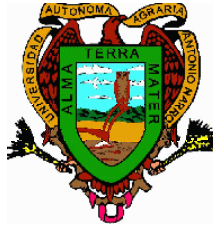


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



Obtención y caracterización de carotenoides presentes en pétalos de la flor de cempoalxochitl (*Tagetes erecta L.*) mediante biocatálisis fúngica

POR:

DANIEL ANGEL ORTÍZ JIMÉNEZ

TESIS

Presentada Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Agosto del 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CAROTENOIDES PRESENTES EN LOS
PÉTALOS DE LA FLOR DE CEMPOALXOCHITL (*Tagetes erecta L.*) MEDIANTE
BIOCATÁLISIS FÚNGICA**

Por:

DANIEL ANGEL ORTÍZ JIMÉNEZ

Tesis

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por el comité de tesis:

Dr. Ramiro López Trujillo
Asesor principal

M. C. María Hernández González
Co-asesor

Dra. Anna Iliná
Vocal

M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla
Vocal suplente

Dr. Ramón F. García Castillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México, Agosto del 2005

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** y a la **virgen de Guadalupe**, por haberme dado la oportunidad de culminar el presente trabajo y esta etapa de mi vida así como por todas las bendiciones que han dado a mi familia.

A mi **Alma Matter** que me alojó en su seno para mi formación profesional, por los servicios proporcionados y por todas las cosas que viví a lo largo de mi estancia en esta universidad.

Al **Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECyT)**, por el apoyo económico otorgado a través del programa Becas Tesis de Licenciatura (etapa Noviembre - Agosto). Así como a la **Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila y el Centro de Investigación para los Recursos Naturales por su contribución y apoyo.**

A la **M. C. María Hernández González**, por todo lo que aprendí tanto en clases como personalmente de ella. Por su apoyo, apertura al dialogo y orientación durante el desarrollo de la presente investigación.

Al **Dr. Ramiro López Trujillo**, por su colaboración, conocimientos e interés así como por ser parte importante del comité de asesores en este trabajo.

A la **Dra. Anna Iliná**, por su colaboración teórica-práctica en diversas etapas de la investigación además de formar parte importante de la misma.

Al **M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla**, por su esfuerzo realizado con sus enseñanzas para la formación de profesionistas de esta institución, además de su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara, M.C. Mildred Flores Verastegui y T. L. Q. Carlos Arévalo Sanmiguel y María de Jesús Sánchez** por haber participado durante el trabajo de laboratorio realizado durante la fase experimental.

Al **Ing. Gerardo Sánchez**, por su amistad, colaboración en mi formación como profesionista y por sus atenciones como amigo.

A mis compañeros de generación: Juan Manuel (Camello), Luis Lándin (Chitter), Heberto (Fox), Mario (Abuelo), Mauro (Maura), Andrés (Shoker), Carlos (Panis), Jorge (gargui), Juan Luís (Polla), Carlos Arturo (Carnavaleiro), Sulpicio (sulfiero), Luis Armando (anciano), Ana, Gaby, Vane, Lupita, Dunia, Rosy, Laura, entre otros. A mis amigos: Ing. Francisco, Juan José, Emilio "gordo", Luis (escobin), Romeo, Ulises, Juan (pollo), Javier Encina (Contry) y a todos aquellos con quién tuve amistad durante mi estancia dentro y fuera de la universidad.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Sra. Teresa Jiménez Villanueva

Sr. Mario Ortíz Jaramillo

Por todos los sacrificios hechos para sacar adelante a nuestra familia, por su cariño, apoyo y comprensión depositados en mí.

A mis hermanos:

Mariela, Mario, Oscar, Emmanuel (†), Carlos, Francisco y Gustavo, por tener la dicha de compartir con ustedes cosas tan maravillosas como es la vida, los quiero mucho, siempre están en mi corazón.

En general a toda la familia, pero especialmente a mis tíos: **Armando, J. Isabel, Alfonso, Carlos, Jaime, Emilio, Refugio, Alicia, Melia, Genaro, entre otros.**

A mis amigos más especiales por su motivación y apoyo:

Arnulfo y Florencia Espinosa, Nancy y Tere Olmos, Francisco Rodríguez, Alfredo V. Rivera, J. Daniel V. Núñez, Manuel Hernández, Lucas y Eva, por haber sido parte importante durante mi formación como persona y como profesionalista, así como a todos aquellos de alguna forma me han apoyado a lo largo de mi existencia.

A **LOLITA**, María Dolores Sifuentes Hilario, una persona muy generosa y de buen corazón quien fue muy importante durante mi estancia en la Universidad ya que me brindó su apoyo incondicional. Mi más sincero respeto y agradecimiento.

"Sabido que no existen palabras para agradecer su apoyo y motivación sólo quiero que sepan que este logro mío es también el logro de ustedes"

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS	3
INDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCION	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Pigmentos	8
2.1.1. Definición.....	8
2.1.2. Clasificación.....	8
2.1.3. Fuentes	8
2.1.4. Importancia.....	9
2.2. Colorantes	10
2.2.1. Definición.....	10
2.2.2. Importancia de los colorantes en la industria alimentaria	10
2.2.3. Clasificación.....	11
2.2.3.1. Colorantes sintéticos	12
2.2.3.1.1. Definición	12
2.2.3.1.2. Distribución	12
2.2.3.1.3. Toxicidad	13
2.2.3.2. Colorantes naturales	14
2.2.3.2.1. Definición	14
2.2.3.2.2. Fuentes.....	14
2.2.3.2.3. Normatividad en función al uso.....	15
2.3. Flor de cempoalxochitl como fuente potencial de colorantes naturales	16
2.3.1. Componentes.....	17
2.3.2. Usos en general	19
2.4. Carotenoides	20
2.4.1. Definición.....	20
2.4.2. Localización	20
2.4.3. Clasificación.....	21
2.4.4. Funciones	21
2.4.5. Métodos de obtención	22
2.4.5.1.1. Extracción con solventes	22
2.4.5.1.2. Extracción con fluido supercrítico	23
2.4.5.1.3. Saponificación	23
2.4.5.1.4. Separación.....	23
2.4.5.1.5. Caracterización	24
2.4.5.1.6. Cuantificación.....	24
2.4.5.1.7. Otras formas de obtención (biocatálisis como prototipo)	24
2.5. Biocatálisis	25

2.5.1.	Definición.....	25
2.5.2.	Microorganismos implicados	25
2.5.3.	Biocatálisis utilizando hongos celulolíticos	25
2.5.4.	Oportunidades de acción sobre la extracción de pigmentos (expectativas a futuro).....	27
3.	MATERIALES Y METODOS	28
3.1.	Etapa 1. Obtención y manejo de la materia prima.....	28
3.2.	Etapa 2. Caracterización de los pétalos empleados	28
3.3.	Etapa 3. Obtención, selección y caracterización de microorganismos fúngicos utilizados	28
3.3.1.	Selección de las cepas fúngicas con mayor actividad sobre la celulosa.....	28
3.3.2.	Caracterización de los microorganismos fúngicos seleccionados	29
3.4.	Etapa 4. Establecimiento del proceso de biocatálisis.....	29
3.5.	Etapa 5. Recuperación de los carotenoides liberados, caracterización del extracto obtenido y cálculo del porcentaje de extracción	30
3.5.1.	Recuperación de los carotenoides liberados	31
3.5.2.	Caracterización del extracto obtenido	31
3.5.3.	Cálculo del porcentaje de extracción.....	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1.	Etapa 1. Obtención de la materia prima	32
4.2.	Etapa 2. Caracterización de los pétalos empleados	32
4.3.	Etapa 3. Obtención, selección y caracterización de microorganismos fúngicos utilizados	33
4.3.1.	Selección de las cepas fúngicas con mayor actividad sobre la celulosa.....	33
4.3.2.	Caracterización de los microorganismos fúngicos seleccionados	35
4.4.	Etapa 4. Establecimiento del proceso de biocatálisis.....	36
4.4.1.	Monitoreo de azúcares totales	36
4.4.2.	Monitoreo de azúcares reductores	39
4.5.	Etapa 5. Recuperación, caracterización del extracto y cálculo del porcentaje de extracción	41
4.5.1.	Recuperación de los carotenoides liberados	41
4.5.2.	Caracterización de la pasta obtenida	42
4.5.3.	Cálculo del porcentaje de extracción.....	43
4.5.3.1.	Efecto de la cepa fúngica sobre el extracto obtenido	45
4.5.3.2.	Efecto del pH sobre el extracto obtenido	45
4.5.4.	Recomendaciones	46
5.	CONCLUSIONES	47
6.	LITERATURA CITADA	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Pigmentos relacionados con los alimentos.....	9
2	Materias primas vegetales utilizadas para colorear alimentos.....	15
3	Clasificación taxonómica de la flor de cempoalxochitl.....	16
4	Porcentaje de carotenoides totales encontrados en pétalos de la flor de cempoalxochitl.....	18
5	Composición del medio formulado para la biocatálisis.....	30
6	Resultados de los análisis químicos realizados a los pétalos.....	32
7	Resultados de la comparación de medias de los datos obtenidos al realizar la técnica del rojo congo.....	34
8	Resultados de la caracterización de los preparados fúngicos seleccionados.....	35
9	Análisis de varianza realizado a los datos procedentes de la recuperación del extracto.....	44
10	Análisis de varianza para cada factor.....	45
11	Efecto de la cepa fúngica sobre el extracto obtenido.....	45
12	Efecto del pH sobre el extracto obtenido.....	46

INDICE DE FIGURAS

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue obtener mediante biocatálisis fúngica y caracterizar los pigmentos de tipo carotenoide presentes en los pétalos de la flor de cempoalxochitl como un proceso alternativo para la extracción de pigmentos. La biocatálisis se llevó a cabo utilizando preparados fúngicos con capacidad para degradar celulosa. Se obtuvo una colección de 7 preparados. Seleccionándolos en base a dicho atributo se eligieron dos, las cuales fueron caracterizadas encontrándose que pertenecen al género *Aspergillus*.

Cada cepa fúngica fue inoculada en medio acuoso formulado con micronutrientes y pétalos como única fuente de carbono. Los valores de pH bajo los que se trabajó fueron de 3, 5 y 7 con temperaturas de 25, 30 y 35 °C para cada uno. Se monitoreó la producción de azúcares totales y reductores como parámetro indicativo de la actividad fúngica durante un periodo de 0 a 144 hr, al término del cual se procedió a la recuperación de los carotenoides liberados obteniéndose un extracto en el que se encontró al compuesto luteína, característico de esta flor.

Se realizó un análisis de varianza ($P \leq 0.1$) entre los factores cepa, pH y temperatura para conocer el efecto de estos sobre la cantidad de extracto recuperado. Se obtuvieron 27 tratamientos estableciendo tres repeticiones para cada uno, por lo que se analizaron un total 81 muestras de extracto recuperado.

En el análisis de varianza no se detectó como significativa ninguna de las interacciones entre los factores estudiados; sin embargo, los efectos de la cepa y el pH fueron significativos, siendo la cepa 7 y el pH 5 los que mostraron la mayor diferencia estadística.

En cuanto al porcentaje de extracción, con el método propuesto se obtuvo 77% el cual es inferior al reportado por Bárzana, 2002 con un método combinando (enzima-solvente), mas sin embargo la ventaja que este método representa es la reducción de los residuos tóxicos en la pasta obtenida, así como el impacto ambiental, por un lado, además del impacto en los costos que generan la compra de las enzimas y los solventes.

1. INTRODUCCION

Los alimentos, tanto en su forma natural como procesada, presentan un color característico el cual se debe a distintos compuestos, algunos que se producen durante su manejo y procesamiento y otros que son añadidos. De acuerdo a su origen, los colorantes utilizados en los alimentos se clasifican en naturales y sintéticos. Los naturales son obtenidos mediante procesos de extracción, ya sean sólido-sólido, sólido-líquido o líquido-líquido basados en el uso de solventes, y los sintéticos, incluyendo los idénticos a los naturales, se obtienen mediante síntesis química.

Debido a la toxicidad de los colorantes sintéticos, así como a los residuos provenientes de los solventes empleados en los procesos de extracción de los colorantes naturales, una alternativa para la obtención de estos compuestos está constituida por los procesos biotecnológicos empleando para ello bacterias, levaduras, algas y hongos, así como el uso de enzimas extraídas de estos microorganismos (García y col., 1999), ya que los microorganismos pueden ser dirigidos hacia la biosíntesis o a la liberación de compuestos mediante la degradación del material que los limita para que sean extraídos.

Los hongos contienen un complejo enzimático que puede ser utilizado para transformar hasta compuestos simples a los sustratos con que hacen contacto (Deacon, 1998), por lo cual pueden ser utilizados para la degradación de sustratos complejos presentes en fuentes de origen vegetal.

