N°2 (indigotina) Rojo cítrico N°2 (solo se permite para colorear la corteza de la naranja). Rojo N°3 (eritrosina). Rojo N°40 Verde N° 3 <p>3.- Colorantes orgánicos minerales.</p> <ul style="list-style-type: none"> Gluconato ferroso Dióxido de titanio

Fuente: Biotecnología alimentaria. 1999. Pág.485

2.1.3.2.4. Fuentes

Los colorantes naturales tienen una amplia fuente de obtención, basta ver alrededor para saber que la mayoría de las cosas que se encuentran en la naturaleza tienen color y pueden proporcionarlo si se tienen las condiciones y técnicas adecuadas de extracción. Existen fuentes minerales, y las que proporcionan materiales orgánicos (comestibles o no) como el: azafrán, la semilla del achiote, el betabel, la cochinilla, la paprika, la uva, los petalos de la flor de cempoalxochitl, etc.

Estas materias son producidas ampliamente en toda la Republica Mexicana como se muestra en la Figura 2.

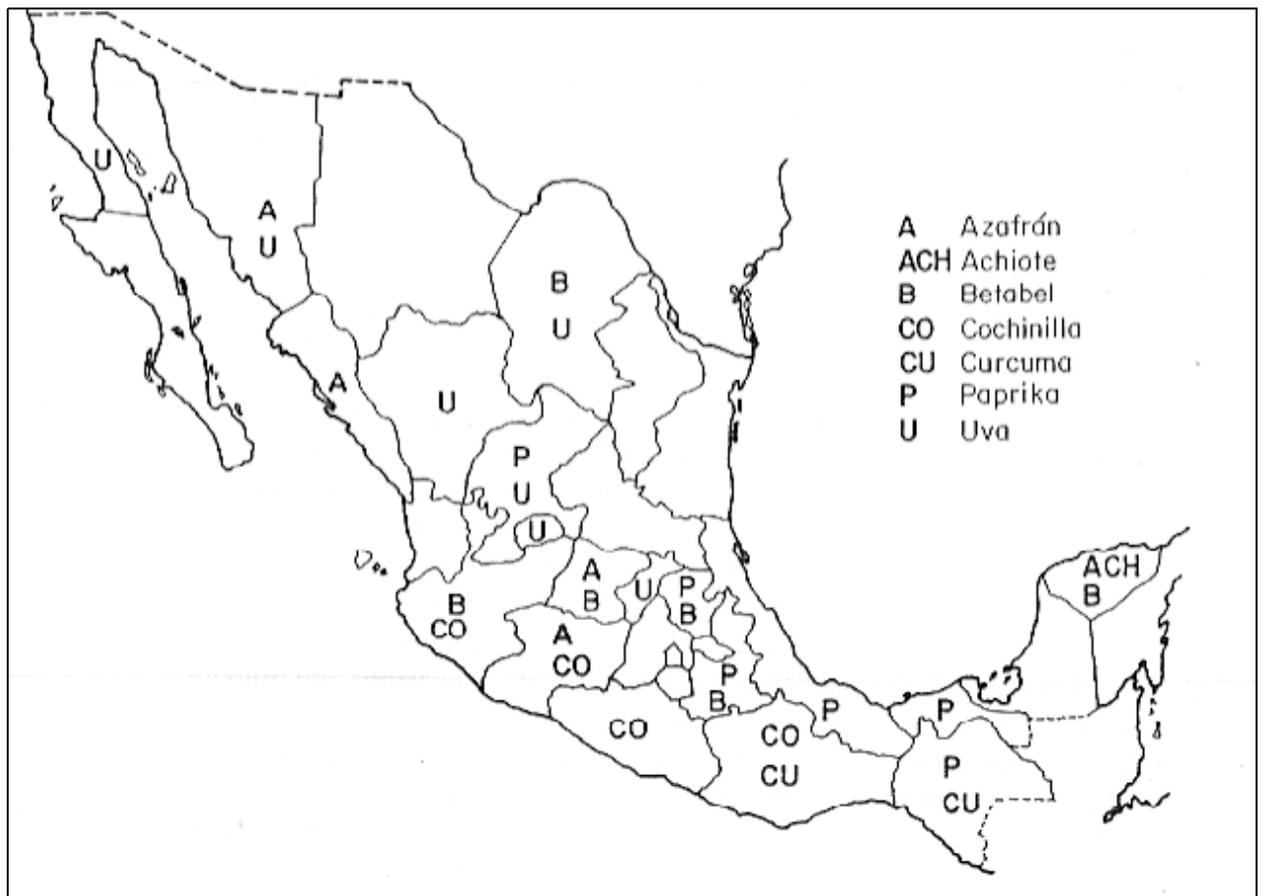


Figura 2. Origen de las materias primas destinadas para colorantes naturales (Garca, 1999).

Dentro de las antes mencionadas de mayor renombre es la flor de cempoalxochitl, una de las fuentes importantes de carotenoides, principalmente luteína, estos pigmentos ocupan un lugar importante dentro de la industria avícola, alimentaria y farmacéutica. Actualmente los β -carotenos tienen un mercado de 19 millones de dólares, destinados de la siguiente manera: Industria alimentaria 13.3, suplemento de vitaminas 4.0 , cosméticos 1.0 y otros 0.7 .

Su crecimiento es del 2 al 6% por año, para usos tradicionales; este crecimiento puede aun verse incrementado hasta en un 50% al poderse comprobar su aplicación como anticancerígeno y radio protector (García, 1999).

2.2. Flor de cempoalxochitl

2.2.1. Características.

El cempoalxochitl (*Tagetes erecta* L.). es una planta anual, erecta, que puede llegar a medir hasta 1.6 m de altura, aromática, de tallos estriados y pubescentes, hojas de hasta 20 cm. de largo, flores liguladas de 5 a 8 ó mas flores, amarillas o rojas (Delgado, 1997). El cempoalxochitl, es una planta muy ramificada, sus hojas presentan nervaduras con bordes

dentados.



Figura 3. Flor de Cempoalxochitl (*Tagetes erecta*) (Anónimo 2, 2005)

2.2.2. Cultivo

Dentro de las labores culturales se describe, que la siembra se realiza en almacigo, con una duración de 20 a 45 días (con temperaturas variables), durante este tiempo se alcanza una altura de 10 cm. aproximadamente, posteriormente se procede al transplante. La variedad criolla alcanza una altura de 1.60 m y la Hawai 1 m, con un diámetro en su flor de 15 cm. La siembra generalmente se realiza en los meses de marzo y junio, el primer corte se hace a los 3 meses después del transplante; los cortes posteriores dependen de la técnica utilizada, manualmente se registran de seis a siete cortes, cuando este es con maquinaria solo tres (Delgado, 1997).

2.2.3. Localización

La flor de cempoalxochitl es nativa de México y cultivada en diversas regiones del país, principalmente en los estados de Michoacán, Guanajuato, Veracruz, Valle de México, Tabasco, Chiapas, Hidalgo y Sinaloa (Mendieta y Del-Amo, 1981) así como en San Luis Potosí, Puebla, Tlaxcala y Veracruz; y en el extranjero en Panamá y Centro América (Delgado,1997). Su producción es de 12 hasta 30 ton/ha, cuando se aplican las cantidades adecuadas de nutrientes y dependiendo de la zona geográfica en donde se realice el cultivo, siendo la zona centro del país la que reporta una producción más alta (Delgado, 1997).

Las variedades utilizadas en México han sido la criolla, la Hawai y la Chilena, en diferentes zonas del país.

2.2.4. Importancia

Por tradición en el país se le ha dado un uso meramente ceremonial, dentro de las festividades de día de muertos, así como usos religiosos y medicinales en ciertas regiones del país. Pero a nivel industrial esta planta tiene aplicación por la obtención

de colorantes y aceites esenciales, para su uso en la industria avícola y en ramas textiles y farmacológica (García, 1999).

La flor de cempoalxochitl tiene un amplio valor comercial debido a que estas son fuente natural de xantofilas pertenecientes al grupo de los carotenoides, principalmente de luteína. Su extracto saponificado es añadido como aditivo al alimento de los pollos (Navarrete, 2004).

Actualmente , debido a su gran contenido en carotenoides, y su asociación de estos con la vitamina A , sus extractos son utilizados como antioxidantes en células humanas, como: saborizante, aromatizante en la industria de la perfumería, en la obtención de resinas, con fines ornamentales, incluso se han realizado modificaciones genéticas de la planta para el control de malezas, como insecticida, nematocida, larvicida, atrayente o repelente de insectos (Serrato, 2004).

Debido a lo anterior y a que es una fuente natural importante de carotenoides, se han realizado diversos estudios para identificar y caracterizar los pigmentos de la flor de cempoalxochitl, uno de ellos fue reportado por Alam et al. (1968a). Los pigmentos principales según el estudio son luteína (64.1%), anteraxantina (31.1%) y criptoxantina (3.5%) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de los carotenoides en flores de *Tagetes erecta*.*

Pigmento	% del Pigmento Total Aislado
<u>Carotenos</u>	
Fitoflueno	0.4
α -Caroteno	0.15
β -Caroteno	0.6
<u>Xantofilas</u>	
α -Criptoxantina	3.5
Luteína	64.1
Anteraxantina	31.1
Productos de oxidación no identificados	0.14
Total	99.99

* Alam y col., 1968a.

