



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación
para el Desarrollo Integral Regional
Unidad Michoacán**



**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL
PIGMENTO COLORIDO PRESENTE EN LA MADERA DEL
GUAMÚCHIL (*Pithecellobium dulce*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE

PRESENTA:

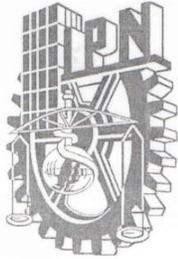
Q.F.B. YVETTE RESENDIZ VILLAGÓMEZ

DIRECTORES

DR. JOSÉ LUIS MONTAÑEZ SOTO..... CIIDIR-IPN-MICH

DR. RAÚL CORTES MARTÍNEZ..... UMSNH

Jiquilpan, Michoacán, México Octubre del 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez Michoacán el día 23 de octubre del año 2015, el que suscribe Q.F.B. YVETTE RESENDIZ VILLAGÓMEZ alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B131045, adscrito al CIIDIR IPN Unidad Michoacán, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los D. en C. José Luis Montañez Soto (CIIDIR-IPN Unidad Michoacán) y Raúl Cortes Martínez (UMSNH) y cede de los derechos del trabajo intitulado; "Extracción y caracterización fisicoquímica del pigmento presente en la madera de guamúchil (*Pithecellobium dulce*)", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones; yvee98@hotmail.com, montasoto@yahoo.com.mx, raulcortesmtz@gmail.com.

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Q.F.B. YVETTE RESENDIZ VILLAGÓMEZ

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 14:00 horas del día 14 del mes de Octubre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

Extracción y caracterización fisicoquímica del pigmento colorido presente en la madera del Guamúchil (*Pithecellobium dulce*).

Presentada por el alumno:

Reséndiz Villagómez Yvette
Apellido paterno Apellido materno Nombre

Con registro:

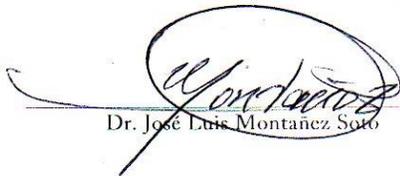
B	1	3	1	0	4	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

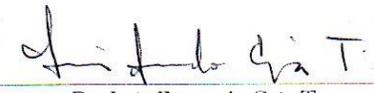
LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis


Dr. José Luis Montañez Soto


Dr. Raúl Cortés Martínez


Dra. Rebeca Flores Magallón


Dr. José Velázquez González


Dr. Luis Fernando Ceja Torres





Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante.
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.

Este trabajo fue realizado en los laboratorios del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional, así como en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología y Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). El proyecto fue apoyado por el Programa Nacional de Becas de CONACYT (CVU 551839).

Dedicatoria

A mi abuelo **Florencio Reséndiz Rodríguez** † (6/01/24- 6/10/15)

Esta estrofa refleja el sentimiento que nos embarga como familia, el día que te vas de nuestro lado y que por supuesto no son los deseos de nuestros corazones.

Pa`Lencho, como te decía comúnmente, creo que ha llegado el momento de despedirnos. Ya nos dimos la última mirada, la última sonrisa, el último abrazo y el último de los besos. No estarás físicamente conmigo, y no poder tocarte y sentirte cerca, ni sentiré la seguridad que me trasmitías como desearía en este momento, pero sé que tu GÜERA, mi abuelita, te llamo para que la acompañes.

La vida nos ha golpeado nuevamente como familia, y tenemos tristeza por tu partida, sin embargo quisiera en esta oportunidad agradecer muchas cosas, primero por ser tu nieta y dejarme compartir contigo, cada vez que quise hacerlo, sin reproches, sin preguntas, sin rencores y con uno que otro regaño pero sin duda bien merecido. Segundo por haber estado con nosotros casi 94 años. Por hacernos vivir momentos únicos y memorables, por tus chistes, tus artesanías para golpear perritos haha inolvidables, por tu picardía, tu entusiasmo y tu alegría. Quisiera agradecer también tus enseñanzas, no expresadas en palabras, ni en la simple teoría, sino en hechos concretos, donde tu valentía, esfuerzo y lucha estuvieron siempre presentes, teniendo a tu familia como el principal pilar de tu existencia.

De ser el mejor panadero del mundo, te convertiste en abuelo de tiempo completo, trabajaste sacrificadamente desde tempranas horas del día. Nos demostraste una vez más que todo era posible. Hiciste que ese caserón de adobe fuera lo que es hasta hoy, un hogar, no solo para tus hijos, sino también, tus nietos y bisnietos.

Siempre se dice que lo material no importa, y claro que no importa si lo que entregas son valores, como los que tú inculcaste a tus hijos. ¿Estas orgulloso de ellos, cierto?, yo estoy segura que sí. Ellos están orgullosos de ti, y lo estarán siempre, eres su padre, eres su héroe y lo seguirás siendo siempre.

Pa`Lencho cuéntale a mi abuelita que estamos bien, cuéntale que recibiste cuidados de tus hijos e hijas con amor, incluso mejor que cuando eras niño espero hihhi. Que nos hacías reír con tu sentido del humor tan peculiar. Dile que aprendimos a entenderte dependiendo de tus chistes, de tus muecas o frases, si decidías no hablarnos también decía mucho. Sin duda alguna solo era tu carácter.

También cuéntale, lo que yo sé, que te aburraste de tomar pastillas, de los chequeos médicos, del dolor y sobre todo de no poder salir a hacer las cosas que te gustaban. Dile que quieres comer dulces, churritos, fruta con mucha sal y chile, dile que quieres caminar con ella aunque rabeen, dile lo molesto que era ir al baño cada 5min, el dolor de tus rodillas, dile que por todas esas cosas, sabias que aquí no era tu lugar, y que por eso aceptaste su llamado y decidiste acompañarla allá, donde ella esta, donde todo será mejor, donde estarás tranquilo, descansando, comiendo dulces aunque no fueran buenos para tu salud y por supuesto estarás acompañado de tu GÜERA.

Buen viaje mi GORDITO CHIQUIADO hasta el final, TE AMO y te ameremos siempre.

Agradecimientos

A mi abuelo, por ser mi pilar, por confiar en mí, por ser mi mayor ejemplo de fortaleza y de que todo se puede mientras se quiera.

Sin duda alguna el apoyo que nos da nuestro padre es pieza clave para lograr nuestros sueños y objetivos, nos comparten su experiencia, nos aconseja cuando queremos rendirnos, nos apoya económicamente cuando la beca no alcanza (hihi), prácticamente nos lleva de la mano hacia nuestro sueño o meta, nos hace sentir que estamos bien respaldados y eso hace que nos despreocupemos de todos los obstáculos que se nos van presentando, pues no se puede fallar y mucho menos decepcionar al jefe. Gracias Pa` Luis Alberto Reséndiz.

Mi madre sin lugar a dudas, es uno de los seres más importantes de mi vida. Mi mamá fue la responsable de cuidarme todo el día y todos los días, de bañarme y cambiarme los pañales, darme de comer cuando tenía hambre. Y aunque cuidarme no fue tarea fácil, agradezco la confianza y el apoyo brindado por parte de mi madre, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su cariño, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos. Gracias Ma` María del Carmen Villagómez.

Queridos hermanos Karla y Beto gracias por creer en mí cuando la situación parecía que caminaba mal, fue fácil terminar este proyecto con su apoyo me apoyaron con amor y con una que otra pelea y rutina de gym hahaha para sacar el estrés, gracias por darme los motivos para ser un buen ejemplo para mis sobrinas July, Monse, Yvette y Zoé. Esta meta será un logro en equipo.

A mi familia, fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida y más aún en mi vida de estudiante, gracias a ustedes por seguir a mi lado Elvira, Domi, Charely, Anel, Jorge, Anatolio, Ana Rosa, Natitas, Migue, Judith, Chucho, Vicha, Arnulfo y Olivia.

La ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más tormentosas, siempre ayudándome. No fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo siempre fuiste muy motivador y esperanzador, me decías que lo lograría perfectamente. Me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más que eso. Muchas gracias amor J. Patricio Suarez García.

Un verdadero amigo es alguien que te conoce tal como eres, comprende donde has estado, te acompaña en tus logros y tus fracasos, celebra tus alegrías, comparte tu dolor y jamás te juzga por tus errores. Compañera, amiga, hermana, gracias por tu paciencia y gentileza Dios permitió que hiciéramos un trabajo más (sufriendo juntas hasta el final hahaha recuerdas) para aprender y conocer muchas cosas nuevas y nos dio la sabiduría para terminar con éxito una etapa más. Gracias por todo amigui Eunice

A mis directores de tesis, Dr. Raúl Cortes Martínez y el Dr. José Luis Montañez Soto por su esfuerzo y dedicación, quienes con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación han logrado que pueda terminar mi posgrado.

También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, y en especial a mis profesores, Dra. Consuelo Cortes, Dra. Berenice Yahuaca, Dr. Héctor Martínez, Dr. Rosalio Mercado y muy especialmente al Dr. José Venegas por ser un ejemplo a seguir, por ser un gran amigo y ser humano por darme el empujoncito cuando quería rendirme muchísimas gracias.

A mis amigos porque siempre estuvieron pendientes de mi progreso día con día y me dieron su apoyo cuando lo necesite sin pedirme nada a cambio. Ustedes me acompañaron a lo largo de este proceso, estuvieron pendientes de que todas las cosas me salieran bien y de que no tomara una mala decisión, les agradezco la confianza que depositaron en mí para poder estar siempre en las buenas y las malas juntos. Gracias por confiar y creer en mí y haber hecho de mi etapa de posgrado un trayecto de vivencia que nunca olvidare, Rober, Susi, Yuli, J. Carlos, Ester, Isa,

Perla, Ivone, Yamin, Lili, Liz, Omar, Panchito, Dennis, Alma, Nelly, Raquel, Michelle, Diego, Hugo, Daniel, Vianney y Silvia.

Al CIIDIR-IPN Unidad Michoacán por darme la oportunidad de estudiar y realizar mi posgrado.

Al CONACyT darme el financiamiento para realizar mi proyecto de investigación.

A la Facultad de Quimicofarmacobiología, en especial a los laboratorios de Biotecnología, De investigación y desarrollo de alimentos (LIDA), de Neurobiología y de Análisis de alimentos, por proporcionarme el equipo necesario para realizar cada experimento.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE

Contenido	Página
DEDICATORIA _____	i
AGRADECIMIENTO _____	iii
ÍNDICE _____	1
ÍNDICE DE FIGURAS _____	3
ÍNDICE DE TABLAS _____	4
RESUMEN _____	5
ABSTRACT _____	8
CAPÍTULO I _____	11
INTRODUCCIÓN _____	12
1.1. Antecedentes _____	15
1.2. El Guamúchil (Pithecellobium dulce (Roxb.) Benth) _____	17
1.2.1. Origen y distribución natural _____	17
1.2.2 Clasificación y descripción botánica _____	18
1.2.3 Composición química _____	20
1.2.4. Aspectos fisiológicos _____	22
1.2.5 Usos _____	22
1.3 Colorantes _____	26
1.3.1 Generalidades _____	26
1.3.2. De colorantes sintéticos a naturales _____	28
1.3.3. Costos _____	28
1.3.4. Innovaciones _____	29
1.3.5. Legislación _____	30
1.3.6. Mercado Global _____	31
1.3.7. Clasificación _____	32
1.4. Uso de la biotecnología en el desarrollo de biocolorantes _____	40
1.5. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> _____	41
1.5.1 Generalidades _____	41
1.5.2. Pudrición blanda _____	43
1.5.3. Pudrición café _____	44
1.5.4. Pudrición blanca _____	45
1.6. Bioquímica de la mineralización de la lignina _____	46
1.6.1. Degradación de la lignina por los hongos de la pudrición blanca _____	47
1.6.2. Peroxidasas lignolíticas _____	48
CAPÍTULO II _____	54

PLANTEAMIENTO	55
2.1. Justificación	55
2.2. Hipótesis	55
2.3. Objetivos	55
2.3.1. Objetivo General	55
2.3.2. Objetivos Específicos	55
CAPÍTULO III	57
MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.1. Materia Prima	58
3.2. Materiales y Equipo de Laboratorio	58
3.2.1. Materiales	58
3.2.2. Reactivos	58
3.2.3. Equipo	58
3.3 Métodos	59
3.3.1. Acondicionamiento de la materia prima.	59
3.3.2. Composición química porcentual	59
3.3.3. Extracción del pigmento mediante el empleo de solventes	62
3.3.4. Extracción del pigmento mediante el empleo de microorganismos (<i>Phanaerochaete chrysosporium</i>)	65
3.3.5. Efecto del pH en la estabilidad del pigmento	67
3.3.6. Caracterización cualitativa por espectrofotometría de infrarrojo FT-IR	68
CAPÍTULO IV	71
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
4.1. Tamaño de partícula	72
4.2. Caracterización fisicoquímica de la madera	72
4.3. Pruebas de solubilidad	74
4.4. Obtención de extractivos	75
4.5. Cinética de extracción del pigmento con etanol	76
4.6. Cinética de extracción microbiológica del pigmento	79
4.7. Efecto del tiempo de digestión microbiológica de la madera de guamúchil en la extracción del pigmento	83
4.8. Estabilidad del pigmento al pH	87
4.9. Espectros FTIR del pigmento	92
CAPÍTULO V	97
CONCLUSIONES	98
CAPÍTULO VI	100

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Distribución aproximada del árbol de guamúchil (P. dulce) en el Continente Americano (McVaugh R., 1983)</i> _____	17
<i>Figura 2. Densidad poblacional del guamúchil en algunos estados de la República Mexicana: blanco-ausencia, gris claro-baja, gris oscuro-media, negro-alta (Guevara et al., 2008).</i> _____	18
<i>Figura 3. (A)Árbol y (B) fruto del guamúchil (P.dulce)</i> _____	19
<i>Figura 4. Usos múltiples del árbol de guamúchil (P. dulce).</i> _____	23
<i>Figura 5. Distribución porcentual de las categorías de uso.</i> _____	24
<i>Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de obtención de los extractivos de la madera del guamúchil (P. dulce)</i>	64
<i>Figura 7. Mantenimiento de la cepa de P. chrysosporium e inoculación a placas con madera de guamúchil.</i> _	65
<i>Figura 8. Crecimiento de P. chrysosporium en aserrín</i> _____	66
<i>Figura 9. Diagrama de flujo del efecto del tiempo de digestión en la extracción microbiológica del pigmento presente en la madera del guamúchil (P. dulce).</i> _____	67
<i>Figura 10. Diagrama de flujo para determinar el efecto del pH en la estabilidad del colorante extraído de la madera de guamúchil (P.dulce)</i> _____	68
<i>Figura 11. Forma, tamaño y coloración que presenta la viruta (A), el aserrín (B) y la harina (C) obtenidas de la madera de guamúchil (P. dulce)</i> _____	72
<i>Figura 12. Solubilidad del colorante presente en la madera del guamúchil en diferentes solventes A) Éter etílico, B) Hexano, C) Agua, D) Etanol, E) Acetona, F) Metanol y G) Cloroformo</i> _____	75
<i>Figura 13 Extracción total del pigmento presente en la madera de guamúchil: viruta (A), aserrín (B), harina (C).</i> _____	76
<i>Figura 14. Cinéticas de extracción del pigmento presente en la madera de guamúchil: harina (A), aserrín (B) y viruta (C).</i> _____	77
<i>Figura 15. Cinéticas de extracción de pigmento de la madera de guamúchil digerida con el hongo P. chrysosporium: harina (A), aserrín (B) y viruta (C).</i> _____	80
<i>Figura 16. Crecimiento de P. chrysosporium en A) Viruta, B) Aserrín y C) Harina</i> _____	82
<i>Figura 17. Digestión de la madera con P. chrysosporium por 24, 120 y 360 horas.</i> _____	84
<i>Figura 18. Disminución de la absorbancia del pigmento obtenido por extracción química a una temperatura de 70°C y a diferentes valores de pH.</i> _____	88
<i>Figura 19. Disminución de la absorbancia del pigmento obtenido por extracción microbiológica/agua, a una temperatura de 70°C y a diferentes valores de pH.</i> _____	89
<i>Figura 20. Disminución de la absorbancia del pigmento obtenido por extracción microbiológica/ caldo Sabouraud, a 70°C y a diferentes valores de pH.</i> _____	89
<i>Figura 21. Espectro de FT-IR del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil por extracción química.</i> _____	93
<i>Figura 22. Espectro de FT-IR del pigmento extraído después de la digestión microbiológica de la madera de guamúchil durante 24 horas e hidratado con agua.</i> _____	93
<i>Figura 23. Espectro de FT-IR del pigmento extraído después de la digestión microbiológica de la madera durante 24 horas e hidratado con caldo Sabouraud.</i> _____	94
<i>Figura 24. Espectro de FT-IR del pigmento extraído después de la digestión microbiológica de la madera durante 360 horas e hidratado con caldo Sabouraud.</i> _____	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Plantas utilizadas en la época Prehispánica</i> _____	27
Tabla 2. <i>Plantas utilizadas en la época colonial</i> _____	27
Tabla 3. <i>Plantas utilizadas actualmente</i> _____	27
Tabla 4. <i>Colorantes naturales usados en alimentos</i> _____	38
Tabla 5. <i>Clasificación taxonómica de <i>Phanerochaete chrysosporium</i></i> _____	42
Tabla 6. <i>Análisis químico porcentual de la madera de guamúchil</i> _____	73
Tabla 7. <i>Rendimiento del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil en sus diferentes tamaños de partícula.</i> _____	78
Tabla 8. <i>Rendimiento del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil digerida con el hongo <i>Phanaerochaete chrysosporium</i>.</i> _____	82
Tabla 9. <i>Comparación del pigmento extraído por método químico y por método microbiológico a partir de la madera de guamúchil en tres tamaños de partícula.</i> _____	83
Tabla 10. <i>Efecto del tiempo de digestión microbiológica del aserrín hidratado con agua y con caldo Sabouraud en la extracción del pigmento.</i> _____	85
Tabla 11. <i>Efecto del pH en la longitud de onda de máxima absorbancia del pigmento.</i> _____	87
Tabla 12. <i>Parámetros cinéticos de la degradación del pigmento obtenido por extracción química a 70° y a diferentes valores de Ph.</i> _____	90
Tabla 13. <i>Parámetros cinéticos de la degradación del pigmento obtenido por extracción microbiológica/agua a 70° y a diferentes valores de pH</i> _____	91
Tabla 14. <i>Parámetros cinéticos de la degradación del pigmento obtenido por extracción microbiológica/caldo Sabouraud a 70° y a diferentes valores de pH.</i> _____	91
Tabla 15. <i>Señales identificadas en los espectros FTIR del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil.</i> _____	95

RESUMEN

En la actualidad el uso de colorantes sintéticos en los alimentos están siendo cuestionados por los consumidores a causa de los efectos perjudiciales para la salud y están optando por productos más naturales. Una de las alternativas es el uso de colorantes naturales extraídos de fuentes vegetales. La utilización de pigmentos naturales ha sido practicada por el hombre desde la prehistoria; sin embargo, su utilización a nivel industrial se redujo drásticamente a partir del descubrimiento de los colorantes sintéticos. Actualmente, la toxicidad asociada al consumo y producción de los colorantes sintéticos, ha renovado el interés por el uso de colorantes naturales, los cuales tienen la ventaja de ser sustancias químicas obtenidas a partir de un recurso natural renovable y biodegradable.

Para aprovechar las sustancias activas de una planta, se recurre frecuentemente a los extractos. El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente, que generalmente suele ser agua o alcohol; se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen, o concentrarse y pulverizarse, por propio interés en base a la aplicación que se le vaya a dar.

Debido a variaciones en su pureza, composición, estabilidad y costo, el uso de colorantes naturales se ha limitado en algunas áreas, pero en otras como la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, su uso es cada vez mayor. México cuenta con una gran riqueza de materias primas a partir de las cuales se pueden obtener los colorantes, como muestra de ello, nuestro país exporta anualmente más de 4000 toneladas de maderas tintóreas.

El objetivo del presente trabajo fue extraer por métodos químicos y microbiológicos, el colorante presente en la madera del Guamúchil (*Pithecellobium dulce*) y caracterizar dicho pigmento para determinar su uso potencial como colorante natural en alimentos. Para ello, inicialmente se determinaron la solubilidad del pigmento en diferentes solventes y después se determinaron las condiciones óptimas para la extracción química del pigmento por extracción a reflujo (tipo de solvente, relación

madera/solvente, temperatura y tiempo de reflujo). Por otro lado, la madera del guamúchil se utilizó como sustrato para el crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*), con la finalidad de que éste libere al medio el colorante presente en la madera y posteriormente se hizo la extracción química del pigmento. Posteriormente, se determinó el efecto del tiempo de digestión de la madera con el hongo, y la cantidad de pigmento obtenido. También se determinó la estabilidad del pigmento a diferentes valores de pH, y se obtuvieron los espectros FTIR del pigmento obtenido por ambos métodos, a fin de identificar los cromóforos presentes en su molécula y comprobar si la digestión de la madera con el microorganismo no altera la estructura química del pigmento. Finalmente se hizo una comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos de extracción.

El pigmento contenido en la madera de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) es muy soluble en metanol y etanol y muy poco soluble en agua. Empleando una relación sólidos-etanol de 1-13.33, temperatura de 70 ± 2 °C, y un tiempo de extracción de tres horas, fueron necesarias tres etapas de extracción del pigmento, con un tiempo mínimo de 3 h c/u, para obtener el máximo rendimiento de pigmento que fue de 2.0096g a partir de aserrín, 1.8008g a partir de viruta, y sólo 1.3338g a partir de harina, lo que equivale a rendimientos de 12.00, 13.40 y 8.89% en base seca, respectivamente. Por su parte, la extracción alcohólica del pigmento después de la digestión previa de la madera de guamúchil durante 48 horas con el hongo *P. chrysosporium*, y a una temperatura de 35°C, fue de 3.4173g a partir del aserrín, 3.1425g a partir de la viruta y 4.0674g a partir de la harina de la madera de guamúchil, lo que arroja rendimientos del 22.78%, 20.95% y 27.12% en base seca, respectivamente. La máxima cantidad de pigmento obtenido se logró a partir de la harina, a consecuencia de su menor tamaño de partícula que presenta una mayor superficie de contacto entre el pigmento y el solvente. No se observó una diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en la cantidad de pigmento extraído a los diferentes tiempos empleados para la digestión de la madera con el hongo, lo que hace necesario emplear tiempos de digestión más cortos para tratar de encontrar el tiempo de digestión en el cual se obtenga el máximo rendimiento en la extracción del pigmento. En todos los casos, la mayor estabilidad del pigmento obtenido a partir de

la madera de guamúchil se obtuvo a valores de $\text{pH} \leq 6.0$; es decir, en condiciones ácidas. Tanto el pigmento obtenido por extracción química como el obtenido por digestión microbiológica adicionado con caldo Sabouraud, presentaron máxima estabilidad a valores de pH de 4-5, y no hubo diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en el tiempo de vida media del pigmento a ambos valores de pH . Los espectros de FTIR del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil mediante el empleo de los diferentes métodos de extracción son muy parecidos entre sí, lo cual indica que el método de extracción no altera la estructura química de la molécula del pigmento. Entre los principales grupos cromóforos identificados en la molécula del pigmento de la madera de guamúchil se tienen: grupos aromáticos (Ar-NH-R), grupos amino (-NH), hidroxilos (-OH), alcoholes aromáticos, grupos metilo, anillo naftaleno, grupos carbonilo (-C=O), cadena alquil, flexión C-N, tensión simétrica del SO_2 , C-N entre grupo azo y anillo aromático. La alta concentración del pigmento presente en la madera de guamúchil sugiere la posible explotación industrial del mismo, siempre y cuando se encuentre apoyada por programas de propagación y cultivo de este recurso natural.

ABSTRACT

Currently the use of synthetic dyes in food are being questioned by consumers because of the harmful health effects and are opting for more natural products. One alternative is the use of natural dyes extracted from plant sources. The use of natural pigments has been practiced by humans since prehistory but its use at industrial level was drastically reduced after the discovery of synthetic dyes. Currently the toxicity associated with the consumption and production of synthetic dyes, has renewed interest in the use of natural dyes, which have the advantage of being chemicals derived from a renewable and biodegradable natural resource.

To take active substances of a plant, it is often resorted to extracts. The extraction process consists in incorporating the active substances of a plant to a solvent, which usually is usually water or alcohol; it can perform cold or hot, and the resulting product may be a concentrated or thick depending on the substance of origin or concentrate and sprayed by self-interest based on the application that is going to solve.

Due to variations in purity, composition, stability and cost, the use of natural dyes has been limited in some areas, but in others such as pharmaceutical, food and cosmetic industries, its use is increasing. Mexico has a great richness of raw materials from which the dyes can be obtained as proof of this, our country annually exports over 4000 tons of dyewoods.

The aim of this study was to obtain by chemical and microbiological methods, the pigment contained in the wood of guamúchil (*Pithecellobium sweet*) and characterize said pigment to determine its potential use as a natural colorant in food. To do this the solubility of the pigment was initially determined in different solvents and then, the optimal conditions for chemical extraction of pigment were determined by extraction under reflux (type of solvent, wood / solvent ratio, temperature and reflux time). The wood of guamúchil was used too as substrate for the growth of the fungus *Phanerochaete chrysosporium*, in order to release it to the medium the dye present in the wood, after chemical extraction of the pigment was made. Subsequently the effect

of time of digestion of wood by the fungus, in the amount of the obtained pigment was determined. Pigment stability obtained by both methods at different pH values were also determined, and the FTIR spectra of the pigment was obtained to identify the chromophores present in the molecule and check if the digestion of wood with the microorganism does not alter the chemical structure of the pigment. Finally a comparison was made of the results obtained by both methods of the pigment extraction.