La flor de cempoalxochitl (*Tagetes erecta L.*) contiene en sus pétalos una alta proporción de pigmentos de la clase carotenoide. Debido a su naturaleza, estos compuestos pueden ser extraídos mediante el empleo de solventes no polares excepto cuando forman complejos con azúcares o proteínas (Delgado, 1997). Estos compuestos son utilizados en la industria alimenticia como colorantes proporcionando tonalidades que van del color amarillo al rojo.

El presente trabajo de investigación se realizó como una alternativa para la extracción de colorantes de origen natural usados por la industria de los alimentos. El objetivo del presente estudio fue el de obtener mediante biocatálisis fúngica y caracterizar los pigmentos carotenoides presentes en los pétalos de la flor de cempasúchil, concibiendo a la biocatálisis como el fenómeno mediante el cual se llevan

a cabo las reacciones químicas en los seres vivos utilizando para ello enzimas (Chamizo, 2004).

Para lograr el propósito del presente estudio se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- a) Determinar los componentes químicos de interés presentes en los pétalos de la flor.
- b) Obtener, seleccionar y caracterizar microorganismos fúngicos capaces de degradar celulosa.
- c) Determinar la cepa fúngica que mejor se adapte al proceso biocatalítico en base a las condiciones de pH y temperatura proporcionados.
- d) Recuperar, caracterizar el extracto y calcular el porcentaje de extracción obtenido.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Pigmentos

2.1.1. Definición

Se les llama pigmentos a las sustancias capaces de absorber energía luminosa en las distintas longitudes de onda que forman el espectro visible, lo cual sirve de base para su identificación, en especial si ocurre en cantidades relativamente pequeñas en otra sustancia o cuerpo cuyo color afectan (Greulach,1980; Cronquist,1991). La abundancia de estos compuestos en la naturaleza requiere que sean clasificados para su identificación, aislamiento y utilización.

2.1.2. Clasificación

Los pigmentos pueden ser agrupados en función a su origen (sintético y natural), fuente (animal o vegetal), naturaleza química (orgánicos e inorgánicos), o por el color que presentan en los organismos que los contienen. De acuerdo a su estructura química pueden ser agrupados de la siguiente forma (Delgado, 1997):

1. Derivados de tetrapirroles: clorofila, mioglobina y hemoglobina.
2. Carotenoides.
3. Compuestos N-heterocíclicos distintos de tetrapirroles: purinas, uterinas, flavinas, fenanzinas y betalaínas.
4. Derivados de benzopirano (compuestos heterocíclicos nitrogenados): antocianinas y otros pigmentos flavoniodes.
5. Quinonas, benzoquinonas, naftoquinonas y antraquinonas.
6. Melaninas.

2.1.3. Fuentes

Los pigmentos procedentes de fuentes vegetales se encuentran principalmente en hojas, frutos y flores. Los que provienen de fuentes animales son localizados fundamentalmente en sangre, músculo, piel y ojos.

Además de estas fuentes, los pigmentos también están presentes en microorganismos tales como bacterias y hongos (Delgado, 1997).

De todos los pigmentos presentes en la naturaleza, los que se encuentran en los alimentos clasificados por fuente se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Pigmentos relacionados con los alimentos (Badui, 1993).

Pigmento	Fuente Animal	Fuente Vegetal
Mioglobina y hemoglobina	X	
Clorofilas		X
Antocianinas		X
Flavonoides		X
Betalaínas		X
Taninos		X
Carotenoides		X
Otros (quinonas, xantonas, etc)	X	X

La relevancia de los pigmentos radica principalmente en las funciones que realizan, en el organismo donde se encuentran o al ser consumidos por otros organismos.

2.1.4. Importancia

Los pigmentos desempeñan importantes funciones, algunas de ellas son (Delgado, 1997; Raven y col., 1991):

- a) Fotosíntesis en las plantas y transporte de oxígeno y dióxido de carbono en animales.
- b) Pantalla protectora en humanos y otros vertebrados.
- c) Algunos actúan de atrayentes para los insectos y otros animales con los que han evolucionado.
- d) Actividad farmacológica en padecimientos tales como el cáncer y enfermedades vasculares.

Además de estas funciones, los pigmentos poseen la propiedad de impartir color a los materiales con que hacen contacto, por lo cual son utilizados como materia prima para colorear en las industrias farmacéutica, perfumería y alimentaria.

2.2. Colorantes

Desde tiempos inmemoriales los colorantes se usan para darle color a algunos alimentos. El color y la apariencia son los principales atributos de calidad que son utilizados por el consumidor durante la elección de los alimentos.

Los colorantes empleados en la industria alimentaria son considerados como aditivos o auxiliares en la elaboración de los alimentos.

2.2.1. Definición

En Estados Unidos, la *Food and Drug Administration* define a los aditivos de color como “cualquier colorante, pigmento u otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar 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 es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos o cosméticos, al cuerpo humano o a cualquier parte, por sí misma es capaz (sola o a través de una reacción con otra sustancia) de impartir color”.

En México, la Secretaría de Salud los define basándose en su origen, determinando que deben ser obtenidos a partir de los vegetales, animales, minerales o por síntesis química, y que son empleados para impartir o acentuar el color, sin especificar su uso o aplicación (García y col., 1999).

La demanda en la utilización de los colorantes les ha conferido vital importancia en la manufactura de los alimentos.

2.2.2. Importancia de los colorantes en la industria alimentaria

El color en los alimentos es un elemento inmediatamente accesible para la evaluación de la calidad, ya que en ocasiones los alimentos que han sido procesados pueden presentar defectos generados u ocasionados ya sea por la calidad de la materia prima, con lo apropiado o defectuoso de la aplicación de un tratamiento tecnológico y/o con el desarrollo de procesos posteriores a su procesamiento (Multon, 2000), lo cual incide directamente en las propiedades tanto sensoriales como funcionales del alimento, afectando así a la calidad final que éste presenta.

Los colorantes de la misma forma que diversos aditivos alimenticios, pueden ser aplicados intencionalmente con la finalidad de mejorar o corregir, pero no para enmascarar, defectos o alteraciones presentes en los alimentos.

Actualmente existe gran cantidad de colorantes que son usados en la industria alimentaria, la clasificación de estos compuestos puede servir de base para delimitar su uso o aplicación.

2.2.3. Clasificación

Los colorantes utilizados en alimentos para consumo humano pueden ser agrupados de diferentes formas: por naturaleza química (en función a su solubilidad o de su reactividad), origen (naturales y sintéticos así como los idénticos a los naturales), certificación, o por su grupo cromóforo (Multon, 2000; García y col., 1999). En la Figura 1 se muestra un ejemplo de la clasificación de estos compuestos.

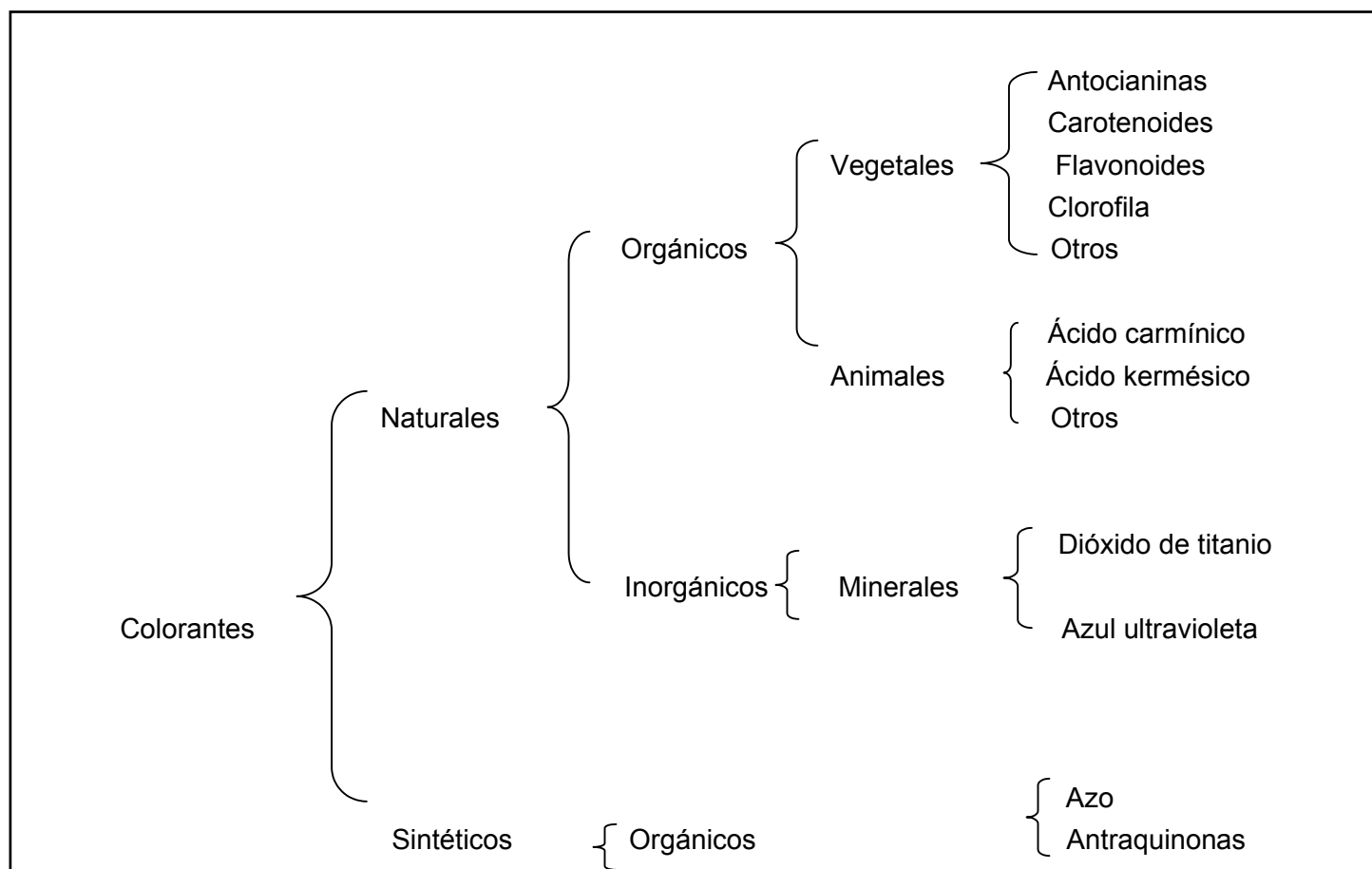


Figura 1. Clasificación de los colorantes utilizados en alimentos para consumo humano (García y col., 1999).

Existe mucha controversia sobre el uso o aplicación de los colorantes. Para tratar de aclarar tal situación es necesario conocer diversos aspectos tales como: origen, forma de obtención, fuentes, toxicidad, normatividad, etc.

2.2.3.1. Colorantes sintéticos

Este grupo de colorantes son los de mayor empleo en la fabricación de alimentos ya que presenta mejores propiedades químicas que los naturales, tales como la solubilidad y estabilidad, sin embargo la utilización de estos ha disminuido en los últimos años debido a los problemas pueden ocasionar en la salud.

2.2.3.1.1. Definición

Los colorantes sintéticos son aquellos que se obtienen mediante síntesis química. La estructura y pureza de estos compuestos están perfectamente definidos (Multon, 2000).

El grupo de los colorantes sintéticos está formado por compuestos que contienen estructuras moleculares parecidas, las cuales forman diversas series químicas que son utilizadas como referencia para su clasificación y/o distribución.

2.2.3.1.2. Distribución

La mayoría de los colorantes sintéticos pertenecen a las siguientes series químicas (Multon, 2000):

- a) Colorantes azoicos: tartrazina, amarillo anaranjado, azorrubina, rojo allura AL, negro brillante BN, pardo FK, etc.
- b) Derivados quinoles: amarillo de quinoloeína.
- c) Derivados de trifenilmetano; azul patentado V.
- d) Diversos: eritrosina, indigotina, verde ácido brillante.

De las series químicas mencionadas anteriormente, algunas contienen compuestos que, al ser absorbidos, pueden ser precursores de la formación de ciertos compuestos tóxicos, por lo cual se ha relacionado a los colorantes sintéticos con problemas de toxicidad.

2.2.3.1.3. Toxicidad

Normalmente, la toxicidad de un colorante está relacionada con su absorción por el tracto gastrointestinal (Rodríguez, 2002). Algunos efectos que pueden producir los colorantes sintéticos son (Multon, 2000):

a) Acción de la flora bacteriana:

Los colorantes de tipo azoico, conjuntamente con la flora bacteriana, presentan actividad azorreductásica, lo cual genera aminas cíclicas las cuales pueden ser absorbidas y metabolizadas.

b) Absorción intestinal-reexcreción biliar:

Los colorantes sintéticos altamente polares son débilmente absorbidos en el tubo digestivo; sin embargo, después de la absorción, la bilis puede representar una vía para su excreción.

c) Catabolismo hepático:

Cuando el colorante sintético llega al hígado puede sufrir degradaciones, las cuales serán especialmente reducciones, N-desalquilaciones, hidroxilaciones o conjugaciones, por lo cual consecuentemente puede generar aminas simples o conjugadas.