2.3. Carotenoides

Los carotenoides tienen una función importante dentro del proceso de la fotosíntesis, ya que estos al igual que la clorofila, absorben la luz y evitan, previenen o minimizan la foto-oxidación de la clorofila, dentro del aparato fotosintético (Cheftel, 1989).

Los carotenoides son los pigmentos de color amarillo naranja a rojo. Son insolubles en agua, pero solubles en las grasas y solventes orgánicos, se los conoce como lipocromos, en los vegetales, estos pigmentos se localizan en las hojas, y en otras partes de la planta (Cheftel, 1989), aunque existe una excepción "la crocetina" que es el pigmento mayoritario del azafrán. Éste se encuentra en forma de glicósido, presentando todos sus grupos carboxilo esterificados con moléculas del disacárido gentobiosa (Coutate, 1986).

Existen mas de 563 carotenoides, los siguientes son los más comunes:

Carotenoides	Fuentes
β -caroteno	Zanahorias
Fucoxantina	Algas
Luteína	Pétalos de caléndula (<i>Tagetes erecta</i>)
Licopeno	Tomates
Bixina	Achiote
Criptoxantina	Naranja, maíz.
Capsantina	Pimientos rojos y pimentón

Los carotenoides (Figura 4) pueden clasificarse en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química: a) carotenos hidrocarburos, que contienen un solo carbono e hidrógeno, y b) xantofilas, también llamados oxicarotenoides, se trata de alcoholes, aldehídos y ácidos, los cuales contienen oxígeno; todas las xantofilas se encuentran en las células como ácidos linoléico, palmítico, esteárico y mirístico, y se presentan como ésteres de zeaxantina y luteína (*psialiena* y *heleniena*) respectivamente, en frutas . Los primeros son solubles en éter de petróleo y muy poco solubles en etanol, comportándose de manera inversa la solubilidad en los oxicarotenoides (Cheftel, 1989).

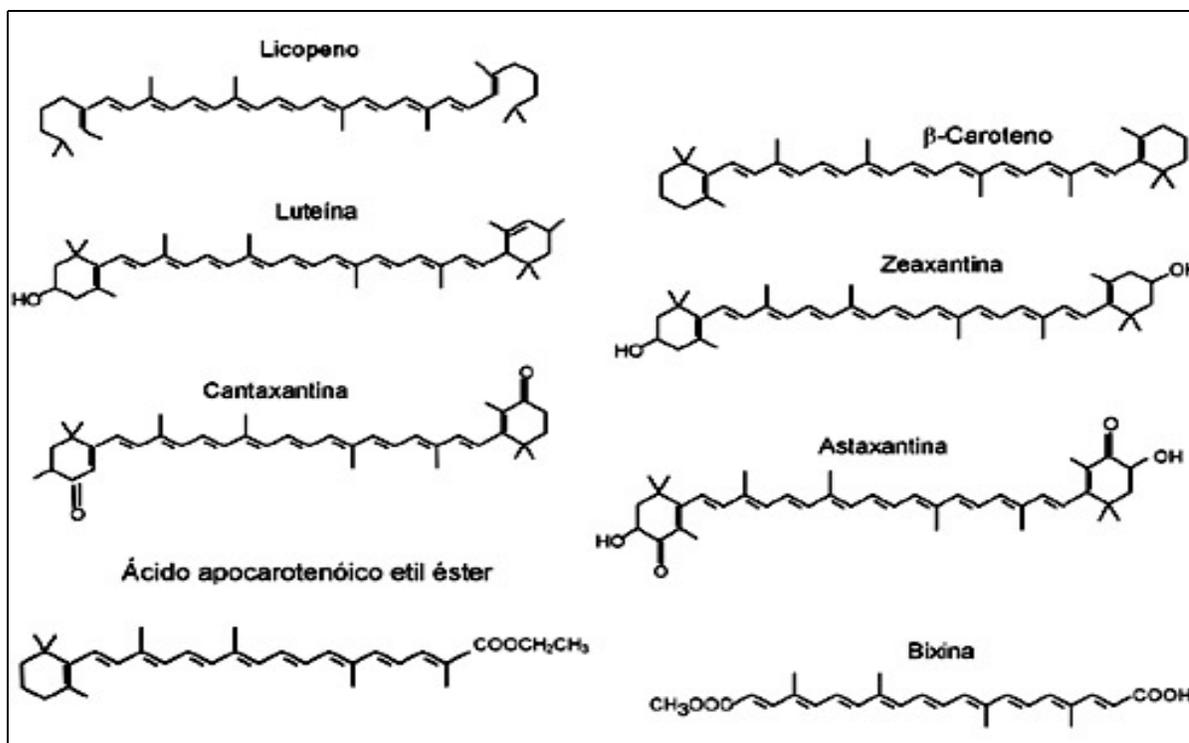


Figura 4. Tipos de carotenoides .

Una gran variedad de tejidos vegetales comestibles contienen carotenoides, las frutas rojas, amarillas o naranjas, raíces , hortalizas, ciertas flores: amarillas, naranjas y rojas, y en muchos microorganismos. Los vegetales y microorganismo sintetizan sus carotenoides, los animales los adquieren por consumo de plantas en su dieta. Por lo tanto, los productos derivados de ellos, como leche, yema del huevo y mantequilla, contienen a estos en sus componentes lipídicos (Owen, 2000).

En la naturaleza existen en forma libre o ligados a otras estructuras como proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, generando diversas tonalidades de acuerdo a la interacción que guarden. Algunos azúcares reductores como la gentobiosa, algunos ácidos grasos como el palmítico y linoléico pueden encontrarse interaccionando con los carotenoides (Badui, 1989).

2.3.1. Obtención

Todas las clases de carotenoides son compuestos lipofílicos, es decir solubles en aceites y en solventes orgánicos.

Debido a la naturaleza de los carotenoides y a su diversa complejidad, es necesario realizar procesos de separación cromatográfica. Según Owen (2000), los procedimientos de extracción para la separación cuantitativa en tejidos utilizan disolventes orgánicos que penetran en la matriz hidrofílica, donde a veces es necesario realizar mezclas de éstos o someter a un tratamiento previo para una extracción satisfactoria.

Debido a su naturaleza lipídica, el proceso de extracción es similar a la de los aceites. Los métodos comúnmente reportados son por presión y extracción con solventes, o una combinación de ambos; actualmente se reportan técnicas innovadoras aun en estudio para su aplicación a gran escala como lo es la extracción acuosa y con fluido supercrítico (Delgado, 1997).

2.3.2. Técnicas de extracción

Debido a la importancia que tienen los colorantes en diferentes ramas industriales, se han realizado diversas investigaciones, para su extracción. Los métodos son diversos y han ido cambiando de acuerdo a las características que se desean obtener del producto.

Algunos colorantes eran extraídos de manera rudimentaria con el uso del agua, método que en ocasiones mostraba el inconveniente de la insolubilidad del colorante así como de los bajos rendimientos obtenidos (Sahaza, 2001), posterior a esto se recurrió a la extracción con solventes de mayor afinidad para su solubilidad, como los orgánicos, técnica que actualmente es utilizada a gran escala por sus altos rendimientos reportados, solo que las tendencias actuales por los productos

orgánicos han ido desacreditando esta técnica por el riesgo que implica, ya que el producto obtenido contiene residuos tóxicos para la salud humana.

Las investigaciones han llevado a la utilización de técnicas como la extracción con fluido supercrítico, la cual no ha sido llevada aun a escala industrial. En fechas recientes se ha incurrido en el uso de enzimas para la extracción de los colorantes, técnica que sigue en constante crecimiento e investigación.

A continuación se citan las siguientes: Extracción con solventes, fluido súper crítico y uso de enzimas.

2.3.2.1. Extracción con solventes

Los carotenoides son solubles en lípidos o en solventes no polares, excepto cuando forman complejos con proteínas y azúcares, es por ello que se usan solventes no polares para su extracción (Delgado, 1997).

La extracción con solventes consiste en un proceso de extracción con hexano o de algún otro solvente orgánico del material previamente molido y hojueado, en un equipo de calentamiento, donde posteriormente el hexano es evaporado y recuperado. Finalmente se realiza una destilación al vacío (Rosenthal et al., 1996).