The pigment contained in the guamuchil wood is very soluble in methanol and ethanol and slightly soluble in water. With a solid-ethanol 1-13.33 ratio, temperature of 70 ± 2 ° C, and an reflux time of three hours, were necessary three extraction steps with a minimum time of 3 hours each, to obtain the maximum quantity of pigment, which were of 2.0096g from sawdust, 1.8008g from chip, and only 1.3338g from flour, equivalent to yields of 12.00, 13.40 and 8.89% on dry base respectively. Meanwhile, the alcoholic extraction of the pigment after prior digestion of wood guamuchil for 48 hours with the fungus, and a temperature of 35 ° C, was of 3.4173g from sawdust, 3.1425g from chip and 4.0674g from flour of the guamuchil wood, giving yields of 22.78%, 20.95% and 27.12% on a dry basis, respectively. The maximum amount of pigment was obtained from flour, as a result of its smaller particle size which has a greater contact surface between the pigment and the solvent. A statistically significant difference ($p > 0.05$) in the amount of pigment extracted at different times used for digestion of wood with the fungus was not observed, which makes it necessary to use shorter digestion times to try to find the digestion time in which the maximum pigment yield is obtained. In all cases, the maximum stability of the pigment obtained from wood guamuchil was obtained at pH values ≤ 6.0 ; that is, under acidic conditions. Both the pigment obtained by chemical extraction as those obtained by microbial digestion added with Sabouraud broth, presented maximum stability at pH values of 4-5, and no statistically significant difference ($p > 0.05$) in the half-life of them. FTIR spectra of the pigment obtained from wood guamúchil by using different extraction methods are very similar to each other, indicating that the extraction method does not alter the chemical structure of the pigment molecule. The main chromophores identified in the molecule of the pigment contained in guamúchil wood it has: aromatic

groups (Ar-NH-R), amino groups (-NH), hydroxyl (-OH), aromatic alcohols, methyl groups, naphthalene ring, carbonyl ($\text{--C} = \text{O}$) -NH- groups, chain alkyl, C-N bending, symmetric tension SO_2 , CN between azo group and aromatic ring. The high concentration of pigment present in the guamúchil wood suggests the possible industrial exploitation of the same, as long as you are supported by programs propagation and cultivation of this natural resource.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El color es uno de los principales atributos para la preferencia de un alimento debido a que representa la primera sensación que se percibe del alimento, y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Es también un factor importante dentro del conjunto de sensaciones que aporta el alimento, y tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor. Badui (1993), manifiesta que el color de los alimentos viene a ser un atributo que tiene mucho peso dentro del juicio del consumidor, este puede llegar a ser determinante para que un producto comestible sea aceptado o rechazado.

Desde las primeras civilizaciones el hombre usó materias colorantes naturales las cuales eran utilizadas para teñir ropas, pintar las pieles y fabricar objetos religiosos y decorativos. El uso de colorantes se remonta a la época de los aztecas en México, mayas en América Central y del Norte y las civilizaciones Chancay, Paracas e Inca en América del Sur, quienes emplearon la cochinilla (*Coccus cacti*), insecto que vive en las ramas de los cactus, particularmente el *Opuntia coccinifera*, como colorante de tejidos y cosméticos.

Los colorantes son sustancias que se usan en la industria alimentaria para proporcionar, reforzar o variar el color a los alimentos, ya sea porque han perdido su color natural durante su procesamiento industrial o, bien, para hacerlos más agradables a la vista y más apetecibles al consumidor. De acuerdo a la fuente de obtención, los colorantes se clasifican en tres grandes grupos que son: los colorantes naturales o pigmentos, los colorantes idénticos a los naturales y los colorantes sintéticos o artificiales.

Los colorantes naturales se obtienen a través del proceso de extracción, ya sea a partir de materia prima de origen vegetal, animal, o de procedencia mineral. Generalmente no se obtienen en forma pura, sino mezclados con otros componentes del material de partida como pueden ser las grasas, carbohidratos o proteínas; sólo en algunos casos se ha llegado al aislamiento del colorante puro. Los colorantes idénticos a los naturales se obtienen a través de transformaciones químicas

artificiales de sustancias de procedencia vegetal. Finalmente, los colorantes sintéticos o artificiales son aquellos colorantes orgánicos que son obtenidos por síntesis química (López, 2011). La distinción entre natural y artificial resulta de difícil aplicación cuando se quiere hablar con propiedad sobre los colorantes utilizados en la industria alimentaria, ya que en sentido estricto, sólo sería natural el color que un alimento tiene por sí mismo.

A pesar de que la tendencia actual es la de utilizar colorantes naturales en nuestros productos de consumo, los colorantes artificiales presentan una serie de ventajas por las cuales el uso más generalizado de los colorantes naturales se ha visto limitado. Entre dichas ventajas se tienen: el amplio rango de colores que se pueden generar, su mayor estabilidad al pH y temperaturas, su mayor poder colorante por gramo de producto, y finalmente a su menor precio. Sin embargo, actualmente, los colorantes naturales experimentan un nuevo auge debido al interés de los consumidores por los productos naturales.

El uso del color de manera estratégica, especialmente en los alimentos procesados, proporciona una inmensa ventaja. El coloreado también contribuye a la identificación visual del producto por parte del consumidor, y en muchos casos un buen proceso de coloreado puede condicionar el éxito o fracaso comercial de un producto. Sin embargo, el empleo de los colorantes no es tan sencillo, ya que existen distintas alternativas para elegir a la hora de dar color a un producto, normativas a cumplir y consumidores que exigen aditivos naturales en los alimentos que consumen.

Del conjunto de los aditivos alimentarios, el grupo de los colorantes es probablemente, el que mayor polémica ha originado entre los consumidores. Frecuentemente se les considera aditivos de dudosa utilidad por cuanto no mejoran – ni tampoco empeoran– la calidad del producto con respecto de su conservación o calidad nutritiva. En consecuencia, y para que sean debidamente aceptados, el nivel de riesgo aceptable para un beneficio pequeño ha de ser forzosamente muy bajo.

En la actualidad existe una cierta tendencia a utilizar, en la medida de lo posible, colorantes naturales en lugar de los sintéticos o artificiales ya que se tiene confianza

sobre su inocuidad, lo que significa que no representan riesgo para la salud del consumidor. El uso de colorantes sintéticos en los alimentos están siendo cuestionados por los consumidores a causa de sus efectos perjudiciales para la salud y están optando por productos más naturales. Una de las alternativas es el uso de colorantes naturales extraídos de fuentes vegetales (Badui, 1993).

Existen regulaciones en diversos países y a nivel mundial respecto al uso de aditivos alimentarios entre los que se cuentan los colorantes, debido a que se ha demostrado en estudios clínicos, que el consumir alimentos con determinados colorantes sintéticos ocasiona daños en la salud, produciéndose reacciones alérgicas, problemas digestivos, insomnio, cáncer e incluso déficit de atención. La Food and Drug Administration (FDA) prohibió el uso de una extensa lista de los colorantes sintéticos (por ser cancerígenos) y otros que están bajo estudio son permitidos sólo temporalmente

El uso de colorantes naturales en los alimentos se remonta a tiempos inmemoriales, tanto en el campo doméstico y artesanal como (más recientemente) en el campo industrial. Sin embargo, la investigación sistemática y especializada sobre la inocuidad de estos aditivos es algo reciente, comparativamente hablando.

Las nuevas tendencias para colorear los alimentos, ha provocado que en estos últimos años se eliminen del mercado los colorantes rojos sintéticos por considerarlos tóxicos; ocasionando que se incremente la demanda de pigmentos naturales principalmente en los países en desarrollo (Badui, 1993)

Buscar tecnologías más amigables con el ambiente llevó a retomar los tintes naturales y un árbol que es muy utilizado en México por sus variadas propiedades es el guamúchil (*Pithecellobium dulce*) ya que esta valiosa materia prima es una fuente importante de ingresos para las comunidades locales que cosechan los frutos que anualmente produce esta planta.

1.1. Antecedentes

Un colorante es un compuesto químico que absorbe la luz en la región visible del espectro electromagnético y el color que observamos corresponde al espectro de emisión, es decir, las longitudes de onda del espectro electromagnético que no absorbe el colorante. La absorción de la luz es debida a los electrones de algún grupo funcional dentro de la molécula del colorante, a dicho grupo funcional se le conoce como cromóforo (Badui, 1993).

La utilización de los pigmentos naturales por el hombre se remonta a tiempos prehistóricos; en aquellas lejanas épocas, los humanos primitivos se valían de lo que se encontraban en su medio natural para colorear pieles y tejidos. Desde las primeras civilizaciones el hombre usó materias colorantes naturales las cuales eran utilizadas para teñir ropas, pintar las pieles y fabricar objetos religiosos y decorativos.

El uso de colorantes se remonta a la época de los aztecas en México, los mayas en América Central y del Norte y las civilizaciones Chancay, Paracas e Inca en América del Sur, quienes emplearon la cochinilla (*Coccus cacti*), insecto que vive en las ramas de los cactus, particularmente el *Opuntia coccinifera*, como colorante de tejidos y cosméticos. Los colorantes se extraían de vegetales, minerales y animales por medio de cocción o del contacto con los materiales para teñir (Calvo, 1999). Con la llegada de los españoles al Nuevo Mundo su comercio y extracción se monopolizó. Entre los siglos XVI y el XIX, el colorante extraído era enviado a España, Inglaterra y a la entonces Colonia Americana. La cochinilla era la única fuente de extracción del carmín rojo, colorante natural. Actualmente este colorante ha tomado una gran importancia debido a sus múltiples usos, desde la industria textil, farmacéutica, cosmética y alimentaria. Además, se han implementado restricciones globales en el uso de colorantes artificiales, sobre todo en la industria alimentaria y otros productos de consumo (varios colorantes sintéticos rojos están hoy en día prohibidos en los Estados Unidos y otros países) (Contreras, 1987).

Los orígenes de los aprovechamientos forestales y las grandes concesiones extranjeras, los acontecimientos que signaron la historia forestal del sur de Quintana

Roo tuvieron comienzo hace mucho tiempo. Desde fines de 1600, Gran Bretaña había acariciado el sueño del monopolio mundial de la producción de palo de tinte (*Haematoxylum campechianum*) (Contreras, 1987). Los aztecas llamaban al palo de tinte “árbol espinoso”, por su tronco espinoso y torcido.

A partir del año 1500 se dieron luchas sangrientas entre los españoles e ingleses a causa del palo de tinte. Los ingleses tomaron varios navíos cargados de palo de tinte saliendo de la Bahía de Campeche y lo usaron como combustible, hasta que cayeron en cuenta de sus valiosas propiedades para el teñido. Hoy en día, el colorante extraído del palo de tinte se usa como tintura de laboratorio y para teñir de negro las medias. De hecho, el mejor uso del palo de tinte resulta de combinarlo con hierro para crear grises y negro (Contreras, 1987). La extensión nativa para el palo de tinte es México, Centroamérica, Colombia, Venezuela y las Guyanas, aunque se ha naturalizado en otros países. Actualmente, los principales exportadores son México, Honduras y Haití.

El uso sustentable de plantas tintóreas en Sierra Leona es discutido por MacFoy (2004) en su estudio donde proporciona un listado de especies y da algunos datos sobre el uso de éstas, además de exponer la problemática actual relativa a la pérdida de conocimientos sobre el tema a la disminución en el uso y la poca documentación. Es de notar que varios estudios documentan la escasez de materia prima, la sustitución de plantas tintóreas por colorantes químicos y en algunos casos la sobre-explotación de especies.

Es notable la gran cantidad de plantas que contienen pigmentos, pero se deben considerar como tintes naturales también a las diversas tierras y óxidos metálicos empleados con el mismo fin, e incluir a los animales e insectos con los que se tiñen algunas fibras como la grana cochinilla y el caracol púrpura. Olvera (2003) reporta el uso de plantas tintóreas en la región de Tacámbaro, Michoacán realizando un inventario de especies y documentando el proceso de tinción. Loredo *et al.* (2002) también realizaron un estudio de aprovechamiento de recursos vegetales en una localidad rural de Michoacán registrando 199 especies de uso tradicional entre ellas algunas con uso artesanal.

1.2. El Guamúchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth)

Los componentes de la selva baja caducifolia que reciben un uso múltiple resultan de especial interés por su potencial contribución en la solución de diversos problemas socioambientales. Tal es el caso del guamúchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth), árbol de usos múltiples que tiene entre sus funciones la de servir como cerco vivo en los campos de cultivo y se propaga extensamente por el mismo hombre, quien dispersa sus semillas cuando transita comiendo el fruto, las cuales tardan a lo sumo dos días en comenzar a germinar. Dada su alta tasa de sobrevivencia, a su rápido y vigoroso crecimiento, y a que se adapta a todo tipo de suelos, es un árbol de fácil establecimiento que hace más económicas las labores de reforestación (Monroy y Colín, 2004).

1.2.1. Origen y distribución natural

La presencia del guamúchil se extiende desde el sur de California hacia las laderas del pacífico mexicano y hasta Colombia y Venezuela (Figura 1), se ha introducido en Sudán, Tanzania y otras áreas de África Tropical, así como en Florida, Cuba, Jamaica, Hawái y Puerto Rico, entre otros (Allen, 1981).



Figura 1. Distribución aproximada del árbol de guamúchil (*P. dulce*) en el Continente Americano (McVaugh R., 1983)

Se tiene la certeza de que el guamúchil es un árbol nativo de México, debido a que se le encuentra en por lo menos 25 Estados de la República Mexicana, los cuales abarcan desde Baja California y Sonora, hasta Campeche y Yucatán (Cervantes, 1996) (Figura 2)

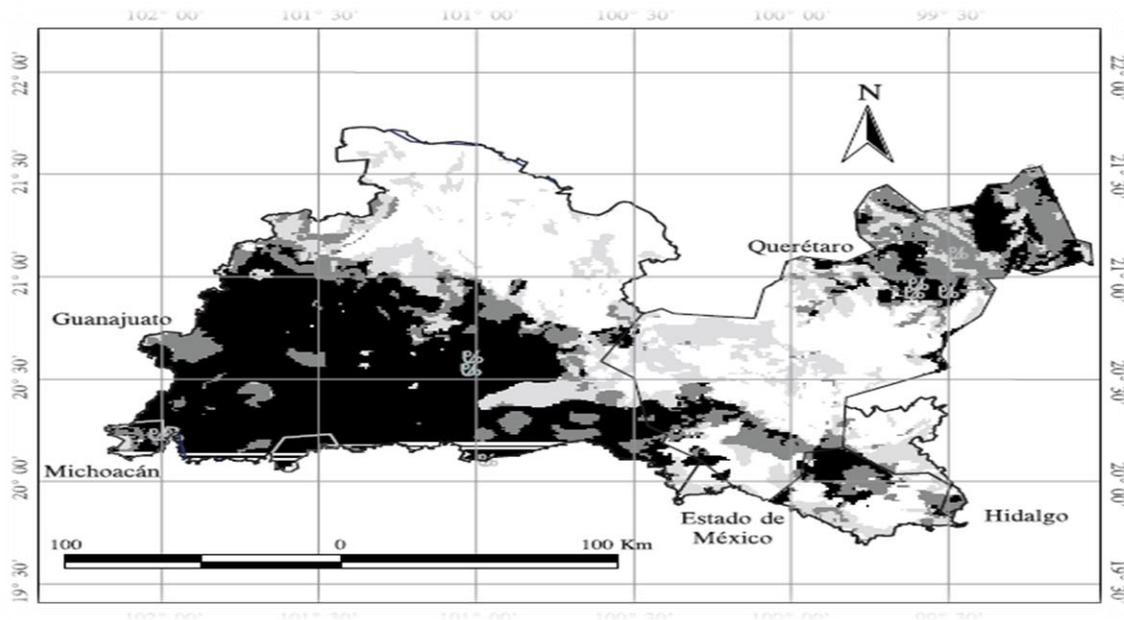


Figura 2. Densidad poblacional del guamúchil en algunos estados de la República Mexicana: blanco-ausencia, gris claro-baja, gris oscuro-media, negro-alta (Guevara et al., 2008).

1.2.2 Clasificación y descripción botánica

De acuerdo con su taxonomía, el guamúchil es un árbol perennifolio, frondoso y robusto que alcanza entre los 15 y 20 metros de altura y con un diámetro de hasta 1m en la base del tronco, tiene copa ancha, tallo ligeramente torcido, corteza ornamentada de color gris verdoso con manchas blanquecinas; de aspecto granuloso por la presencia de abundantes lenticelas de color café rojizo agrupadas en líneas longitudinales. Sus ramas son delgadas y ascendentes, presentan pelos en las partes jóvenes y espinas por pares (aunque algunos especímenes carecen de ellas) (Figura 3-A). Su nombre científico es *Pithecellobium dulce* y pertenece a la familia de las plantas Leguminosas y a la subfamilia de las Mimosoideas.



Figura 3. (A)Árbol y (B) fruto del guamúchil (*P.dulce*)

La madera del guamúchil es dura y pesada, presenta un color amarillo claro con tonalidades rojizas en la albura y de color café rojizo en el duramen; tiene un olor característico y un sabor amargo, su textura es fina y de grano entrecruzado, se utiliza en la construcción de viviendas, para la obtención de leña y carbón.

Sus hojas están dispuestas en espiral bipinnadas y pecioladas, compuestas por un par de folíolos secundarios sésiles. Sus inflorescencias son axilares o terminales, panículas péndulas de cabezuelas, tomentosas; las flores actinomorfas, verdosas y sésiles (Barajas y Pérez, 1990). Los frutos del guamúchil son vainas lineares, curvas o enroscadas en espiral, formando de una o dos vueltas y llegan a medir hasta 20 cm de largo y entre 10 y 15 mm de ancho. Las vainas dehiscentes son de aspecto rollizo y presentan constricciones entre las semillas; su coloración puede ser verde, rojiza o rozada cuando están maduras y se vuelven pardas al abrirse (Figura 3-B).

Por lo general, las vainas contienen de 5 a 12 semillas reniformes, de color negro brillante, cada una de 10 mm de largo aproximadamente y cubiertas por un arilo

dulce y carnoso de color blanco-rojizo. Las semillas son comestibles y se consumen ya sea en fresco o bien, sometiénolas previamente a un proceso de cocción en agua a ebullición. El arillo carnoso agridulce que rodea la semilla es muy apreciado como complemento alimenticio; se consumen preferentemente frescos, aunque también hay quienes los prefieren asados o se utilizan en la preparación de bebidas refrescantes; razón por la que durante la temporada de producción, es muy común encontrar a la venta los frutos del guamúchil en los mercados de muchos pueblos de la República Mexicana y de América Latina (McVaugh, R. 1983).

Un árbol de guamúchil en pleno desarrollo produce entre 15 a 30 Kg de fruta por planta, lo cual depende de la edad, de las enfermedades que ha padecido la planta, así como de las condiciones agronómicas de su desarrollo, entre otras. El arilo o pulpa representa el principal constituyente del fruto del guamúchil, pues su contribución en el peso total del fruto es del 65% en base húmeda; le sigue la cáscara y las semillas, cuya contribución en el peso fresco de los frutos es del 20 y del 15% respectivamente.

La floración del guamúchil ocurre por primera vez cuando el árbol tiene dos años de edad, y se presenta entre los meses de diciembre a mayo, mientras que la maduración de sus frutos tarda de tres a cuatro meses después de la floración de la planta, de ahí que se les pueda encontrar entre los meses de marzo a junio, dependiendo de la zona (Crane, et. al., 1984; Guízar y Sánchez, 1991).

1.2.3 Composición química

Químicamente la corteza del guamúchil contiene triterpeno, lupopenona y lupeol. Las hojas contienen flavonoides como afzelin, ramnosido de camferol y quercitrin. Las flores contienen camferol y quercitrin. Las semillas están compuestas por 10.6% de humedad, 5.3% de cenizas; 20% de proteína; 37.6% de ácido mirístico, 38.9% de ácido palmítico, 4.3 % de ácido esteárico, 8.4% de ácido oleico, 4.3% de ácido

linoleico, 6.4% de ácido linolenico, entre 4 y 5% de pectinas; entre 20 y 26 % de lípidos; de 4 a 48 % de compuestos fenólicos; β -citosterol y α -amirina.

El arilo contiene vitamina C (94 mg de ácido ascórbico/100 g de pulpa fresca); 9,4 % de pectinas en base seca y 2% en base fresca: de 27 a 60 % de compuestos fenólicos y 15 % de ácidos orgánicos. Por otro lado, el contenido de sólidos totales en la porción comestible de los frutos del guamúchil es de 21.9%, de los cuales, el principal constituyente lo representan los carbohidratos, cuyo contenido alcanza el 80.36% en base seca. En un segundo término se encuentran las proteínas, cuyo contenido en base seca llega a un 11.47%. Finalmente se encuentra la fibra cruda, las cenizas y la grasa, cuyo contenido alcanza el 4.01, 2.97 y 1.19% en base seca, respectivamente (Banerjee y Jain, 1988 y Valenzuela, 1977).

En términos generales se puede decir que el guamúchil es un buen complemento alimenticio, pues brinda un aporte considerable de fósforo y potasio, satisface los requerimientos nutricionales vitamina C, y su aporte de vitamina B1 cubre el 16% de su ingesta diaria recomendada y proporciona cantidades importantes de otras vitaminas como la vitamina B2 (riboflavina) y también de niacina; además, las proteínas del guamúchil son de muy buena calidad debido a que presentan un considerable aporte de aminoácidos esenciales como valina, lisina, fenilalanina y triptófano (Druke, 1983).

Al determinar la composición química, los niveles de metabolitos secundarios, el valor nutritivo y la aceptabilidad del follaje de diez leguminosas forrajeras entre las que se encuentra el guamúchil (*Pithecellobium dulce*), García y Medina (2006) mencionan que todas estas plantas presentaron buena calidad bromatológica, lo cual obedece a sus elevados contenidos proteicos y baja fracción fibrosa de la biomasa comestible de cada una de ellas. De todas ellas, *P. dulce* exhibió la degradación postruminal del nitrógeno más elevada (66,7%) y concluyen que los follajes de todas las leguminosas estudiadas presentan aceptable calidad nutritiva; sin embargo, de forma integral, *Albizia lebbbeck*, *P. dulce*, *Gliricidia sepium* y *Enterolobium contortisilicum* mostraron las mejores potencialidades como alimento suplementario para los rumiantes.

1.2.4. Aspectos fisiológicos

Dada su alta tasa de sobrevivencia, a su rápido y vigoroso crecimiento, y a que se adapta a todo tipo de suelos, el guamúchil es un árbol de fácil establecimiento. Como todas las leguminosas, el árbol del guamúchil presenta desarrollo de nódulos integrados por microorganismos (*Rhizobium*) fijadores de nitrógeno en sus raíces, lo que lo convierte en una planta de crecimiento rápido y vigoroso, capaz de tolerar la competencia de hierbas y arbustos, debido a que sin problema crece más rápido que la competencia. A los 5 o 6 años alcanza una altura de 10 m, llegando a crecer hasta 2.0 m por año; además, el guamúchil es una planta que presenta una temprana edad de fructificación (Allen, 1981).

1.2.5 Usos

El guamúchil se considera una planta multipropósito ya que cada una de sus partes es utilizable para manufacturar diferentes productos, además de que la presencia de diversos componentes químicos le brinda características para tratar diversos padecimientos. A continuación se presentan los principales usos genéricos y terapéuticos de cada una de las partes del árbol del guamúchil (Figura 4).

Entre los usos más destacados del guamúchil se encuentra la extracción de goma, la cual presenta un mucílago similar a la goma arábica, sustancia que es utilizada como aditivo espesante en la industria de alimentos. Además, de su corteza se extraen compuestos químicos conocidos como taninos, los cuales son compuestos químicos ampliamente utilizados en la industria de la curtiduría. También produce aceites esenciales aromáticos y un tinte amarillo.

Como alimento, el fruto del guamúchil puede presentar dos sabores, lo cual depende de la variedad de la planta; uno agrídulce que se prefiere para su consumo en fresco o en atoles, y otro que la gente llama “atorón” o “ahogadizo”, empleado en la preparación de salsas. Los frutos frescos consumidos en grandes cantidades llegan

a “cerrar” la garganta, lo cual se debe a su alto contenido de taninos. El consumo más reconocido es fresco como golosina (Monroy y Colín, 2004).



Figura 4. Usos múltiples del árbol de guamúchil (*P. dulce*).

Fuente Monroy y Colín, 2004

El principal uso del árbol de guamúchil es como recurso *maderable* (Figura 5), es apto para su uso como leña y carbón, debido a que presenta un alto valor calorífico, aunque la leña produce bastante humo. La madera es poco apreciada por ser quebradiza, es de textura fina, dura, pesada y difícil de trabajar por tener el grano entrecruzado. Sin embargo, gracias a su resistencia y dureza, es utilizada en las zonas rurales para la construcción de viviendas, cercas, trancas y postes. En menor escala se construyen mangos para herramientas, así como artesanías por el tipo de acabado que se logra (Guízar y Sánchez, 1991).

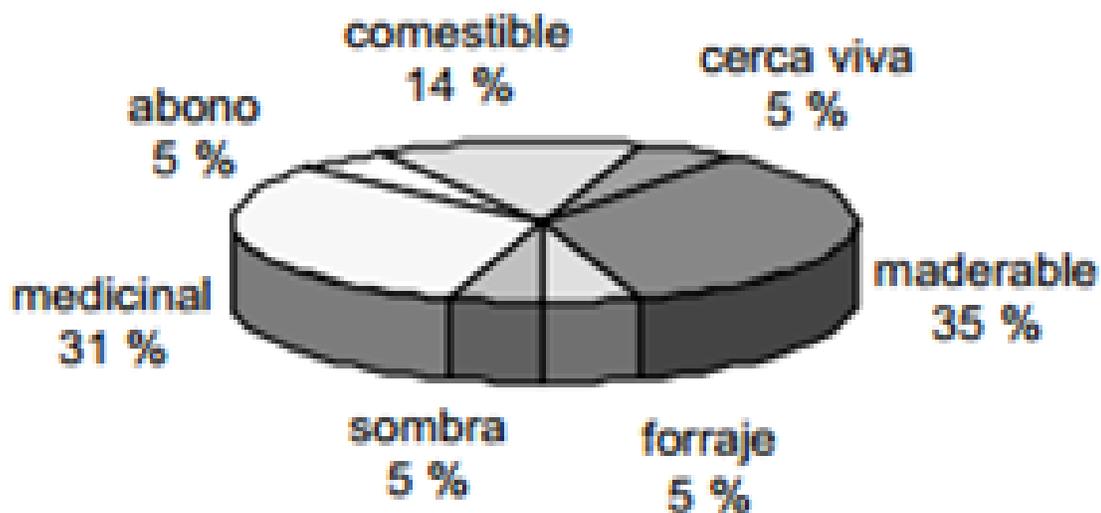


Figura 5. Distribución porcentual de las categorías de uso.

Fuente. Monroy y Colín, 1997.

Uso medicinal. Porque contiene propiedades curativas que son utilizadas en la medicina tradicional para prevenir o curar. En particular es utilizado para la diarrea, cólicos, malestar estomacal, llagas, heridas, granos y para reforzar la dentadura. Esta planta es recomendada para el tratamiento de trastornos digestivos en general, pero el manejo más frecuente es para la diarrea, para cual, se prepara un cocimiento de la corteza

Uso como forraje. Las vainas y el follaje del árbol de guamúchil se utilizan como forraje en época de secas para el ganado bovino, caballar, ovino y caprino. Sus flores son como pequeñas motas blancas verdosas que despiden un aroma suave y producen miel de buena calidad (Allen, 1981).

El guamúchil se aplica indirectamente al suelo como abono orgánico, proporcionando nutrimentos, mejora las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo.

Como hábitat es el lugar con características ambientales donde un organismo vive normalmente (Stiling, 1996). Además, el guamuchil representa un nicho alimentario

para una gran variedad de especies de fauna silvestre, entre los que se encuentran reptiles, aves, mamíferos e insectos; estas interacciones abren un campo para su análisis ecológico.