Cabe señalar que los colorantes sintéticos autorizados para alimentos de consumo humano no presentan riesgos sin llegar a la dosis diaria admisible (DDA) (Multon, 2000).

Debido a lo mencionado anteriormente, existe una tendencia actual en la industria alimentaria internacional de encontrar colorantes naturales que sustituyan a los colorantes obtenidos por síntesis química (Sálas, 2003; Gallego, 2004).

2.2.3.2. Colorantes naturales

En los últimos años, los colorantes naturales han cobrado mayor importancia, sobre todo en países desarrollados, ya que actualmente existe una tendencia de consumo de productos de origen natural, además de prohibir ciertos colorantes de origen sintético debido a que se han encontrado indicios de efectos nocivos para la salud.

2.2.3.2.1. Definición

Los colorantes naturales son todos de origen vegetal, excepto el ácido carmínico y el ácido kermésico, los cuales pueden ser obtenidos como compuestos puros o como productos de extracción. Los compuestos puros están bien definidos químicamente y pueden ser de origen natural o haber sido obtenidos por síntesis; son siempre de calidad igual y responden a especificaciones precisas. Los productos de extracción proceden de materias primas alimenticias pudiendo estar asociados a numerosas impurezas; los compuestos obtenidos no tienen composición ni propiedades colorantes constantes; lo que hace que la obtención de estas sustancias en forma práctica sea más fácil por síntesis que por procedimientos de extracción (Multon, 2000).

2.2.3.2.2. Fuentes

La mayoría de los vegetales contiene este tipo de colorantes, sobre todo en estado maduro. Sin embargo, debido a las características fisicoquímicas y disponibilidad de estos compuestos, pocas son las fuentes empleadas por la industria alimentaria. Algunas de las fuentes de este tipo que son empleadas como materia prima para colorear se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Materias primas vegetales utilizadas para colorear alimentos (Badui, 1993).

Fuente	Agente activo
Achiote, annato (<i>Bixa orellana</i>)	Bixina (carotenoide)
Azafrán (<i>Crocus sativus</i>)	Crocetina (carotenoide).
Cúrcuma (<i>Cúrcuma longa</i>)	Cucurmina
Cochinilla (<i>Dactylopius coccus</i>)	Ácido carmínico
Pimiento rojo (<i>Capsicum annuum</i>)	Capsantina (carotenoide)
Enocianina	Polímeros de antocianina
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	B- caroteno (carotenoide)
Cempoalxochitl (<i>Tagetes erecta</i>)	Luteína (carotenoide)
Plantas verdes	Clorofila
Betabel (<i>Beta vulgaris</i>)	Betalaínas

Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes sintéticos (Gallego, 2004), no obstante, también deben ser aprobados para su empleo en cada país en base al cumplimiento de la normatividad correspondiente.

2.2.3.2.3. Normatividad en función al uso

Los colorantes naturales, al ser considerados como aditivos, tienen que someterse a severas reglamentaciones para su aprobación. De acuerdo con la Comisión Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission, 1995), deben ser usados conforme a especificaciones aprobadas, algunas de éstas incluyen por ejemplo la identidad y pureza.

En México la regulación de los colorantes es delimitada por la norma “NOM-119-SSA1-1994 bienes y servicios. Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes orgánicos naturales. Especificaciones sanitarias”, así como la norma “NOM-038-SSA1-1993 Colorantes orgánicos sintéticos. Especificaciones sanitarias generales” (Secretaría de Economía, 2000).

Sin embargo, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios determinó que las normas mencionadas se consideran como obsoletas ya que no eliminan ningún riesgo para la salud de los consumidores y se contraponen a otros ordenamientos legales e inhiben el desarrollo tecnológico, por lo cual fueron canceladas (Diario Oficial de la Federación, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, los vegetales son las principales fuentes de colorantes naturales, sobresaliendo las frutas y hortalizas. Sin embargo, existe gran diversidad de plantas que contienen estos compuestos y que también pueden ser utilizadas, ejemplo de esto es la planta conocida como flor de cempoalxochil.

2.3. Flor de cempoalxochitl como fuente potencial de colorantes naturales

El nombre de la planta conocida como cempoalxochitl proviene del náhuatl, en el idioma Inglés se conoce como *marigold*, también es llamada caléndula (Badui, 1997). La clasificación taxonómica de esta planta muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de la flor de cempoalxochitl (USDA, 2005).

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Tagetes L. marigold</i>
Especie	<i>Tagetes erecta L. – Aztec marigold</i>

2.3.1. Componentes

Leung y Foster (1996) mencionan como principales componentes encontrados en los pétalos de la flor de Cempoalxochitl a los siguientes:

- a) Glucósidos.
- b) Aceites esenciales y aceites volátiles.
- c) Flavonoides.
- d) Resinas.
- e) Esteroides.
- f) Carotenoides.

De todos los componentes mencionados, los que presentan un uso potencial en la industria alimenticia son los carotenoides. Valadon y Mummery citados por Delgado (1997), estudiaron los carotenoides presentes en esta flor, particularmente en los pétalos, y encontraron como principales a los epóxidos de β -caroteno seguidos por la luteína, como se muestra en el Cuadro 4. La luteína encontrada estaba presente en forma de ésteres de ácido palmítico y mirístico, la Figura 2 muestra su estructura.

Cuadro 4. Porcentaje de carotenoides totales encontrados en pétalos de la flor de cempoalxochitl (Valadon y Mummery 1976, citados por Delgado, 1997).

Carotenoide	AMARILLO 1.15 µg/100g % de c/u	NARANJA 2.23 µg/100g % de c/u
Fitoeno	4.7	0.9
Fitoflueno		11.4
α-Caroteno		0.5
β-Caroteno	1.1	1.0
β-Zeacaroteno	0.9	0.2
ζ-Caroteno	0.5	0.2
Isómeros del 5,6-monoepóxi-β-Caroteno	0.3	5.0
5,6-Monoepóxi-β-Caroteno	55.4	39.8
5,6-Diepóxi-β-Caroteno	4.4	20.8
Mutatocromo	0.4	0.5
Flavocromo		0.8
Criptoxantina	2.8	1.4
Zeaxantina		2.4
Luteína	7.6	3.7
Epóxido de luteína	2.2	2.0
Crisantemaxantina	1.2	2.2
Flavoxantina	5.8	2.4
Anteraxantina		2.2
Auroxantina	12.7	1.2

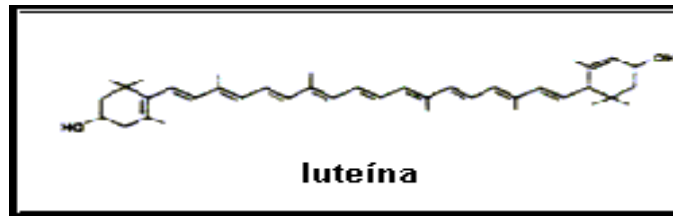


Figura 2. Estructura de la luteína (FAO, 1995).

Debido a la diversidad de los componentes presentes, la planta se ha utilizado de formas diversas, pero es importante enfatizar que, debido al contenido en colorantes naturales de la clase carotenoides en sus pétalos, la planta puede ser considerada como materia prima para colorear los alimentos (Sánchez, 1998).

2.3.2. Usos en general

Los principales usos a los que se destina la flor son: ceremonial y religioso, decorativo, forrajero, medicina, veterinario y colorante (SEMARNAT, 2005).

La presencia de carotenoides, tanto en la flor deshidratada como en el extracto obtenido a partir de esta parte de la planta, hace posible que sea utilizada en los alimentos. En forma deshidratada, es destinada básicamente a la alimentación de las aves de corral para realzar el color amarillo de la carne y de la yema del huevo. Como extracto, hay un uso de menor importancia en productos para consumo humano, sin embargo, en algunas regiones del mundo, por ejemplo Europa Occidental, se utiliza en productos en donde se requiere un color amarillo tales como: ensaladas, helados, bebidas y productos de la panadería y confitería (FAO, 1995).

En México, a pesar de la legislación existente, el extracto fue permitido como aditivo o coadyuvante en la elaboración de alimentos y bebidas (Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1999).

Los carotenoides son los compuestos que han sido utilizados por la industria alimenticia para colorear tanto en su forma natural como sintética. De forma natural, especialmente debido los colores que proporcionan y a las funciones biológicas que desarrollan cuando son asimilados.

2.4. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos naturales que se encuentran más ampliamente distribuidos en la naturaleza, imparten tonalidades que van desde amarillo, naranja, hasta el rojo (Badui, 1993).

La definición de estos compuestos se basa en su estructura química, la cual sirve de fundamento para las funciones que realizan.

2.4.1. Definición

Los carotenoides se definen como terpenoides con 40 átomos de carbono, los cuales consisten en ocho unidades de isopreno con enlaces conjugados (Robinson, 1991), cuyo arreglo se hace inverso en el centro de la molécula y pueden ser de cadena lineal o tener anillo en los extremos. El isopreno, como se muestra en la Figura 3, presenta cinco átomos de carbono dispuestos espacialmente.

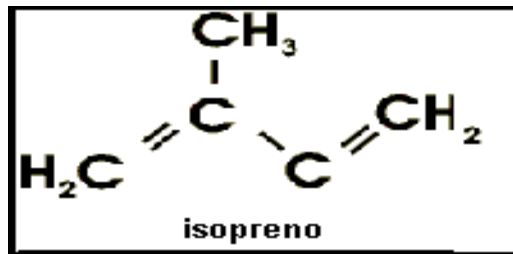


Figura 3. Estructura del isopreno (Anónimo, 2005).

Estos compuestos existen en forma libre disueltos en la fracción lipídica del tejido vegetal, unidos a carbohidratos, o como ésteres de ácidos grasos (Badui, 1993). En el tejido vegetal hacen su aparición cuando los pigmentos más abundantes, principalmente las clorofilas, desaparecen. La Figura 4 muestra un ejemplo de la localización de los carotenoides.

2.4.2. Localización

Los carotenoides se localizan en el tejido fotosintético, particularmente en los organelos celulares llamados plastidios, cloroplastos y cromoplastos (Gross, 1987).

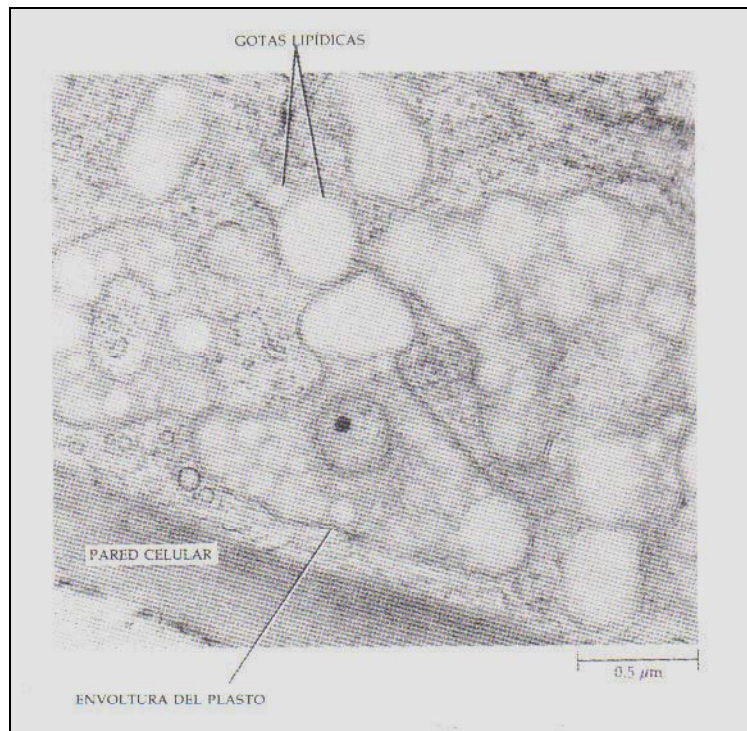


Figura 4. Localización de los carotenoides en el interior de un cloroplasto (Raven y col, 1991).

2.4.3. Clasificación

De acuerdo con Mayer (1950). Los carotenoides se pueden dividir en dos grupos:

- 1.- Carotenoides.
- 2.- Xantofilas, compuestos oxigenados derivados de los carotenoides y pueden contener grupos hidroxílicos, aldehídicos, cetónicos o carboxílicos.

Los compuestos definidos en esta clasificación le deben su color a la conjugación en la molécula, de dobles enlaces así como a la presencia de anillos en los extremos, las funciones de estos compuestos se basan en las modificaciones de su estructura (Badui, 1993).

2.4.4. Funciones

Algunos carotenoides presentan actividad pro-vitamínica A, lo cual les confiere ser sustancias precursoras del retinal, componente no protéico del pigmento visual de la retina. También cumplen una función protectora contra la formación y acción de radicales

libres los cuales pueden dañar las células, ocasionar enfermedades crónicas del corazón y pulmones, así como artritis y hasta cáncer (Coultate, 1986; Badui, 1993).