El proceso que recibe la flor de cempoalxochitl, para la extracción del pigmento se describe en la Figura 5. La flor se recibe en fresco (70-80% humedad), posteriormente se procede a su ensilado a cielo abierto por un tiempo de 3-4 meses, reportándose una pérdida de 30% de xantofilas de la flor. Luego la flor es prensada mecánicamente con la finalidad de eliminar humedad (20%) para después pasarla a un proceso de secado, con gases de combustión que generen una atmósfera inerte por algunos segundos a temperaturas que varían entre 105-115°C. Posteriormente se obtiene una humedad del 14% en el producto. Se procede al molido y peleteado

con un diámetro de 0.25 y 0.4 mm. en la hojuela. La flor peleteada se pasa a un extractor con solvente, siendo el más común el hexano, que presenta un punto de ebullición bajo de 63 – 69 (Gustone y Norris, 1983). Finalmente, de la extracción con solventes se obtiene una oleoresina que contiene carotenoides esterificados con ácidos grasos esteárico, palmítico y mirístico (Alam et al., 1968a; Philip y Berry, 1975; Fraser et al., 1993), con un contenido de 50-60% de ácidos grasos y 40 y 50% de materia no saponificable, reportando un rendimiento de 70000 a 120000 ppm de xantofilas. Debido a esto se procede a su saponificación, ya que los carotenoides resisten hidrólisis alcalina, cuando los pigmentos sirven para pigmentación de la piel de pollos (Hencken, 1992).

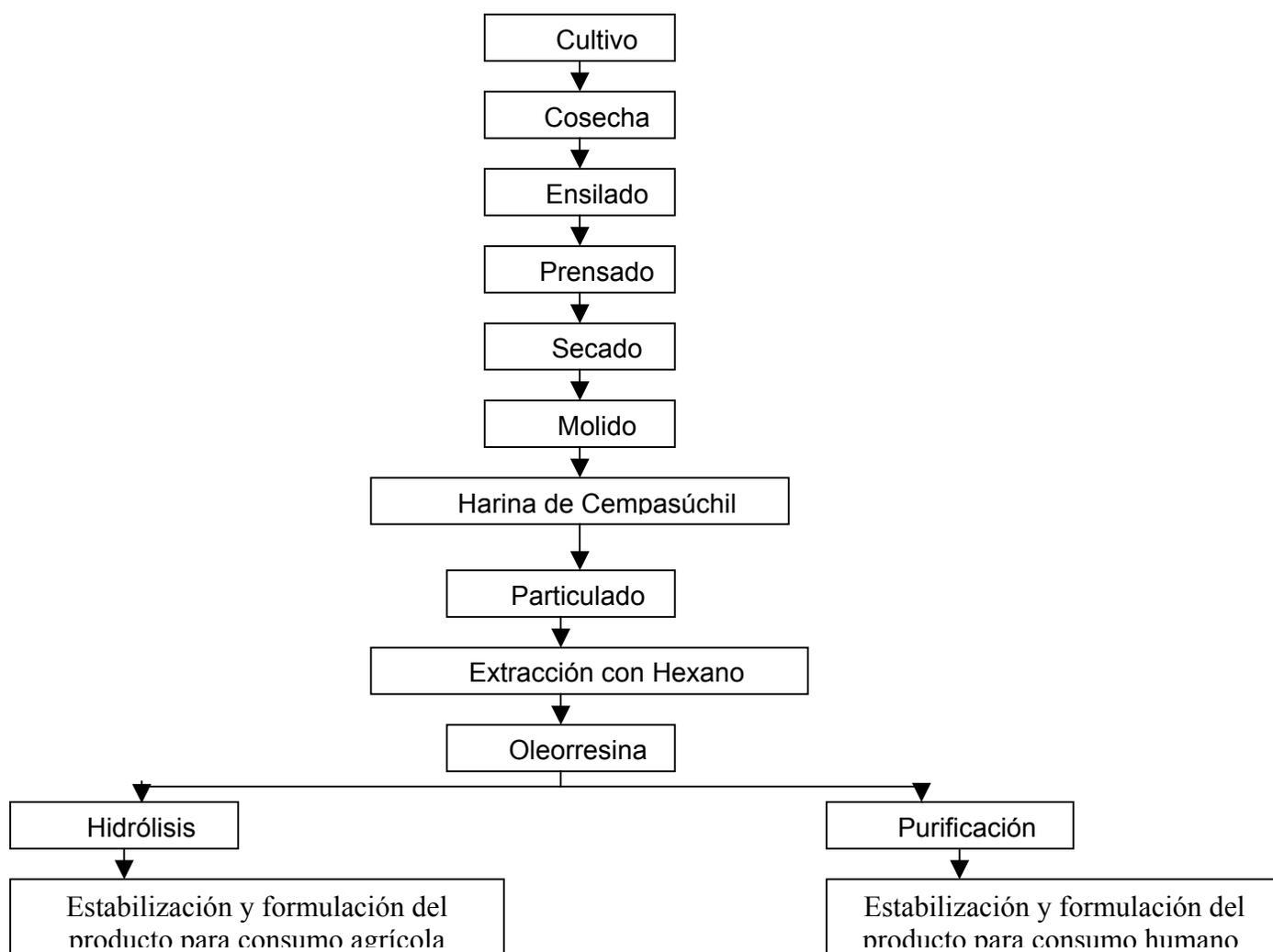


Figura 5. Proceso de extracción de carotenos a partir de cempasúchil (García, 1999).

2.3.2.2. Extracción con fluido supercrítico.

La técnica con fluido supercrítico, es una técnica rápida, donde se tiene un control sobre la fuerza del solvente, estos solventes son gases bajo condiciones ambientales y su toxicidad es baja (Wilson, 1985; Hawthorne, 1990; Randolph, 1990; Chester y col., 1992). Esta técnica consiste en la extracción con solventes que bajo condiciones normales de presión y temperatura son gases, pero al aplicarles altas presiones se convierten en líquidos, los cuales sirven para la extracción de los carotenoides, donde si se retorna a las condiciones normales de presión y temperatura, se eliminan los solventes debido a que estos retornan a su naturaleza gaseosa evitando con ello su costosa recuperación, generando un producto libre de solventes (Delgado, 1997).

2.3.2.3. Tratamientos enzimáticos

Hoy en día, la utilización de enzimas en la industria alimentaria, ha cobrado vital importancia, debido a que los procesos mediados enzimáticamente tienen ventajas, ya que son específicos sobre el sustrato en el que actúan, requieren pH y temperaturas de trabajo moderados, y el producto final se ve poco afectado por los subproductos secundarios obtenidos (Delgado, 1997).

Se han reportado investigaciones desde los años 50 del uso de enzimas en diversos procesos de extracción como lo es, la industria de aceites, la extracción de colorantes, en procesos de separación, etc.

En la industria alimentaria el uso de enzimas puede encontrarse en tres ramas principalmente: extracción, licuefacción y procesos terminales. Así que el objetivo de utilizar procesos enzimáticos pueden ser variables, por ejemplo el desarrollo de nuevos productos cuya obtención solo es viable mediante procesos enzimáticos, o en donde se requiere reducir el número de operaciones unitarias (Delgado, 1997).

Para que un proceso con enzimas sea útil y por tanto rentable comercialmente, el producto desarrollado bajo esta tecnología deberá contener las siguientes características: i) que la calidad del mismo sea superior a la del tradicional, ii) que este sea mas útil, iii) la reducción en costos del producto; debido a que se reducen los gastos de operación, materia prima, equipo requerido, manufactura y iv) que mediante el uso de enzimas se puedan obtener productos de existencia limitada o que no se procesaban debido a la baja disponibilidad de fuentes naturales (Wiseman, 1991).

Existen un sin número de investigaciones, donde se propone un pre-tratamiento enzimático para eficientar la extracción de aceites esenciales así como de pigmentos, incluso el uso de estas, en técnicas como la del fluido supercrítico. Actualmente se han realizado estudios de la actividad enzimática en medios con baja actividad acuosa, lo cual favorece algunos procesos, recurriendo así al uso de soportes para su uso (Barzana, 2002).

Rubio y col. (1994) propusieron la utilización de un preparado comercial multienzimático de hidrolasas para mejorar los rendimientos en la extracción de luteína, esta tecnología simplifica el proceso industrial eliminando la etapa de maceración y secado previos, previniendo perdidas por oxidación de hasta 50%, estos resultados fueron probados a escala planta piloto por Barzana y col. (2002).

Pommer (1994), propuso un método de extracción de oleorresinas vegetales y pigmentos, donde el material es mezclado con agua y un ácido orgánico inmisible en agua, con el uso de una enzima la SPSasa , sistema que reporta un incremento en la extracción de pigmentos de *Tagetes erecta*.

El uso de enzimas degradadoras de la pared celular de los sustratos, para la extracción de aceites vegetales por métodos acuosos, es un área de investigación

donde hasta la fecha no se ha reportado su uso a nivel industrial que además limita el uso de solventes orgánicos (Rosenthal y col., 1996).

2.3.2.3.1. Celulasas.

La pared celular de los sustratos es muy compleja contiene mananos, galactomananos, arabinoxilogalactanos, celulosa, etc., y se utilizan para su degradación complejos enzimáticos con actividades múltiples (Christensen, 1989; Düsterhöff y col., 1993, citados por Delgado, 1997).

La celulosa es el material orgánico mas abundante, existe como componente estructural de los tejidos vegetales en la pared celular, además a diferencia de muchas fuentes de energía esta es renovable . En diversas industrias esta es generada como desecho de muchos procesos (Wiseman, 1991).