Más del 60% del territorio mexicano sufre una degradación edáfica severa, y un gran número de especies de plantas están en peligro de extinción. México es patria de muchas leguminosas leñosas potenciales; sin embargo, la falta de información sobre las propiedades de estas leguminosas (por ejemplo, agronómico, biológico, nutricional) limita su uso (Delgado *et al.* 2004). A pesar de su amplio uso tradicional, el árbol del guamúchil está infrautilizado en México debido a la falta de información sobre sus propiedades beneficiosas.

Esta valiosa materia prima es una importante fuente de ingresos para las comunidades tribales locales que cosechan las vainas de cada año a partir de las plantas de guamúchil silvestres. A pesar de su gran importancia económica, soporte natural de la especie está disminuyendo día a día debido a la indiscriminada explotación y la deforestación (McVaugh R., 1983).

Se tiene evidencia que los bosques además de la madera, proporcionan otros beneficios y productos no forestales, que las comunidades conocen y utilizan desde tiempos remotos como elemento indispensable y tradicional de supervivencia (Chalá *et al.* 2003). Hay una gran variedad de plantas que se pueden utilizar para hacer tintes vegetales, ejemplo de esto sería que diversos tintes se hacen con diferentes partes de las plantas (las hojas, la cáscara de algunas frutas, la corteza de los árboles, las raíces o la madera) (Carter, 1983).

Los colorantes están presentes en casi todas las plantas. De éstos, unos son producidos directamente por la actividad fisiológica de las plantas, mientras que otros son producto de transformaciones artificiales de sustancias de procedencia vegetal.

1.3 Colorantes

1.3.1 Generalidades

Desde épocas muy antiguas, el uso de sustancias naturales para la producción de tintes de colores, ha traspasado todas las esferas del mundo mesoamericano. Al paso de los siglos, aún sobreviven pinturas rupestres de distintas civilizaciones, como Olmecas, Mayas, Aztecas, Teotihuacanos, etc.

Las plantas tintóreas se utilizaron mucho en distintos contextos, pero debido a que son materiales perecederos, no sobreviven largo tiempo. Algunos investigadores postulan que una de las primeras formas del uso de pintura entre humanos, fue la pintura corporal, la cual no se circunscribió a una forma ritual, sino también a una adaptación al ambiente, y funcionó como tipo de repelente para insectos (Ivic y Beger, 2008). Los materiales colorantes fueron muy variados. Los colores más comunes fueron los rojos, azules, amarillos y verdes. Estos tintes se pueden encontrar en todas las partes del vegetal (dependiendo de la especie). Difícilmente se obtienen los colorantes de manera directa de la naturaleza, es decir que por lo general es necesario mezclarlos o combinarlos con otros, y muchas veces tomando en cuenta varios principios inmediatos de los vegetales (Rossignon, 1859).

En Europa, durante el Siglo XIX, la industrialización de los textiles requirió de enormes cantidades de tintes que estuvieran fácilmente disponibles. Esta situación impulsó la producción y desarrollo de tintes sintéticos. En muchas regiones indígenas, la creación de dichos tintes y el posterior ingreso de hilos mercerizados a sus mercados, sustituyó parcial o totalmente a la tintorería local, aunque las sustancias tintóreas permanecieron. Al mismo tiempo, los colores sintéticos produjeron un estallido de color en la creación de los tejidos nativos, especialmente porque aunque se contaba con una amplia gama de colores, las técnicas para fijarlos no eran eficientes (Ivic y Beger, 2008). En las Tablas 1, 2 y 3 se presentan algunas de las principales plantas utilizadas para la obtención de tintes durante la época prehispánica, época colonial, y época actual, respectivamente.

Tabla 1. Plantas utilizadas en la época Prehispánica

Nombre común	Nombre científico	Familia
Índigo, añil, chol	<i>Indigofera tinctoria</i> Linn.	Fabaceae
Chukum	<i>Phitecellobium albicans</i> Benth.	Fabaceae
Palo tinta	<i>Haematoxylon Campechianum</i> L.	Fabaceae
Kanté	<i>Diphysa robinoides</i> (Mill.) M. Sousa	Fabaceae
Chanté	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Standl.	Fabaceae

Tabla 2. Plantas utilizadas en la época colonial

Nombre común	Nombre científico	Familia
Achiote	<i>Bixa orellana</i> L.	Bixaceae
Matlalxochitl	<i>Commelina coelestis</i>	Commelinaceae

Tabla 3. Plantas utilizadas actualmente

Nombre común	Nombre científico	Familia	Origen de la planta
Ilamo	<i>Alnus jorullensis</i> Kunth.	Betulaceae	Desde Mexico hasta Sudamérica
Encino	<i>Quercus sp.</i>	Fagaceae	Distribucion mundial
Palo de pito	<i>Erythrina sp</i>	Fagaceae	Guatemala
Pericon	<i>Tagetes lucida</i> L.	Asteraceae	América
Chipilín	<i>Crotolaria guatemalensis</i> Benth. Ext.Oerst.	Fabaceae	América

1.3.2. De colorantes sintéticos a naturales

Los consumidores marcan la pauta respecto al reemplazo progresivo de colorantes sintéticos por colorantes naturales en los alimentos. El consumo de lo natural es cada vez más fuerte y el uso de ellos es considerado un atributo de calidad del producto. Desde hace algunos años la legislación sanitaria a nivel mundial ha prohibido una cantidad importante de sustancias químicas sintéticas que eran empleadas como colorantes en alimentos por considerarlas tóxicas para el humano (Duxbury, 1990; Korwek, 1990). Sobresalen aquellos compuestos que imparten el color rojo, así como sus diferentes tonalidades y matices: rojo FDC 1 (CI-16155), 2 (CI-16185), 4 (CI-14700) y 2G (CI-18050), eosina (CI-14405) y rosa de bengala (CI-45440) (Bridle, 1997). Entre los factores que influyen al momento de tomar la decisión de utilizar un colorante natural, y que se relacionan con los principales desafíos en su utilización, destacan los siguientes:

1.3.3. Costos

La estabilidad del color y su dependencia de factores como exposición a la luz, pH, temperatura y reacciones de oxidación con otros ingredientes. Uniformidad del color durante el procesamiento y almacenaje del alimento, durabilidad del color y alteración del sabor durante el almacenaje del alimento. Inocuidad y propiedades benéficas para la salud que se atribuyen a algunos pigmentos naturales. Además de la aceptación por el consumidor hacia un producto nuevo, hacen poco probable que se incremente la lista de colorantes autorizada, pero se considera que la diversidad de la vegetación tropical y subtropical ofrece un rango prometedor (Wissgott y Bortlik, 1996).

Hay una tendencia mundial en general al uso de aditivos y colorantes de alimentos en particular. Un estudio sobre las patentes emitidas de colorantes en alimentos 1979 a 1984 (Francis, 1998) comparado con el de 1969 a 1978 reveló un aumento de más del 100% en el número de patentes que tratan con colorantes naturales. Por

esta razón el empleo de pigmentos naturales ha recobrado un gran interés, especialmente aquellas sustancias provenientes de fuentes consideradas como “no convencionales” tales como microorganismos, algas y flores de las cuales se puede obtener una amplia gama de pigmentos que incluyen a los carotenoides, antocianinas y betalaínas entre otros (Paredes, 1986; Francis, 1998; Knorr, 1987).

La decisión de los fabricantes de aditivos de producir colorantes naturales para la industria alimentaria se vio acelerada por la publicación de un estudio realizado por la Universidad de Southampton y solicitado por la FSA (Food Standards Agency) del Reino Unido (McCann *et al*, 2007). El objetivo del estudio fue verificar el efecto de la mezcla de seis colorantes sintéticos y benzoato sódico, usado como conservador de bebidas y otros productos consumidos por niños. El resultado concluyó que la hiperactividad infantil se veía exacerbada por el uso de esta mezcla, lo que ha acelerado la tendencia hacia el uso de colorantes naturales en Europa y otros mercados, ya que la demanda de los consumidores por formulaciones más naturales aumenta y los principales productores y distribuidores minoristas buscan eliminar gradualmente los ingredientes sintéticos (Carmona, 2013).

1.3.4. Innovaciones

Actualmente los colorantes usados en los alimentos son elaborados de manera tal para mantener las propiedades sensoriales y de color durante la vida útil del alimento. En los últimos años, la calidad y variedad de colores provenientes de fuentes naturales ha mejorado sustancialmente. Además de ser más inocuos que sus pares sintéticos, algunos otorgan al producto distintos tipos de funcionalidad. Tal es el caso de los carotenoides y de las antocianinas, compuestos conocidos por su actividad antioxidante y por su efecto protector en la prevención de ciertas enfermedades crónico degenerativas y distintos tipos de cáncer (Carmona, 2013).

1.3.5. Legislación

Del conjunto de los aditivos alimentarios, el grupo de los colorantes es probablemente, el que mayor polémica ha originado entre los consumidores. Frecuentemente se les considera aditivos de dudosa utilidad por cuanto no mejoran – ni tampoco empeoran– la calidad del producto con respecto de su conservación o calidad nutritiva. En consecuencia, y para que sean debidamente aceptados, el nivel de riesgo aceptable para un beneficio pequeño ha de ser forzosamente muy bajo.

Existen regulaciones en diversos países y a nivel mundial respecto al uso de aditivos alimentarios entre los que se cuentan los colorantes, debido a que se ha demostrado en estudios clínicos, que el consumir alimentos con determinados colorantes sintéticos ocasiona daños en la salud, produciéndose reacciones alérgicas, problemas digestivos, insomnio, cáncer e incluso déficit de atención.

Las autoridades sanitarias y expertos, antes de aprobar cualquier nuevo aditivo, analizan los datos de estudios previos efectuados sobre los efectos de consumo agudo y crónico del ingrediente, definiendo una Ingesta Diaria Admisible (IDA) con un amplio margen de seguridad. Las autoridades sanitarias marcan la pauta en normativas de uso de aditivos alimentarios, son la FDA (Food and Drug Administration) en EE.UU., y la EFSA (European Food Safety Authority) en la unión Europea. Sin embargo, hay países que difieren respecto a las propuestas de los organismos antes mencionados, por lo que es importante, antes de emprender en este nicho de negocio, conocer las normas específicas de cada país.

La mayoría de colorantes se pueden usar en el mercado internacional, pero también hay restricciones regionales. Por ejemplo, mientras que en Estados Unidos se puede usar el colorante Allura Red AC (16035), éste se prohíbe en muchos países europeos. Por el contrario, Estados Unidos prohíbe parcialmente la eritrosina (45430), la cual generalmente se usa ampliamente en el resto del mundo. Además de estas regulaciones gubernamentales, existen limitaciones empresariales para el uso de colorantes, como el caso de las cadenas de supermercados Tesco y ASDA

del Reino Unido, los que a partir de 2008 no usan colorantes sintéticos en los productos con marca propia (Claudia Dziuk O'Donnell, 2011)

En México la normatividad está sustentada básicamente por la comisión del Codex alimentarius que es un organismo internacional de la FAO y la Organización Mundial de la Salud que se basa en normas de regulación alimentaria que tienen que ver con la producción, procesamiento y comercio de alimentos para asegurar la protección de la salud de los consumidores.

La ley General de Salud y las Normas Oficiales Mexicanas referentes a los alimentos (NOM-036-SSA1-1993, NOM-086-SSA1-1994, NOM-120-SSA1-1994, NOM-131-SSA1-1995, NOM-147-SSA1-1996, NOM-185-SSA1-202, NOM-213-SSA1-2002) establecen la dosis recomendada de colorantes para su uso en la industria basada en el Codex Alimentarius.

1.3.6. Mercado Global

El uso mundial de los colorantes alimenticios en la actualidad oscila alrededor de 40.000 a 50.000 toneladas. Un reciente estudio de PR Newswire de 2012, indica que el mercado global de la industria de colorantes para alimentos en el año 2011 fue de USD 1.615 millones de dólares, y se estima que para el 2018 llegará a unos USD 2,154 millones de dólares, a una tasa de crecimiento anual compuesto de 4,3% entre los años indicados. Los alimentos constituyen el 67% del mercado mundial de colorantes alimenticios; seguido por la industria refresquera con 28% y las bebidas alcohólicas con 5%. Europa domina el mercado global de los colorantes alimenticios con 36% del mercado, seguido por el mercado estadounidense (28%), Japón (10%) y China (8%); y el 18% restante corresponde a países desarrollados como Canadá y Australia y de nuevos mercados alimenticios como los de India y Brasil.

1.3.7. Clasificación

De acuerdo a la fuente de obtención, los colorantes se clasifican en tres grandes grupos que son: los colorantes naturales o pigmentos, los colorantes idénticos a los naturales y los colorantes sintéticos o artificiales. Los colorantes naturales se obtienen a través del proceso de extracción, ya sea a partir de materia prima de origen vegetal, animal, o de procedencia mineral. Generalmente no se obtienen en forma pura, sino mezclados con otros componentes del material de partida como pueden ser las grasas, carbohidratos o proteínas; sólo en algunos casos se ha llegado al aislamiento del colorante puro. Los colorantes idénticos a los naturales se obtienen a través de transformaciones químicas artificiales de sustancias de procedencia vegetal. Finalmente, los colorantes sintéticos o artificiales son aquellos colorantes orgánicos que son obtenidos por síntesis química (López, 2011).

La distinción entre natural y artificial resulta de difícil aplicación cuando se quiere hablar con propiedad sobre los colorantes utilizados en la industria alimentaria, ya que en sentido estricto, sólo sería natural el color que un alimento tiene por sí mismo.

En la química de los colorantes se suele establecer una división de los colorantes y pigmentos de acuerdo con su constitución, es decir, según su fórmula química y grupo funcional al que pertenezcan (por ejemplo; azoicos, xántinas, quinoleinas, trifenilmetánicos, cianinas oxazinas, etc.). Dado que la fórmula química de los colorantes es muy variada, resulta muy complicado establecer una clasificación de dichos compuestos en base a este concepto, en la práctica resulta mucho más útil el criterio de clasificación basado en las propiedades técnicas y funcionales.

Con el tiempo, la gran cantidad de colorantes que fueron apareciendo en el mercado para satisfacer requerimientos tan variados, hizo que fuese necesaria una recopilación de toda la información existente al respecto, así como una forma más adecuada de clasificar estos productos, lo cual dio origen a la aparición del Color Index (CI).

El Color Index (CI), es un compendio de todos los colorantes existentes clasificados e identificados individualmente mediante una convención de alcance internacional. Se edita en el Reino Unido por la Society of Dyers and Colourists y en USA por la American Association of Textile Chemists and Colourists. Cada colorante posee un nombre genérico y un número de clasificación. En Europa el número de identificación del colorante va precedido de la letra E. El nombre genérico es un código que contiene tres elementos: familia de colorante, color y un número de identificación integrado por cinco dígitos. Este número de cinco dígitos se asocia a cada producto químico individual que es utilizado como colorante. Consecuentemente los colorantes pueden identificarse haciendo referencia a un número del Color Index, así cuando se especifica un colorante, las siglas del color index deben acompañarlo (Badui, 1993).

Por ejemplo: El colorante azul número 1, llamado también como azul brillante (FD&C Blue No.1), es un derivado del ácido trifenilmetano, clasificado como CI 42090; es un polvo purpura-café, con brillo metálico, DL_{50} subcutánea para ratón 4,6g/kg, es higroscópico y estable en ácidos y a la luz; tiene una máxima absorción a 360nm, inestable con agentes reductores y anhídrido sulfuroso, muy soluble en agua (20g en 100mL) y etanol e insoluble en grasas.

1.3.7.1. Colorantes Sintéticos

El desarrollo de la química y la tecnología ha permitido la producción de una gran variedad de colorantes por síntesis química a partir de derivados del petróleo. Las características de los colorantes sintéticos o artificiales son superiores a las que presentan los colorantes naturales, tanto en sus propiedades físico-químicas como por las ventajas funcionales que estos muestran tanto en su aplicación como una vez aplicados, especialmente en lo que respecta a las solidez generales. Su resistencia a la degradación en cualquiera de sus formas, ha sido tan perfeccionada que en la vestimenta actual la vida del color es ya comparable a la propia vida del tejido y de la prenda misma. A este aspecto técnico hay que sumarle otro no menos importante, que es el costo y la capacidad de producción. La alta capacidad de

producción hizo que los precios fueran cada vez menores, con productos novedosos, y de fácil disponibilidad.

Los colorantes sintéticos actualmente permitidos por la legislación alimentaria son todos ellos productos solubles en agua, se presentan en su forma pura en forma de polvo y para colorear se disuelven previamente o se dispersa el polvo en el producto. Cubren toda la gama de colores ya que se pueden mezclar entre ellos para obtener distintos tonos. Poseen una pureza del 80-90% y el resto corresponde a productos que provienen del proceso de fabricación, en su mayoría sales inorgánicas, y sus cantidades máximas están fijadas en las especificaciones de las normativas correspondientes. Por ello los colorantes sintéticos poseen una calidad uniforme que facilita su aplicación y garantiza que la tonalidad sea siempre la misma. Entre las propiedades que deben tener los colorantes sintéticos para poder utilizarse en la industria alimentaria destacan las siguientes: deben ser inocuos, su estructura química debe ser conocida, deben tener un alto poder colorante, deben ser estables frente a la luz el calor y el pH, deben ser compatibles con otros productos, no deben tener ni desarrollar olores desagradable, deben ser económico.

Existe una gran cantidad de colorantes sintéticos; sin embargo, solo algunos de ellos están aprobados para su uso en la industria de alimentos, bebidas y fármacos, (aunque su aprobación puede no verse favorecida por todos los países (Badui, 1993). Entre los colorantes sintéticos autorizados para usarse en alimentos se tienen los siguientes.

- a) Amarillo N°6: es la sal disódica del ácido 1-sulfofenilazo-2-naftol-6-sulfónico, clasificado como CI15985; es un polvo naranja, inodoro, higroscópico, de máxima absorción 480 nm (en acetato de amonio), DL50 oral para ratas >10 g/kg, muy solubles en agua (19g/100ml), estables en ácidos, sensible a los agentes reductores (Badui, 1993).
- b) Azul N°1 o azul brillante: es un derivado del ácido trifenilmetano, clasificado como CI 42090; es un polvo purpura-café, con brillo metálico, DL50 subcutánea para ratón 4,6g/kg, es higroscópico y estables en ácidos y a la luz;

tiene una máxima absorción a 360nm, inestable con agentes reductores y anhídrido sulfuroso, muy soluble en agua (20g en 100ml) y etanol e insoluble en grasas.

- c) Azul N°2 o indigotina
- d) Rojo cítrico N°2: es el 1-(2,5-dimetoxifenilazo) -2-naftol, clasificado como CI12156, y se presentan como cristales rojos de punto de fusión 156°C, algo soluble en agua y en etanol; se usa principalmente para colorear algunos cítricos (Badui, 1993).
- e) Rojo N°3 o eritrosina: es la sal sódica o potásita de la tetroyodofluoresceína; es un polvo rojo-café, DL50 oral para ratas de 2,89g/kg, máxima absorción a 524 nm y es inestable en presencia de ácidos, luz y cobre, pero resiste las altas temperaturas; es insoluble en grasas, pero soluble en agua (9g/100ml) y poco en etanol, se clasifica como CI 45430 (Badui, 1993).
- f) Rojo N°4: es la sal disódica del ácido 3-[(2,4-dimetil-5-sulfofenil) azo]-4-hidroxi-1-naftalensulfónico y está clasificado como CI 14700; comercialmente son cristales rojos, DL50 oral para ratas >2g/kg, máxima absorción a 500nm, soluble en agua (22g/100ml) y muy poco en etanol; algunos países prohíben su uso como colorante sintético (Badui, 1993).
- g) Rojo N°40: se clasifica como CI16035, es una polvo rojo oscuro, estable a pH ácidos, soluble en agua (22g/100ml) y en etanol al 50%.
- h) VerdeN°3: está clasificado como CI 42053, es un polvo verde oscuro o gránulos con lustre metálico, DL50 oral para ratas 2g/kg, de máxima absorción a 628nm, estable en ácidos y soluble en agua (20g/100ml) (Badui, 1993).
- i) El amaranto corresponde a la sal trisódica del ácido azonaftalensulfónico-2-naftol-3,6 disulfó, clasificado como CI 16185; es un polvo rojo-café, de máxima absorción a 522,5 nm, soluble en agua (1g/ 15ml) y poco en etanol, sus soluciones son estables a la luz y su coloración se incrementa en presencia de hidróxido de sodio; algunos países prohíben su uso por considerarlo carcinógeno y teratogénico (Badui, 1993).

Otra forma de clasificar y agrupar a los colorantes sintéticos se hace basándose en toda la información y pruebas de laboratorio disponibles. De esta manera los colorantes sintéticos se agrupan dentro de las siguientes categorías.

Categoría A: Colorantes admitidos para uso alimentario. Categoría B: Colorantes que no han sido lo suficientemente estudiados para ser incluidos en la categoría A. Categoría C-I: Colorantes no estudiados de forma exhaustiva, pero de los cuales ya se tienen bastantes datos obtenidos de los ensayos de larga duración. Categoría C-II: Colorantes con datos inadecuados para su evaluación, pero no se conocen resultados de los ensayos de toxicidad de larga duración, como para relacionarlos con procesos cancerígenos. Categoría C-III: Colorantes de los cuales se tienen pocos datos para evaluarlos, pero que son suficientes como para relacionarlos con efectos perjudiciales para la salud. Categoría D: Colorantes de los cuales se desconocen casi por completo, datos referentes a su posible toxicidad. En la etiqueta debe constar el tipo de colorante, en caso de que el alimento lo contenga.

1.3.7.2. Colorantes Naturales

En la actualidad el uso de colorantes sintéticos en los alimentos están siendo cuestionados por los consumidores a causa de los efectos perjudiciales para la salud y están optando por productos más naturales. Una de las alternativas es el uso de colorantes naturales extraídos de fuentes vegetales (Badui, 2003)

Los colorantes naturales se obtienen por la extracción de materia de origen vegetal o animal o son colorantes inorgánicos de procedencia mineral. Por ser productos de extracción en general no son productos puros sino que se obtienen mezclados con otros componentes del material de partida que pueden ser grasas, carbohidratos o proteínas; sin embargo en algunos casos se ha llegado al aislamiento del colorante puro. Dependiendo de las propiedades químicas del colorante, este puede presentarse en forma hidrosoluble, liposoluble o en ambas.

Buscar tecnologías más amigables con el ambiente llevo a retomar los tintes naturales, ciertamente, el uso de estos pigmentos reduce de manera importante el impacto deletéreo al ambiente ocasionado por efluentes tóxicos en procesos industriales tales como la tinción de fibras textiles (Warmi, 2002).

De acuerdo a su origen, los colorantes naturales se clasifican en dos grandes grupos que son: de origen animal y, de origen vegetal (Delgado et al., 2000). Shirata (1996) clasificó los colorantes naturales en ocho grupos, basándose en la estructura química de sus moléculas; estos grupos son:

1.-

Colorantes flavonoides:

- a) Grupo tanino-pirogallo y catecol. Color café proveniente del castaño.
- b) Derivados de delfinidina. Color azul proveniente de la hierba de pollo (*Alternanthera pungens*).

2.- Colorantes carotenoides

3.- Colorantes tipo quinona (benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas)

4.- Colorantes derivados del indol (color azul proveniente del añil).

5.- Colorantes derivados del dihidropirano (color rojo y violeta obtenidos a partir del palo de Brasil).

6.- Colorantes del grupo de las betalainas (color rojo obtenido a partir del betabel).

7.- Colorantes del grupo de las Xantonas (color amarillo proveniente de líquenes).

8. Colorantes del grupo de las clorofilas (color verde obtenido a de plantas verdes).

Entre los colorantes naturales más utilizados en alimentos en Europa se tienen los siguientes (Tabla 4) (Bridle 1997).

Tabla 4. Colorantes naturales usados en alimentos

Nombre del Colorante	Nombre común	Nombre botánico
Bixia (carotenoide)	Achiote	<i>Bixia Orellana</i>
Crocetina (carotenoide)	Azafrán	<i>Crocus sativus</i>
Betalainas	Betabel	<i>Beta vulgaris</i>
Curcumina	Cúcuta	<i>Curcuma longa</i>
Ácido carmínico	Cochinilla	<i>Dactylopius coccus</i>
Capsantina (carotenoide)	Pimiento rojo	<i>Capsicum annum</i>
Polímeros de antocianinas	Enocianina	
β -caroteno (carotenoide)	Zanahoria	<i>Daucus carota</i>
Luteína (xantofila)	Cempasúchil	<i>Tapetes erecta</i>
Clorofila	Plantas verdes	
Melanoidinas	Azúcar caramelizada	
Melanoidinas	Extractos de malta	

Entre las principales propiedades de algunos de los colorantes naturales más utilizados en la industria de alimentos destacan las siguientes.

Curcumina (E100). Se obtiene a partir de las raíces y los tallos de la cúrcuma. Es de color amarillo y da este tono al polvo de curry. Su ingesta máxima es de 1mg/kg (Badui, 1993).

Riboflavina (E101). Es amarillo y se utiliza en una gran variedad de alimentos: leche, huevos y vegetales. Puede elaborarse también de manera artificial, es poco soluble en agua y su ingesta máxima diaria es de 0,5 mg/kg de peso corporal (Badui, 1993).

La cubierta de las semillas de achiote (*Bixa orellana*) contiene un colorante rojo que se usa en todo el Ecuador para la preparación de distintos tipos de comidas. Los responsables del color son los elementos bixin y norbixin, que son carotenoides solubles en aceites. Una forma típica de preparar un aliño es machacar las semillas de achiote en aceite o manteca y después mezclar con otros condimentos. En la

industria alimenticia, Bixa orellana se usa como colorante de margarina, mantequilla, queso, helado y cereales y se denomina aditivo E-160b o annatto (Giridhar et al., 2014)

El betabel, el pimiento rojo y la zanahoria, que contiene betalaínas, capsantina y β -caroteno, respectivamente, se deshidratan y se muelen, y el polvo resultante se usa para colorear. También se pueden someter a un proceso extractivo y concentración del pigmento. Esto mismo ocurre con el azafrán, la cúrcuma y el achiote o anato; en estos dos últimos es más fácil dicha extracción (Badui, 1993).

En la actualidad el carmín tiene una gran importancia comercial; este compuesto se extrae de los insectos *Dactylopius coccus* (también conocidos como *Coccus cacto*), *Dactylopius indicus* y otros, que reciben el nombre genérico de cochinilla o grama (Badui, 1993).