Para que estos compuestos desarrollen las funciones mencionadas se requiere que, tanto los métodos utilizados para su obtención o aislamiento como los tratamientos a los que es sometido el alimento durante su procesamiento, no afecten su estabilidad química.

2.4.5. Métodos de obtención

El aislamiento de carotenoides implica procedimientos de extracción, saponificación y separación (Gross, 1987). Para la extracción se deben tener en cuenta algunas características fisicoquímicas como las siguientes:

- a) Son solubles en lípidos o en solventes no polares, excepto cuando forman complejos con proteínas o azúcares, es por esto que se utilizan solventes no polares para su extracción (Delgado, 1997).
- b) Son sensibles a la luz, calor, oxígeno, ácidos y, en algunos casos, a las bases (Goodwin, 1976).

Existen diversos métodos de extracción o aislamiento de carotenoides, algunos de ellos son mediados por el uso de solventes y fluidos supercríticos.

2.4.5.1.1. Extracción con solventes

Este proceso consiste en la extracción de un compuesto presente en la muestra o sustrato a partir del contacto con un solvente mediante recirculación. La elección del solvente más apropiado para un proceso de extracción depende de la naturaleza y composición de la muestra. Los procesos utilizados tradicionalmente se basan en el estado físico de la muestra y el solvente, pudiendo ser sólido-sólido, sólido-líquido o líquido-líquido.

Cabe señalar que el empleo de este método proporciona al producto final gran cantidad de residuos provenientes de los solventes utilizados, además, también provoca efectos adversos al medio ambiente (García y col.1999).

2.4.5.1.2. Extracción con fluido supercrítico

La extracción con fluido supercrítico consiste en la utilización de sustancias que bajo condiciones normales de temperatura (NPT) son gases, pero que al aplicarles altas presiones se convierten en líquidos. Implicando que si después de la extracción se retorna a las NPT, se eliminan los solventes de la extracción sin la aplicación de condiciones extremas (Cerpa, 2005). Con el empleo de esta tecnología los residuos son minimizados, pero presenta el inconveniente de que su implementación es económicamente muy elevada.

Posterior a la extracción de los carotenoides se requiere el empleo, en forma continua, de los procesos de saponificación y separación.

2.4.5.1.3. Saponificación

La saponificación es un procedimiento de purificación que sirve para remover las clorofilas y los lípidos indeseados, los cuales pueden ser extraídos junto con los carotenoides (Gross, 1987). Al final de este proceso se obtiene únicamente carotenoides, los cuales deben ser fraccionados durante la separación.

2.4.5.1.4. Separación

La cromatografía es la técnica más importante para la separación y purificación de carotenoides. Las técnicas cromatográficas utilizadas para la separación de carotenoides son principalmente las mencionadas a continuación (Martínez, 2005):

- 1.- Cromatografía en papel.
- 2.- Cromatografía de capa delgada (TLC).
- 2.- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Cuando ya se tiene a los carotenoides aislados y purificados se procede a su caracterización.

2.4.5.1.5. Caracterización

Los carotenoides se pueden identificar en base de su comportamiento cromatográfico y espectrofotométrico debido a que absorben cierta longitud de onda del espectro visible, la cual es determinada por el tamaño del cromóforo presente en la molécula, es decir el radical que les confiere color, y por la polaridad de los grupos funcionales que lo conforman (Gross, 1987).

2.4.5.1.6. Cuantificación

Los carotenoides pueden ser cuantificados mediante espectrofotometría cuando están en solución, donde en base a la ley de Lambert-Beer se dice que su absorbancia en el solvente deseado es directamente proporcional a su concentración, requiriendo para esto el coeficiente extinción molar del carotenoide en el solvente en estudio (Rodríguez y Kimura, 2004).

Además de los procesos mencionados anteriormente para la extracción de los carotenoides, existen procesos biotecnológicos, los cuales son adaptados mediante el empleo de técnicas conjuntas de bioquímica, microbiología e ingeniería para la obtención de estos compuestos.

2.4.5.1.7. Otras formas de obtención (biocatálisis como prototipo)

La obtención de productos naturales a partir de fuentes vegetales se puede realizar a partir de la utilización de microorganismos mediante procesos que implican biosíntesis, transformación y/o degradación de un sustrato (García y col, 1999).

La biocatálisis puede ser adaptada mediante el empleo de diversas técnicas pertenecientes a las áreas mencionadas anteriormente para la degradación de diversos sustratos, pudiendo estar presentes ya sea en materias primas, subproductos o en desechos (Gotor, 2002).

2.5. Biocatálisis

2.5.1. Definición

La biocatálisis es el fenómeno por medio del cual se llevan a cabo las reacciones químicas en los seres vivos, se le llama así porque son reacciones llevadas a cabo por catalizadores especiales, de origen orgánico, es decir, enzimas (Chamizo, 2004). Con la producción de enzimas endógenas como exógenas, los microorganismos pueden transformar los sustratos con los que hacen contacto para obtener los nutrientes requeridos para su crecimiento y multiplicación.

Cabe señalar que algunos microorganismos desarrollan esta capacidad de forma natural y otros cuando son forzados por las condiciones del medio donde están presentes (Bárzana, 2002).

2.5.2. Microorganismos implicados

Los microorganismos de mayor aplicación para llevar a cabo la biocatálisis utilizando biotecnología son bacterias, levaduras y hongos (Bárzana, 2002).

Los hongos al ser cosmopolitas juegan un papel importante en la degradación de la materia orgánica por lo cual algunos de ellos son empleados en procesos agroindustriales. De acuerdo con Agrios (1997), las condiciones fisicoquímicas requeridas para el crecimiento y/o desarrollo de los hongos son temperatura (mínimas 5 –10 °C, óptimas 20-40 °C y máximas 35-45 °C), oxigenación y pH (3.5-6.5).

2.5.3. Biocatálisis utilizando hongos celulolíticos

Los hongos celulolíticos, producen enzimas extracelulares al medio circundante para degradar sustratos complejos (Lechenvalier, 1974) hasta compuestos que se puedan asimilar fácilmente, por ejemplo, la degradación de celulosa hasta azúcares cuando éstos no están disponibles directamente (Deacon, 1988).

Algunas enzimas del complejo celulolítico producidas por los hongos son: endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasa y celobiasas. Estas enzimas son eficientes para la industria en función a su alta temperatura de operación, actividad o por

su capacidad de producir otras enzimas paralelamente, algunos hongos productores son: *Trichoderma reesei*, *Chaetomium termophilus*, *Sporotrichum termophilus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus phoenicis* (García y col, 1999).

La degradación de celulosa utilizando hongos, como se muestra en la Figura 5, se lleva a cabo por dos enzimas producidas comúnmente: exo- β -glucanasa, endo- β -glucanasa y β -glucosidasa.

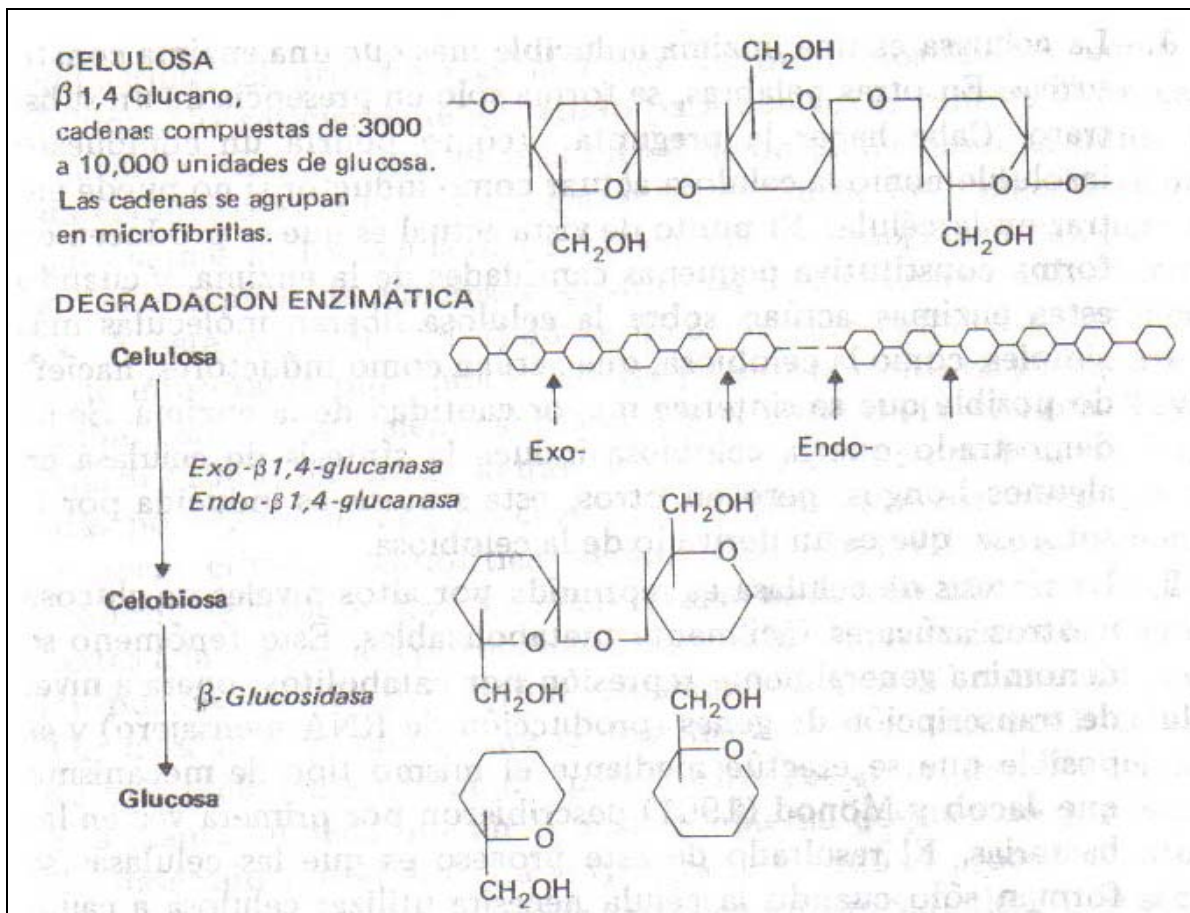


Figura 5. Degradación de celulosa mediante enzimas de origen fúngico (Deacon, 1988).

Como se muestra en la Figura 5, para la degradación de la celulosa las enzimas endo y exo- β -glucanasas rompen las cadenas de celulosa para formar varias moléculas como el dímero celobiosas y el trímero celotriosas; luego, la β -glucosidasa rompe a la celobiosas para formar glucosa, la cual es asimilada por la pared celular del hongo.

Cuando se presentan juntas las enzimas mencionadas anteriormente, actúan en forma sinérgica, por lo que las tasas de degradación de celulosa son mayores que cuando las mismas enzimas actúan por separado. En su conjunto, estas enzimas se conocen como celulasas o celulolíticas (Mandels, 1981 citado por Deacon, 1988).

2.5.4. Oportunidades de acción sobre la extracción de pigmentos (expectativas a futuro)

Los hongos, debido a su capacidad para degradar sustratos complejos, pueden ser utilizados para la extracción de compuestos de interés alimenticio procedentes de fuentes vegetales tales como los pigmentos. Para esto, se requiere proporcionar las condiciones fisicoquímicas requeridas para su crecimiento, así como el diseño de un proceso biotecnológico el cual dirija las rutas metabólicas de estos microorganismos hacia la degradación de las materias primas para la liberación de los pigmentos existentes en éstas.

Se han utilizado con éxito diversas cepas fúngicas para la producción de carotenoides, donde la base de los procesos microbianos es la biosíntesis. Sin embargo, no se ha obtenido información concerniente a la extracción de estos compuestos basándose en la degradación de sustratos con esta finalidad, lo cual representa una oportunidad para ser experimentada.

Tomando como referencia la información recabada en la revisión de literatura la hipótesis planteada para el desarrollo del presente estudio fue la siguiente:

“Es posible la obtención de los carotenoides presentes en los pétalos de la flor de Cempoalxochitl (*Tagetes erecta L.*) mediante biocatálisis fúngica”.

3. MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo de la presente investigación se plantearon las siguientes etapas:

3.1. Etapa 1. Obtención y manejo de la materia prima

La materia prima utilizada en la presente investigación fue constituida por pétalos de la flor de cempoalxochitl, la cual fue cultivada en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro bajo apropiadas prácticas culturales de siembra, riego y fertilización.

Los pétalos fueron sometidos a un proceso de secado natural hasta obtener una humedad considerable para su manejo durante el desarrollo de la investigación. Finalmente, fueron envasados en una bolsa de papel y se almacenaron en condiciones de oscuridad.

3.2. Etapa 2. Caracterización de los pétalos empleados

Para los objetivos de la investigación, se procedió a realizar análisis de humedad y carotenoides totales en base a los métodos establecidos por la AOAC (1980), así como el análisis de fibra cruda, celulosa y lignina de acuerdo a lo establecido por Van Soest y Wine (1968).