La composición de la celulosa, debido a que es parte estructural de los vegetales presenta una elevada firmeza, debido a la cantidad de puentes hidrógeno que se forman en cada residuo, lo que le confiere tal capacidad, la fibra celulosa con la presencia de otras sustancias como la hemicelulosa, la pectina y lignina forman capas donde estas ultimas tiene la función de cementantes.

Las celulasas son enzimas que tiene la capacidad de hidrolizar celulosa, desdoblándola a sus unidades estructurales, la glucosa. La hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa, es uno de los recientes logros de la ingeniería enzimática. Esta hidrólisis es catalizada por la celulasa (algunas provenientes por ejemplo de *Trichoderma viride*) , la cual es una mezcla compleja de varias enzimas con diversas actividades hidrolíticas, utilizando soforosa como inductor, mediante fermentación en fase semisólida o sumergida (Wiseman, 1991).

“El modo de acción de la celulasa no se conoce aun totalmente, aunque se cree que el complejo celulasa incluye varias *endo*- β -1,4-glucanasas (Figura 6) una de las cuales puede ser la enzima que actúa en primer lugar sobre la celulosa” (Wiseman, 1991).

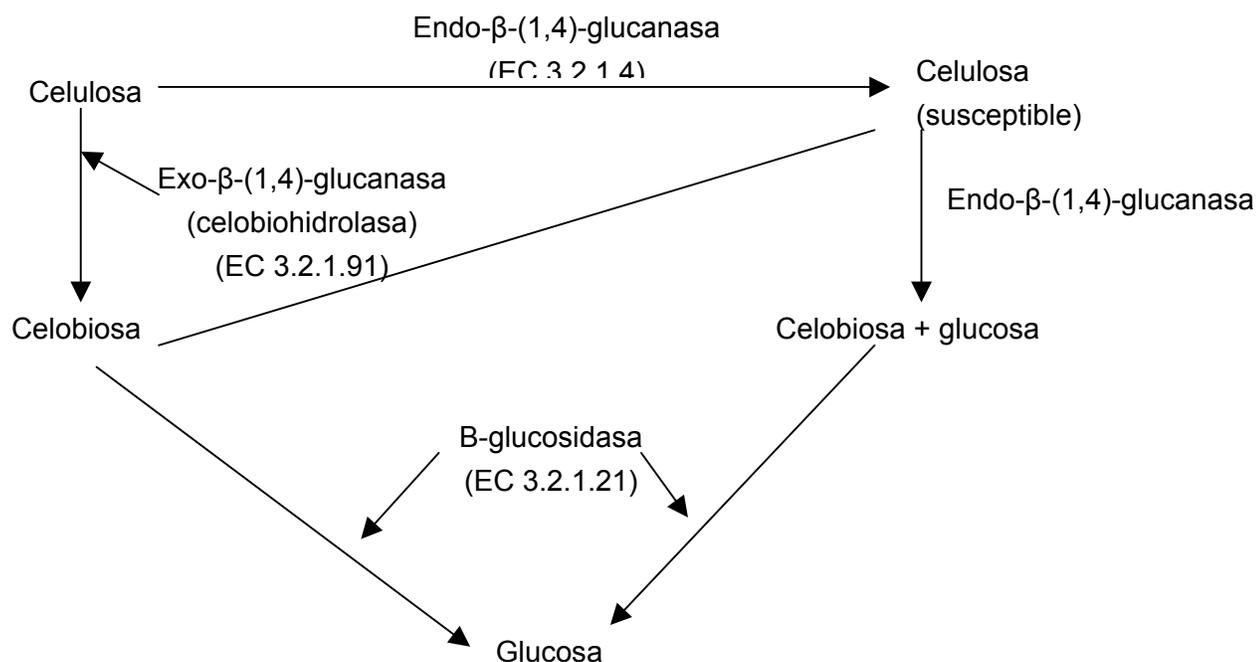


Figura 6. Modo de acción de la celulasa en sistemas enzimáticos de celulosa-celulosa (Ryu Mandels, 1980, citados por Wiseman, 1985).

Sus aplicaciones comerciales son a pequeña escala, como auxiliares digestivos en la degradación de celulosa en ajo y champiñones. En diversas industrias como la textil, para el aprovechamiento de sus desechos en la producción de glucosa, así como la aplicación en la rama ambiental para la degradación de compuestos, para mejorar la calidad del pan y su incursión en la extracción de oleorresinas y de pigmentos, la cual generalmente encontramos con mezclas de diversas enzimas celulolíticas.

Delgado (1997) realizó en el CINVESTAV el estudio de los pigmentos contenidos en la flor de cempoalxochitl su caracterización fisicoquímica, procesamiento y

eficiencia pigmentante, donde propone el uso de un complejo multienzimático (como pre-tratamiento para la extracción de los carotenoides contenidos, con el uso de solventes orgánicos, lo cual le llevo a reportar un incremento favorable en su extracción.

Posterior a esto Barzana y col. (2002) propusieron la extracción de los carotenoides contenidos en la *Tagetes erecta* utilizando un esreado enzimático previo a la extracción con solventes orgánicos, lo cual reporta una recuperación elevada (97%) de los carotenoides contenidos en la flor. En este método se propone utilizar flor en fresco con un tiempo de contacto enzima-sustrato, con condiciones controladas, lo cual reduce sustancialmente la perdida de estos colorantes en procesos tradicionales de ensilado, que si bien se trata de una fermentación por la microbiota natural , se lleva bajo en condiciones no controladas, y esto aunado a las temperaturas de secado conllevan a perdidas de mas del 50%.

Çinar (2003) evaluó los efectos de concentración enzimática y el tiempo de extracción así como el rendimiento de los carotenoides a diferentes concentraciones de celulasas y pectinasas y combinaciones de estas , en zanahoria, cáscara de naranja y en boniato, como resultado se obtuvo que el mismo rendimiento del colorante se puede obtener reduciendo la concentración de enzima, pero incrementado el tiempo de extracción.

Sin embargo constantemente se realizan investigaciones que proponen el uso de nuevas tecnologías para la extracción de pigmentos basadas en la tendencia actual de la mira industrial, la reducción de tiempo y costos en procesos de extracción. Navarrete-Bolaños (2004) menciona que existe una relación importante entre el tratamiento previo adecuado y la eficiencia del proceso. Ya que asocia el mecanismo de biolixiviación bajo condiciones controladas de enzimas hidrolíticas de la microbiota natural de la flor, la cual facilitara los mecanismos de difusión entre la pared celular y el intercambio de masas en fases inmiscible, afectando positivamente el rendimiento

en la extracción de xantofilas, resultados que tienen impacto en costo-eficiencia del proceso.

Siendo aun un campo vasto de investigación la búsqueda de nuevas alternativas que conlleven amplios beneficios a la industria de extracción de colorantes. Que tengan inclinación por el uso de fuentes naturales, de las cuales México, cuenta con una gama impresionante para su explotación, así como la seguridad de generar productos seguros e inofensivos a la salud del hombre.

Por lo anteriormente expuesto se planteó la siguiente hipótesis:

Hipótesis

Es posible la obtención, de pigmentos contenidos en la flor de Cempoalxochitl mediante el uso de enzimas celulolíticas, proceso que genere un producto libre de agentes tóxicos para la salud humana.

3. Materiales y Métodos

3.1. Etapas del trabajo.

Este trabajo abarco etapas definidas, análisis de la flor de cempoalxochitl, determinación de las condiciones optimas de concentración inicial de enzima, tiempo de extracción de la celulasa utilizada, y la recuperación del pigmento mediante proceso de filtrado y prensado manual.

3.2. Localización.

El desarrollo de este trabajo se realizo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en la ex- hacienda Buenavista en la ciudad de Saltillo, Coah. En el laboratorio del Departamento de Nutrición y Alimentos. El material biológico fue sembrado en las instalaciones del invernadero del Departamento de Horticultura.

3.3. Materia prima.

Pétalos de la flor de cempoalxochitl. La flor fue deshojada manualmente y posterior a esto se sometió a un proceso de secado (temperatura ambiente) en asoleadero.

Enzima celulasa donada por la Facultad de Ciencias Química de la U. A de C.

3.4. Metodología.

3.4.1. Análisis de los pétalos de la flor de cempoalxochitl, para la determinación del componente mayoritario.

Se procedió a realizar el análisis químico de los pétalos de la flor de cempoalxochitl, dentro de los cuales se determino humedad, con una estufa de secado a 60°C., se extrajo la grasa de la muestra, según técnicas oficiales de la AOAC (Lynch,1987), utilizando un aparato de reflujo Soxhlet, posteriormente, la muestra desengrasada se sometió a la determinación de fibra cruda. La celulosa y lignina fue determinada por extracción con detergentes (Tejeda, 1980).

3.4.2. Determinación de las condiciones óptimas de reacción.

Una vez analizado el contenido de la muestra, se procedió a determinar las condiciones de reacción, para lo cual se establecieron cuatro tratamientos a diferentes concentraciones de enzima inicial 1.0%, 0.1 %, 0.01 %, 0.001% y 0.0001% en relación (p/p) con 1 g de muestra de pétalos de la flor deshidratada. Bajo las siguientes condiciones: pH 4.5, utilizando para ello solución amortiguadora acetatos (Lynch y col., 1987) a un temperatura de 55°C. en un baño María con agitación continua lo cual se puede observar en la Figura 7. Los cuatro tratamientos fueron monitoreados a diferentes tiempos(5, 60, 120, 240, 480 y 700 minutos), mediante la formación de azúcares totales (Técnica del Fenol sulfúrico, Dubois, 1956) y azúcares reductores (Técnica del Ácido Dinitrosalicílico, Miller, 1959).