El producto conocido como cochinilla está integrado por los cuerpos secos de las hembras adultas de estos insectos, y contienen aproximadamente 10% de ácidos carmínicos, 40% de proteína, 12% de cenizas y diversos polímeros estructurales propios del animal. Se requiere alrededor de 130000 insectos para lograr un kilogramo de cochinilla; cuando los cuerpos se muelen se obtiene una masa de color rojo muy intenso, de la cual se puede elaborar diversos derivados comerciales a base de ácido carmínico; un extracto acuoso-alcohólico, con una concentración mínima de 1,8% ácido carmínico; el carmín, que es una laca de aluminio o de aluminio-calcio y que generalmente contienen más del 50% de ácido carmínico, que representa la forma más purificada de este pigmento (Badui, 1993).

Actualmente los colorantes naturales encuentran también aplicaciones en forma comercial en tinciones histológicas, tal es el caso de la hematoxilina que se extrae del palo de Campeche (*Haematoxylum campechianum*); colorantes para teñir el cabello (2-oxi-naftoquinona), en medicamentos el carmín, como reactivos analíticos la curcumina, o bien, como base para tintas de impresión (perezona).

Entre los eventos que han generado el incremento en el uso de los colorantes naturales en alimentos se tienen los siguientes. La eliminación de los colorantes rojos

N°2 y N°6 grado FD&C (Food, Drug and Cosmetics) por la agencia FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de América. Por otro lado, los resultados de estudios recientes atribuyen a los colorantes naturales algunos beneficios farmacológicos y confirman la asociación que muchos consumidores hacen entre colorantes sintéticos y enfermedad (Bridle, 1997).

Entre las alternativas económicamente viables para la sustitución de los colorantes rojos sintéticos en la industria de alimentos, farmacéutica y de cosméticos se encuentran las antocianinas y las betalainas (Wissgott y Bortlik, 1996).

1.4. Uso de la biotecnología en el desarrollo de biocolorantes

Aunque hay un gran número de biocolorantes existentes en la naturaleza, sin embargo, un sinnúmero de ellos están disponibles a partir solo de extractos naturales (Chattopadhyay et al. 2008).

Por lo tanto, la biotecnología podría ser una solución para proporcionar más número de compuestos colorantes que son difíciles de sintetizar por medios químicos u obtenerlos por los métodos tradicionales de extracción. En los últimos años, ha habido una buena aceptación para que se realicen estudios para la producción de biocolorantes a través de la biotecnología. Para la producción biotecnológica de tales colorantes, las plantas y los microorganismos son las fuentes más adecuadas, debido a la cultura y técnicas de procesamiento (Aberoumand, 2011).

Desde hace mucho tiempo se ha investigado la producción de pigmentos de origen natural, aislando, caracterizando y purificando muchos compuestos de este tipo (Durán et al., 2002); los cuales se han obtenido a partir de plantas y microorganismos principalmente. Sin embargo los procesos biotecnológicos, parecen ser una mejor alternativa, para la obtención de estos compuestos. El empleo de microorganismos, especialmente los hongos filamentosos, ha traído consigo la generación de nuevas tecnologías, y nuevos pigmentos; así mismo, la obtención de estos productos, puede reemplazar en grandes partes el uso de colorantes químicos o sintéticos.

Los hongos filamentosos han sido estudiados por su actividad metabólica, en la generación de una cantidad de metabolitos tanto primarios como secundarios (pigmentos), además de su capacidad de producción extracelular, facilitar procesos fermentativos y por los altos rendimientos obtenidos (Carvalho et al., 2003).

1.5. *Phanerochaete chrysosporium*

1.5.1 Generalidades

Los hongos se han descrito tradicionalmente al reino vegetal, a pesar de que no tienen clorofila, tejidos especializados ni flores. No fue sino hasta apenas unos 30 años, cuando se empezó a aceptar la idea de que los hongos son organismos independientes de las plantas y aunque químicamente están muy relacionados con animales, forman un grupo aparte, el llamado Reino de los Hongos o Reino Fungí. La pared celular de los hongos generalmente está compuesta por quitina como la de los animales y no por lignina y celulosa como los vegetales. Además los hongos almacenan glicógeno y no almidón como sucede entre los animales. El hecho de que los hongos formen un reino independiente, se basa en que tienen características propias y a su vez una mezcla curiosa de vegetales y animales (Guzmán, G. 2000).

Todos los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada que utilizan como fuente de energía y de carbono para la síntesis de estructuras celulares. Debido a la rígida pared celular, no pueden fagocitar el alimento; más bien, absorben nutrientes simples y solubles que obtienen mediante la degradación de polímeros complejos con enzimas extracelulares que liberan al medio (Hickman y Perry, 1997).

Los hongos tanto por su capacidad hidrolítica como por su distribución, son los organismos lignocelulósicos por excelencia. Entre ellos existen algunos con mayor capacidad degradativa de lignina: los que producen la llamada “pudrición blanca” que podrían utilizarse en el proceso de bioconversión. Esta categoría definida por el tipo de pudrición que causan en la madera contiene cientos de especies de

Basidiomicetos. Todos son capaces de degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa de la madera, pero la velocidad y extensión de la degradación de cada componente de la pared varía considerablemente (Joselau y Ruel, 1994; Carlile et al., 2001). La clasificación taxonómica del hongo *Phanerochaete chrysosporium* se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Phanerochaete chrysosporium*

Reino	Fungi
Familia	Agaricaceae
Subdivisión	Basidiomiceto
Género	Phanerochaete
Especie	Chrysosporium

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, estos filamentos vegetativos de los hongos reciben el nombre de hifas, las cuales a menudo están divididas por tabiques llamados septos. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. Generalmente todo el cuerpo de un hongo está basado en filamentos uniseriados, ramificados (Miles y Chang, 2001). En la mayoría de los casos ese cuerpo se diferencia en una parte vegetativa que absorbe nutriente, y una parte reproductiva. Principalmente en hongos superiores (Ascomyceto y Basidiomycota) la parte recolectada del hongo no es más que el órgano de reproducción del hongo, llamado carpóforo (Gow, 1995). El verdadero cuerpo del hongo, o cuerpo vegetativo, está escondido, formado por una red de filamentos microscópicos inmersa en el sustrato, llamado micelio. La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular. El desarrollo fúngico se concentra en el ápice de la hifa, con numerosas vesículas liberando enzimas líticas y biosintéticas de la membrana plasmática a una alta velocidad (Carlile et al., 2001).

Los hongos de la pudrición, tanto Ascomycota como Basidiomycota, juegan un papel importante en los bosques por ser los únicos organismos capaces de descomponer

la madera hasta su total mineralización, llegando finalmente a la formación de capas de humus en el suelo. La actividad enzimática de los hongos descomponedores de la madera es de gran importancia tanto a nivel ecológico como industrial ya que su complejo enzimático especializado de peroxidasa, lacasa y celulasas como la celobiosa deshidrogenasa, tienen gran importancia dentro del ciclo del carbono. Por otro lado, su actividad enzimática presenta una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas en la industria del papel, de textiles y tintes, de alimentos y en procesos de detoxificación. Hasta ahora, las enzimas más estudiadas de los hongos de la pudrición han sido la manganeso peroxidasa, la lignina peroxidasa y la lacasa; la celobiosa deshidrogenasa se conoce hace poco tiempo en relación a las otras enzimas.

El conocimiento acerca del papel de los hongos en la pudrición de la madera se hizo efectivo al final del siglo XIX. Sin embargo, la asociación entre los hongos y la pudrición de la madera siempre ha sido notable, encontrando que la descomposición de esta involucra el crecimiento espontáneo de los hongos (Rayner y Boddy, 1988).

En la tecnología industrial se habla de varios tipos de pudrición, según si el hongo se alimenta de lignina de la madera o de la celulosa. En realidad, en un ataque de pudrición se suelen desarrollar muchos tipos de hongos, cada uno de los cuales actúa en un determinado intervalo de degradación (Vignoth et al., 1981). Las principales categorías de ataque y de las condiciones en que ellos crecen son la pudrición blanda, pudrición café y la pudrición blanca (Luley, 2006).

1.5.2. Pudrición blanda

Ocurre cuando el daño causado por el microorganismo es muy superficial. La madera pierde fuerza mecánica y se torna húmeda y esponjosa. Es causada por Ascomycetes y Deuteromycetes, e inicialmente puede caracterizarse por cadenas de cavidades longitudinales con puntos cónicos en la capa de la pared (Montoya, 2008). Alrededor de las hifas se genera una destrucción localizada de la celulosa, formando

una cavidad en la pared secundaria. Algunos de los hongos causantes de este tipo de pudrición son *Chaetomium globosum* y *Daldinia concéntrica* (Moore, 1998).

1.5.2.1. Hongos de la pudrición blanda

La pudrición de la madera, es una alteración provocada por algunas especies de hongos denominados de la pudrición que se han especializado en alimentarse de la pared celular constitutiva de la madera, causando por ello una pérdida de resistencia, que si el ataque es importante, impide cualquier tipo de aplicación de ésta, dado que su resistencia se anula, pudiendo desintegrarse por la simple acción de la presión de los dedos (Vignoth et al., 1981).

1.5.3. Pudrición café

Es causada principalmente por basidiomicetes, los cuales degradan la hemicelulosa y la celulosa despolimerizada (Luley, 2006). Los carbohidratos son removidos, pero la lignina es modificada solamente hasta cierto límite (Rayner y Boddy, 1988). La madera toma un color café oscuro debido a la degradación de la celulosa que es de color blanco, quedando el color café de la lignina residual. La descomposición de la celulosa ocurre a cierta distancia de la hifa, mediante un sistema celulítico difusible y un proceso no enzimático mediado por peróxido de hidrogeno e iones de manganeso. Este grupo de hongos representa solo el 7% de los basidiomicetes causantes de pudrición en la madera (Martínez et al. 1996).

1.5.3.1. Hongos de la pudrición café

Entre los hongos que causan la pudrición café esta *Fomitopsis pinicola*, *Poria placenta*, *Tyromyces palustres* y *Gloeophyllum trabeum* (Markham, 1998). Los hongos de la pudrición café pertenecen al grupo de los ascomicetos. Estos hongos son capaces de degradar celulosa y hemicelulosa, dejando a la lignina más o menos intacta como una capa de color café (de ahí su nombre). Sin embargo, probablemente modifican la estructura de la lignina, al menos al grado de que no forma complejos químicos con la celulosa (Vignoth et al., 1981).

1.5.4. Pudrición blanca

Ocurre cuando los microorganismos que atacan la madera degradan profunda y completamente los compuestos lignocelulósicos. Los hongos de la pudrición blanca están implicados en la degradación de la mayoría de las estructuras químicas que componen la madera incluyendo la celulosa, aunque la lignina es el principal compuesto degradado (Rayner y Boddy, 1988). Por tal razón la madera toma una apariencia blanquecina, humedad, blanda, espinosa y en las etapas avanzadas la madera se debilita notablemente (Martínez, 2002). La apariencia de la madera con pudrición blanca es fibrosa, debido a que parte de la celulosa permanece intacta hasta las etapas tardías del proceso.

Generalmente es menos fibrosa en maderas duras que en maderas blandas (árboles de coníferas), debido a las fibras cortas que poseen las maderas duras. Usualmente la madera se vuelve blanquecina debido al blanqueamiento producido por la oxidación y a la pérdida de lignina, la cual es ligeramente café. El color y la textura dependen del hongo causante de la pudrición (Worrall, 2005). Se conocen dos formas de pudrición blanca: la deslignificación selectiva ocurre en angiospermas y coníferas. En este proceso las poliosas (hemicelulosa) y la lignina son atacadas generalmente en estados tempranos, y posteriormente es atacada la celulosa (Zabel y Morrel, 1992). Como ejemplos de los hongos que causan la pudrición blanca están *Phanaerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*.

1.5.4.1. Hongos de la pudrición blanca

En la naturaleza, los hongos de la pudrición blanca (PB) son basidiomicetos, comunes en bosques de pino y encino (Christian et al., 2005), la nominación de hongos PB, deriva de su capacidad de mineralización de la lignina y sus derivados que le da a la madera un aspecto blanquecino (Poiting, 2001), estos hongos realizan una función natural esencial en la conversión de la lignina cuya producción es de 20.3×10^{12} kg/año, este es un polímero polifenólico heterogéneo que se degrada por oxidación. El reciclaje de lignina por hongos de la PB, es un factor fundamental del

ciclo del carbono en los bosques, una de las mayores reservas de carbono orgánico del suelo.

Estos hongos de la PB producen enzimas oxidativas extracelulares únicas que inicialmente actúan sobre polímeros aromáticos complejos naturales como la lignina. Ejemplos importantes de estas enzimas son las peroxidasas de tipo heme, lignina peroxidasas (LiP) y peroxidasa dependiente de manganeso (MnP) así como la fenol oxidasa con contenido de cobre y lacasa (Cabral, 2004).

Aunque existen varios grupos de organismos capaces de degradar lignina, son los hongos lignolíticos pertenecientes al grupo “de la podredumbre blanca de la madera” (“White rot fungi”, WRF), los principales responsables de la mineralización de este polímero. Tras la degradación de la lignina se acumulan celulosa y hemicelulosa que son las responsables del color blanquecino característico que aparece durante la degradación de la madera por estos hongos (Cheng y Chang, 1985). Aunque *Phanerochaete chrysosporium* es el hongo mejor conocido del grupo, no es el más selectivo en la degradación de la lignina (Broda et al., 1996). Los hongos basidiomicetos lignolíticos producen un conjunto de enzimas extracelulares para metabolizar la lignina que les confieren, asimismo, la capacidad de degradar un amplio abanico de contaminantes (Mc Eldowney et al., 1993)

1.6. Bioquímica de la mineralización de la lignina

Los hongos de la PB, secretan una o más de las tres enzimas extracelulares oxidativas esenciales en la mineralización de lignina: la lignina peroxidasa, que por síntesis endógena de H_2O_2 , oxida veratril alcohol, a la vez oxida compuestos aromáticos no fenólicos. En la reacción se generan radicales arilo y alquilo que anabolizan intracelularmente: la manganeso peroxidasa, que oxida componentes fenólicos de la lignona, mediante la reacción de oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} , la cual es dependiente del H_2O_2 , y la lacasa, una fenol oxidasa con cobre, que oxida anillos de lignina: como la glioxal oxidasa y la superóxido dismutasa que sintetiza el H_2O_2 necesario para la actividad de la LiP y la MnP; mientras otras enzimas fúngicas

funcionan como enlace entre las rutas de mineralización de la lignocelulosa, como: la glucosa oxidasa, la aril alcohol oxidasa, la celobiosa quinona oxidoreductasa y la celobiosa deshidrogenasa (Poiting, 2001).

La síntesis fúngica de la LiP y la MnP se realiza bajo una alta tensión de oxígeno, se reprime en agitación o cuando los hongos de la PB, se cultivan en medio líquido, sin embargo la lacasa se sintetiza solo en agitación, estas tres enzimas son inespecíficas y se inducen en condición limitante de nutrientes, como la fuente de nitrógeno (Christian et al., 2005). Este complejo enzimático inespecífico fúngico extracelular, tiene potencial en la eliminación de xenobioticos con estructura química similar a la lignina tales como aromáticos policiclicos, herbicidas, pesticidas, detergentes clorofenoles y colorantes (Poiting, 2001).

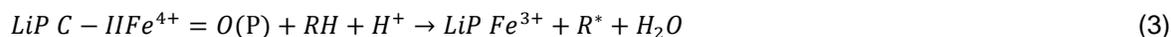
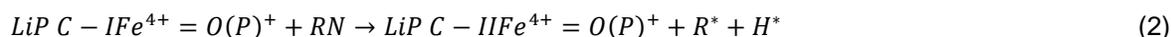
1.6.1. Degradación de la lignina por los hongos de la pudrición blanca

La degradación de la lignina por estos hongos es un proceso oxidativo, multienzimático e inespecífico, en el que participan enzimas lignolíticas y otras enzimas, junto con metabolitos aromáticos sintetizados por los hongos (Higuchi, 1990; 2004). Se han identificado dos familias de enzimas lignolíticas extracelulares, las peroxidasas y las lacasas. Estas enzimas son capaces de oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos y se diferencian en sus requerimientos catalíticos, potencial de óxido-reducción, y en su modo de acción que puede ser directo o indirecto (mediante la cooperación de intermediarios (Daniel et al., 1989; Sutherland et al., 1991).

1.6.2. Peroxidasas lignolíticas

1.6.2.1. Lignina peroxidasa (LiP) EC 1.11.1.14

Esta enzima fue descrita por primera vez en *P. chrysosporium* (Tien y Kirk, 1983; Glenn et al., 1983). Es una glucoproteína monomérica que contiene un grupo hemo. El ciclo catalítico de esta peroxidasa comienza con la oxidación de la enzima por peróxidos, dando lugar al compuesto I, que contiene un complejo oxo-Fe⁴⁺ radical catiónico de la porfirina (Schoemaker et al., 1994) (1). El compuesto I es reducido en dos pasos consecutivos por compuestos aromáticos, para formar el compuesto II y la enzima nativa (2) (3). El exceso de peróxido da lugar a una reacción irreversible en la que se forma el compuesto III que es inactivo (4). La LiP se diferencia de otras Peroxidasas por su alto potencial de óxido-reducción, lo que le permite oxidar directamente compuestos aromáticos no fenólicos, y por tanto, la mayor parte de las unidades de la lignina (Tien, 1987).

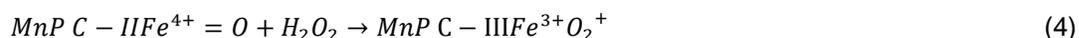
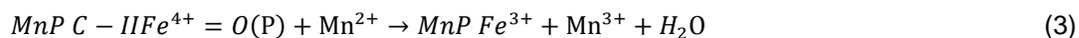
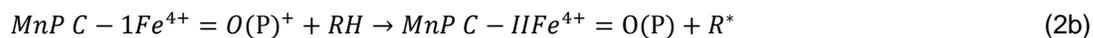
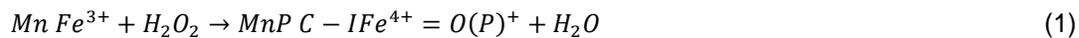


En el hongo *P. chrysosporium* se han encontrado al menos 8 isoenzimas de esta enzima, siendo la H8 la mejor caracterizada (Tien y Kirk, 1998). Tras clonar los genes de varias isoenzimas (Pribnow et al., 1989), se ha comprobado que no responden de la misma manera a los factores reguladores.

1.6.2.2 Manganeso peroxidadas (MnP) EC 1.11.1.13

Más frecuente que la producción de LiP es la producción de peroxidadas que oxidan el Mn^{2+} a Mn^{3+} en presencia de peróxidos. Estas Peroxidadas manganeso dependientes se han descrito en la mayoría de los hongos lignolíticos de la podredumbre blanca de la madera (Hatakka, 1994). El Mn^{3+} formado en la reacción es un fuerte oxidante, que estabilizado con ácidos dicarboxílicos secretados por el hongo, actúa como intermediario en la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos (Hammel et al., 1989). El ciclo catalítico de la MnP es semejante al de otras Peroxidadas incluidas la LiP y transcurre a través de la formación de intermediarios de la enzima MnP C-I y MnP C-II.

El primer producto de la reacción de la MnP nativa con el peróxido de hidrogeno es el compuesto I (1). La reducción mono electrónica del compuesto I por Mn^{2+} conduce al compuesto II que de nuevo se reduce por Mn^{2+} (2b), el compuesto II de la MnP (2a), por otros donadores como los fenoles (2b), el compuesto II de la MnP solo puede ser reducido por Mn^{2+} por lo que depende de este catión para cerrar su ciclo (3). Al igual que la LiP la MnP es sensible a altas concentraciones de H_2O_2 que provocan la inactivación reversible de la enzima al compuesto III que es un estado de oxidación inactivo catalíticamente (4).



La mayoría de estas peroxidadas se caracterizan por depender del Mn^{2+} para cerrar su ciclo catalítico (reducción del compuesto II de la enzima) (Schoemaker et al., 1994). Son enzimas que solo actúan de manera indirecta sobre la lignina. En *P.*

chryso sporium se han detectado varias isoenzimas codificadas por tres genes (Pease y Tein, 1992).

Además de estas Peroxidasas dependientes de Mn^{2+} , se han encontrado más recientemente en varios hongos del género *Pleurotus* (Martínez et al., 1996; Sarkar et al., 1997) y en *Bjerkandera adusta* (Heinfling et al., 1998) otras Peroxidasas que oxidan eficazmente el Mn^{2+} y que no dependen de él para cerrar su ciclo catalítico. Son Peroxidasas que pueden oxidar compuesto aromáticos de forme directa (independientes de Mn^{2+}) e indirectamente (con Mn^{2+}).

En *Pleurotus eryngii* se ha purificado una de estas enzimas y se ha comprobado que comparte propiedades catalíticas de la LiP y de la MnP de otros basidiomicetos. Además es capaz de oxidar fenoles y colorantes que no pueden oxidar directamente las LiPs ni las MnPs “convencionales” (Camarero et al., 1999).

1.6.2.3. Lacasas EC.1.10.3.2

Las enzimas lacasas son fenoloxidasas ampliamente distribuidas en plantas, hongos de diferentes clases (Gianfreda et al., 1999) y algunas bacterias (Diamantidis et al., 2000). Fueron descubiertas en el látex de la planta *Rhus vernicifera* (Thurston, 1994), como la sustancia termolábil responsable del endurecimiento de la resina. En las plantas la lacasa tiene una función protectora frente a lesiones sufridas por el vegetal, pues la oxidación de fenoles del látex por la lacasa provoca radicales libres que tienden a polimerizar lo que origina una cubierta protectora en la lesión.

La función de la lacasa en los hongos no está clara, se ha relacionado con la morfogénesis, con la pigmentación de los conidios, con la formación de rizomorfos, con el desarrollo de cuerpos fructificantes (Thurston, 1994) con la patogénesis (Lewis y Yamamoto, 1990) y en la protección frente a compuestos fenólicos tóxicos liberados durante la degradación de la lignina (Bollag et al., 1988).

1.6.2.4. Metabolitos de bajo peso molecular

Los hongos ligninolíticos se caracterizan por producir gran cantidad y variedad de metabolitos extracelulares (Shimada e Higuchi, 1991). Algunos de estos compuestos participan en la degradación de la lignina; como mediadores de las enzimas lignolíticas como el alcohol veratrílico o el ácido hidroxiantranílico mediadores de la LiP (Cancel et al., 1993) y la lacasa (Eggert et al., 1996a); otros como sustratos de las enzimas (como el glioxal o metilglioxal) para la glioxal oxidasa o los ácidos dicarboxílicos que estabilizan al Mn^{3+} producido por la MnP (Kishi et al., 1994). Además de estos metabolitos aromáticos estos hongos producen también especies reducidas del oxígeno como H_2O_2 , anión superóxido (O_2^-) y radical hidroxilo (OH) que es un oxidante fuerte (Backa et al., 1993).

1.6.2.5. Actividad lignolítica

Phanaerochaete chrysosporium produce el sistema enzimático lignolítico durante el metabolismo secundario, en respuesta a la limitación en nitrógeno, carbono o azufre (Dosoretz y Grethelein, 1991; Faison y Kirk, 1985; Jeffries et al., 1981; Kirk et al., 1978). Sin embargo, en otros hongos de la podredumbre blanca de la madera, la degradación de la lignina se produce bajo condiciones de exceso en carbono y nitrógeno (Périé y Gold, 1991). De forma general en los laboratorios, la producción de enzimas lignolíticas y la propia ligninólisis se producen bajo elevadas tensiones de O_2 (Ríos y Eyzaguirre, 1992). Otros factores que afectan a la ligninólisis son la agitación de los cultivos, de forma diferente dependiendo del hongo (Waldner et al., 1988), y la presencia de un surfactante.

En los WRF, la acumulación de las enzimas extracelulares ligninolíticas puede variar dependiendo no solo de la especie de hongo, sino también de las condiciones ambientales (Tour et al., 1995). Además, aunque en ciertos hongos se detectan secuencias génicas que hibridan con sondas de la LiP de *P. chrysosporium*, no se detecta LiP en sus cultivos (Rüttimann et al., 1992).

La complejidad en la producción de las enzimas ligninolíticas se encuentra ilustrada por la lacasa de *P. chrysosporium*. Este hongo se consideró como una excepción entre los hongos de la podredumbre blanca de la madera por su incapacidad de producir lacasa (Gold y Alic, 1993). Sin embargo, en 1995, se detectó lacasa en cultivos con celulosa como fuente de carbono y más recientemente se purificaron parcialmente varias fracciones proteicas con actividad lacasa (Dittmer et al., 1997). Dado que en el genoma de *P. chrysosporium* no se han encontrado genes de lacasas, es probable que estas actividades enzimáticas pudieran corresponder a alguna de las multicobre oxidasas (MCOs) descritas más recientemente (Larrondo et al., 2004).

En otras especies del mismo género, como en *P. sórdida*, no se ha detectado lacasa (Rüttimann et al., 1994); en *P. laevis* no se detectó LiP, pero en cambio se detectaron elevados niveles de MnP y lacasa (Bogan y Lamar, 1996). En *P. flavido-alba*, se purificó una lacasa (Pérez et al., 1996) y se describieron también varias MnPs y LiPs (Ben et al., 1997).

La lacasa presenta una amplia especificidad de sustrato puesto que cataliza la oxidación de orto y para difenoles, amino fenoles, dímeros de lignina fenólicos e incluso no fenólicos en presencia de algunos intermediarios, (Kawai et al., 1987; Hatakka et al., 1991). La oxidación puede estar controlada por las diferencias en potencial redox entre los sustratos reductores y el cobre tipo 1 de la lacasa (Thurston, 1994).

En general las lacasas tienen baja especificidad por estos sustratos en relación al oxígeno. La oxidación mono-electrónica de un sustrato por la lacasa implica la formación de un radical libre. Estos radicales posteriormente pueden ser oxidados a quinonas por la enzima o bien sufrir reacciones no enzimáticas variadas. La oxidación de fenoles frecuentemente produce reacciones de acoplamiento carbono-carbono o carbono-oxígeno entre los radicales lo que origina productos de mayor peso molecular que los sustratos, es decir, reacciones de polimerización. La tendencia de esta enzima de provocar polimerización no es una desventaja en

biorremediación ya que la polimerización oxidativa de los contaminantes puede ser un método aceptable para su eliminación.

Mientras que las lacasas solo pueden oxidar directamente subunidades fenólicas de lignina (más fáciles de oxidar pero menos abundantes), pueden reaccionar indirectamente con componentes no fenólicos de la lignina mediante la participación de mediadores redox que son compuestos de bajo peso molecular fácilmente oxidados por estas produciendo radicales muy inestables y muy reactivos que a su vez pueden oxidar sustratos más complejos. Se han citado mediadores sintéticos como el [2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazonil-6-sulfonato)] o 1-hidroxibenzotriazol (Bourbonnais et al., 1997; Pickard et al., 1999) y naturales como 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzol y 3-hidroxiantranilato (Bourbonnais y Paice, 1990, Eggert et al., 1996,1997).