3.3. Etapa 3. Obtención, selección y caracterización de microorganismos fúngicos utilizados

Se obtuvo una colección de 7 preparados fúngicos los cuales fueron proporcionados por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

3.3.1. Selección de las cepas fúngicas con mayor actividad sobre la celulosa

La selección de los preparados fúngicos se realizó con el objetivo de evaluar la actividad degradativa sobre la celulosa mediante la capacidad para producir enzimas celulolíticas.

Para realizar lo anterior, los preparados fúngicos fueron viabilizados en un medio líquido y posteriormente inoculados en placas de agar carboximetilcelulosa (CMC). Después de 7 días de incubación a 28 °C, se evaluó su actividad degradativa sobre la celulosa aplicando la técnica del rojo congo en base a los lineamientos descritos por Iliná, 2002 (citado por Tirado, 2005). Los resultados obtenidos de esta técnica (diámetro de aro descolorido) fueron sometidos a un análisis de varianza ($P \leq 0.05$).

3.3.2. Caracterización de los microorganismos fúngicos seleccionados

Los hongos que presentaron la mayor actividad celulolítica fueron analizados tanto macroscópica como microscópicamente, mediante análisis de morfología, esporulación y asimilación de nutrientes de acuerdo a los lineamientos propuestos por Barnett y Hunter (1987), y Romero (1993), lo cual se realizó con el apoyo del Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA), dependiente de la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria, ubicado en Salaces, Mpio. de Villa López, en Chihuahua.

3.4. Etapa 4. Establecimiento del proceso de biocatálisis

En esta etapa, el proceso biocatalítico se fundamentó en la degradación de los pétalos en medio acuoso para liberar los carotenoides presentes en ellos mediante la producción de enzimas celulolíticas, bajo las condiciones de variación de los parámetros fisicoquímicos requeridos para el crecimiento y desarrollo fúngico tales como aerobiosis, pH y temperatura. Además, se empleó un medio de cultivo como fuente de microelementos, el cual consistió en una preparación modificada del agar Carboximetilcelulosa (CMC), donde se sustituyó la celulosa artificial (como única fuente de carbono utilizable) del medio original por la celulosa presente en los pétalos. Este medio fue formulado en base a la técnica de la Etapa 2. La composición del medio se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Composición del medio de cultivo formulado para la biocatálisis.

Pétalos	2.0 g
NaNO ₃	0.6 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
MgSO ₄	0.1 g
KCl	0.1 g
K ₂ SO ₄	0.02 g
Buffer	200 ml

El medio de cultivo formulado fue disuelto tanto en buffer fosfatos (pH 7.0) como buffer acetatos (pH 5.0 y 3.0) amortiguándolos con HCl 0.2 N y NaOH 0.2 N, lo cual se preparó de acuerdo con los lineamientos propuestos por Lynch y col. (1987).

Posteriormente se inoculó a cada envase una cantidad de 2, 000,000 de esporas/ml., para lo cual previamente se aplicó la técnica de conteo de estas a cada hongo seleccionado, utilizando para ello los lineamientos propuestos por Iliná, 2002 (citado por Tirado, 2005).

Finalmente, cada unidad experimental fue colocada en Baño María para el control de la temperatura a 25, 30 y 35 °C, durante un tiempo comprendido de 0 a 144 horas. Con el objetivo de conocer el comportamiento de la actividad fúngica sobre los pétalos, se monitoreó durante el tiempo mencionado la formación de azúcares totales utilizando la técnica del fenol-sulfúrico en base a la metodología propuesta por Dubois y col. (1956) así como la formación de azúcares reductores, de acuerdo a la técnica del DNS establecida por Miller (1959).

3.5. Etapa 5. Recuperación de los carotenoides liberados, caracterización del extracto obtenido y cálculo del porcentaje de extracción

3.5.1. Recuperación de los carotenoides liberados

Una vez terminado el proceso biocatalítico, cada unidad experimental fue esterilizada en una autoclave a 120 °C durante 15 min., para detener la actividad fúngica.

Después de la esterilización los carotenoides liberados (tras la degradación de los pétalos, para favorecer su liberación) fueron recuperados mediante tratamientos de calentamiento, prensado y filtrado, hasta obtener la mayor cantidad posible.

Finalmente, el extracto obtenido en las operaciones antes citadas, fue sometido a evaporación a una temperatura entre 60-65 °C hasta la eliminación completa de la humedad residual. Los pesos de los extractos se obtuvieron mediante análisis gravimétrico los cuales posteriormente fueron sometidos a un análisis de varianza ($P \leq 0.01$).

3.5.2. Caracterización del extracto obtenido

Cabe señalar que los datos obtenidos del análisis gravimétrico sólo ofrecen información sobre la cantidad de materia bruta extraída a partir de los pétalos. Sin embargo, no revelan la naturaleza de los compuestos presentes en el extracto obtenido, y para conocer esto, se procedió a aplicar un análisis de espectroscopia infrarroja (IR), el cual se realizó tomando como referencia un estándar (químicamente puro) de la misma naturaleza.

3.5.3. Cálculo del porcentaje de extracción

La eficiencia de la extracción del proceso biocatalítico se realizó en base al contenido de carotenoides totales presentes en el extracto que presentó la mayor cantidad de masa bruta procedente del análisis gravimétrico realizado en la etapa 3.5.1. Los pesos obtenidos en tal análisis fueron sometidos a un análisis de varianza factorial ($P \leq 0.1$), con el objetivo de conocer las condiciones de temperatura y pH que ofrecen una mayor liberación de los carotenoides. El análisis de varianza se elaboró de tercer orden tomando como factores a cepa fúngica, pH y temperatura cada uno con tres niveles. Se obtuvieron 81 observaciones, ya que se trabajó con 27 tratamientos los cuales se corrieron por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Etapa 1. Obtención de la materia prima

La materia prima, presentó una textura quebradiza producida durante el transcurso del almacenamiento lo cual se debe a una lenta pérdida de humedad ya que el método de secado no la eliminó en su totalidad además de que las condiciones de almacenamiento no fueron las adecuadas. Delgado (1997) reporta que debido a la sensibilidad de los pigmentos carotenoides a la luz, temperatura y oxígeno, el método de secado puede favorecer la oxidación, por lo cual durante el almacenamiento se pueden favorecer pérdidas en la cantidad de carotenoides, de acuerdo con este autor, el secado por liofilización, envasado a vacío y almacenamiento a 4°C son las condiciones adecuadas para la conservación de estos compuestos antes de su extracción, sin embargo esta metodología económicamente no es favorable ya que requiere equipos especiales a nivel industrial lo cual incrementa el precio del producto final.

Debido a que la materia prima no presentó signos de alteración importantes tales como la oxidación, se decidió su empleo para la presente investigación.

4.2. Etapa 2. Caracterización de los pétalos empleados

Los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados a los pétalos se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Análisis químicos realizados a los pétalos.

Componente	(%)	(µg/100g)
Humedad	26	
Fibra cruda	10.93	
Lignina	2.92	
Celulosa	4.17	
Carotenoides totales		4.03

Cabe señalar que no se encontró información en la revisión de literatura sobre la composición química, excepto del contenido de carotenoides totales, de los pétalos de la flor de cempoalxochitl.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis químicos realizados, es posible decir que los pétalos presentaron un considerable contenido de humedad y deduciendo de ello, un elevado contenido de materia seca (alrededor del 74%) y que está constituida por una proporción de fibra cruda, de la cual el componente mayoritario es la celulosa.

Esta información demuestra que los pétalos pueden ser empleados para el proceso de biocatálisis, debido al elevado contenido en fibra y celulosa utilizando a estos componentes como fuente de carbono, por ser este elemento indispensable para el crecimiento y desarrollo fúngico.

4.3. Etapa 3. Obtención, selección y caracterización de microorganismos fúngicos utilizados

4.3.1. Selección de las cepas fúngicas con mayor actividad sobre la celulosa

En función al diámetro de la coloración producida al aplicar la técnica del rojo congo, lo cual expresa cualitativamente la hidrólisis de la celulosa en beta-(1-4) glicanos con siete o menos unidades de glucosa por cadena, los datos obtenidos de esta técnica fueron sometidos a un análisis de varianza ($P \leq 0.05$). De los resultados de este análisis, sólo se reportan en el Cuadro 7 una comparación de medias realizada a partir del análisis de t-Student ($P \leq 0.05$) elaborado después de observar la significancia del precedente análisis de varianza.

Cuadro 7. Resultados de la comparación de medias de los datos obtenidos al realizar la técnica del rojo congo.

PREPARADO FÚNGICO						PROMEDIOS DE MÍNIMOS CUADRADOS
Cepa 7	A					3,90 cm.
Cepa 5		B				3,40 cm.
Cepa 2		B	C			3,23 cm.
Cepa 8			C	D		3,10 cm.
Cepa 1			C	D		3,05 cm.
Cepa 4				D		2,91 cm.
Cepa 3					E	2,63 cm.

Promedios con la misma literal no son estadísticamente diferentes ($P \geq 0.05$)

Los resultados arrojados por el análisis estadístico de medias muestran que existen diferencias significativas entre las cepas fúngicas analizadas, correspondiendo a la cepa 7 los mejores resultados, seguida por la 5 y 2 que son inferiores a la primera pero iguales entre sí, y mayores y diferentes que el resto de las cepas en estudio.

Las diferencias producidas se deben a que las cepas fúngicas 7, 5 y 2 presentan mayor capacidad para degradar la celulosa. La Figura 5 muestra los cultivos de la cepa 7 al efectuar la técnica del rojo congo.

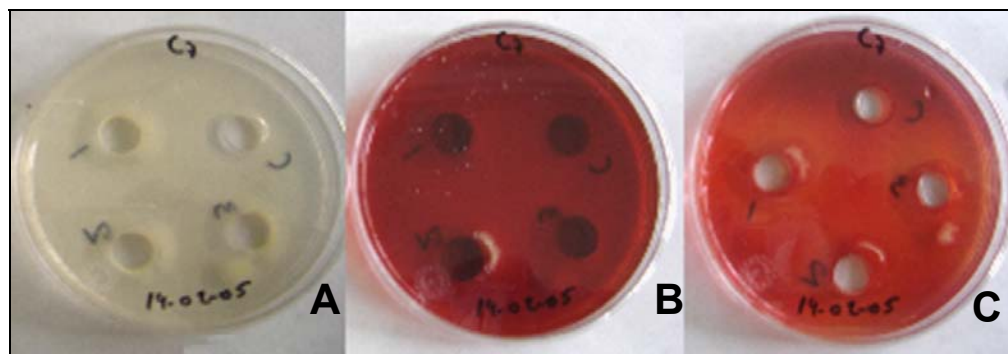


Figura 6. Comportamiento de los cultivos de la cepa 7 durante la aplicación de la técnica de rojo congo. Figura A: placa con crecimiento fúngico en agar Carboximetilcelulosa. Figura B: placa con rojo congo. Figura C: placa después de lavado con solución salina

En la Figura 6A se puede apreciar el crecimiento fúngico sobre la periferia de los círculos presente en la placa, una vez que se aplica la solución de rojo congo que se presenta en la Figura 6B; se procede al lavado con solución salina y las zonas decoloradas observadas en la figura 6C ponen de manifiesto la actividad celulolítica de la cepa 7.

4.3.2. Caracterización de los microorganismos fúngicos seleccionados

Los resultados de la caracterización de las cepas seleccionadas se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Resultados de la caracterización de las cepas seleccionadas.

PREPARADO FÚNGICO	GENEROS FUNGICOS
7	<i>Aspergillus</i>
5	<i>Aspergillus</i>
2	<i>Peniciullum</i> y <i>Aspergillus</i>

Se observa que en las muestras estudiadas predomina el género *Aspergillus*, presente en los preparados fúngicos 7 y 5 así como en el 2 donde está mezclado con hongos del género *Penicillium*.

La predominancia del hongo *Aspergillus* indica que tiene una buena capacidad para producir enzimas celulolíticas, con lo cual es capaz de degradar la celulosa, siendo esto corroborado con lo postulado por García y col. (1999) y Gretty y col. (2003).

Es importante señalar que en el caso del preparado fúngico 2 se presentaron dificultades para su crecimiento en medio sólido (requerido para formación de esporas, utilizadas en la Etapa 4) lo cual obedece a que no es un cultivo puro, motivo por el cual no fue utilizada para realizar el proceso biocatalítico.

4.4. Etapa 4. Establecimiento del proceso de biocatálisis

En esta etapa se realizó el monitoreo de la formación y consumo de azúcares totales y reductores como un indicador de la actividad fúngica, por lo cual los datos arrojados de tal monitoreo son analizados gráficamente.

4.4.1. Monitoreo de azúcares totales

En las Figuras 7, 8 y 9 se muestra el comportamiento de los niveles de azúcares totales. Se observa que durante las primeras horas se produjo la mayor cantidad de éstos para posteriormente dejar ver un comportamiento inestable observándose incrementos y decrementos.