Figura 7. Reactor para el sistema empleado en Flor de Cempoalxochitl

3.4.3. Determinación del tiempo de reacción enzimática, en el cual se tiene la máxima recuperación del pigmento.

Se establecieron nuevamente las mismas condiciones de reacción para la celulasa en un sistema a temperatura de 55°C., agitación constante, pH 4.5 y a la

mejor relación sustrato enzima encontrada en la etapa experimental anterior. Además se agrego un tratamiento testigo, el cual no contenía enzima, pero, se sometió a las mismas condiciones de reacción que el tratamiento con enzima. Ambos tratamientos fueron monitoreados a diferentes intervalos de tiempo para determinar la formación de producto, en función al contenido de azúcares totales (Dubois, 1956) y reductores (Miller, 1959).

3.4.4. Recuperación del pigmento.

Después del pre-tratamiento enzimático, las muestras fueron sometidas a un calentamiento a ebullición por un tiempo aproximado de 15 minutos y posteriormente se filtro el sobrenadante con una malla de poro mediano, la muestra restante se lavo repetidas veces hasta obtener un filtrado claro, el cual se recupero en frascos (Figura 8), que posteriormente se introdujeron a una estufa de secado a una temperatura de 60°C., hasta su completa evaporación.

Finalmente se obtuvo el pigmento mediante la determinación de pesos constantes.



Figura 8 . Muestran el sistema de recuperación, filtrado y prensado de la flor hasta obtener la cantidad mínima de color.

3.4.5. Caracterización del pigmento obtenido.

El pigmento obtenido fue caracterizado mediante técnica espectrofotométrica de Infrarrojo, para determinar las fracciones obtenidas.

4. Resultados y discusión

4.1. Determinación del componente mayoritario de los pétalos de la flor de cempoalxochitl

De acuerdo a los análisis realizados a los pétalos, se obtuvieron los siguientes resultados reportados en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentaje de los principales componentes de los pétalos de la flor.

COMPUESTO	PORCENTAJE (%)
MATERIA SECA (MS)	99.28
HUMEDAD	0.72
CENIZAS	4.47
GRASA	8.24
FIBRA CRUDA	10.93
CELULOSA	4.17
LIGNINA	2.92

Se observó que el compuesto de mayor porcentaje en los pétalos es la fibra cruda (10.93%) y que la celulosa en su pared celular fue de 4.17%, encontrándose además otros compuestos en menores proporciones, concordando con definiciones a cerca de la composición química de la pared celular (Encarta, 2005) en la cual se asevera que la mayor proporción de las paredes en tejidos vegetales es la celulosa y la lignina, además de otros componentes en menor porcentaje, por lo cual se considera de mayor influencia en el desarrollo de la presente investigación a la celulosa y por ello se justifica el uso de celulasas para la ruptura de las paredes dentro de las cuales se encuentra el pigmento, facilitando con ello su liberación.

4.2. Determinación de la relación enzima-sustrato.

En esta etapa se determinó la concentración óptima de enzima inicial, para llevar a cabo el proceso, dando seguimiento a la cinética de reacción enzimática mediante el monitoreo de la formación de azúcares reductores, variando la concentración de enzima inicial (E_0) desde 0.0001 hasta 1.0% a diferentes tiempos, con lo cual fue posible obtener valores de velocidad inicial (V_0) para indicar la eficiencia del proceso, ya que la *velocidad inicial* es el parámetro que ayuda a calcular el comportamiento de la cinética, sin esperar el consumo total del sustrato, por ello se recurre a calcular este indicador antes de que se consuma el 10% del total del sustrato (Anónimo 3, 2005).

Los valores obtenidos de velocidad inicial en función a las diferentes concentraciones de enzima están reportados en el Cuadro 4, los cuales fueron sometidos a un análisis de varianza, mediante el ensayo de t-Student (Apéndice a) con $P \leq 0.05$ (Figura 9), donde fue posible observar que las concentraciones 1.000 y 0.1 % son estadísticamente semejantes pero superiores a las de 0.01 y 0.001 las cuales a su vez no presentan diferencias significativas entre ellas, encontrándose finalmente que la de 0.0001% es estadísticamente menor al resto de las concentraciones ensayadas, por lo que por cuestiones de costos se opta por el uso de la concentración 0.1% ya que fue la que mayores velocidades iniciales reportó junto con la de 1.0%. Dicho dato es similar al reportado por Delgado (1997) en un estudio similar.

Cuadro 4. Medias de las velocidades iniciales en función a la concentración inicial de enzima.

Concentración Eo mg	Vo mg/ml /min
0.0001	0.004582
0.001	0.011008
0.01	0.011810
0.1	0.014462
1.0	0.014113

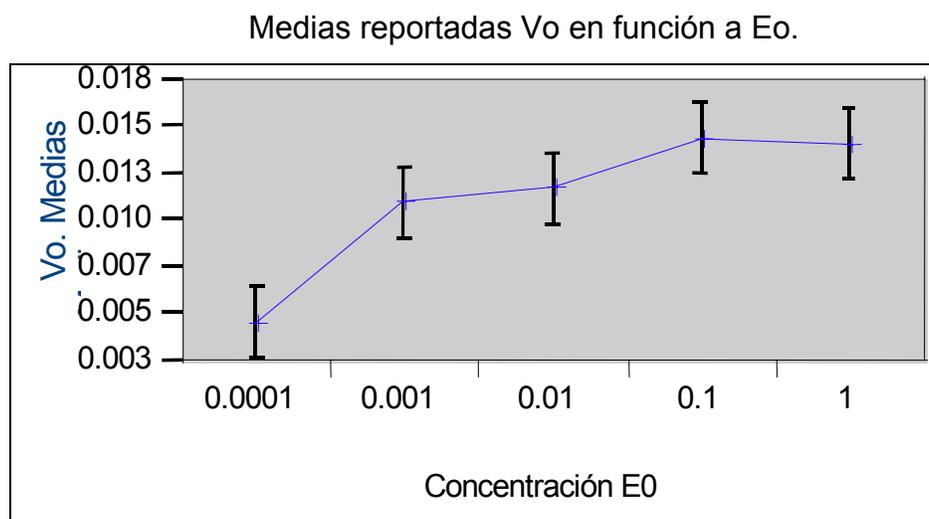


Figura 9. Medias de Vo en función a la concentración inicial de enzima.

4.3. Tiempo de reacción óptimo para lograr la mayor recuperación de pigmento.

Una vez determinada la concentración adecuada de enzima inicial, se realizaron pruebas para identificar el tiempo óptimo de reacción, donde se obtuviera una mayor recuperación de pigmento, para lo cual se monitoreo la reacción con la ayuda de un indicador: la formación de azúcares totales y reductores, tal y como se señala en la ruta para el modo de acción de la celulasa en sistemas enzimáticos de celulosa-celulasa (Ryu y Mandels,1980). Se sabe que la celulosa es un polisacárido donde

sus unidades estructurales son la glucosa, por lo tanto entre mayor formación de azúcares tanto totales como reductores, se observará mayor degradación de celulosa. En las Figuras 10 y 11, respectivamente, se observa el comportamiento de dichos azúcares a diferentes intervalos de tiempo, las graficas reportan el comportamiento de las medias estimadas en el análisis de varianza realizado. La comparación de medias de ambos gráficos se reportan con una $P \leq 0.05$ (Apéndice b y c).

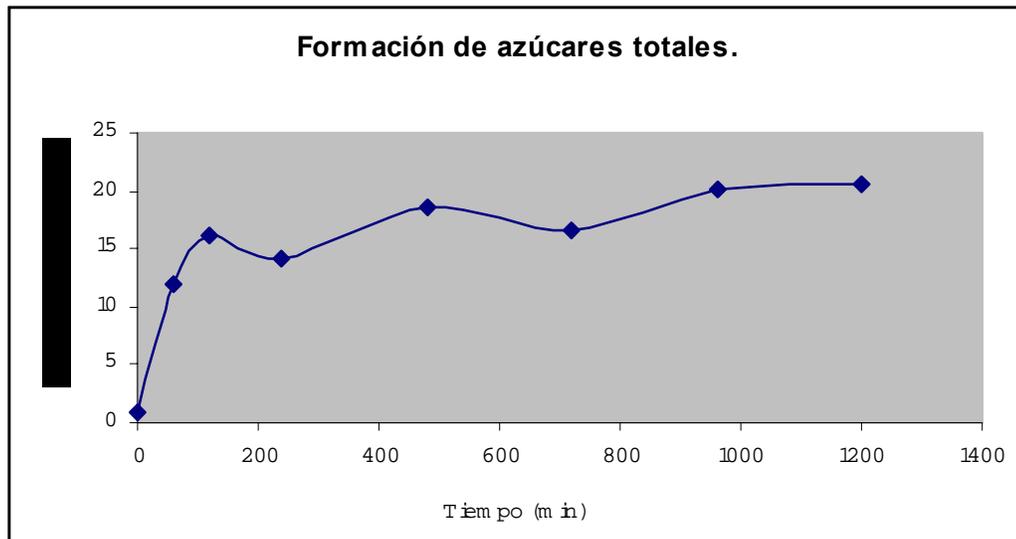


Figura 9. Formación de azúcares totales en función al tiempo.