La producción enzimática depende no solo del tipo de hongo sino de las condiciones nutricionales empleadas, de la presencia o ausencia de inductor, tiempo de inducción, naturaleza y composición del medio de cultivo y sobre todo de la manipulación genética. Los principales inductores de esta actividad incluyen compuestos fenólicos relaciones con la lignina (Gianfreda et al., 1999) aunque también compuestos no derivados de la lignina y diferentes extractos vegetales de diversa naturaleza han demostrado la inducción de lacasa de *Phanerochaete flavidobalba* por alpechín.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO

2.1. Justificación

Debido a sus efectos toxicológicos en los humanos y a la contaminación ambiental que se origina durante su producción, en los últimos años ha surgido la necesidad de reemplazar los colorantes sintéticos que se emplean en la elaboración de alimentos y productos farmacéuticos, por colorantes de origen natural, menos tóxicos para los humanos y más amigables con el medio ambiente; así mismo, desarrollar procesos biotecnológicos para aumentar la eficiencia en la extracción de dichos colorantes, minimizando así la generación de residuos con impacto negativo al ambiente.

2.2. Hipótesis

El uso de microorganismos lignocelulósicos tales como *Phanerochaete chrysosporium* incrementa el rendimiento del proceso de extracción del pigmento presente en la madera de guamúchil (*Pithecellobium dulce*).

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo General

Extraer por método químico y microbiológico, el compuesto colorido presente en la madera de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) y realizar la caracterización química del mismo.

2.3.2. Objetivos Específicos

- 1) Determinar la composición química porcentual de la madera de guamúchil (*Phithecellobium dulce*).

- 2) Determinar las condiciones óptimas para la extracción química del pigmento presente en la madera de guamúchil.
- 3) Determinar las condiciones óptimas para la extracción microbiológica del pigmento presente en la madera de guamúchil.
- 4) Comparar los rendimientos del pigmento obtenido por ambos métodos de extracción.
- 5) Realizar la caracterización química del pigmento obtenido

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materia Prima

El tronco de un árbol de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) de aproximadamente 20 años de edad fue colectado en la comunidad de Pueblo viejo, Michoacán. Se usó la cepa de *Phanaerochaete chrysosporium* que fue donada por el laboratorio de Biotecnología Ambiental (Micorremediación y Fitorremediación de Suelos y Agua), de la colección de la Universidad Autónoma de Aguascalientes

3.2. Materiales y Equipo de Laboratorio

3.2.1. Materiales

Los de uso común en el laboratorio

3.2.2. Reactivos

Benceno, Alcohol etílico absoluto, Éter etílico anhidro, Ácido sulfúrico (95-98%), Dicromato de potasio, Ácido acético glacial, Clorito de sodio (80-85%), Acetona, Agar extracto de malta DIFCO y Reactivo Brandford; todos ellos grado reactivo analítico y adquiridos de la empresa SIGMA, México.

3.2.3 Equipo

- a. Bomba de vacío SIEMENS, modelo: IRF3 052-4YC31
- b. Balanza Analítica marca STARTORIUS, modelo: BL 120-S, Alemania.
- c. Balanza granataria Triple Beam Balance, OHAUSR, U.S.A
- d. Desecador NALGENE Modelo: 150MM, Jalisco, México.
- e. Equipo Soxhlet marca TAURO
- f. Estufa de secado digital FELISA, modelo FE-291D, Jalisco, México.
- g. Espectrofotómetro UV/Vis Smartec Plus marca Bio-Rad
- h. Espectrofotómetro Infrarrojo Perkin-Elmer, Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectromer.

- i. Licuadora Osterizer
- j. Mufla marca FELISA modelo FE-260, Jalisco, México.
- k. Placa de Calentamiento marca LINDBERG, modelo 53066, México, D.F
- l. Refrigerador marca General Electric modelo turbo plus cooling system
- m. Rotor Lab. Depot, Dawsonville, GA, USA.
- n. Tamices DAIGGER, U.S. estándar del no. 20, 40, 60, 80, 100 y 120. U.S.A.
- o. Vortex.
- p. IdentifyIR® Portable FT-IR Spectrometer

3.3 Métodos

3.3.1. Acondicionamiento de la materia prima.

Se obtuvo el tronco de un árbol de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) de aproximadamente 20 años de edad y colectado en la comunidad de Pueblo viejo, Michoacán, fue triturado mediante un molino Pulvex modelo 200. El pulverizado que se obtuvo fue separado con una malla de 200 mm de apertura y el polvo fue envasado en un frasco de vidrio con tapa hermética y almacenado en un lugar fresco y seco para su posterior análisis y aplicaciones.

3.3.2. Composición química porcentual

3.3.2.1. Determinación de humedad

De acuerdo con la norma TAPPI T 12 os-75 el contenido de humedad de la madera libre de extractos. Tal determinación consistió en pesar 2 gramos (g) de muestra en un crisol de peso conocido. Posteriormente la muestra se secó en un horno a 105 ± 3 °C durante 2 horas, se dejó enfriar en un desecador y se volvió a pesar. Se continuó secando en el horno por períodos de 1 hora hasta que se obtuvo un peso constante. El contenido de humedad en la madera se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de Humedad} = (P_m - P_s) / M \times 100$$

Dónde:

P_m = peso de la cápsula más la muestra húmeda en gramos.

P_s = peso de la cápsula más la muestra seca en gramos.

M = peso de la muestra húmeda en gramos.

3.3.2.2. Determinación de cenizas

Para la determinación de cenizas se usó la norma TAPPI T 15 os-58. Se tomaron 4 g de madera libre de extractos, colocándose en un crisol de peso conocido. La madera se secó hasta obtener un peso constante. Después se quemó directamente con una flama hasta que ésta desapareció y se introdujo en una mufla a 575 ± 25 °C durante un período de 3 horas o hasta que todo el carbón se quemó, indicado por la desaparición de partículas negras. La muestra se dejó enfriar en un desecador y se pesó. El porcentaje de cenizas se calculó en base al peso anhidro de la muestra (Honorato y Hernández, 1998).

3.3.2.3. Determinación de componentes extractivos orgánicos

La determinación de extractivos solubles en etanol-benceno se llevó a cabo de acuerdo a la norma TAPPI 204- os-76 (modificada). Aproximadamente 10 g de madera molida seca se depositan en un dedal de extracción. El dedal se coloca en un equipo de extracción tipo Soxhlet con 150 mL de una mezcla de alcohol- benceno (1:2 v/v) y se ajusta al calentador de tal forma que la velocidad de evaporación recircule el solvente 6 veces por hora durante 8 h. Después de la primera extracción se sigue con una extracción con acetona (150 mL) durante 8 h, posteriormente se hace otra extracción con etanol (150 mL) durante 8 h y finalmente una extracción con agua durante 8 h. El solvente se evapora a 80°C y el matraz bola de peso conocido se deja secar en la estufa a 105 ± 3 °C durante 12 h y así para cada una de las

extracciones con los diferentes solventes. El contenido de componentes extractivos se obtiene mediante la aplicación de la ecuación.

$$\text{Extractivos (\%)} = (\text{Pe} - \text{Prs}) / \text{Pm}$$

Dónde:

Pe: Peso seco del extracto

Prs: Peso seco del residuo del solvente

Pm: Peso seco de la muestra de manera

3.3.2.4. Determinación de lignina insoluble en ácido.

Se determina de acuerdo a la norma TAPPI T222 os-74. Se usa 1 g de material libre de extractivos, se agregan 15 mL de H₂SO₄ al 72 % (v/v). Se mezcla durante 60 min a 30°C. Luego se agregan 56 mL de agua destilada lo cual hace que la concentración del ácido disminuya hasta el 4% (p/p). Esta solución se calienta en una autoclave a 121°C durante 60 minutos. Posteriormente se filtra y se lava con agua destilada para someterla finalmente a un proceso de secado, en donde el peso final es la lignina ácido insoluble, cuyo concentración (%) se obtiene mediante la ecuación

$$\text{Lignina insoluble en acido (\%)} = \frac{\text{Peso de la lignina}}{\text{Peso seco de la muestra}} \times 100$$

3.3.2.5. Determinación de celulosa y hemicelulosa

El contenido de celulosa se determina usando la norma ASTM 1695-77. Se toman 1.5 g de holocelulosa libre de extractivos y se agregan 10 mL de NaOH al 17.5% p/v, a una temperatura constante de 20°C en un baño termorregulador. Después de 2 minutos se agregan 5 mL de la solución de NaOH 17.5% p/v, en intervalos de 5 minutos hasta completar 25 mL de NaOH en total, incluyendo la cantidad inicial. Luego de esto se deja la mezcla a 20°C durante 30 minutos, para un total de 45

minutos. Pasados los 45 minutos se agregan 33 mL de agua destilada a 20°C y el sólido se deja reposar por 1 hora antes de filtrar.

Se usa papel filtro de porosidad media a peso conocido para llevar a cabo la filtración, lavando con agua destilada. Luego a la celulosa recogida en el papel se le agregan 15 mL de ácido acético al 10% v/v. El ácido es retirado pero no en su totalidad, solo para que el sólido celulósico quede ligeramente cubierto por 3 minutos. Posteriormente se retira el ácido acético remanente por succión y se efectúan lavados hasta que la concentración de ácido sea la mínima posible.

Finalmente se seca el papel con la celulosa. El peso de celulosa se determina como la diferencia entre el peso del crisol con sólidos y el peso del papel vacío. La hemicelulosa se determina haciendo la diferencia entre la cantidad inicial de holocelulosa libre de extractivos y la cantidad de celulosa determinada aplicando la metodología anterior (Triana, 2010).

3.3.3. Extracción del pigmento mediante el empleo de solventes

3.3.3.1. Pruebas de solubilidad

Se realizaron pruebas de solubilidad del pigmento, colocando 5 g de viruta obtenida del duramen del guamúchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb.)), en tubos de ensaye que contienen 10 mL de disolventes de diferente polaridad, tales como etanol, metanol, acetona, éter etílico, hexano, cloroformo y agua. Los tubos se agitaron inicialmente para homogeneizar su contenido y se mantuvieron en reposo durante 24 horas a temperatura de laboratorio (25°C). Posteriormente los extractos fueron filtrados a través de papel filtro y las longitudes de onda de máxima absorbancia se determinaron mediante un análisis de barrido en el espectrofotómetro, dentro del espectro visible (400 – 700 nm). La selección del disolvente se hizo considerando la intensidad del color de la disolución, así como el costo y la toxicidad del disolvente en cuestión.

3.3.3.2. Obtención de los extractivos

El procedimiento consistió en una extracción sólido-líquido a reflujo por lotes y con recuperación de disolvente (Figura 6). Con el fin de determinar las condiciones necesarias para obtener el mayor rendimiento de pigmento en el mínimo tiempo y gasto de solvente, se llevaron a cabo una serie de extracciones utilizando la mínima cantidad de solvente (200 mL) que permitió cubrir la madera 15 g de residuo (viruta, aserrín, harina).

Se realizó una extracción total la cual constó de tres fases, la primera extracción se llevó a cabo durante tres horas monitoreando el cambio de color por espectrofotometría, el proceso de extracción se siguió a través de la medición de absorbancia en el extracto a 450 nm, cada 15 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos las dos horas siguientes haciendo una extracción total en un tiempo de 9 horas, realizando un cambio de solvente cada 3 horas. Después de las 9 horas se suspendió el calentamiento y se filtraron las muestras. El filtrado fue recuperado en el evaporador rotatorio, dejando unos 10 mililitros los cuales fueron evaporados, secados y se registró su peso. El etanol recuperado fue utilizado para realizar una re-extracción.

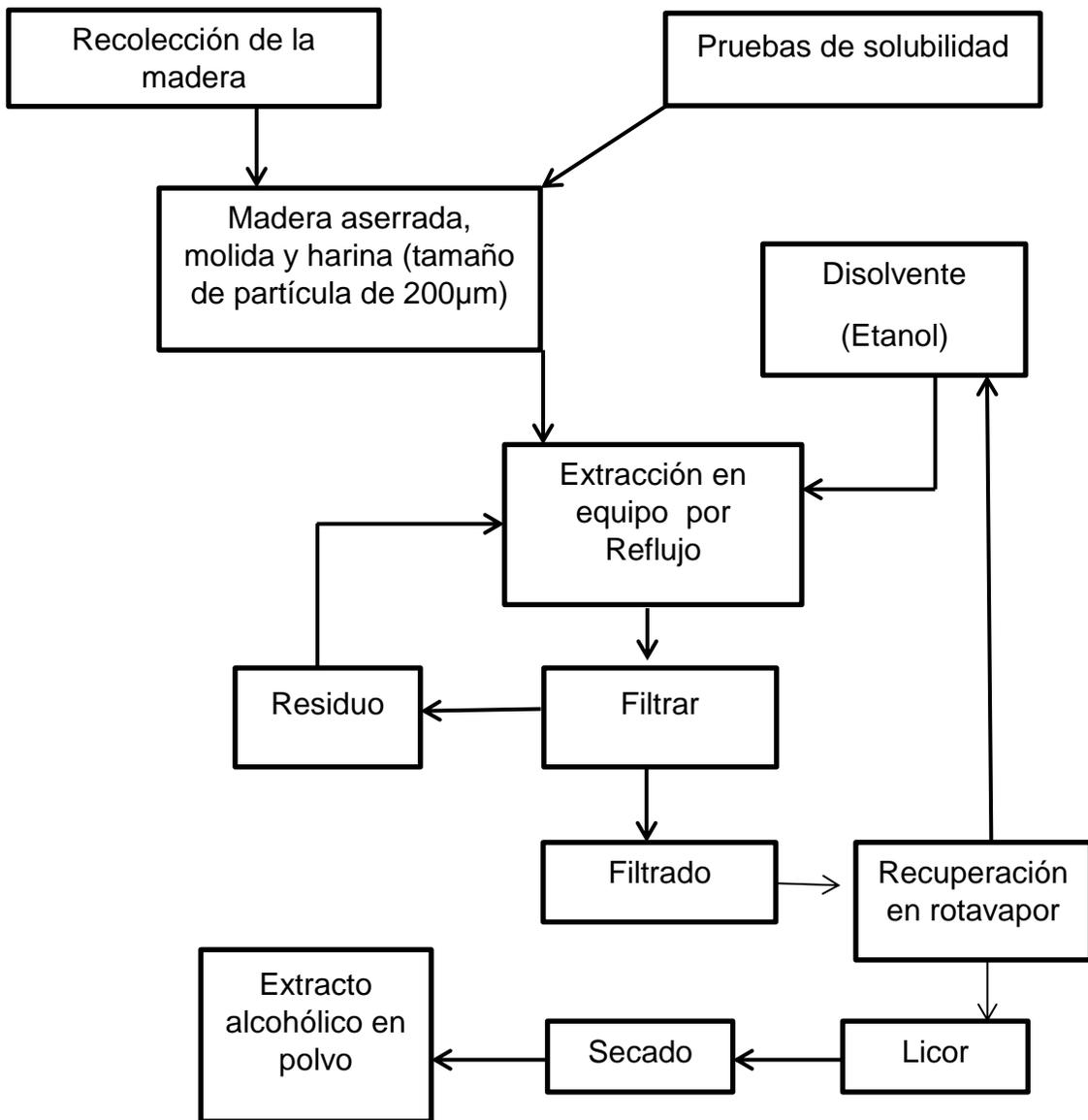


Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de obtención de los extractivos de la madera del guamúchil (*P. dulce*)

3.3.4. Extracción del pigmento mediante el empleo de microorganismos (*Phanaerochaete chrysosporium*)

3.3.4.1. Preparación y recuperación de la cepa

Se usó la cepa de *Phanaerochaete chrysosporium* de la colección de la Universidad Autónoma de Aguascalientes que fue donada por el laboratorio de Biotecnología Ambiental (Miorremediación y Fitorremediación de Suelos y Agua). Se mantuvieron en agar extracto de malta a 4°C. A partir de este momento, fueron transferidas a placas Petri (10.0 g/L de glucosa, 3.5 g/L de extracto de malta y 15.0 g/L de agar) y llevadas a incubación durante 5 días. La temperatura de incubación para *P. chrysosporium* fue de 30 a 37°C respectivamente. La preparación de los inóculos para todos los experimentos se llevaron a cabo transfiriendo de 1 a 3 trozos cuadrados de agar colonizado desde las cajas Petri (Figura 7).



Figura 7. Mantenimiento de la cepa de *P. chrysosporium* e inoculación a placas con madera de guamúchil.

3.3.4.2. Cultivos en fase sólida / Pretratamiento microbiológico

La evaluación de la producción de biomasa se realizó variando el tamaño de partícula del residuo en un sistema de fermentación. Se colocaron de 3 a 5 g del

material seco y estéril en placas Petri por triplicado con un trozo de 1 cm de diámetro promedio, con 10 mL de caldo Sabouraud y/o agua destilada estéril, se incubaron a 30 °C durante 12, 24, 120 y 360 horas (Figura 8).



Figura 8. Crecimiento de *P. chrysosporium* en aserrín

3.3.4.3. Efecto del tiempo de digestión microbiológica de la madera del guamúchil en la extracción del pigmento

En la Figura 9 se presenta el diagrama de flujo empleado en la extracción microbiológica del colorante presente en la madera de guamúchil (*Pithecellobium dulce*). El etanol recuperado se utilizó para realizar las re-extracciones necesarias para agotar el pigmento presente en la madera, manteniendo siempre la misma relación madera-disolvente.

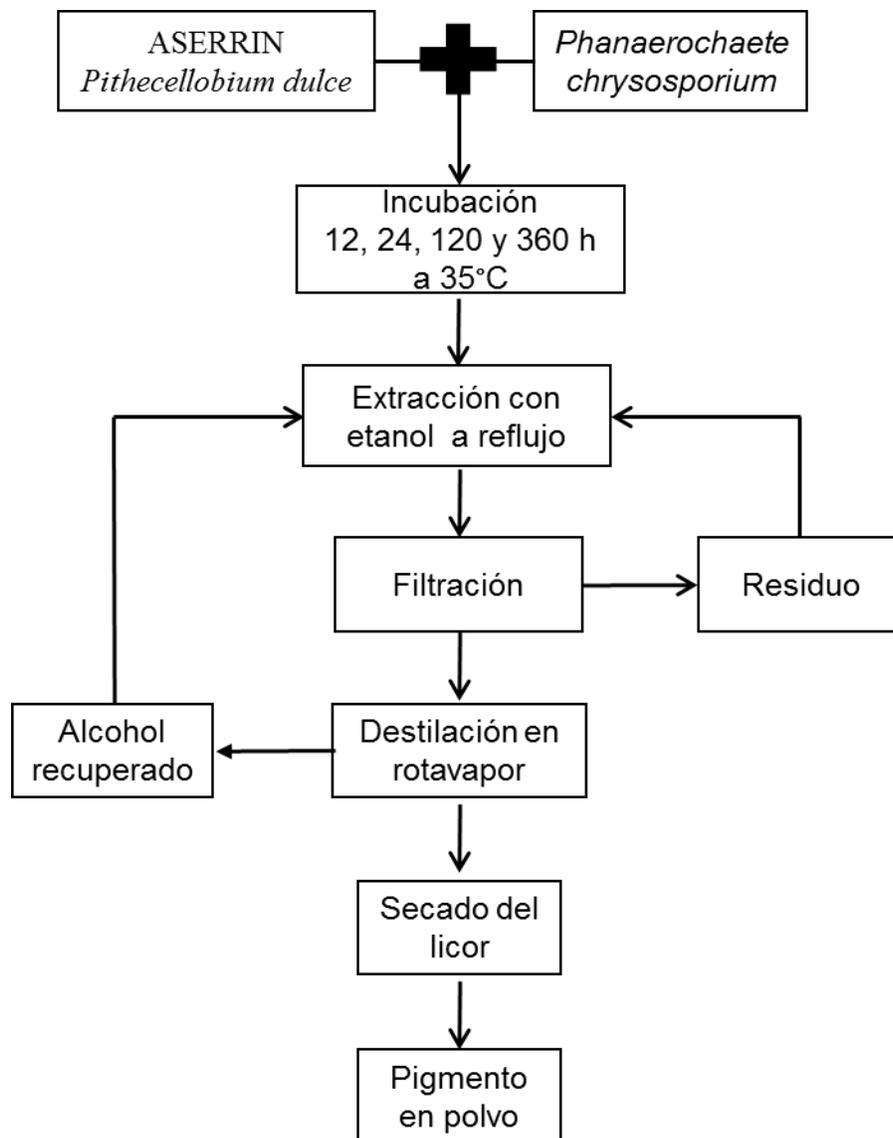


Figura 9. Diagrama de flujo del efecto del tiempo de digestión en la extracción microbiológica del pigmento presente en la madera del guamúchil (*P. dulce*).

3.3.5. Efecto del pH en la estabilidad del pigmento

La estabilidad del color al pH fue determinada por espectrofotometría visible a la longitud de onda de máxima absorbancia del pigmento, de acuerdo a la metodología propuesta por Barragán (2001), la cual consistió en lo siguiente: Se preparan soluciones del colorante en polvo a una concentración de 1 mg/mL, utilizando un regulador de McIlvaine de ácido cítrico fosfato 0.1 M, ajustándose el valor de pH

desde 2 hasta 8. A cada una de las muestras se les realizó un barrido desde 400 a 600 nm, con objeto de encontrar la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{m\acute{a}x}$) del pigmento a los diferentes valores de pH. Los cambios de color se determinan por el valor de la absorbancia en un intervalo de pH de 2 a 8, seleccionando de aquí el valor más alto de dicho parámetro. Considerando este valor se realizan curvas tipos de calibración para cada uno de los pigmentos de estudio a cada pH, sobre los cuales se interpolan los datos obtenidos de absorbancia durante la cinética, para conocer la concentración respectiva. Posteriormente se evalúa el efecto del pH con respecto al tiempo en la pérdida de color. Se determinaron las cinéticas respectivas evaluando los cambios en la absorbancia con relación al tiempo a diversos valores de pH y la temperatura constante (Figura 10).

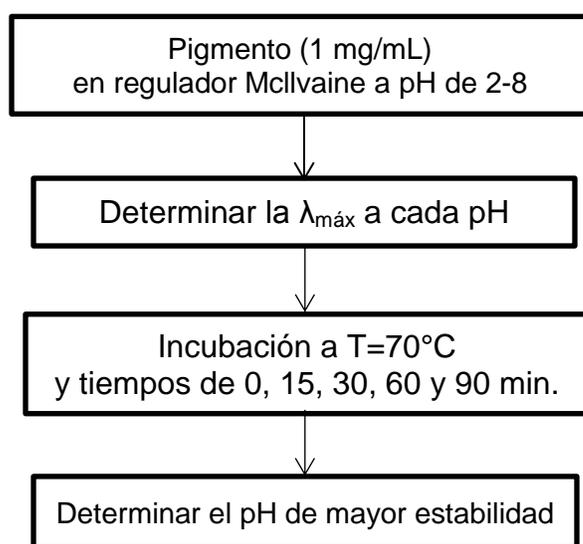


Figura 10. Diagrama de flujo para determinar el efecto del pH en la estabilidad del colorante extraído de la madera de guamúchil (*P.dulce*)

3.3.6. Caracterización cualitativa por espectrofotometría de infrarrojo FT-IR

La espectrofotometría de infrarrojo es una de las técnicas ópticas más utilizadas para el análisis de estructuras moleculares, así como de identificación química de compuestos desconocidos, debido principalmente a que el análisis no altera o

destruye la muestra, siendo relativamente rápido (de 2 - 3 minutos). Este se fundamenta en las vibraciones moleculares y rotatorias que se generan al momento de absorber radiación electromagnética en el espectro infrarrojo, en el cual las moléculas experimentan un cambio en el momento dipolar, dando lugar a vibraciones de tensión, flexión y rotación de los grupos funcionales (Olsen, 1990).

La región del infrarrojo intermedio es la de mayor interés, ya que entre $1300-652\text{ cm}^{-1}$ se observan bandas de absorción correspondientes a las frecuencias fundamentales de vibración, las cuales dependen de la masa relativa de los átomos enlazados, la constante de fuerza del enlace y la geometría de la molécula, dando lugar a un espectro y/o huella dactilar de las sustancias (Gómez et al., 2009).

La instrumentación empleada se clasifica en la forma de separación de frecuencias, dando lugar a infrarrojos dispersivos y de Transformadas de Fourier. Este último se ha utilizado con mayor frecuencia, destacando por disminuir el ruido analítico, mayor sensibilidad óptica y rapidez para obtener un espectro completo, introduciendo un interferómetro en lugar de un monocromador (Olsen, 1990)

Para medir una muestra, un rayo de luz infrarroja atraviesa la muestra. Cuando la frecuencia de excitación de un enlace (o grupo de enlaces) coincide con alguna de las frecuencias incluidas en las ondas componentes del rayo, se produce absorción. Lo que se registra es la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda. Esto puede lograrse escaneando el espectro con un rayo monocromático, el cual cambia de longitud de onda a través del tiempo, o usando una transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez. A partir de esto, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual muestra las longitudes de onda donde la muestra absorbe el IR, y permite una interpretación de qué enlaces están presentes (Moffat, 2011).

Un espectrómetro infrarrojo funciona con una pequeña muestra que es colocada en una celda infrarroja, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido desde las longitudes de onda de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} . La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida en cada número de onda, lo que

permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. Esto se conoce como el espectro infrarrojo de la muestra. En la región infrarroja del espectro, las frecuencias de resonancia (vibración) de una molécula se deben a la presencia de grupos funcionales moleculares. Un grupo funcional es simplemente un grupo de dos o más átomos, enlazados de una manera específica. En la molécula de agua (H_2O), el grupo funcional O-H es el que contribuye a la frecuencia de resonancia (vibración) alrededor de los 3450 cm^{-1} . (Moffat, 2011).

En cuanto a la caracterización vibracional en el espectro infrarrojo de las muestras, todos los pigmentos extraídos fueron analizados en un espectrofotómetro de infrarrojo FT-IR Identify IR modelo Smiths, con una base de Selenurio de Zinc. El intervalo de análisis fue de los $4000\text{-}652\text{ cm}^{-1}$ (infrarrojo intermedio) ajustado a 100% de absorbancia (A). Ninguna muestra fue reconstituida, fueron analizadas y comparadas con la ATR FT-IR Base de datos Spectra. IdentifyIR utiliza una reflexión total (DATR) interfaz de muestreo de diamante atenuado, lo que significa que puede analizar rápidamente cualquier muestra sólida o líquida, incluyendo materiales cáusticos y corrosivos. Esta técnica funciona exclusivamente con enlaces covalentes, y como tal es de gran utilidad en química orgánica.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tamaño de partícula

La forma y el tamaño de las fibras dependen del tipo e intensidad de los procesos de molienda, lo que es importante para su funcionalidad. En la figura 11 se muestran las diferentes presentaciones y la coloración de la madera del guamúchil: viruta (A), aserrín (B) y harina (C); cuyos tamaños promedio de partícula fueron de 45 mm, 15 mm, y 250 μm , respectivamente. En los experimentos de extracción de pigmento se utilizaron los tres tamaños de partícula: viruta, aserrín y harina (polvo retenido en la malla N°.60 del juego de tamices). La harina presentó el menor tamaño de partícula, lo cual le proporciona una mayor capacidad de hidratación, al haber una mayor superficie de contacto específica, en comparación con las partículas de mayor tamaño (Jongaroontaprangsee et al., 2007).