En la Figura 7 se observa que durante las primeras horas del monitoreo a temperatura de 25 °C, la cepa 5 a pH de 7 y 3 y la cepa 7 a pH de 5 y 3 son las mayores productoras de azúcares totales.

La cepa 7 a pH 7 mostró un comportamiento en forma de campana produciendo la mayor cantidad de azúcares totales en un tiempo cercano a las 80 horas, para su posterior consumo. La misma cepa pero a pH 5 también tuvo una alta producción, pero su consumo no fue tan pronunciado como el anterior.

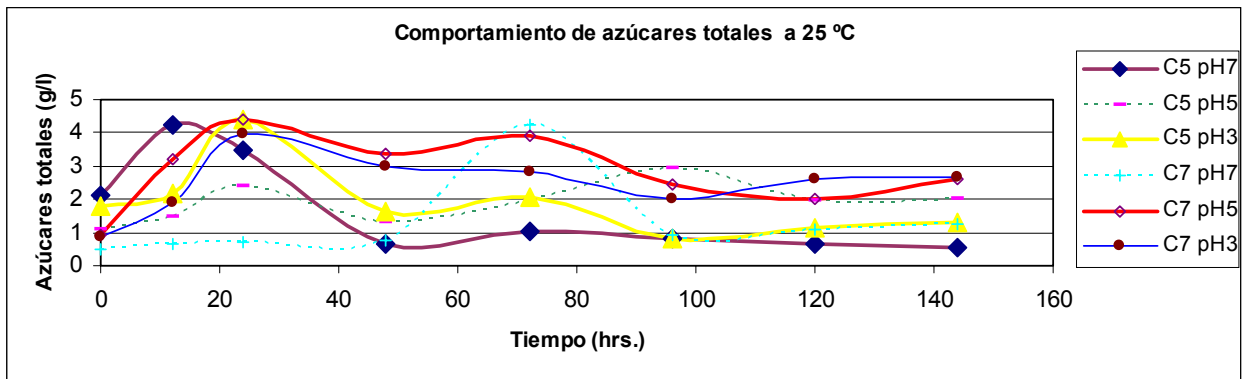


Figura 7. Cinética de cambio en la concentración de azúcares totales durante la fermentación de las cepas 5 y 7 en los reactores con diferente pH inicial a temperatura de 25 °C.

En la Figura 8 se observa un comportamiento similar al anterior, durante las primeras horas del monitoreo a temperatura de 30°C. La cepa 7 a pH de 5 y 3 fue la que produjo la mayor cantidad de azúcares totales en las primeras horas y en el tiempo restante se mostró el consumo de los mismos, incrementándose ligeramente después de las 120 hr de tratamiento. La cepa 5 a pH 7 y 3 se comportó de forma similar sin embargo, produjo menor cantidad de azúcares totales que la cepa 7 a pH 5 y 3. La cepa 7 a pH 7, comparada con las cepas en las condiciones mencionadas anteriormente, mostró lentamente incrementos y decrementos, además fue la que produjo durante todo el monitoreo la menor cantidad de azúcares totales. La cepa 5 a pH 5 mostró un comportamiento inestable de incrementos y decrementos diferenciando a este de los mencionados anteriormente.

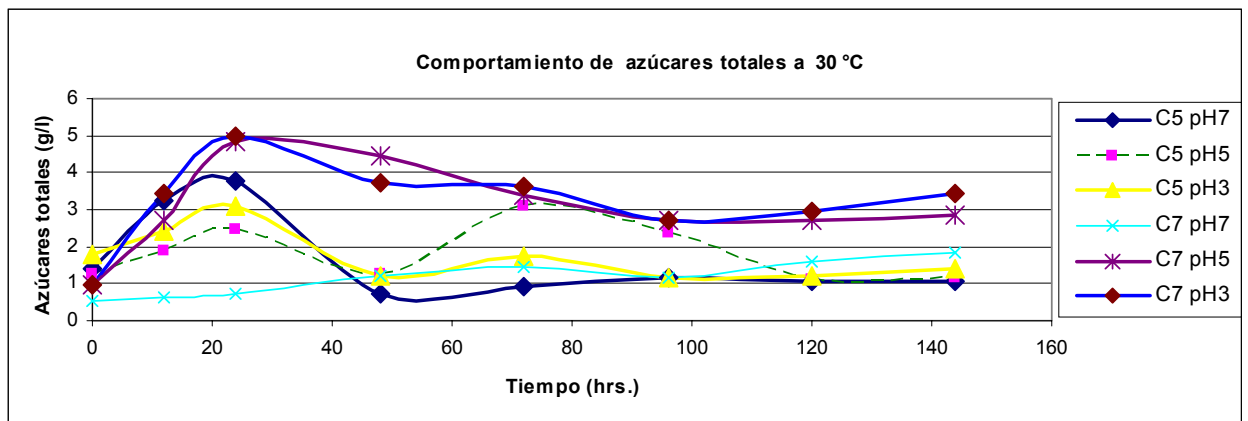


Figura 8. Cinética de cambio en la concentración de azúcares totales durante la fermentación de las cepas 5 y 7 en los reactores con diferente pH inicial a temperatura de 30 °C.

En la Figura 9, correspondiente a la fermentación a temperatura de 35 °C se observa un comportamiento semejante a los monitoreos en las temperaturas de 25°C y 30 °C. Sin embargo, en este monitoreo la cepa que sobresale inicialmente por la mayor producción de azúcares totales fue la cepa 5 a pH 3. La cepa 7 a pH de 5 y 3 fue la que produjo mayores cantidades en las primeras 24 hr para su posterior consumo. La cepa 5 en el pH 5 mostró inicialmente un incremento para su posterior descenso y ascenso a lo largo del proceso. Finalmente, la cepa 7 a pH 7 fue la que produjo la menor cantidad de azúcares totales el cual tuvo un ligero incremento en las horas iniciales y posteriormente presentó una disminución en forma lineal.

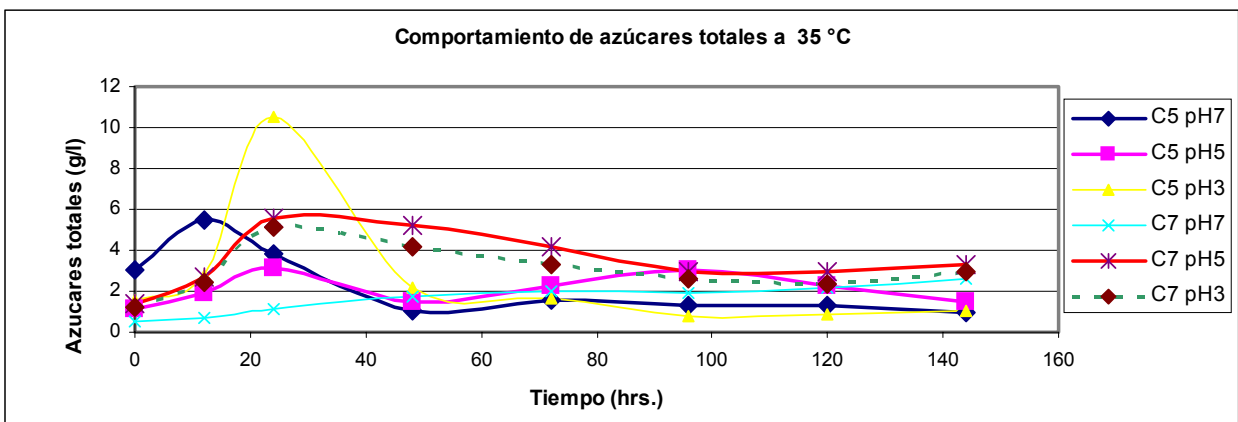


Figura 9. Cinética de cambio en la concentración de azúcares totales durante la fermentación de las cepas 5 y 7 en los reactores con diferente pH inicial a temperatura de 35 °C.

El comportamiento observado en las gráficas anteriores indica que existe una producción y consumo de azúcares totales. Durante las primeras horas la cantidad de estos se dispara debido a la degradación de polímeros complejos presentes en la pared celular de los pétalos de la flor, tales como la celulosa. Esto sucede debido a la producción de enzimas extracelulares que son liberados al medio circundante. Para los nutrientes simples y solubles son metabolizados, en este caso azúcares. Ello sucede de forma continua a fin de suplementar al medio el azúcar necesario ya que una vez consumido se requiere su generación a partir de los polímeros antes citados, esto aunado a la presencia de los demás nutrientes y a las condiciones de pH, temperatura y aeración, permite el desarrollo fúngico, observándose físicamente una gran cantidad de micelio

flotando en el medio. Todo lo anterior coincide con lo establecido por Deacon (1988), pudiendo además que la flora microbiológica nativa ejercer cierto efecto.

4.4.2. Monitoreo de azúcares reductores

En las Figuras 10, 11 y 12 se presenta el resultado del monitoreo de azúcares reductores, el cual muestra el comportamiento parecido al observado en el monitoreo de azúcares totales aunque de forma más lenta ya que inicialmente se produjo un incremento y en el tiempo restante fue estabilizándose y disminuyendo lentamente.

El monitoreo en las tres temperaturas analizadas mostrado en las Figuras 10, 11 y 12 presenta un comportamiento similar. En el cual se observa que la cepa 7 a pH 5 y 3 fue la que produjo la mayor cantidad de azúcares reductores. Inicialmente se produjo un incremento que fue disminuyendo en forma lenta y estable durante el tiempo restante. La cepa 7 a pH 7 se comportó de forma similar, pero la disminución fue mayor. La cepa 5 a los tres pH analizados produjo menor cantidad comparada con la cepa 7 en los pH's mencionados.

En el monitoreo a 25°C (Figura 10) la cepa 5 a pH 5 también mostró un comportamiento de incrementos y decrementos en la producción de azúcares reductores.

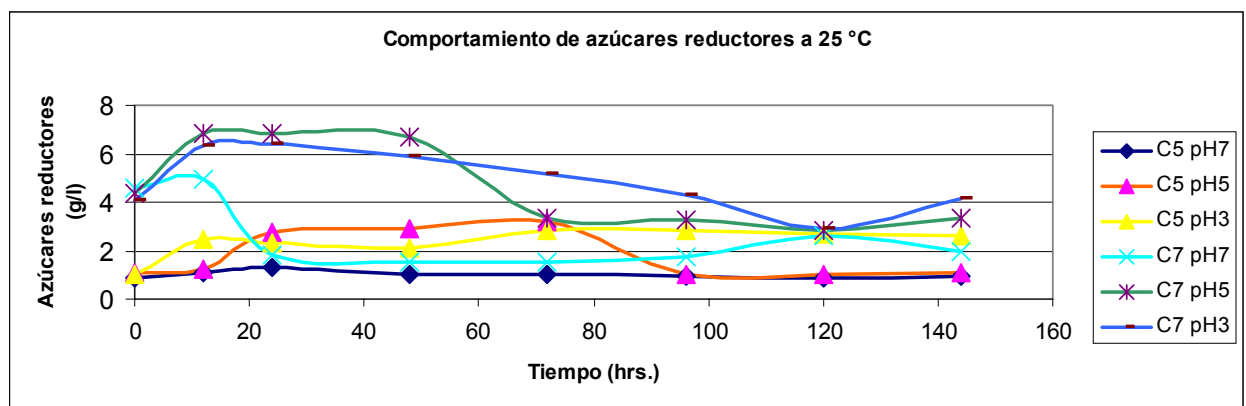


Figura 10. Cinética de cambio en la concentración de azúcares reductores durante la fermentación de las cepas 5 y 7 en los reactores con diferente pH inicial a temperatura de 25 °C.

En la Figura 11 se muestra el comportamiento del nivel de azúcares reductores a 30°C, similar al presentado en las Figuras 10 y 12. En los tres casos no se observó cambio en el nivel de azúcares reductores en la fermentación de las cepas a pH 7.

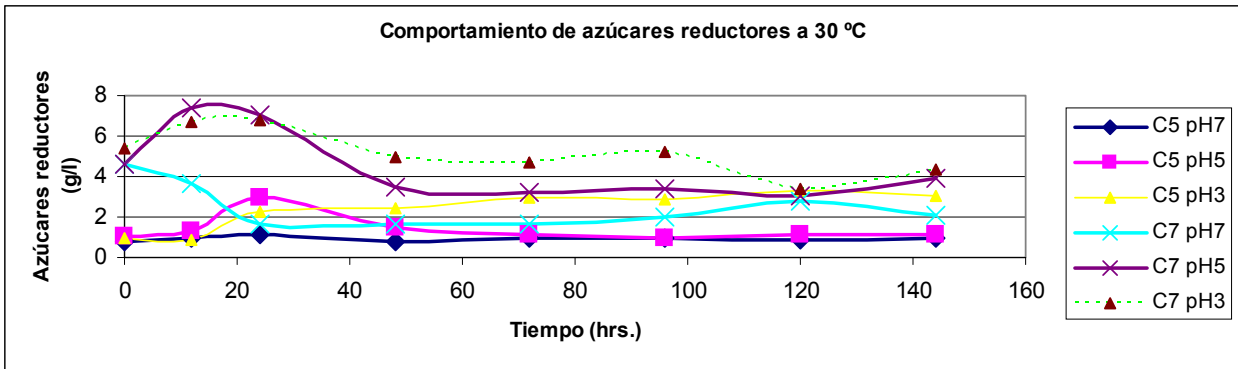


Figura 11. Cinética de cambio en la concentración de azúcares reductores durante la fermentación de las cepas 5 y 7 en los reactores con diferente pH inicial a temperatura de 30°C.