Las medias entre los tiempos 1200, 960 y 480 minutos fueron estadísticamente similares siendo el tiempo de 1200 min. donde hubo una mayor formación de azúcares totales, con diferencias significativas al último tratamiento, el cual reporto una media de 0.79001 veinte veces menor al tiempo máximo de formación.

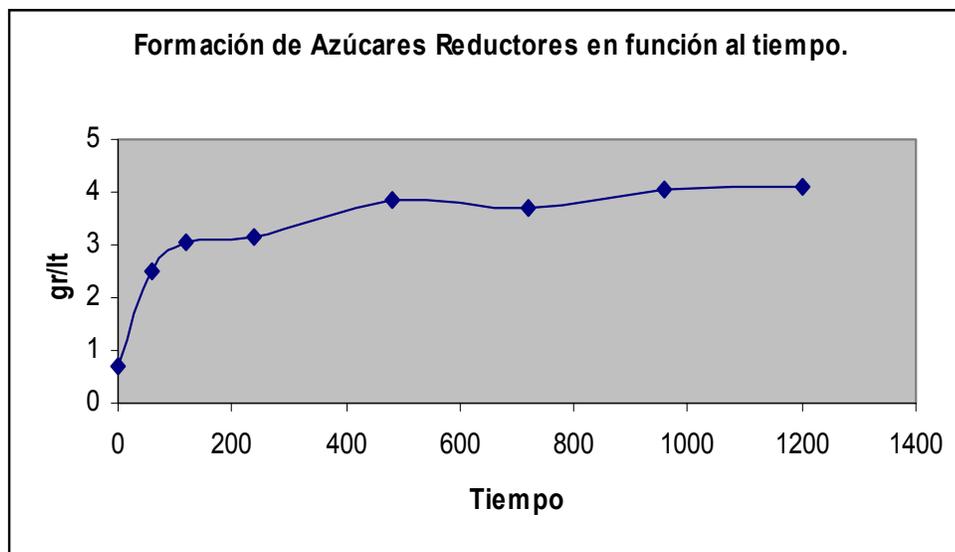


Figura 10. Formación de azúcares reductores en función al tiempo.

Los resultados reportan que las diferencias entre medias de los tiempos 1200, 960 y 480 minutos, son estadísticamente semejantes, donde los dos últimos tiempos fueron iguales pero diferentes al tiempo mas alto, que fue el de las 20 horas.

En los datos obtenidos se observa, que la mayor formación tanto de azúcares totales como reductores se encuentra a los 1200 minutos, donde una vez analizados estadísticamente se puede apreciar que no existe diferencia significativa entre los 480-960 y 1200 minutos siendo estadísticamente diferentes al resto de los tiempo y estadísticamente semejantes entre sí.

Posterior a estos resultados se analizó la correlación existente entre formación de azúcares totales y reductores con la liberación de pigmento. Para lo cual se realizó la recuperación del pigmento a diferentes tiempos. La Figura12 muestra la relación de gramos de pigmento recuperado y el tiempo de tratamiento empleado, donde finalmente después de haber realizado técnicas de filtrado y prensado, se obtuvieron muestras con bajo contenido de colorante, esto fue posible ya que si el carotenoide forma complejos con proteínas o azúcares se vuelve soluble en solventes polares como el agua (Delgado, 1997).

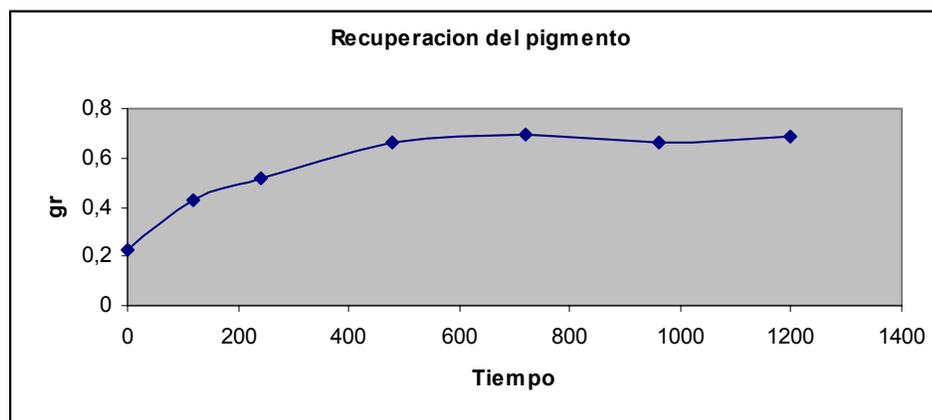


Figura 11. Valor medio de la recuperación del pigmento en función al tiempo.

Los valores reportados en el gráfico son las medias estimadas en el análisis estadístico que muestran que no existe diferencia significativa según comparación de medias con la prueba de t-Student (Apéndice d) entre los 480-960 y 1200 minutos, por lo cual se establece que aun cuando la mayor liberación de azúcares totales y reductores se da en un mayor tiempo de tratamiento, no es necesario dicho tiempo para obtener un rendimiento aceptable, ya que estadísticamente los rendimientos son semejantes en un tiempo menor de 480 minutos.

El tiempo de reacción se determinó mediante la correlación entre formación de azúcares totales y reductores, así como la recuperación del pigmento, en un tiempo de 8 horas, tiempo 15 veces menor al reportado por Delgado (1997), donde empleó un tratamiento de 120 horas para la mayor recuperación de carotenoides, esta diferencia significativa en la reducción del tiempo de tratamiento, pudo darse debido a la naturaleza de las hidrolasas utilizadas, así como su efectividad frente al sustrato, ya que en cuanto a la relación de enzima-sustrato, se utilizó la misma. Çinar (2004) dice que es posible reducir la concentración de enzimas, pero extendiendo el tiempo de extracción, situación que propone una reducción en los costos de enzima, lo que a nivel industria es necesario analizar, ya que si es necesario extender el tiempo de extracción implica mayor consumo energético, probablemente es un punto necesario

de discusión para saber en que se ahorra mas en el consumo de energía o en la reducción de la cantidad de enzima necesaria para el proceso.

4.4. Comparación entre tratamientos.

En esta etapa se llevo a cabo la comparación entre el tratamiento utilizando enzimas y uno testigo, el cual no las contiene , en función a la recuperación de pigmento en un periodo de tiempo de 20 horas. La Figura13 muestra el comportamiento de ambos tratamientos donde se puede observar claramente las diferencias significativas que existen entre el tratamiento a prueba y el testigo. Donde el primero es ocho veces mayor que el ultimo tiempo el cual reporta rendimientos mínimos.

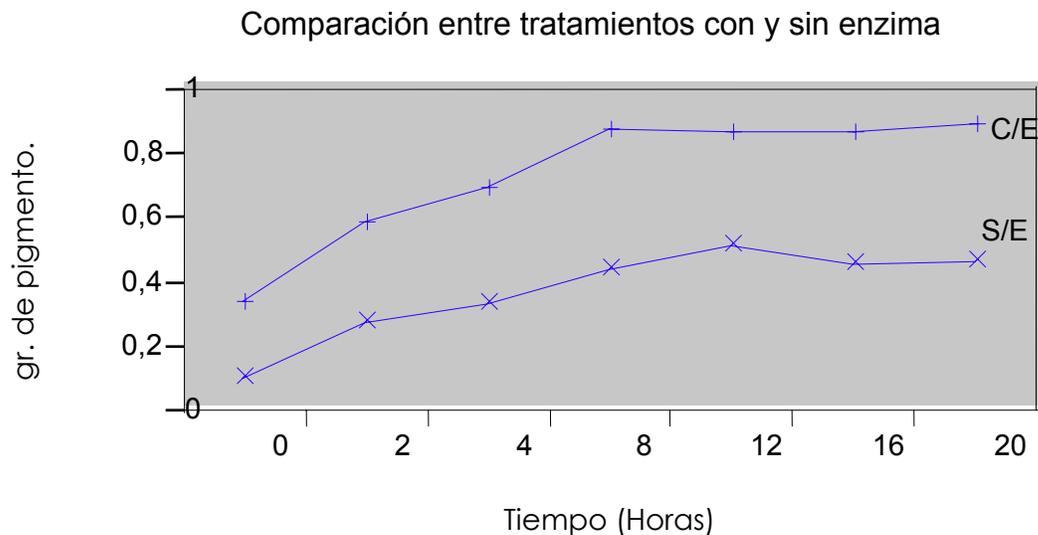


Figura 12. Grafico que muestra la comparación entre tratamientos con y sin enzima.