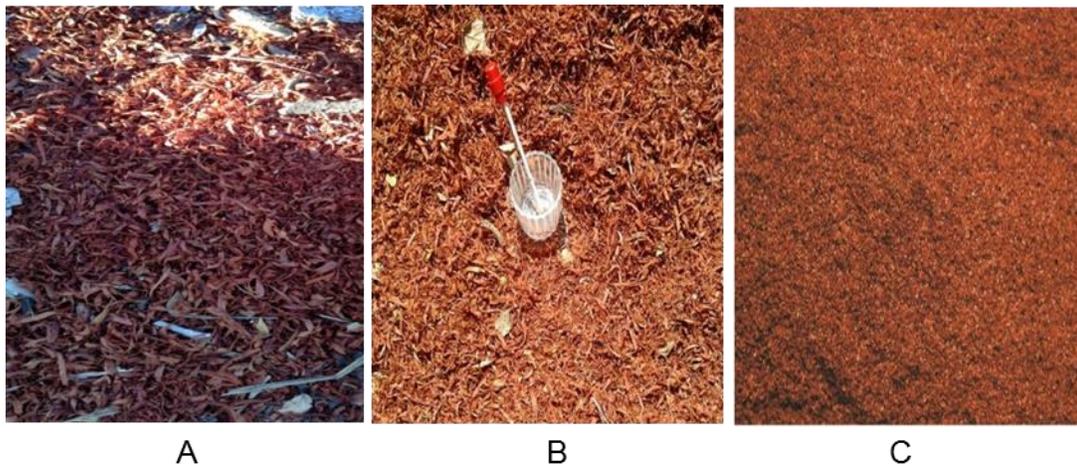


Figura 11. Forma, tamaño y coloración que presenta la viruta (A), el aserrín (B) y la harina (C) obtenidas de la madera de guamúchil (*P. dulce*)

4.2. Caracterización fisicoquímica de la madera

Se llevó a cabo un análisis químico para determinar los principales componentes químicos de la madera de guamúchil. Actualmente no se han encontrado reportes sobre la composición química de la madera de guamúchil, por lo que no es posible

hacer comparaciones bibliográficas entre los resultados obtenidos y otros autores. Los resultados derivados de la presente investigación se proporcionan a continuación, de acuerdo al orden establecido en la metodología, para los análisis fisicoquímicos (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis químico porcentual de la madera de guamúchil

Determinación	Contenido (%)*
Humedad	1 ± 0.02
Cenizas	1 ± 0.05
Lignina	26 ± 2.6
Hemicelulosa	15 ± 1.7
Celulosa	39 ± 2.5
Extractivos	18 ± 1.5

*Promedio ± desviación estándar de 3 repeticiones

Pequeñas cantidades de elementos minerales, como calcio, potasio y magnesio, se encuentran en ceniza de madera. Normalmente, el volumen de la ceniza raramente es más bajo que 0.2% o más alto que el 1% del porcentaje en peso de madera. La ceniza puede contener cantidades diminutas de una lista larga de otros elementos, como fósforo (P), azufre (S), sodio (Na), aluminio (Al), titanio (Ti), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), plata (Ag), bario (Ba), plomo (Pb), y oro (Au). En algunas especies tropicales, la mayoría de la ceniza está compuesta de sílice (SiO₂). (Paz, 2008). El mismo autor menciona que el contenido total de ceniza y la composición de la misma, varían significativamente entre las especies, lo cual se atribuye en gran parte a las condiciones del medio ambiente bajo las que el árbol ha crecido.

Al determinar los principales componentes químicos de la madera de cinco especies de pino procedentes del municipio de Morelia, Michoacán, René et al., (2013) encontraron que la madera está compuesta por 68.1 - 74,7% de holocelulosa, y de 24.0 – 28.5% de lignina. Se debe tener presente que la holocelulosa constituye la suma de la celulosa más la hemicelulosa.

El contenido de los constituyentes fibrosos (celulosa, hemicelulosa y lignina) presentes en la madera, además de darnos información sobre los usos alternativos a que se puede destinar dicho recurso, también nos habla de su facilidad para biodegradarse, ya que cuanto mayor es el contenido de compuestos ligno-celulósicos, mayor dificultad tendrán los microorganismos para degradar dicho material (Thomas et al., 1998). Al trabajar con la madera de los árboles de (*Gmelina arborea* Roxb), Paz (2008) no encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en la composición química de la madera obtenida a partir de las diferentes secciones del tronco.

Se ha visto que la lignina imparte resistencia a la degradación microbiana de la madera, por lo cual, la lignificación en muchas plantas puede ser un mecanismo de resistencia a la enfermedad y se produce como un mecanismo de defensa hacia los hongos patógenos o en respuesta a heridas (Blanchette, 1995). También se ha demostrado que la lignina como sustrato único no es una fuente aprovechable para el crecimiento de los hongos, sino que es necesaria la presencia de un sustrato (Kirk et al., 1978). Por lo tanto se puede decir que la madera de guamúchil que se utilizó y al porcentaje de lignina que se obtuvo

4.3. Pruebas de solubilidad

Se realizaron pruebas de solubilidad para encontrar el disolvente más adecuado con el que se lograra obtener la mayor cantidad de pigmento con la mínima cantidad de solvente. El pigmento contenido en la madera de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) fue muy soluble en metanol, acetona y etanol; poco soluble en agua y en cloroformo, e insoluble en éter etílico y hexano (Figura 12).

El mayor rendimiento de color se obtuvo cuando se utilizó el metanol como disolvente, seguido por el etanol y la acetona. Lo anterior se determinó mediante un análisis de barrido en un espectrofotómetro Uv-Visible y se logró establecer también la longitud de onda (450 nm) a la cual se obtenían las mejores concentraciones de pigmento extraído.

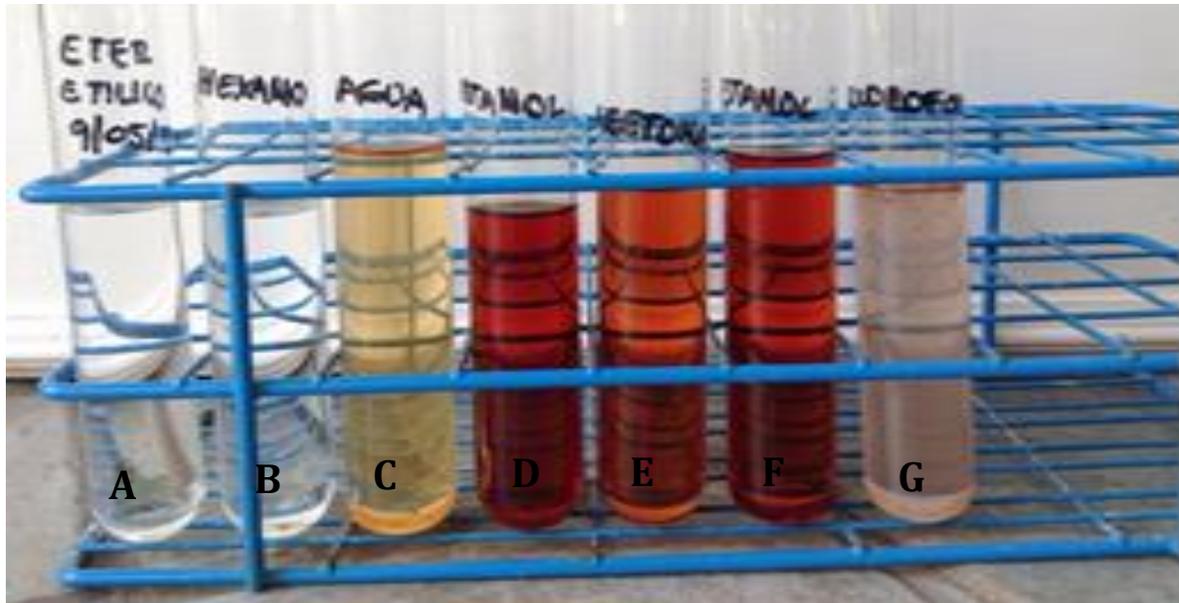


Figura 12. Solubilidad del colorante presente en la madera del guamúchil en diferentes solventes A) Éter etílico, B) Hexano, C) Agua, D) Etanol, E) Acetona, F) Metanol y G) Cloroformo

Actualmente el empleo de disolventes es masivo en todo tipo de industrias, lo que plantea problemas de contaminación del medio ambiente y sobre todo repercusiones a la salud humana, con base en lo anterior se determinó realizar las extracciones con etanol al 96%. También se buscaba utilizar un disolvente más económico y menos tóxico. Se recuperó aproximadamente el 90% del volumen original de los líquidos lo cual implica que, de esta forma, se pueden reutilizar los disolventes y así mejorar la economía del proceso y provocar menor impacto ambiental.

4.4. Obtención de extractivos

La extracción del pigmento se realizó haciendo lecturas de la absorbancia del extracto a $\lambda = 450 \text{ nm}$, longitud de onda a la cual se presentó la máxima absorbancia del pigmento, y se llevó a cabo empleando las tres diferentes presentaciones de la madera: viruta, aserrín y harina. En la figura 13 se muestran los extractos obtenidos en cada una de las fases del proceso de extracción y para cada tamaño de partícula

diferente. Resulta difícil apreciar y determinar a simple vista el proceso que dio los mejores resultados, simplemente se puede concluir que independientemente del tamaño de partícula, la mayor cantidad de pigmento se obtiene durante la primera fase del proceso de extracción; es decir, durante las primeras 3 horas de iniciado el proceso de extracción a reflujo. Por otro lado, se observa que en el aserrín y la harina no se llegó al agotamiento del pigmento contenido en la madera en la 3ª fase del proceso de extracción.

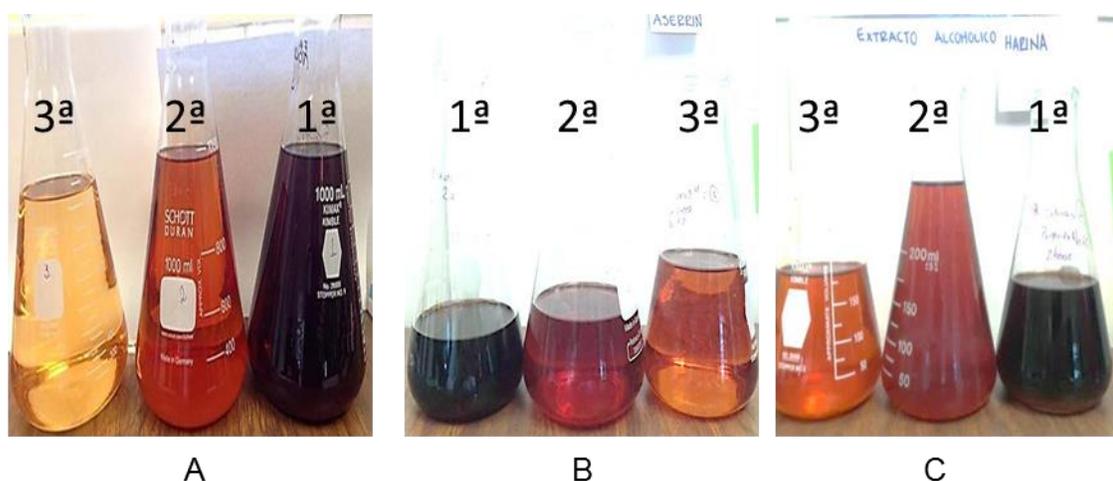


Figura 13 Extracción total del pigmento presente en la madera de guamúchil: viruta (A), aserrín (B), harina (C).

4.5. Cinética de extracción del pigmento con etanol

El principal propósito de realizar cinéticas de extracción del pigmento es puntualizar la influencia del tiempo de extracción; es decir, el tiempo en el cual está en contacto la materia prima con el solvente, bajo las condiciones de trabajo establecidas: relación sólidos-solvente y temperatura. Las cinéticas del proceso de extracción del pigmento presente en la madera de guamúchil en sus tres diferentes tamaños de partícula (viruta, aserrín y harina), se presentan en la Figura 14.

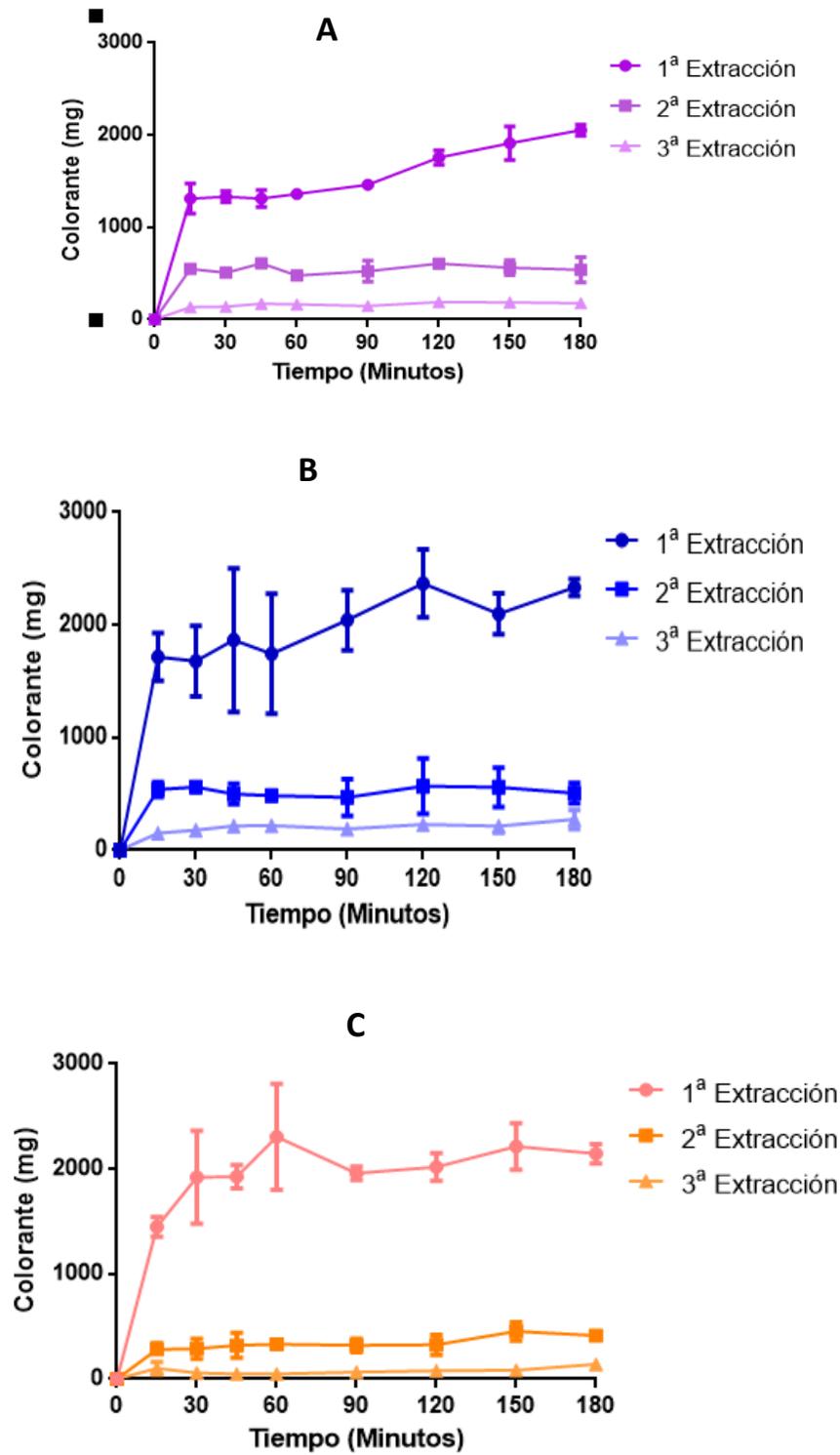


Figura 14. Cinéticas de extracción del pigmento presente en la madera de guamúchil: harina (A), aserrín (B) y viruta (C).

Se puede apreciar que cuando se utiliza viruta y aserrín, la máxima cantidad de pigmento extraído ocurrió a los 60 minutos de tiempo de reflujó en las tres fases de extracción, mientras que cuando se utilizó la harina, la máxima extracción del pigmento ocurre a los 15 minutos de tiempo de extracción, lo cual se debe a que las partículas de harina, al ser de menor tamaño (250 μm), presentan mayor superficie de contacto con el solvente por unidad de peso, de ahí que se requiera de menor tiempo de exposición entre el solvente y el pigmento, para lograr la solubilidad y por lo tanto la extracción del pigmento del seno de la partícula de polvo en la harina de la madera del guamúchil, con respecto al aserrín o a la viruta.

La cantidad total de pigmento obtenido fue de 2.0096g a partir de aserrín, 1.8008g a partir de viruta, y sólo 1.3338g a partir de harina (Tabla 7). Dado que como material de partida se utilizaron 15g de madera en sus distintas presentaciones, los rendimientos obtenidos en base seca fueron: 12.00 (harina), 13.40 (aserrín) y 8.89% (viruta). Este rendimiento fue menor al obtenido por Barragán (2001), quien obtuvo el 24.5%, al extracción el pigmento presente en la madera del campincerán (*Dalvergia congestiflora* Pittier). Una de las diferencias podría atribuirse principalmente a que se trata de especies diferentes, por lo que su contenido de extraíbles también resulta diferente.

Tabla 7. Rendimiento del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil en sus diferentes tamaños de partícula.

Fase de extracción	Tamaño de partícula					
	Viruta		Aserrín		Harina	
	g	%	g	%	G	%
1 ^a	1.4950 ^a	83.02	1.2615 ^b	62.77	0.9356 ^c	70.15
2 ^a	0.2427 ^a	13.48	0.5437 ^b	27.06	0.3156 ^a	23.66
3 ^a	0.0631 ^a	3.50	0.2044 ^b	10.17	0.0826 ^a	6.19
Total (g)	1.8008 ^b	100	2.0096 ^a	100	1.3338 ^c	100

Promedio \pm desviación estándar de 3 repeticiones por tipo de muestra. Valores no conectadas por la misma literal en la misma fase, presentan diferencia significativa ($P < 0.05$).

Considerando que, el tamaño de partícula que presentan cada uno de los productos de partida, la superficie de contacto entre el solvente y las moléculas de la madera se va incrementando a medida que disminuye el tamaño de las partículas; era de esperarse que se obtuviera una mayor cantidad de pigmento a partir de la harina, después a partir del aserrín, y por ultimo a partir de viruta. La posible explicación que se encuentra, sobre el hecho de haber obtenido menor rendimiento en la cantidad de pigmento extraído a partir de la harina es que, la harina se apelmaza y se compacta y por lo tanto, realmente no entra en contacto con el solvente, razón por la que se obtienen los menores rendimientos de pigmento.

Para evitar el apelmazamiento y compactación de las partículas de harina de la madera de guamúchil, se podría implementar un sistema de agitación en el proceso de extracción a reflujo y de esa forma, tratar de mantener en suspensión las partículas para que entren en contacto directo con el solvente y así, lograr una mayor extracción del pigmento.

4.6. Cinética de extracción microbiológica del pigmento

Al realizar previamente la digestión microbiológica de la madera de guamúchil (*P. dulce*) mediante el empleo del hongo (*P. chrysosporium*), y posteriormente llevar a cabo la obtención del pigmento por extracción a reflujo utilizando etanol como disolvente, se obtuvieron los siguientes datos cinéticos de la extracción (Figura 15)

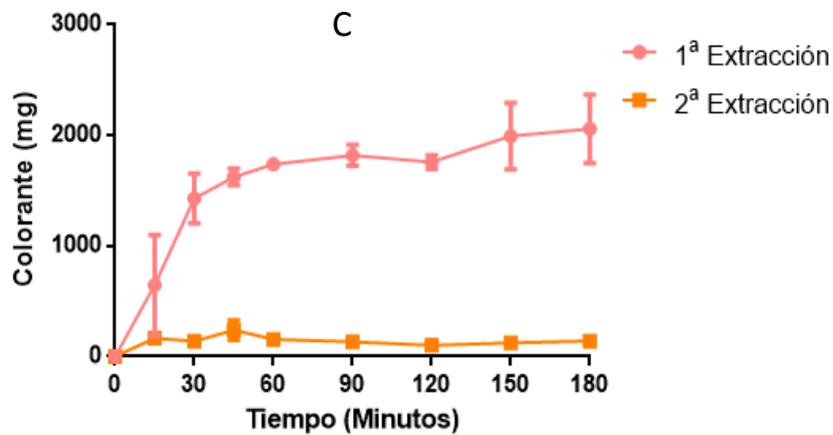
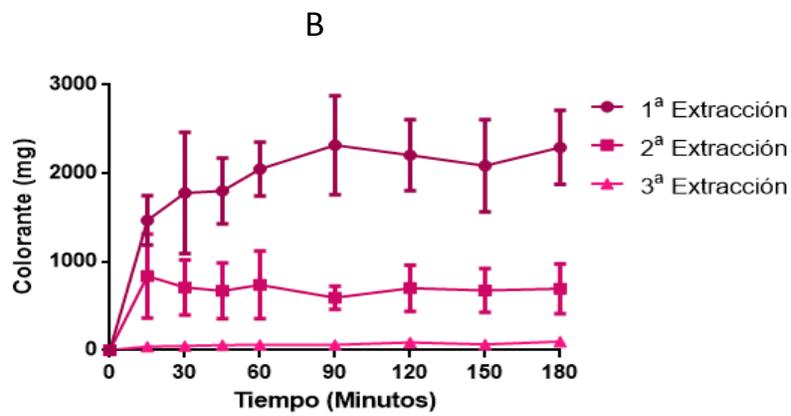
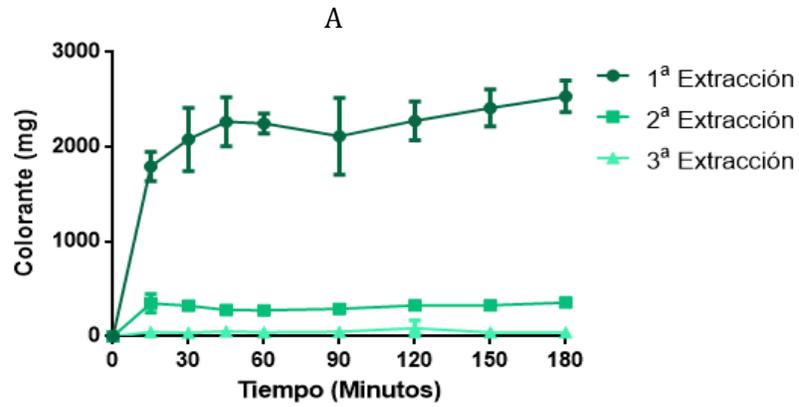


Figura 15. Cinéticas de extracción de pigmento de la madera de guamúchil digerida con el hongo *P. chrysosporium*: harina (A), aserrín (B) y viruta (C).

El pretratamiento microbiológico de degradación de la pared celular de la madera que se realizó a cada tamaño de partícula, con el fin de verificar si era posible reducir los tiempos de extracción y obtener un mayor rendimiento del pigmento contenido en la madera del guamúchil como se observa en la figura 15. El tiempo de incubación con el microorganismo fue de 48 h en cada tamaño de partícula, tiempo establecido de acuerdo a la cinética de crecimiento del microorganismo en condiciones normales.

Cuando la extracción del pigmento se realizó a partir de la harina previamente digerida con el hongo *P. chrysosporium* (Figura 15-A), el tiempo de reflujo al cual se logró la mayor extracción de pigmento fue de los 45 minutos, alcanzando la estabilidad al minuto 120. También se puede observar que en esta primera fase no se logra extraer todo el pigmento contenido en las partículas de harina. Cuando la extracción se llevó a cabo a partir del aserrín previamente digerido por el hongo, el tiempo de reflujo al cual se obtuvo la mayor concentración de pigmento fue de 90 minutos y en esta 1ª fase tampoco se extrajo el 100% del pigmento contenido en el aserrín de madera de guamúchil (Figura 15-B).

Cuando la viruta de la madera de guamúchil previamente digerida por *P. chrysosporium* fue utilizada para la obtención del colorante por extracción a reflujo con etanol, lo más representativo que se puede observar es que la extracción total del pigmento se logró realizar en solo dos fases del proceso (Figura 15-C); es decir, la predigestión microbiana de la viruta de la madera de guamúchil por el hongo *P. chrysosporium* redujo en tres horas el proceso de extracción del pigmento contenido en dicha viruta, pues debemos recordar que cada fase de extracción consta de 3 horas.

La predigestión de la madera de guamúchil con *P. chrysosporium* favorece la extracción del pigmento, independientemente del tamaño de partícula del material de partida (Tabla 8). La cantidad total de pigmento obtenido fue de 3.4173g a partir del aserrín, 3.1425g a partir de la viruta, y sólo 4.0674g a partir de la harina de la madera de guamúchil previamente digeridas con *P. chrysosporium*. Si tomamos en cuenta que se utilizaron 15 gramos de madera como material de partida en sus distintas presentaciones, los rendimientos obtenidos fueron de 22.78%, 20.95% y 27.12%,

respectivamente. También se observó que en el caso de la viruta se logró realizar la extracción total del pigmento en un tiempo de seis horas, reduciendo así la utilización de solvente y optimizando el tiempo del proceso. Como se puede observar en la figura 16.



Figura 16. Crecimiento de *P. chrysosporium* en A) Viruta, B) Aserrín y C) Harina

Tabla 8. Rendimiento del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil digerida con el hongo *Phanaerochaete chrysosporium*.

Fase de Extracción	Tamaño de partícula					
	Viruta		Aserrín		Harina	
	g	%	G	%	g	%
1 ^a	3.1497 ^a	92.17	2.4099 ^b	76.69	3.1214 ^a	76.74
2 ^a	0.2676 ^a	7.83	0.6552 ^b	20.85	0.7863 ^c	19.33
3 ^a	0.0000 ^a	0.00	0.0774 ^b	2.46	0.1597 ^c	3.93
Total (g)	3.4173 ^a	100	3.1425 ^b	100	4.0674 ^c	100

Promedio \pm desviación estándar de 3 repeticiones por tipo de muestra. Valores no conectados por la misma literal en la misma fase, presentan diferencia significativa ($P < 0.05$).