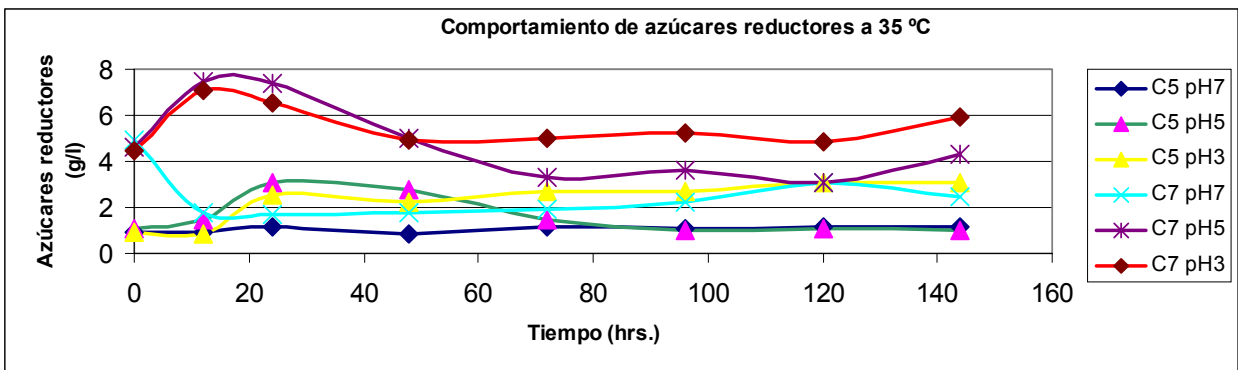


Figura 12. Cinética de cambio en la concentración de azúcares reductores durante la fermentación de las cepas 5 y 7 en los reactores con diferente pH inicial a temperatura de 35 °C.

Es importante señalar que el tratamiento del testigo presentó niveles de azúcares sumamente bajos, es decir en un rango de los cuales se presentan muy ligeras variaciones a lo largo del proceso debido a la presencia de flora banal.

4.5. Etapa 5. Recuperación, caracterización del extracto y cálculo del porcentaje de extracción

El estudio realizado demuestra la presencia de actividad celulolítica durante el proceso de fermentación, así como el crecimiento de los microorganismos y aprovechamiento de la materia prima en el metabolismo fúngico.

4.5.1. Recuperación de los carotenoides liberados

La Figura 13 muestra la fotografía que demuestra los extractos de los carotenoides recuperados después del proceso de biocatálisis realizado con la cepa 7.

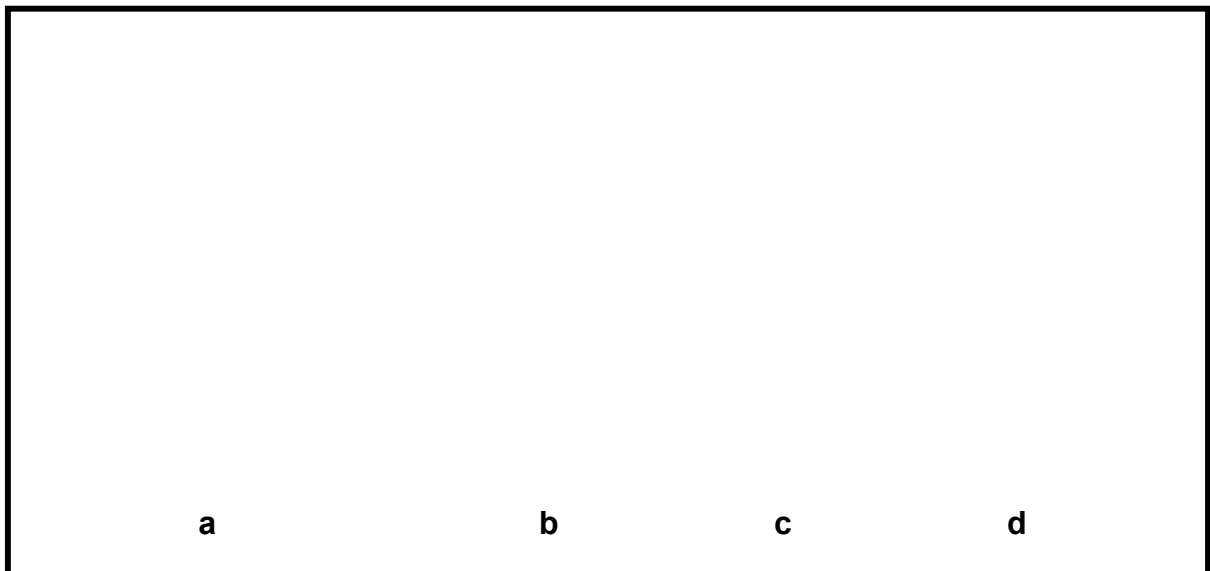


Figura 13. Recuperación de los carotenoides liberados. Tratamiento testigo (a), carotenoides liberados a partir de la biocatálisis de los pétalos en los tratamientos con cepa fúngica: (b) C7 pH 3, (c) C7 pH 5 y (d) C7 pH 7.

En la Figura anterior se observa que existe similitud en la intensidad de la coloración entre el tratamiento testigo (Fig. 13a) y en los tratamientos con cepa fúngica a pH de 5 y 3

(Figs. 13 b y c), siendo muy diferente a observada para el tratamiento con cepa fúngica a pH de 7 la cual mostró una coloración más intensa.

4.5.2. Caracterización de la pasta obtenida

En la Figura 14 se muestra una comparación del espectro infrarrojo obtenido al realizar la caracterización de la pasta procedente de la biocatálisis de los pétalos en el tratamiento con la cepa 7 a pH 3 y temperatura de 25 °C (Muestra b) contra un estándar químicamente puro (Testigo Q. P.).

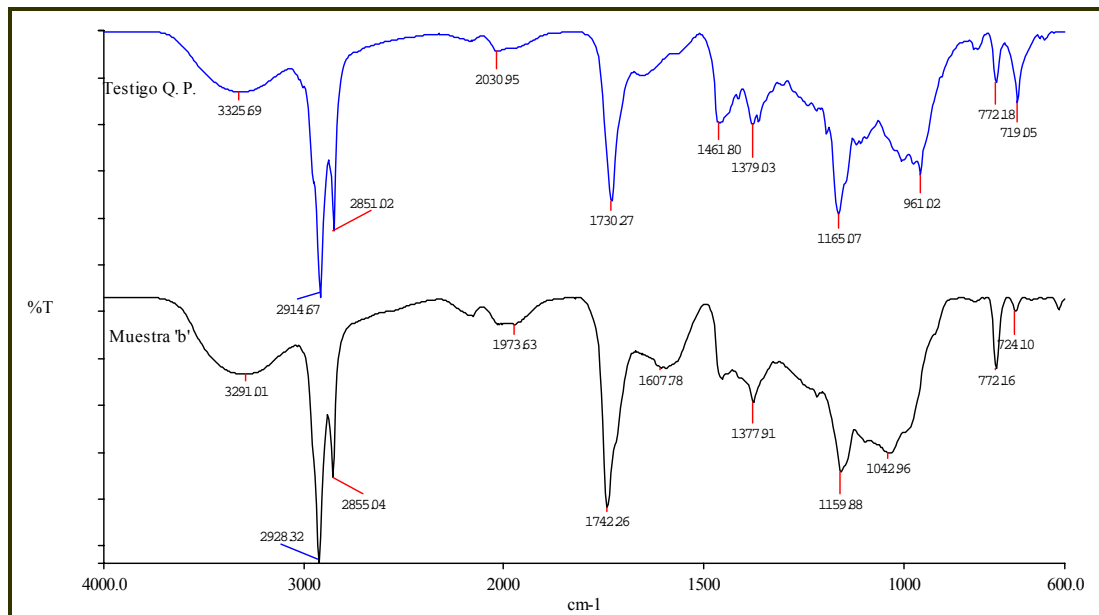


Figura 14. Caracterización del extracto obtenido, mediante espectrometría infrarroja.

El espectro infrarrojo muestra que existe mucha similitud entre el estándar químicamente puro y el obtenido tras la biocatálisis. El mayor pico de absorción en la muestra obtenida por el tratamiento con cepa fúngica fue detectado a 3291.001 cm⁻¹ el cual es característico para los grupos OH, los cuales presentan bandas de absorción cercanas a los 3300 cm⁻¹. La presencia de grupos OH es impostante característica de las xantofilas. Además se muestra una banda fuerte a 1742.36 cm⁻¹ lo cual indica la presencia de dobles enlaces, característicos de la luteína (Martínez 2001, citado por Devia 2005).

Los resultados arrojados en este estudio verifican la presencia de las sustancias de interés en los extractos obtenidos.

4.5.3. Cálculo del porcentaje de extracción

En la Figura 15 se muestran los pesos de los extractos obtenidos en el proceso biocatalítico de los pétalos, comparados contra el testigo, procedentes de la Etapa 3.5. Se hace énfasis en el efecto de cada tratamiento sobre el peso del extracto liberado. Se observa que la cepa 5 en condiciones de pH 5, y temperatura de 35°C, así como condiciones de pH 5 y temperatura de 30°C, subsecuentemente, fue con la cual se obtuvo la mayor cantidad. También se observa que en el caso de la cepa 7, la mayor cantidad se produjo en las condiciones de pH 5 y temperatura de 30°C.

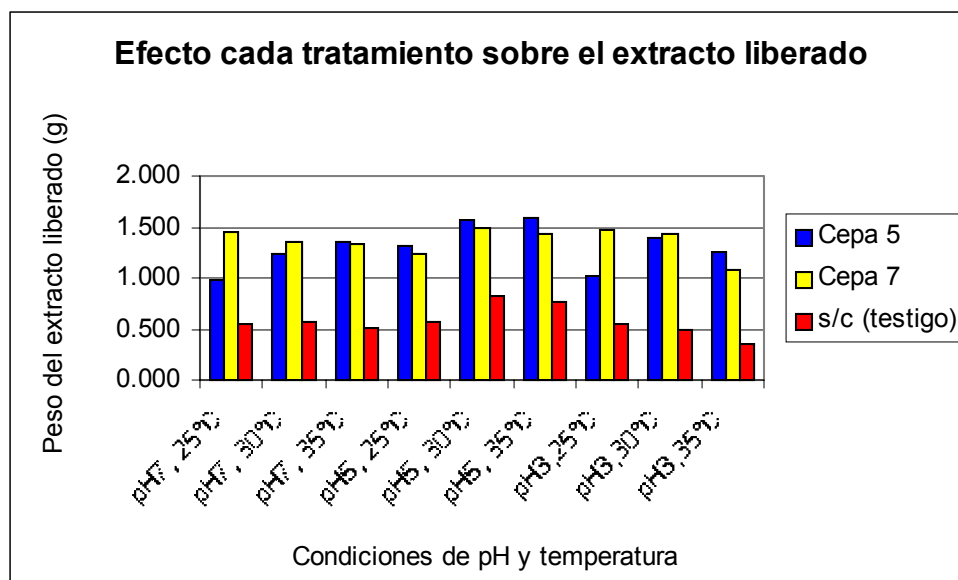


Figura 15. Efecto de cada tratamiento sobre el extracto liberado.

En la misma figura se observa que los tratamientos con ambas cepas fúngicas permitió obtener mayores cantidades en comparación con el tratamiento testigo del cual se obtuvo la menor cantidad de extracto.

En cuanto al porcentaje de extracción, partiendo de que para 100gr de pétalos se espera tener 4.03 μg de carotenoides totales (resultado obtenido en la Etapa 2) y que en los tratamientos antes propuestos se parte de 2 gr de pétalos, se esperarían obtener 0.0806 μg de carotenoides totales. Por lo tanto, en el tratamiento con cepa fúngica 5 y a

pH 5 se produjo un 77.77% ya que en la determinación de dicho factor a la pasta obtenida se encontraron 0.0668 μg de carotenoides totales, siendo que en el testigo al mismo pH se encontraron 0.0297 μg de carotenoides totales lo cual representa el 36.90% de eficiencia en la extracción. Esto corresponde a menos de la mitad a lo obtenido mediante la biocatálisis fúngica.

Cabe mencionar que el valor de 77.77% obtenido mediante el tratamiento propuesto es inferior al reportado por Bárzana (2002) del 97%, con un método que combina pre-tratamiento enzimático y extracción con solventes. Mas, sin embargo, la ventaja que representa el método propuesto en el presente trabajo es la reducción de los residuos tóxicos en la pasta obtenida, así como el impacto ambiental, por un lado, además del impacto en los costos que generan la compra de las enzimas y los solventes.