Los rendimientos reportados para los tiempos 8, 12, 16 y 20 con tratamiento enzimático, no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre si, de acuerdo a la comparación de medias con la prueba de t-Student con una $p \leq 0.05$.

Estas diferencias existentes en los tratamientos con y sin enzimas, son sustentadas por las investigaciones realizadas en el área de extracción de colorantes y aceites, donde Navarrete-Bolaños (2004) señala el incremento significativo en la eficiencia de extracción de xantofilas de *Tagetes erecta* por la aplicación de un pre-tratamiento enzimático de hidrolasas sintetizadas por la microbiota de esta flor, el inconveniente presentado por este método, probablemente sea que no se tienen identificadas las condiciones ideales de trabajo, por lo cual puede existir el riesgo de generar metabolitos secundarios que afecten el producto, además de que en la industria es necesario estandarizar procesos para lograr su mayor efectividad, ventaja que el método sugerido en la presente investigación muestra, ya que las enzimas además de trabajar a temperaturas moderadas, son específicas sobre el sustrato que actúan y pueden ser reutilizadas si se fijan a soportes logrando un proceso continuo, además de una reducción de costos en el mismo. Sineiro (1998) señala un tratamiento con celulasas a las semillas de girasol para incrementar la extracción de aceites de un 30 hasta un 80%. Mencionamos también el trabajo realizado por Çinar (2004), que propone la utilización de celulasas y pectinasas para la extracción de carotenoides y recientemente Barzana, realizó un escalamiento a planta piloto, donde se demostró el incremento en la recuperación de pigmento contenido en *Tagetes erecta* del 97% de extracción, utilizando un método combinado de enzimas y solventes. Todas estas investigaciones nos llevan a corroborar que la utilización de enzimas como la celulasas en el proceso de degradación de la celulosa, llevan a una mejor recuperación del pigmento encapsulado por paredes celulares, logrando así una ventaja altamente notoria contra métodos de extracción donde no se emplean.

4.5. Caracterización del pigmento.

El pigmento obtenido, se analizó para determinar los compuestos encontrados en las muestras mediante espectro infrarrojo Figura14 donde se comparó con una muestra químicamente pura, una oleoresina de luteína.

Graficas del espectro infrarrojo de muestras de flor de cempoalxochitl

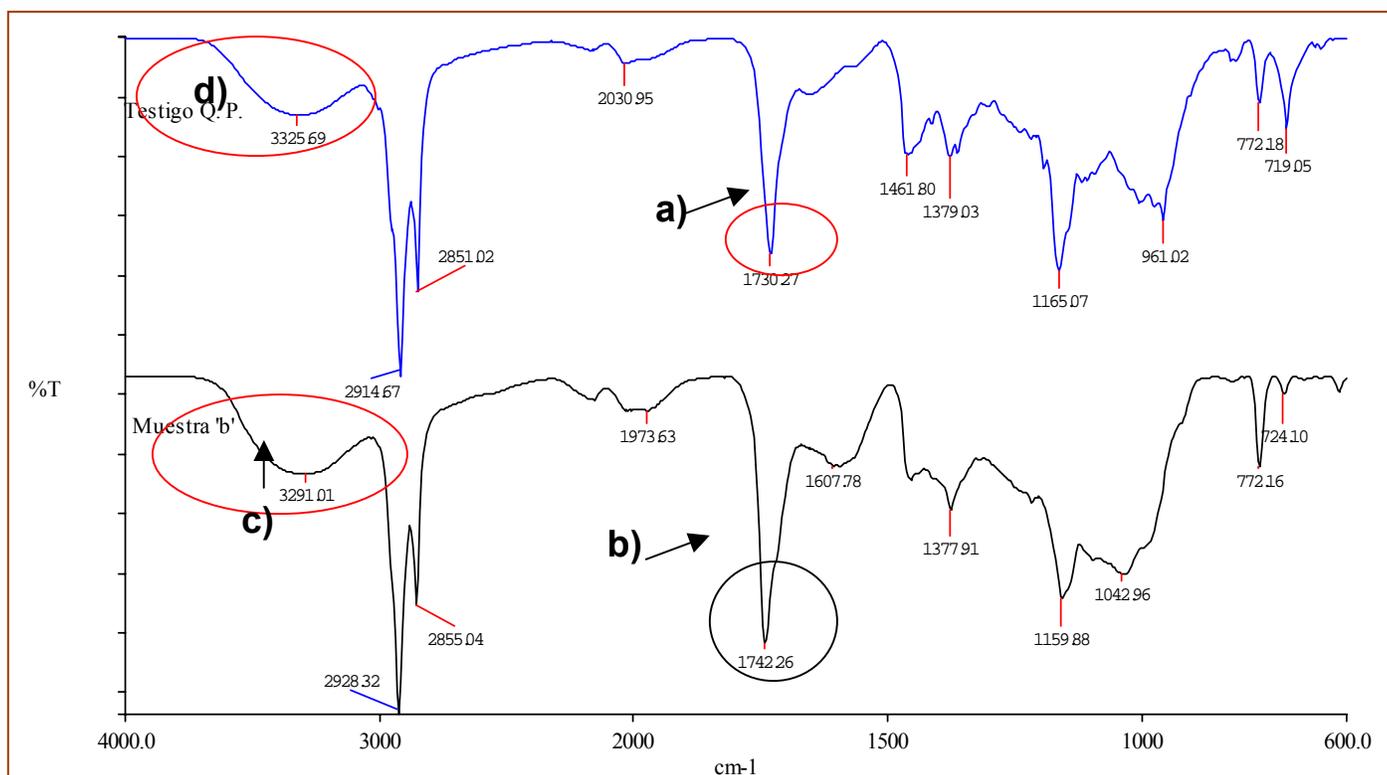


Figura 13. Espectro infrarrojo de muestras en Flor de Cempoalxochitl.

En el espectro IR anteriormente mostrado se observa que existen picos pronunciados entre los 1742.26 cm^{-1} lo cual indica según Philip y Berry (1975) que existe luteína, la grafica superior tomada como patrón tiene un pico mas pronunciado a los 1730.26 cm^{-1} cercano a los 1725 cm^{-1} lo cual indica que la muestra es una oleoresina la luteína se encuentra enlazada a los ácidos grasos.

En el área c) se observa un valor muy aproximado a los 3300cm^{-1} , 3291.01cm^{-1} , lo cual indica según la referencia se trata de un monoéster o en su caso que el pigmento se encuentra en “forma libre”, en tanto que la curva patrón registra un comportamiento en el área de los 3325.69cm^{-1} lo cual indica que puede tratarse de un diéster.

5. Conclusiones

Al concluir la presente investigación puede citarse que los resultados en la composición química de los pétalos , contiene una mayor proporción de fibra cruda 10.93%, de la cual un 4.17% era celulosa y el 2.92% lignina.

Posterior a esto se determino la relación optima enzima-sustrato, probando diferentes concentraciones de enzima inicial y a diversos intervalos de tiempo, para lo cual se analizo el comportamiento de la cinética enzimática determinando la V_0 (velocidad inicial) obteniendo valores de 0.014462 mg/ml/min para la concentración 0.1000 % (p/p) no habiendo diferencias significativas entre el tratamiento con 1.0000 % de enzima (p/p), concluyendo que la concentración ideal para llevar a cabo este proceso de biolixiviación fue de 0.1000 % (p/p) sustrato-enzima.

El tiempo de reacción optimo para la mayor degradación de celulosa fue a las 20 horas, no encontrándose diferencias significativas entre 480-960 minutos, posteriormente se procedió a la recuperación del pigmento para su cuantificación y caracterización, donde después de haberse degradado la mayor cantidad de celulosa contenida en el sustrato, los pétalos se encontraron casi totalmente degradados. La recuperación represento casi el 80% del total de la muestra tratada, en un tiempo de 480 min. por lo cual se puede observar que aun cuando la mayor degradación de celulosa se presento a las 20 horas, la recuperación del pigmento liberado mostró mejores resultados a las 8 horas, no habiendo diferencias significativas entre estos tiempos.

Finalmente se identifico el producto obtenido mediante espectroscopia infrarrojo, realizando una comparación entre una muestra químicamente pura y la obtenida mediante tratamientos enzimáticos, se tienen valores de 1742.26 cm^{-1} muy cercanos a los 1725 cm^{-1} los cuales indican la presencia de luteína además de lecturas en el área de 3300 cm^{-1} , 3291.01 cm^{-1} , lo que indica que el pigmento es un monoéster o se encuentra en forma libre Philip y Berry (1975).

6. Resumen

En la presente investigación se propone el uso de un sistema de biolixiviación enzimática en medio acuoso, para lograr la mayor extracción del pigmento contenido en los pétalos de la flor de cempoalxochitl, reduciendo con ello el impacto al medio ambiente y la obtención de un producto sin residuos tóxicos como los de un solvente.