Algo más que llama la atención sobre los datos presentados en esta Tabla 8, es el hecho de que ahora el máximo rendimiento en cuanto a la cantidad de pigmento extraído ocurrió al utilizar la harina de la madera de guamúchil como material de partida, lo cual esperábamos que ocurriera también durante el proceso de extracción química del pigmento, debido al menor tamaño de partícula que presenta la harina en comparación con la viruta y el aserrín.

Haciendo un análisis comparativo entre el rendimiento en la cantidad de pigmento que fue obtenido por el método químico (Tabla 7) y por el método microbiológico (Tabla 8), a partir de la madera de guamúchil, independientemente del tamaño de partícula del material de partida, se puede observar (Tabla 9) que, la pre digestión microbiológica de la madera del guamúchil con *P. chrysosporium*, incrementó el rendimiento en cuanto a la cantidad de pigmento obtenido hasta un 89.77% en la viruta, 56.37% en el aserrín, y 204.95% en la harina, con respecto al método de extracción química tradicional.

Tabla 9. Comparación del pigmento extraído por método químico y por método microbiológico a partir de la madera de guamúchil en tres tamaños de partícula.

Tamaño de Partícula	Extracción Química (g)	Digestión Microbiológica (g)	Variación	
			g	%
Viruta	1.8008	3.4173	1.6165	89.77
Aserrín	2.0096	3.1425	1.1329	56.37
Harina	1.3338	4.0674	2.7336	204.95

4.7. Efecto del tiempo de digestión microbiológica de la madera de guamúchil en la extracción del pigmento

Aun cuando el mayor rendimiento en la extracción del pigmento se obtuvo cuando se utilizó la harina como materia prima de partida, para realizar este estudio se eligió

trabajar con el aserrín de madera de guamúchil como se observa en la figura 17, debido a que este material no presenta problemas de compactación como la harina y se facilita la filtración a la hora de la separación del pigmento

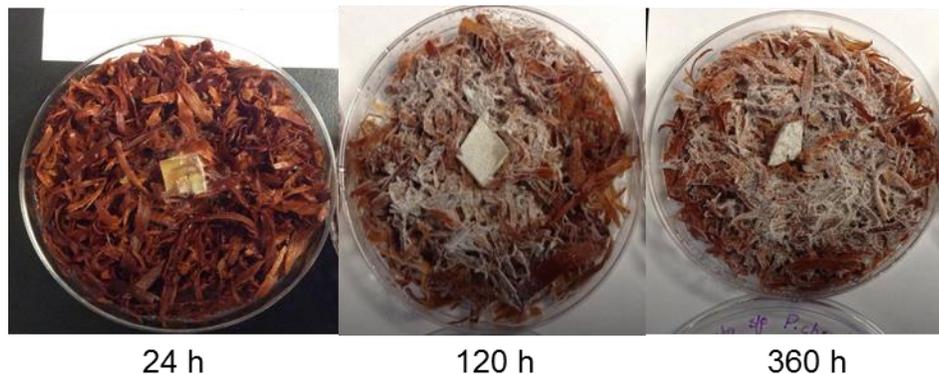


Figura 17. Digestión de la madera con *P. chrysosporium* por 24, 120 y 360 horas.

Para determinar el tiempo óptimo requerido para la digestión microbológica de la madera en el proceso de extracción del pigmento, se eligieron cuatro tiempos de incubación: a) 12 horas, que sería el tiempo mínimo requerido para que se observe un efecto sobre la extracción del pigmento, b) 24 horas de incubación, tiempo en el cual el crecimiento del micelio del hongo es visible en la madera, c) 120 horas, tiempo en el cual el hongo ha adquirido el crecimiento suficiente para producir una mayor cantidad de enzimas para la degradación de los componentes de la pared celular de la madera y, d) 360 horas, tiempo máximo en que las muestras se mantienen con una hidratación adecuada. La hidratación del sustrato se llevó a cabo tanto con agua destilada y estéril, como con caldo Sabouraud como fuente adicional de carbono, buscando mejorar tanto el crecimiento del microorganismo como el rendimiento en la extracción del pigmento contenido en la madera de guamúchil.

En la Tabla 10 se presentan los datos obtenidos sobre el efecto del tiempo de digestión microbológica del aserrín hidratado con agua y con caldo Sabouraud, en la extracción del pigmento. La mayor cantidad de pigmento se obtiene en la primera fase de extracción del mismo, independientemente del tiempo de digestión de la

madera con el hongo *P. chrysosporium*, así como del agente hidratante empleado durante el crecimiento del hongo. También se observó que no existe una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) en la cantidad de pigmento extraído, tanto en los diferentes tiempos de digestión de la madera con el hongo, como con los diferentes agentes hidratantes empleados durante el crecimiento del hongo.

Tabla 10. Efecto del tiempo de digestión microbiológica del aserrín hidratado con agua y con caldo Sabouraud en la extracción del pigmento.

Tiempo de digestión	Fase de extracción	Agente hidratante			
		Agua		Caldo Sabouraud	
		g	Total	g	%
12	1 ^a	1.6907	2.3084	ND	ND
	2 ^a	0.4795			
	3 ^a	0.1382			
24	1 ^a	1.7340	2.3560 ^a	1.9265	2.4033 ^a
	2 ^a	0.4740		0.3804	
	3 ^a	0.1470		0.0964	
120	1 ^a	1.7495	2.2901 ^a	1.9351	2.4371 ^a
	2 ^a	0.4142		0.3955	
	3 ^a	0.1264		0.1065	
360	1 ^a	1.5287	2.0894 ^a	1.6534	2.0374 ^a
	2 ^a	0.4161		0.3030	
	3 ^a	0.1545		0.0810	

Promedio \pm desviación estándar de 3 repeticiones por tipo de muestra. Muestra no conectadas por la misma literal en el mismo renglón, presentan diferencia significativa ($P<0.05$).

Aun cuando no existe una diferencia estadística significativa entre la cantidad de pigmento extraído a los diferentes tiempos de digestión del aserrín con el hongo *P. chrysosporium*, sí se observa una ligera diferencia con respecto a la cantidad de pigmento extraído a los diferentes tiempos de digestión, pues a medida que se incrementa el tiempo de digestión microbiológica del aserrín, disminuye ligeramente la cantidad de pigmento extraído. Una posible explicación a lo anterior sería que el hongo empieza a liberar el pigmento debido a que consume el material celulósico de la madera, pero a medida que pasa el tiempo, también comienza a degradar el propio colorante.

Entre los factores que afectan tanto en la etapa de crecimiento del microorganismo, como en la etapa de extracción alcohólica del pigmento se tienen los siguientes. El primero de ellos lo constituye la granulometría del material de partida, la cual tiene gran importancia en el rendimiento total de la extracción; cuanto menor es el tamaño de partícula mayor es el rendimiento del proceso de extracción del pigmento, pues a medida que disminuye el tamaño de partícula, se incrementa su superficie y facilita la acción de las enzimas digestivas secretadas por el hongo, sobre los constituyentes de la madera (celulosa, hemicelulosa y lignina), con lo cual se incrementa la liberación del pigmento al medio y por otro lado, también a menor tamaño de partícula se incrementa la interacción del solvente con el pigmento, logrando así una mayor extracción del mismo.

Otro factor determinante sería la temperatura a la cual se lleva a cabo la incubación y el proceso de extracción alcohólica del pigmento, aunque en este caso en particular, ambas temperaturas quedan preseleccionadas desde un inicio con el tipo de microorganismo empleado para llevar a cabo la digestión de la madera, y la otra con la elección del tipo de solvente utilizado para realizar la extracción del pigmento. La temperatura de incubación debe ser la temperatura a la cual se tiene el crecimiento óptimo del microorganismo, en este caso se eligió trabajar a 35°C debido a que esa es la temperatura de crecimiento óptimo del hongo *P. chrysosporium*. Por otro lado, dado que el etanol fue uno de los solventes donde se tuvo la máxima solubilidad del pigmento, la temperatura de extracción del pigmento queda supeditada por la temperatura del punto de ebullición del solvente, que en este caso es de 70°C, por lo que no es posible trabajar el proceso de extracción del solvente a $T > 70^{\circ}\text{C}$, pues se requeriría modificar la presión debido al cambio de fase.

Generalmente la velocidad de las reacciones químicas aumenta al incrementar la temperatura, debido a que se aumenta la energía cinética de las moléculas, lo que ocasiona que éstas se muevan más rápido y que se presenten más choques entre ellas, originando así el aumento de la velocidad de reacción. Las reacciones catalizadas por enzimas, y por lo tanto, el crecimiento microbiano, siguen esta misma tendencia, solo que al ser proteínas, a partir de cierta temperatura se empiezan a

desnaturalizar. Esa temperatura se llama temperatura óptima y es aquella en la que la velocidad enzimática es máxima. La velocidad de reacción disminuye al alejarse de la temperatura óptima. En general, por cada 10°C de incremento en la temperatura, la velocidad de la reacción se duplica, o bien, por cada 10°C de disminución en la temperatura, la velocidad de reacción disminuye en un 50%. A esta variación se le conoce como coeficiente de temperatura (Q_{10}) y generalmente se encuentra entre $1.7 < Q_{10} < 2.5$ (Whitaker, 1994)).

Otro factor que también afecta el rendimiento global en la cantidad de pigmento obtenido lo constituye la relación sólido/solvente y el número de extracciones que se llevan a cabo en el proceso de extracción del pigmento, razón por la que debe hacerse un estudio para encontrar las condiciones bajo las cuales se obtenga la mayor cantidad de pigmento con la menor cantidad de solvente empleado en el proceso de extracción, y donde el gasto energético y el tiempo de operación sean menores.

4.8. Estabilidad del pigmento al pH

Debido a que el pH afecta al color del pigmento, la degradación del pigmento se siguió por espectrofotometría visible a la $\lambda_{\text{máx}}$ del pigmento, por lo que se determinaron primero las longitudes de onda de máxima absorción del pigmento a los diferentes valores de pH de trabajo (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto del pH en la longitud de onda de máxima absorbancia del pigmento.

Ph	2	3	4	5	6	7	8
$\lambda_{\text{máx}}$	465nm	465nm	465nm	465nm	465nm	485nm	440nm

La velocidad de deterioro del pigmento se determinó utilizando el extracto alcohólico obtenido de la madera del guamúchil en sus tres variantes: A) Extracción química, B) Extracción microbiológica/agua y, C) Extracción Microbiológica / caldo Sabouraud. La

variación de la absorbancia de los pigmentos con respecto al tiempo y a los diferentes valores de pH de trabajo, se muestran en las figuras 18, 19 y 20. Se puede observar que en todos los casos, la absorbancia tiende a disminuir a consecuencia del deterioro gradual del pigmento.

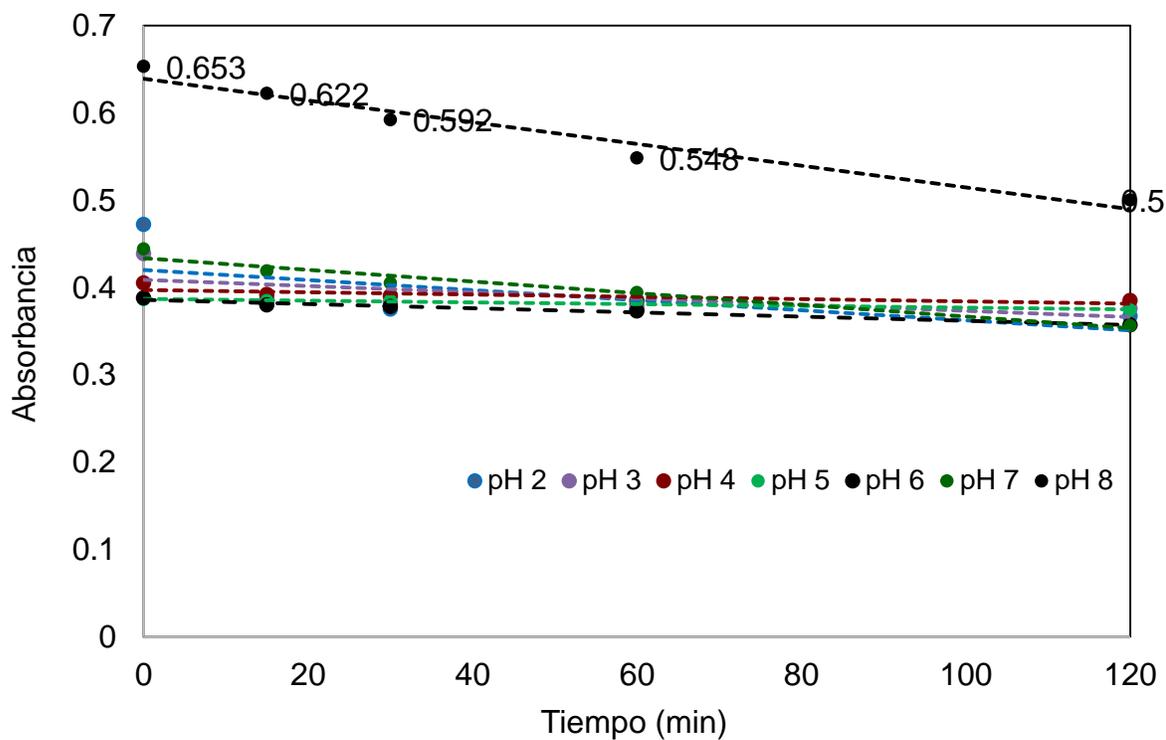


Figura 18. Disminución de la absorbancia del pigmento obtenido por extracción química a una temperatura de 70°C y a diferentes valores de pH.

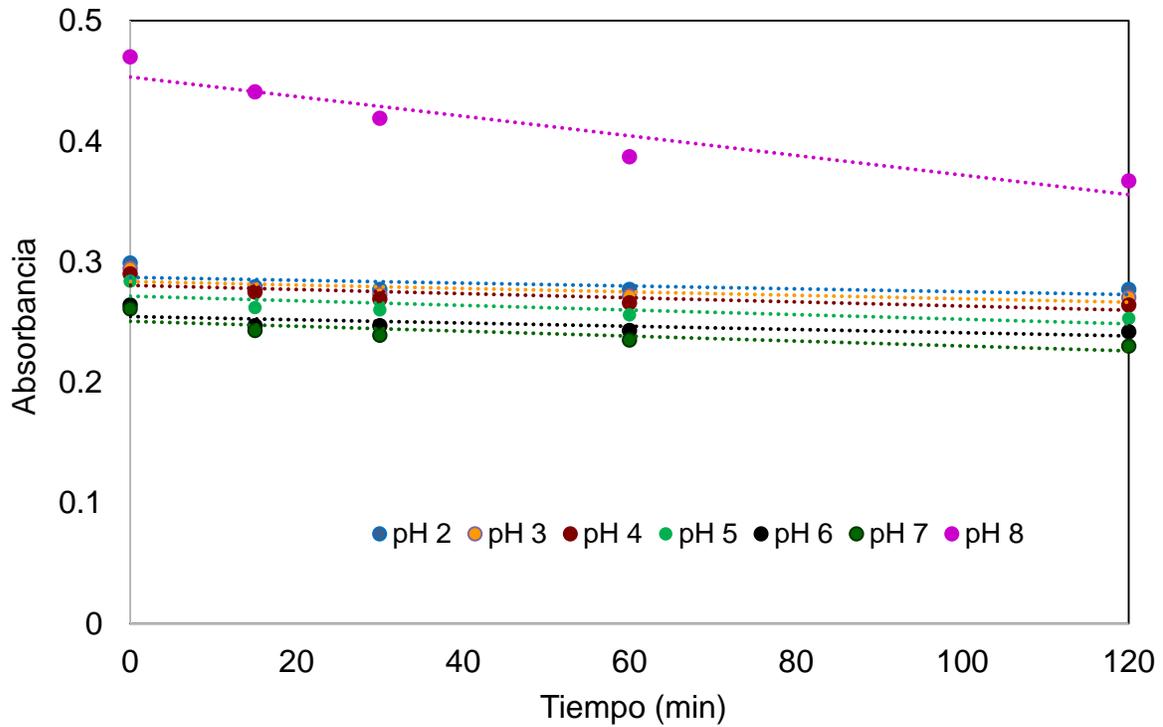


Figura 19. Disminución de la absorbancia del pigmento obtenido por extracción microbiológica/agua, a una temperatura de 70°C y a diferentes valores de pH.

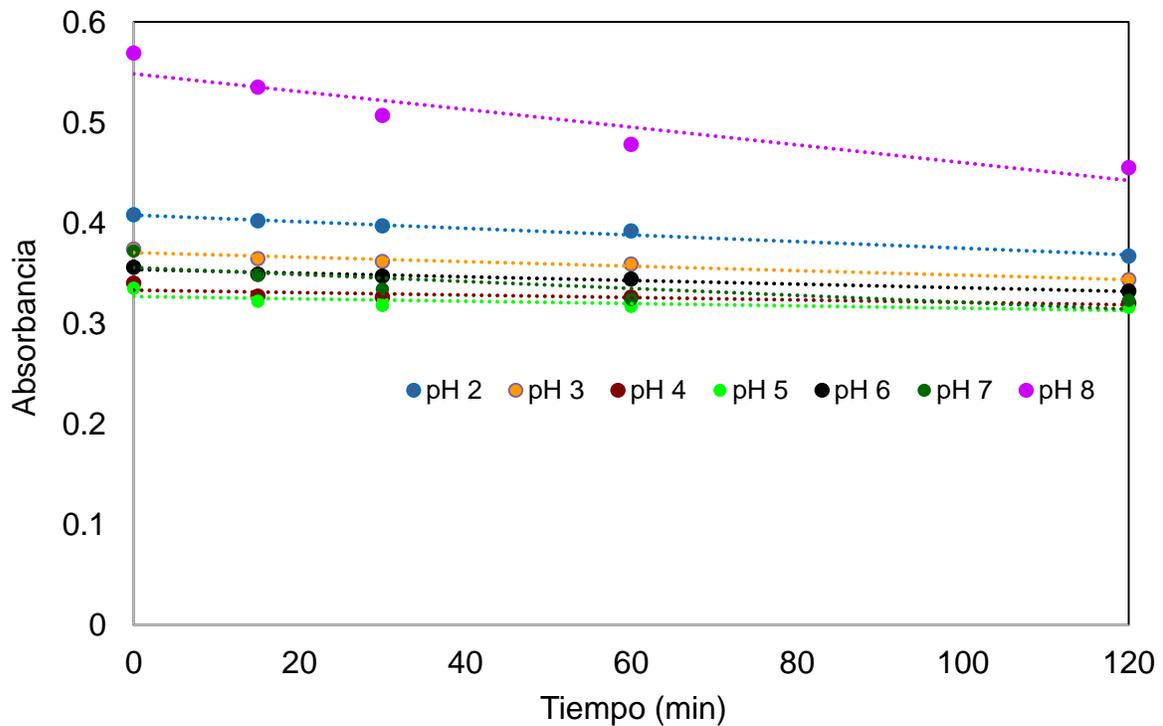


Figura 20. Disminución de la absorbancia del pigmento obtenido por extracción microbiológica/ caldo Sabouraud, a 70°C y a diferentes valores de pH.

A partir de las ecuaciones obtenidas para cada valor de pH, se determinó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y la constante de degradación (k), los cuales constituyen las constantes cinéticas de la degradación del pigmento extraído de la madera de guamúchil (Tablas 12, 13 y 14). El tiempo de vida media corresponde al el tiempo requerido para que la absorbancia inicial disminuya en un 50%, mientras que la constante de degradación se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente ecuación (Von Elbe et al., 1974).

$$k = m (-2.3)$$

$$t_{1/2} = 0.693/K$$

Tabla 12. Parámetros cinéticos de la degradación del pigmento obtenido por extracción química a 70° y a diferentes valores de Ph.

pH	Ecuación de la recta	R ²	t ½ (min)	k *10 ³ (min) ⁻¹
2	Y = -0.0006X + 0.4201	0.3875	306.8 ^a	1.38
3	Y = -0.0004X + 0.4087	0.4201	473.6 ^b	92.00
4	Y = -0.0001X + 0.3973	0.5796	1948.0 ^c	23.00
5	Y = -0.0001X + 0.3871	0.9259	1941.0 ^c	23.00
6	Y = -0.0002X + 0.3860	0.9766	960.0 ^d	46.00
7	Y = -0.0007X + 0.4337	0.9505	302.4 ^a	1.61
8	Y = -0.0012X + 0.639	0.9544	260.0 ^e	2.76

Los valores representan el promedio de tres determinaciones. Valores no conectadas por la misma literal, presentan diferencia significativa (P<0.05).

El pH de mayor estabilidad del pigmento corresponde al pH donde el pigmento presenta su mayor tiempo de vida media. En todos los casos, la mayor estabilidad del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil se obtuvo a valores de pH ≤ 6.0; es decir, en condiciones ácidas. Tanto el pigmento obtenido por extracción química como el obtenido por digestión microbiológica adicionado con caldo Sabouraud, presentaron máxima estabilidad a valores de pH de 4 y 5, y no hubo una diferencia estadística significativa entre ellos. Por su parte, el pigmento obtenido por digestión microbiológica y adicionada con agua, presentó su máxima estabilidad a

valores de pH de 2 y 3 y de 6, lo que podría significar que en este caso, hubo alguna alteración en la estructura molecular del pigmento, a causa de la acción de las enzimas extracelulares del microorganismo. En todos los casos, el pigmento extraído de la madera de guamúchil presentó menor estabilidad a pH 8.

Tabla 13. Parámetros cinéticos de la degradación del pigmento obtenido por extracción microbiológica/agua a 70° y a diferentes valores de pH

pH	Ecuación de la recta	R ²	t ½ (min)	k *10 ³ (min) ⁻¹
2	Y = -0.0001X + 0.2871	0.3286	1376 ^a	23.00
3	Y = -0.0001X + 0.2838	0.4774	1366 ^a	23.00
4	Y = -0.0002X + 0.2805	0.6044	678 ^b	46.00
5	Y = -0.0002X + 0.2716	0.5510	648 ^b	46.00
6	Y = -0.0001X + 0.2546	0.5044	1226 ^a	23.00
7	Y = -0.0002X + 0.2508	0.6716	602 ^b	46.00
8	Y = -0.0008X + 0.4535	0.8806	273 ^c	1.84

Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones. Valores no conectados por la misma literal, presentan diferencia significativa (P<0.05).

Tabla 14. Parámetros cinéticos de la degradación del pigmento obtenido por extracción microbiológica/caldo Sabouraud a 70° y a diferentes valores de pH.

pH	Ecuación de la recta	R ²	t ½ (min)	k *10 ³ (min) ⁻¹
2	Y= - 0.0003X + 0.4081	0.9813	680 ^a	69
3	Y= - 0.0002X + 0.3707	0.9427	918 ^b	46
4	Y= - 0.0001X + 0.3334	0.6315	1634 ^c	23
5	Y= - 0.0001X + 0.3269	0.4996	1594 ^c	23
6	Y= - 0.0002X + 0.3538	0.9606	879 ^b	46
7	Y= - 0.0003X + 0.3557	0.6419	566 ^d	69
8	Y= - 0.0009X + 0.5486	0.8642	293 ^e	2.1

Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones. Valores no conectados por la misma literal, presentan diferencia significativa (P<0.05).

El pigmento púrpura obtenido por Barragán (2001) mediante la extracción alcohólica a partir de la madera de campincerán (*Dalbergia congestiflora*) presentó máxima estabilidad a pH 3 y un tiempo de vida media de 20.2 horas (1212 minutos); el 62% del tiempo de vida media que presentó el pigmento obtenido en este estudio a partir de la madera de guamúchil por método químico y microbiológico fue a pH de 4 y 5.

Dado que el pigmento del guamúchil presenta su máxima estabilidad a valores de pH entre 4-5, la aplicación de este pigmento sería más conveniente en aquellos alimentos cuyo pH se encuentre dentro de este intervalo, entre los que se encuentra una gran variedad de alimentos procesados como son los productos lácteos fermentados, embutidos cárnicos, jugos de frutas y néctares, así como una gran variedad de productos de la industria refresquera (Teh y Francis 1988).

Dado que el pigmento extraído de la madera de guamúchil presenta mayor solubilidad en etanol y muy baja solubilidad en agua, la aplicación de este nuevo pigmento natural en productos de consumo humano como son los diversos tipos de alimentos y fármacos, se ve limitada tanto a su solubilidad, como a los resultados de las pruebas toxicológicas que se requieren para poder considerar a este nuevo pigmento como un aditivo GRAS (Generally Recognized As Safe); es decir, aditivos que son generalmente reconocidos como seguros, por lo que pueden emplearse en el procesamiento de alimentos, bebidas y fármacos (Badui 1993).

4.9. Espectros FTIR del pigmento

En investigación, la espectroscopía de infrarrojo puede brindar información acerca de los grupos funcionales de moléculas de estructura desconocida. Al medir a una frecuencia específica a lo largo del tiempo, se pueden medir cambios en el carácter o en la cantidad de un enlace en particular. Esta técnica funciona exclusivamente con enlaces covalentes, y como tal es de gran utilidad en química orgánica. Algunos equipos indican automáticamente cuál es la sustancia que está siendo medida a partir de miles de espectros de referencia que tiene almacenados en su biblioteca.

Los espectros de FT-IR del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil mediante el empleo de los diferentes métodos de extracción (Figuras 21a la 24), son

muy parecidos entre sí, pues las diferencias en las absorbancias registradas se deben fundamentalmente a las distintas concentraciones que de pigmento se tienen en los extractos, pero fundamentalmente las señales registradas son las mismas en los distintos extractos.

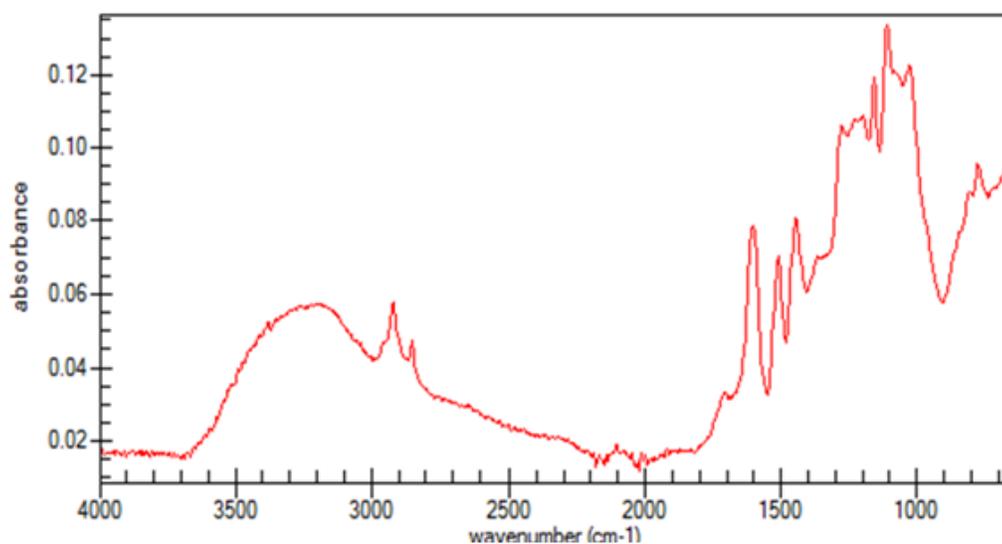


Figura 21. Espectro de FT-IR del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil por extracción química.