En el Cuadro 9 se puede observar el análisis de varianza realizado a los datos pesos de los extractos. Se observa que el modelo resulto ser altamente significativo lo que indica que el efecto producido por los factores fue diferente.

Cuadro 9. Análisis de varianza realizado a los datos procedentes de la recuperación del extracto.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	Fc.
Modelo	26	12.30016	0.473083	10.1305
Error	54	2.521740	0.046699	Prob. > F <.0001
Total corregido	80	14.82190		

En el Cuadro 10 se muestra el resultado del análisis de varianza para cada factor, así como para cada una de las interacciones. En dicho cuadro, se observa que los factores cepa fúngica y pH produjeron un efecto altamente significativo en el proceso de biocatálisis, donde la probabilidad de ocurrencia mostrada por el primero indica que la mayoría de los pesos obtenidos en la recuperación se encuentran dentro del nivel de significancia analizado.

Cuadro 10. Análisis de varianza para cada factor.

F.V.	GI	SC	F _c	F _t (P<0.1)	F _t (P<0.1)	Prob > F
Cepa fúngica	2	10.342981	110.7412	3.23	5.18	<.0001
PH	2	0.557947	5.9739	3.23	5.18	0.0045
Cepa fúngica *pH	4	0.235054	1.2583	2.61	3.83	0.2977
Temperatura	2	0.232302	2.4872	3.23	5.18	0.0926
Cepa fúngica *Temperatura	4	0.419657	2.2466	2.61	3.83	0.0760
pH*Temperatura	4	0.319550	1.7107	2.61	3.83	0.1611
Cepa fúngica *pH*Temperatura	8	0.192679	0.5157	2.18	2.99	0.8394

FV = fuente de variación, gl = grados de libertad, F_c = F calculada, F_t=valor tabular,
Prob > F = Probabilidad **F_c < F teórica**

Para conocer el efecto de los factores altamente significativos se realizó un análisis de t-Student (P<0.05) cuyos resultados se muestran a continuación:

4.5.3.1. Efecto de la cepa fúngica sobre el extracto obtenido

El cuadro 11 muestra el análisis de t-Student realizado para definir el efecto de la cepa sobre el extracto obtenido. Este arrojó que la cepa fúngica 7 fue la que produjo la mayor diferencia estadística, aunque también se observó que ambas cepas produjeron diferencia estadística semejante entre si, las cuales son mayores que la producida por el testigo.

Cuadro 11. Efecto de la cepa fúngica sobre el rendimiento final obtenido.

Level			Least Sq Mean
C7	A		1.3604815
C5	A		1.3042222
s/c		B	0.5758889

Promedios con la misma literal no son estadísticamente diferentes (P≥0.05)

4.5.3.2. Efecto del pH sobre el extracto obtenido

En el Cuadro 12 se muestra el resultado del análisis de t-Student realizado considerando como factor el pH. Se observa que el pH 5 produjo la mayor diferencia

estadística que el resto. El pH 7 y 3 resultaron ser estadísticamente semejantes entre sí pero la diferencia producida fue menor a la arrojada por el pH 5.

Cuadro 12. Efecto del pH sobre el rendimiento final obtenido.

Level			Least Sq Mean
5	A		1.1961481
7		B	1.0380000
3		B	1.0064444

Promedios con la misma literal no son estadísticamente diferentes ($P \geq 0.05$)

El cuadro anterior muestra que la acidez es un factor que influye sobre el proceso de biocatálisis, lo cual detalla que las cepas fúngicas empleadas se desarrollan y/o presentan actividad en esta característica, lo cual es corroborado por lo propuesto por Agrios en 1997.

4.5.4. Recomendaciones

En caso de extracción acuosa a partir de tratamiento fúngico, durante la recuperación de los carotenoides no deben de usarse temperaturas superiores a 60°C ya que debido a la inestabilidad de estos compuestos se favorece su oxidación reduciendo así la cantidad obtenida.

Para verificar la influencia del pH sobre la actividad fúngica así como para la actividad enzimática en la biocatálisis se recomienda monitorear este parámetro durante el transcurso de dicho proceso.

5. CONCLUSIONES

Los análisis químicos realizados a los pétalos de la flor de cempoalxochitl (*Tagetes erecta L.*) arrojaron que la materia prima presenta un alto porcentaje de fibra y celulosa.

De los preparados fúngicos evaluados, la cepa que presentó mayor actividad celulolítica fue la designada como 7, identificada con el género *Aspergillus*.

El monitoreo de azúcares totales y reductores en la cepa 5 a pH 5, puso de manifiesto la actividad fúngica sobre los polisacáridos presentes en los pétalos de la flor, lo que está relacionado con la producción de enzimas extracelulares del tipo celulolítico con lo que se facilitó la extracción de los carotenoides presentes.

El extracto obtenido resultó ser similar al testigo químicamente puro. En dicho extracto existe el compuesto luteína, xantofila que ocupa el mayor porcentaje del contenido de carotenoides presentes en los pétalos.

Aunque el análisis de varianza realizado resultó ser altamente significativo, no se produjo el efecto conjunto de los factores analizados. La cepa y el pH presentaron un efecto altamente significativo el cual fue estadísticamente mayor en la cepa 7 y en el pH 5.

El factor de mayor influencia para el proceso de biocatálisis fúngica fue el pH, siendo la acidez donde se ejerce la mayor actividad microbiana. Contrario a esto, la temperatura no es un factor de influencia sobre la biocatálisis fúngica realizada por lo cual dicho proceso puede ser llevado a cabo sin el control estricto de este factor pudiéndose utilizar la temperatura ambiente para reducir los costos de operación.

Con la metodología propuesta se obtuvo 77 % de extracción, aunque es inferior al mostrado por Bárzana (2002) con un método combinado enzima-solventes, elimina los efectos toxicológicos tanto en el producto como en el medio ambiente reduciendo además los costos que generan la compra de las enzimas y los solventes.

6. LITERATURA CITADA

AOAC. 1980. Official Methods of Analysis Chemists of the Association Official Analytical Chemists. Thirteenth edition. AOAC international 353 p.

Agrios, G. 1997. Plant Pathology. 4ª edición. Ed. Academic Press. New York, E. U. 635 p.

Anónimo.2005. Estructura isoprenoide.

<http://www.guidobauersachs.de/index.html> [Consultado:19/02/05 2:20 pm.].

Badui, D. S. 1993. Química de los Alimentos. Ed. Addison Wesley Longman de México. México, D. F. pp. 379-383.

Badui, D. S. 1997. Diccionario de Tecnología de Alimentos. Ed. Longman de México. México, D. F. pp. 251-252.

Bárzana, G. E. 2002. Biocatálisis en medios no acuosos: una historia de 20 años, desde los fundamentos a las aplicaciones industriales. Revista Academia de Ingeniería. IV (2-5): pp. 52-54.

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1987. Illustrated general of imperfect fungi. 4th edition. Mc Millan Publishing Company. pp 70-85.

Cerpa. Ch., M. 2005. Extracción de productos naturales mediante fluidos supercríticos: fundamentos y posibilidades de uso en el Perú.

<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Launchpad/2296/Extraccion.html>. [Consultado: 31/05/05 8:30 pm.].

Codex Alimentarius Commission.1995. General Standard for Food Additives. Codex Stand 192-195. Pp.1-6.

Coultate, T. P. 1986. Alimentos Química de sus Componentes. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 110 p.

Cronquist, J. A. 1991. Introducción a la Botánica. Ed. Continental. México, D. F. pp. .31.

Chamizo, J. P. 2004. Categorías, conceptos y leyes de la bioquímica.

<http://jagua.cfg.sld.cu/bioquimica/leydebioqhtm.htm#Biocatálisis>. [Consultado: 2/02/05 9:48 pm.].

- Deacon**, J. W. 1988. Introducción a la Micología Moderna. Ed. Limusa. México, D. F. pp. 120-123.
- Delgado**, V. F. 1997. Pigmentos de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*)-caracterización fisicoquímica, procesamiento y eficiencia pigmentate. Tesis Doctoral en biotecnología de plantas. Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Guanajuato. México. pp. 5-40 y 124-136.
- Devia**, P. J. E. 2005. Pulverización de colorantes naturales por secado por atomización. Universidad EAFIT. Medellín, Colombia. 58 pp.
- Diario Oficial de la Federación**. 2004. Aviso de cancelación de normas. México, D. F. pp.103.
- Dubois**, M. G., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. J. Anal. Chem. 28:530.
- FAO**. 1995. Natural Colorants and Dyestuffs. Serie No.4: Non-wood forest products. http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/V8879E/V8879e03.htm [Consultado: 25/02/05 9:20 pm.].
- Gallego**, L. 2004. Definición y características más importantes de los colorantes. <http://www.analizacalidadasesores.com>. [Consultado: 28/02/05 6:40 pm.].
- García**, G. M., Quintero, R. R. y López-Munguía, C. A. 1999. Biotecnología Alimentaria. Ed. LIMUSA. México, D. F. pp. 352-360.
- Gretty K.**, V. y Marcel, G. C. 2003. Biopelículas de *Aspergillus Níger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Vol. 10, numero 1. http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/Vol10_N2/PDF/colifagos.pdf [Consultado: 30 mayo 2005].
- Greulach A.**, V.. 1980. Las Plantas, Introducción a la Botánica Moderna. Ed. Limusa. México, D. F. pp. 440.
- Gross**, J. 1987. Pigments in Fruits. Food Science and Technology a series of monographs. Ed. Academic Press. London, Inglaterra. pp. 86-121.
- Gotor**, V. 2002. Biocatálisis para la Preparación de Productos Químicos. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. pp. 1-2.

- Goodwin**, T. W. 1976. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Vol. 2. Ed. Academic Press. London, Inglaterra. pp. 38-155.
- Lechenvalier**, L. 1974. Handbook of Microbiology. Vol. 3. Ed. CRC Press. Ohio, E. U. 66. pp.
- Leung**, A. y Foster, S. 1996. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics. 2nd edition. Ed. Book News Portland, E. U. pp. 688.
- Lucas**, C. E. A. 2004. Biotecnología de Alimentos.
<http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpZZpVVkupfTuOiNRY.php#OBJETIVOS>
[Consultado: 25/02/05 10:49 am.].
- Lynch**, M. Mellor, S., Spare D., Inwood D. 1987. Métodos de Laboratorio. 2ª ed. Vol 2. Ed. Nueva editorial interamericana. México, D. F. pp. 1446-1447.
- Mayer**, F. 1950. La Química de las Materias Naturales Colorantes; constitución, propiedades y correlaciones biológicas de los pigmentos naturales importantes. Ed. Aguilar. Madrid, España. pp. 75-76.
- Martínez**, E. 2005. Prácticas de Metodología y Experimentación de Bioquímica II, extracción, cuantificación y análisis de lípidos mediante cromatografía. Universidad de Navarra. Navarra, España. pp. 25-42.
- Miller**, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugars. J. Anal. Chem. 31: pp. 426- 428.
- Multon**, J. I. 2000. Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias. 2ª edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 350-362.
- Raven**, H. P., Evert, F. R. y Eichorn, E. S. 1991. Biología de las Plantas. Ed. Reverte. México, D. F. pp. 99.
- Robinson**, S. D. 1991. Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 313-314.
- Rodríguez**, A. D. y Kimura, M. 2004. Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis. Harvestplus Technical Monograph 2. Washington, D.C. and CALI: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT). Washington, D. C., E.U. pp. 35.

Rodríguez, M. M. 2002. Diario de seguridad alimentaria. Fundación Grupo Eroski. <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2002/10/09/3639.php#bibliografia>. [Consultado: 12/02/05 2:00pm.].

Romero, C. S. 1993. Hongos fitopatógenos. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. México, D. F. 348 p.

Sálas, G. L. 2003. Educación Alimentaria, manual indispensable en educación para la salud. Ed. Trillas. México, D. F. 97 p.

Sánchez, M. 1998. Carotenoides del cempasúchil. Departamento de Biotecnología y biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://www.biomedicas.unam.mx/html/gaceta98/sept06.htm>. [Consultado: 4/06/04 8:00pm.].

Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1999. Acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes. México, D. F. 44 pp.

SEMARNAT. 2005. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/TagetesErecta.html>. [Consultado: 15/02/05 8:00pm.].

Tirado, G. J. M. 2005. Obtención del colorante de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) utilizando microorganismos celulolíticos. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo. Coahuila, México. pp. 58-61.

USDA. 2005. *Tagetes erecta* L /Aztec marigold. Plants National Database Reports and Tropics.

<http://www.usda.com.plantsnationaldatabase/reports/topics/tageteserecta.html>.

[Consultado: 15/02/05 8:30pm.].

Van soest, P. J. y Wine, R. H. 1968. Determinación de fibra por el método ácido detergente/ determinación de lignina, celulosa y silicio por el método de permanganato. J. Anal. Chem. pp. 51: 780.