Los resultados obtenidos demostraron que la concentración de enzima inicial óptima es del 0.1% (p/p) en relación al sustrato, en un tiempo de 8 horas para lograr una máxima recuperación, a temperatura de 55°C , pH 4.5 y agitación constante. Estos resultados son discutidos con trabajos similares donde se encontró como concentración de enzima inicial la misma que la reportada por Delgado (1997), además de la reducción de tiempo de tratamiento a 8 horas, diferente al tiempo propuesto por Delgado (1997) de 120 horas. Se encontró además que la diferencia es notoria entre tratamientos mediados con y sin enzima, dando una ventaja relevante en tiempo y recuperación de pasta pigmentante.

Finalmente se realizó la caracterización de la pasta recuperada, la cual se analizó mediante espectroscopia infrarrojo, encontrándose similitudes en comparación con una muestra químicamente pura., las cuales posteriormente se discutieron, para observar que los gráficos mostraban picos a los 1742.26 cm^{-1} característicos de la luteína, así como a 3291.01 cm^{-1} , lo que indica que se trata de un monoéster o en su caso que el pigmento se encuentra de forma libre.

7. Literatura Citada

ALAM, A.U., Couch, J.R. y Creger, C.R. 1968. The carotenoids of marigold *Tagetes erecta*. Canadian J. Botany 46:1539-1541.

Anónimo1,2005.Carotenoids.

<http://www.carotenoidsociety.org/carotenoids/fcarotenoids.html> (25-08-05).

Anónimo2,2005. <http://www.photorae.it/gallerianatura/pages/TagetesErecta.htm>

(25-08-05).

Anónimo3, 2005. <http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ3.htm#e> (25-08-05)

BADUI, D. S., 1993. Química de los Alimentos. Addison Wesley Longman de México, S.A. de C. V. México D.F Págs. 271-276.

BARZANA E., Rubio, D., Santamaría, R.I., Garcia C., O., Garcia F., R., Saenz V. 2004. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*).Facultad de Química, UNAM, México.

BARZANA, G. Eduardo. 2005. Biocatálisis en medios no acuosos: una historia de 20 años, desde los fundamentos a las aplicaciones industriales. Academia de Ingeniería. Revista Investigación Tecnológica. Publicación de la Academia de Ingeniería, A.C.

CANACINTRA, 1988. Anteproyecto de normatividad para colorantes naturales. Cámara Nacional de la industria de la Transformación.

CINAR, N. 2003. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. *Process and Biochemistry* 40(2): 945-949.

COUATE T., P. Año. Alimentos. Química de sus componentes. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

CHEFTEL, C. J., Cheftel, H. B. y Pierre. 1989. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Vol. II. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p. 31

CHESTER, T.L., Pinkstone, J. D. y Rayne, D.E. 1992. Supercritical fluid chromatography and extraction. *Anal. Chem.* 64(12):153R-170R.

DELGADO V., F. y Paredes-López, O. 1997. Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flower (*Tagetes erecta*). *Food Chem.* 58(3): 255-258.

DEMAN, J.M. 1980. Color.. En: Autores que fungen como editors. Principles of Food Chemistry. 2nd. Ed. AVI Publishing Company. Weport, Connecticut, USA. P.15-51.

DUBOIS, M., Guilles, K.A, Hamilton, J.K, Rebers, P.A y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:530-pag final.

ENCARTA, 2005. Fisiología Vegetal. On line. <http://es.encarta.msn.com> (24-08-05)

FDA 1986 Food and Drug Administration. Radio nuclides in Foods- Derived Intervention. Levels. Compliance Policy Guide 7119.14, Section 560.750; 1986.

FENNEMA, R. O. 2000. Química de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 773-805.

FRASER, P.D., Linden, H. y Sandmann, G. 1993. Purification and reactivation of recombinant *Synechoccus* phytoene desaturase from an overexpressing strain of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 291:687-692.

GARCÍA, G. y Quintero L., falta inicial de nombre .1999. Biotecnología Alimentaria. Ed. Limusa. México, D.F

GRAYSON, M. 1979. Color. En: G.J.Bushey, C.L Eastman, A. Klingsberg y L. van Nes (Eds.). Kirk-Ohmeter Enciclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons. USA, p.523-548.

GUSTONE, F. D. y Norris, F. A. 1983. Lipids in Foods. Pergamon Press. N. Y., USA, p. 95-107.

HARI, R.K., Patel, R.T. y Martin, A.M. 1994. An overview of pigment production in biological systems: function, biosynthesis and applications in food industry. Food Rev. Internal.10(1): 49-70.

HAWTHORNE, S.B. 1990. Analytical-scale supercritical fluid extraction. Anal. Chem. 62(11): 633A-642A.

HENCKEN, H. 1992. Chemical and physiological behaviour of feeds carotenoids and their effects on pigmentation. Poultry Sci. 71: 711-717.

LYNCH, M. J. R., S. S. Mellor, D. L. Spare, D. P. Inwood, H. M. J. 1987. Métodos de Laboratorio. Vol 2. 2ª ed. Nueva Editorial Interamericana. México, D. F. pp. 1446-1447.

MADRID, A., Cenzano I. y Vicente J.M. 1994. Nuevo manual de las industrias alimentarias. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. Págs. 47-53.

MARMION, D.M. 1979. *Handbook of us colorants for foods, drugs and cosmetics*. Jonh Wiley y Sons, EUA. Pág.350.

MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31: 426-428.

MUNGUÍA, A. año. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). J. Agri. Food and Chem.,50: 4491-4496.

MULTON, J. L. 2000. Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias. 2da. Ed. Acribia. Zaragoza, España. . p 343-345.

NAVARRETE,B.J.L.2004. Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. Food Research International Volume 38, Issue 2 , March 2005, Pages 159-165

OWEN, R. F..año. Química de los Alimentos. 2da. Ed. Acribia.A. Zaragoza, España.

PHILIP, T. y Berry, J. W. 1996. A Process for the purification of lutein-fatty acid esters from marigold petals. J. Food Sci. 41:163-165.

RANDOLPH, T.W. 1990. Supercritical fluid extraction in biotechnology. Trend in Biotech. 8:78-82.

RODRÍGUEZ Montoya Martha Catalina. 2002. Importancia de los colorantes en la industria alimentaria.**ROSENTHAL**, A., Pyle, D.L y Niranján, K. 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. Enzyme and Microbiol. Tech. 19:400-420.

RUBIO H., D., Barzana, E. y López-Munguía, A. 1994. Procedimiento para la obtención de pigmentos liposolubles a partir de productos vegetales. Falta nombre de revista, vol., Págs., país.

SAHAZA Cardona, D.P 2001. El achiote. Disponible en: www.unalmed.edu.co/~crsequed/ACHIOTE.htm .

SANTOS, F.E.1988. Colorantes naturales en la industria alimentaria. *Avances en aditivos para la industria de alimentos*, PUAL, UNAM, México. Págs. 3-140.

SERRATO C., M. A.. año. Cempoalxochitl. Diversidad biológica y usos. Ciencia y desarrollo en Internet. Vol. Págs.

SINEIRO,J.1998. Optimization of the enzymatic treatment during aqueous oil extraction from sunflower seeds. Food and Chem.Volume 61,Issue 4, pag.464-474.

TOMBS, M.P. 1967. Proteins bodies of the soybean. *Plant Physiol.* vol(núm.): Págs. no creo que sea de la 742-797.

WALFORD, J.1977.Historical Development in food coloration. *Development in food colours –1, Walford , J. (comp)*,J.Applied Science Publishers, Londres, pp.77-84.

WISEMAN, A. Año. Manual de Biotecnología de las Enzimas. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

WONG, W. S. D.. 1989. Química de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Level				Least Sq Mean
0.100	A			0.01446222
1.000	A			0.01411300
0.010	A	B		0.01181000
0.001		B		0.01100773
0.0001			C	0.00458206

a) T-Student comparación de tratamiento Vo en función a Eo.

Level							Least Sq Mean
0.001,1200	A						20,614771
0.001,960	A						20,059302
0.001,480	A	B					18,643248
0.001,720		B	C				16,695196
0.001,120			C	D			16,116257
0.001,240				D	E		14,0665
0.001,60					E		12,008919
0.001,0						F	0,790017

b) T-Student de azucares totales para tiempo optimo

Level					Least Sq Mean
0.001,1200	A				5.1577064
0.001,960	A	B			4.6757428
0.001,480	A	B			4.591275
0.001,720		B			4.327934
0.001,120			C		2.9521018
0.001,240			C		2.9411706
0.001,60			C		2.5714996
0.001,0				D	0.4597406

c)T-Student de azúcares reductores para tiempo optimo.

Level							Least Sq Mean
C/E,20	A						0,89750000
C/E,8	A						0,88055000
C/E,16	A						0,87080000
C/E,12	A						0,87070000
C/E,4	A	B					0,69555000
C/E,2			B	C			0,58750000
S/E,12			B	C	D		0,51765000
S/E,20			B	C	D		0,46910000
S/E,16			B	C	D		0,45650000
S/E,8			B	C	D		0,44140000
C/E,0				C	D	E	0,34690000
S/E,4				C	D	E	0,33480000
S/E,2					D	E	0,27370000
S/E,0						E	0,10195000

d)T-Student para tratamiento con y sin enzima en función a la recuperación de pigmento.