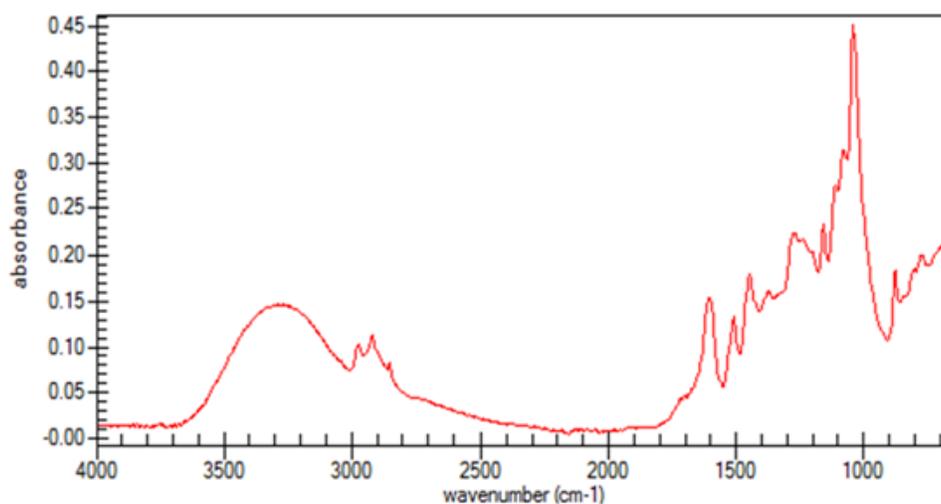


Figura 22. Espectro de FT-IR del pigmento extraído después de la digestión microbológica de la madera de guamúchil durante 24 horas e hidratado con agua.

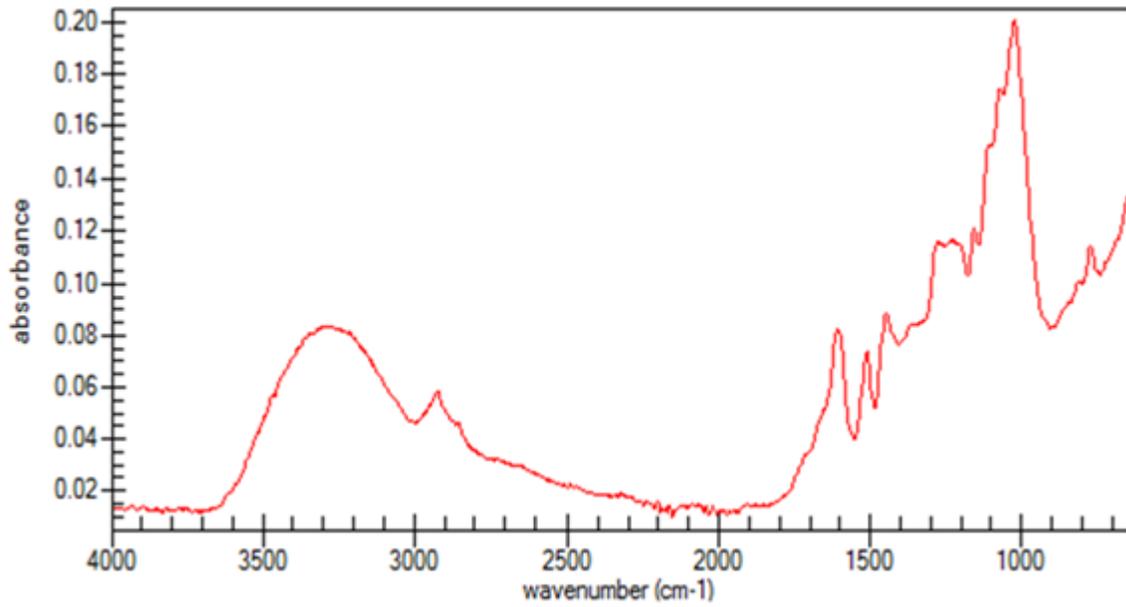


Figura 23. Espectro de FT-IR del pigmento extraído después de la digestión microbiológica de la madera durante 24 horas e hidratado con caldo Sabouraud.

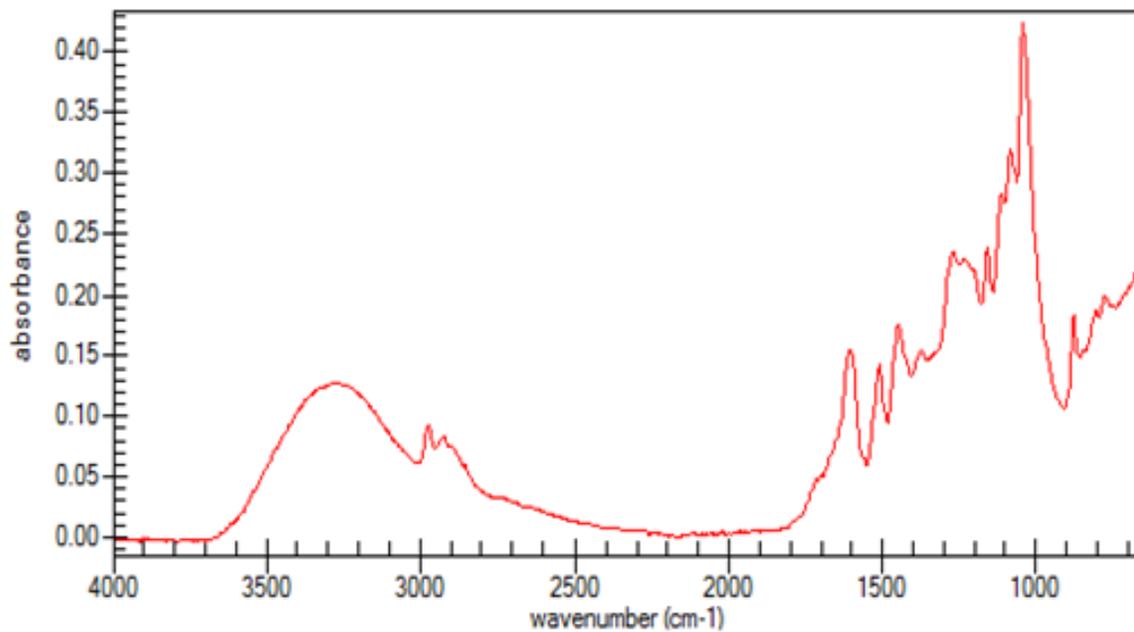


Figura 24. Espectro de FT-IR del pigmento extraído después de la digestión microbiológica de la madera durante 360 horas e hidratado con caldo Sabouraud.

Los principales grupos funcionales que, de acuerdo con sus señales emitidas, fueron identificados en los espectros FTIR del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil se presentan en la Tabla 15 (Maradiya y Patel 2001).

Tabla 15. Señales identificadas en los espectros FTIR del pigmento obtenido a partir de la madera de guamúchil.

Señales observadas (cm ⁻¹)	Especie a que corresponde
3,450	Ar-NH-R
3,200 – 3,400	N-H, O-H, alcoholes aromáticos
2920	C-H metilo
1600-1700	Anillo naftaleno
1603	C=O
1490-1500	-NH-
1450	Cadena alquil
1190-1130	Flexión C-N
1170 – 1120	Tensión simétrica del SO ₂
1106	C-N entre grupo azo y anillo aromático

Maradiya y Patel (2001).

A estos grupos funcionales identificados en los espectros FTIR del pigmento extraído de la madera de guamúchil, también reciben el nombre de *cromóforos*. Los grupos *cromóforos* son los grupos funcionales de las moléculas, responsables de la absorción de la luz en el espectro visible. También se pueden definir como aquellas sustancias que tienen muchos electrones capaces de absorber energía o luz visible, y excitarse para así emitir diversos colores, dependiendo de las longitudes de onda de la energía emitida por el cambio de nivel energético de los electrones, de estado excitado a estado fundamental o basal. Cuando una molécula absorbe ciertas longitudes de onda de luz visible y transmite o refleja otras, la molécula tiene un color. Un cromóforo es una región molecular donde la diferencia de energía entre dos orbitales moleculares cae dentro del rango del espectro visible. La luz visible que incide en el cromóforo puede también ser absorbida excitando un electrón a partir de su estado de reposo. Entre los principales cromóforos se tienen a los dobles y triples enlaces carbono-carbono, sistemas aromáticos, grupo carbonilo (-C=O), grupo imino (-C=N-), grupo amida (₂HN-C=O), grupo diazo (-N=N-), grupo nitro (-NO₂),

grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$), grupo éster ($-\text{COOR}$), grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) y enlaces C-Y (Y es un átomo con pares electrónicos libres) (Maradiya y Patel 2001).

Dado que en la biblioteca que maneja el equipo de FTIR no se encontró ningún espectro que coincidiera arriba del 90% con los espectros de FTIR obtenidos de los pigmentos que fueron extraídos a partir de la madera de guamúchil, esto nos indica presumiblemente que se trata de un nuevo pigmento que aún no ha sido estudiado, razón por la cual, para poder dilucidar la estructura química del mismo, se requiere llevar a cabo estudios complementarios de Resonancia magnética Nuclear (RMN), o de Difracción de Rayos X, lo cual quedó fuera del alcance del presente estudio, por lo que los espectros de FT-IR obtenidos sólo nos sirven para hacer una comparación de los mismos, y verificar si los distintos métodos de obtención del pigmento no ocasionaron cambios estructurales significativos en su molécula.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Dado el creciente interés por el uso de colorantes naturales en la elaboración de una gran variedad de productos, la obtención y caracterización fisicoquímica del pigmento contenido en la madera de guamúchil (*Pithecellobium dulce*), permite conocer aún más los recursos naturales de la región, buscando darles un mayor valor agregado y lograr el aprovechamiento sustentable de los mismos.

El presente trabajo confirma mediante un análisis integral, que la extracción del pigmento presente en la madera de guamúchil con pretratamiento microbiológico, si presenta un incremento en rendimiento con respecto a extracción química común.

En cuanto a las características de extracción, fue determinante establecer las condiciones óptimas tanto para la extracción química, como para la extracción con pretratamiento microbiológico. Donde la caracterización química proporcionó el efecto que tendría utilizar la madera de guamúchil como sustrato para el crecimiento del microorganismo ya que cumplía con los requerimientos nutricionales (% lignina) y con esto también poder clasificarla dentro de las maderas duras.

Las muestras de madera de guamúchil con de reducción del tamaño de partícula, el aserrín presentó los mejores rendimientos para la extracción química, obteniendo el agotamiento total del pigmento en nueve horas.

Con el pretratamiento microbiológico las mejores condiciones fueron: aserrín, adición de una fuente extra de carbono (caldo Sabouraud), con un tiempo de incubación de 5 días del microorganismo sobre el residuo, llegando a la extracción total en un tiempo de nueve horas. Aunque, si lo que se busca mejorar no solo es el rendimiento en la extracción sino también la reducción de insumos y aminorar el impacto al medio ambiente, se podría utilizar la viruta como principal sustrato, ya que reduce la extracción total a un tiempo de seis horas.

Por otro lado, se identificaron compuestos o algunos de los principales grupos funcionales de un pigmento en particular (ácido carmínico) que es el que se obtiene de la grana cochinilla y esta presenté en el pigmento extraído.

CAPÍTULO VI

NOMENCLATURA

P. dulce	-	Pithecellobium dulce
P. chrysosporium	-	Phanaerochaete chrysosporium
FTIR	-	Espectrofotometría de infrarrojo
c/u	-	Cada uno
°C	-	Grados centígrados
IDA	-	Ingesta Diaria Admisible
FDA	-	Food and Drug Administration
EE.UU	-	Union Europea
EFSA	-	European Food Safety Authority
FAO-		Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura
NOM	-	Norma
CI	-	Color Index
PB	-	Pudrición Blanca
LiP	-	Lignin Peroxidasa
MnP	-	Manganeso Peroxidasa
H ₂ O ₂	-	Peróxido de Hidrogeno
mL	-	Mililitro
nm	-	Nanómetros
µm	-	Micras
λ _{máx}	-	Longitud de onda máxima
g	-	Gramos

BIBLIOGRAFIA

- Aberoumand A. (2011). A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry, *World J. Dairy and Food Sci.* 6 (1): 71- 78.
- Allen O. (1981). *The Leguminosae a source book of characteristics, uses and nodulation.* The University of Wisconsin Press. U.S.A. pp. 528-530.
- Backa S., Gierer J., Reitberger T., Nilsson T. (1993). Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. *Holzforschung* 47: 181-187.
- Badui D. S. (1993). *Química de los alimentos.* Addison Wesley Longman de México, S. A. DE C. V. México D. F., México.
- Banerjee A., Jain M. (1988). Studies on *Pithecellobium dulce* seed oil. *Fitoterapia. Italia* 59(5): 405.
- Barajas J., Pérez. (1990). *Manual de identificación de árboles de la selva baja mediante cortezas.* Cuadernos del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Talleres gráficos de cultura, S. A. México. 6:49.
- Barragán H.B.E. (2001). *Estudio de la material colorante de la madera del campincerán (Dalbergia congestiflora Pittier).* Instituto Tecnológico de Durango. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica.
- Ben H.O., De la Rubia T., Martínez J. (1997). Effect of carbon as nitrogen limitation on lignin peroxidases and manganese peroxidases production by *Phanerochaete flavido-alba*, *J. Appl. Microbiol.* 83: 751-757.
- Blanchette R.A. (1995). Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botanic.* 73: 999-1010.
- Bogan B.W., Lamar R.T. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular lignolytic enzymes. *APPL. Environ. Microbiol.* 62: 1597-1603.
- Bollag J.M., Shuttleworth K., Anderson D. (1988). Laccase/mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 4: 3086-3091

- Bourbonnais, R., Paice, M. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccases in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
- Bridle, T. (1997). "Anthocyanins as natural food color - selected aspect". *Food Chemistry.* 58 (1-2): 103-109
- Bourbonnais R., Paice M., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4627-4632.
- Broda P., Birch P., Brooks P., Sims P. (1996). Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium* gene expressions for a complex process. *Mol. Microbiol.* 19: 923-932.
- Cabral M. (2004). Crecimiento de Shiitake (*Lentinus edodes*) en medios de cultivo líquidos con aceite automotriz. Tesis inédita pag: 25.
- Calvo C. (1999). Uso de los colorantes en el campo de la alimentación. *Alimentación, Equipos y Tecnología; Rev. N°3:* 79-88.
- Camarero S., Sarkar S., Ruiz D.F., Martínez A. (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese-peroxidase and lignin-peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* 274: 10324-10330.
- Cancel A., Orth A., Tien M. (1993). Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanaerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2909-2913.
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W. (2001). *The fungi* (Second edition.) London: Academic Press
- Carmona I. (2013). *Analista de Alimentos Procesados. Inteligencia Competitiva para el sector Agroalimentario*
- Carter I. (1983). Market Place, South Cave, Brough, N Humberside, HU15 2AS, Inglaterra
- Carvalho J.C., Pandey A., Babitha S., Soccol C.R. (2003). Production of monascus biopigments: An overview. *Agro Food Industry hi-tech.* 6:37-42.

- Cervantes S.M. (1996). Investigación en especies arbórea de uso múltiple de la selva baja caducifolia (SBC) en el estado de Morelos. Resúmenes del II Congreso Mexicano de Etnobiología. Cuernavaca, Morelos. p.8.
- Chalá W.P. Guerreño J.E., Rivas C.A., Castro A.A., Palacios J.A., Castro A. (2003). Extracción de colorantes naturales, una alternativa de aprovechamiento de la diversidad biológica del choco, Colombia. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Tecnológica del Choco. Seccional Choco. Quibdó, Colombia
- Chattopadhyay P., Chatterjee S., Sen S.K. (2008). Biotechnological potential of natural food grade biocolorants, *Afri. J. Biotech.*, 7 (17): 2972-2985.
- Chen S., Chang H. (1985). Chemistry of lignin biodegradation. p.p 535- 555. En: T. Higuchi (ed.) "Biosynthesis and biodegradation of wood components". Academic Press, Orlando.
- Christian V. Shrivastava R., Shukla D., Modi H., Vyas B.R. (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. *Indian J. Exp. Biol.* 43:301-312.
- Contreras S.A.C. (1987). El palo de tinte, motive de un conflicto entre dos naciones (1670-1802). *H. Mex.* 37(1): 49-74.
- Crane E., Walker P., Day R. (1984) Directory of important world honey sources. IBRA, London, pp 384
- Daniel G., Nilsson T., Pettersson B. (1989). Intra and extracellular localization of lignin peroxidase during the degradation of solid wood and wood fragments by *Phanaerochaete chrysosporium* by using transmission electron microscopy and immune-gold labeling. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 871-881.
- Delgado V.F., Jiménez A.R., Paredes L.O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(3):173-289.
- Delgado V.F., Lopez V.H.E., Valdez R.S., Blanco L.A., Chagolla L.A., Lopez V.E.J. (2004). Isolation and properties of a Kunitz-type protein inhibitor obtained from *Pithecellobium dulce* seeds. Food Science and Technology Program, Faculty of Chemical and Biological Sciences, Autonomous University of Sinaloa,

- Sinaloa, Mexico, Institute for Neurobiology, UNAM, Queretaro, Qro., Mexico, and CINVESTAV-IPN, United Irapuato, Irapuato, Gto., Mexico
- Diamantidis G., Effosse, A, Potier P., Bally R. (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheres bacterium *Azospillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem.* 32: 919-927.
- Dittmer J., Pantel N., Dhawale S. (1997). Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 65-70.
- Dosoretz C., Grethelein H. (1991). Physiological aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanaerochaete chrysosporium*. *Appl. Biochem. Biotech.* 28: 23-265.
- Duke A.J. (1983). Handbook of Energy Crops. Consultado el 20/08/2013. https://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Pithecellobium_dulce.html
- Durán N., María F.S.T., De Conti R. (2002). Ecological-Friendly Pigments from Fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1): 53-66.
- Duxbury. (1990). "Replacement colors and blends for hanne FD&C red No.3 lake". *Food. Proc.*, 51(5): 63-70.
- O'Donnell D.C. (2011). Tendencias Globales en Colorantes. *Industria Alimentaria*. Consultado el 18/08/14. <http://www.industriaalimenticia.com/publications/3/editions/1101>
- Eggert C., Temp U., Dean J., Eriksson K. (1996a). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391: 144-148.
- Eggert C., Temp U., Erikson K. (1996b). The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158.
- Eggert C., Temp U., Erikson K. (1997). Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Lett.* 407: 89-92
- Faison B., Kirk T. (1985). Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanaerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 299-304.

- Francis. (1998). "Stability of anthocyanin's from *Zebrina pendula* and *Ipomea tricolor* in a model beverage. J. Food. Science.53:1580-1582.
- García E.D., Medina G.M. (2006). Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. Zootecnia Tropical., 24: 233-250.
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J.M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductases enzymes. Bioremed. J. 3: 1-25.
- Gleen J., Morgan M., Mayfiels M., Kuwahara M., Gold M. (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14: 1077-1083.
- Gold M., Alic M. (1993). Molecular biology of the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiological Reviews. 57: 605-622.
- Gómez R.S., Sierra A.M.I., Pérez Q.d., Morante Z.S. (2009). Análisis Instrumental. Primera edición. Barcelona, España. Netbiblo.
- Gow N.A. (1995). The growing Fungus. (C. y Hall, Ed.) London: N.A.R Gow y G. M. Gadd.
- Guevara E.A, González S.E, Suzan A.H., Barrera G.M.M, Diaz M., Gómez S.M., Hernández S.L., Pantoja H.Y., Olvera V.D. (2008). Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario s/n. 76010. Santiago de Querétaro, Qro.
- Guízar y Sánchez. (1991). Guía para reconocimiento de los principales arboles del Alto Balsas. Dirección de Difusión Cultural. Universidad Autónoma Chapingo. México: p 109.
- Guzmán G. (2000). Genus *Pleurotus* (Jacq: Fr.) P. Kumm (Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems and development. 65: 41-48.
- Hammel K., Tardone P., Moen M., Price J.A. (1989). Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn (II): New observations on the oxidability of guaicyl and syringyl substructures. Arch. Biochem. Biophys. 270: 404-409.
- Hatakka A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Micribiol. Rev. 13:125-135.

- Hatakka A., Lundell T.A., Brunow, G. (1991). Metabolism of non-phenolic β -O-4 lignin model compounds by the white- rot fungus *Phlebia radiata*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 270-277.
- Heinfling A., Martinez M., Martinez A., Bergbauer M., Szewzyk U. (1998). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkkandera adusta*. FEMS Microbiol. Lett. 165: 43-50.
- Hickman G.W., Perry E. (1997). The common wood decay fungi on California landscape trees. Western chapter, international society of arboriculture. Sacramento, CA.
- Higuchi T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. Wood. Sci. Technol. 24: 23-63.
- Higuchi T. (2004). Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences, 80 (5): 204-214.
- Honorato S.J.A., Hernández P.J. (1998). Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del estado de Puebla. Investigador. INIFAP. Campo Experimental San Martinito. Apdo. Postal No. 124. San Martin Texmelucan, Pue. 74000 México.
- Ivic M.M., Berger W.M. (2008). El arte sale de las casas: los tintes naturales en San Juan la Laguna, Sololá, Ciencia y técnica maya. Editores: Matilde Ivic Monterroso e Iván Azurdiaq. Fundación Solar. Guatemala. Pp: 101-133.
- Jeffries T., Choi S., Kirk T. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerocheate chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 42: 290-296.
- Jongaroontaprangsee S., Tritrong W., Chokanaporn W., Methacanon P., Devahastin S., Chiewchan N. (2007). Effects of Drying Temperature and Particle Size on Hydration Properties of Dietary Fiber Powder from Lime and Cabbage By-Products. International Journal of Food Properties. 10 (4): 887-897.
- Joselau J.P., Ruel K. (1994). Wood polysaccharides and their degradation by fungi, in O. Petrini y G.B. Ouellette (Eds.), Host Wall Alterations by Parasitic Fungi. Minnesota St. Paul: APS Press

- Kawai S., Umezawa T., Huguichi T. (1987). P- Benzoquinone monoketals, novel degradation products of β -O-4 lignin model compounds by *Coliolum versicolor* and lignin peroxidase of *P. chrysosporium*. FEBS Lett. 210: 61-87.
- Kirk T., Schultz E., Connors W., Lorenz L., Zeikus J. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanaerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117: 277-285.
- Kishi K., Wariishi H., Márquez L., Dunford H., Gold M. (1994). Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. Biochemistry 33: 8694-8701.
- Knorr D. (1987). "Modern Technology regulation: over view and selected issues". Food Technol., 42(1): 12-13
- Korwek L.E. (1990). "Food biotechnology regulation: over view and selected issues". Food Technol., 44(4):74-76
- Larrando L., Gonzales B., Cullen D. (2004). Characterization of a multicopper oxidase gene cluster in *Phanerochaete chrysosporium* and evidence of altered splicing of the mco transcripts. Microbiology. 150: 2775-2783.
- Lewis N., Yamamoto E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 41: 455-496.
- Loredo M.O.L. Rodríguez C.J.M., Ramos E.M.G. (2002). Aprovechamiento de recursos vegetales en una localidad de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca, Michoacán, México. Etnobiología 2: 32-60
- López G.N. (2011). Determinación de colorantes alimentarios en productos alimenticios del mar. Departamento de Hidrología y Química Analítica. Master Universitario Oficial en Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental.
- Luley C. (2006) Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en arboles urbanos. Sociedad Internacional de Arboricultura. (Página en línea). Consultado el 15/09/214. Disponible en: <http://www.isahispana.com/treecare/articles/decay-fungy.aspx>
- Maradiya H.R., Patel V.S. (2001). Synthesis and dyeing performance of some novel heterocyclic azo disperse dyes. J. Braz. Chem. Soc. 12(6): 710-714.

- Markham P. (1998). Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycological Research*, 98:1089-1106.
- Martinez A. (2002). Molecular Biology and structure-function of lignin-degrading hemo peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 425-444.
- Martinez M., Ruiz D.F., Guillen F., Martinez A. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eu. R. J. Biochem.* 237:424-432.
- McCann D., Barrett A., Cooper A., Crumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K., Porteous L., (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3 and 8/9 year old children in the community. *The Lancet* (20-Ago-2014). http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/660.pdf
- Mc Eldowney S., Hardman D.J., Waite S. (1993). Treatment Technologies. In: *Pollution Ecology and Biotreatment Technologies*. Singapore, Longman Singapore Publishers.
- MacFoy C. (2004). Ethnobotany and Sustainable Utilization of Natural Dye Plants in Sierra Leone. *Economic Botany* 58 (supplement): S66-S76
- McVaugh R. (1983). *Flora Novo-Galiciana: a descriptive account of the vascular plants of western Mexico*. Ann Arbor, MI: University of Michigan Press. 786 p. Vol. 5.
- Miles P., Chang S.T. (2001). *Biología de las setas*. Bogotá: Ágora Editores Ltda.
- Moffat A.C. (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons*. Cuarta edición. Londres. Pharmaceutical Press.
- Monroy R., Colín H. (2004). El guamúchil *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth, un ejemplo de uso múltiple Madera y Bosques, 10 (1): pp. 35-53, Instituto de Ecología, A.C. México.
- Montoya B.S. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto grifola frondosa. Tesis de grado maestría en Ingeniería-Ingeniería Química.
- Moore D. (1998). *Fungal Morphogenesis*. New York, United States of America: Cambridge University Press.

- Olsen E.D. (1990). Métodos ópticos de análisis. Primera Edición. Barcelona, España. Reverte
- Olvera G.C. (2003). Las plantas tintóreas de la Región de Tacámbaro. Casa de las artesanías del Estado de Michoacán México.
- Paredes L.O. (1986). "La biotecnología de las plantas: una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México": Ciencia y Desarrollo. 12(68): 27-43
- Pease E., Tien M. (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanaerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 174: 3532-3540.
- Pérez J., Martínez J., De la Rubia T. (1996). Purification and partial characterization of a lacasse from the white rot fungus *Phanerochaete flavid-alba*. Appl. Environ. Microbiol. 62:4263-4267.
- Périé F., Gold M.H. (1991). Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus aqualens*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2240-2245.
- Pickard M., Roman R., Tinoco R., Vázquez D.R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by White rot fungi and oxidation by *Corilopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3805-3809.
- Poiting S. (2001). Feasibility of bioremediation by White rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:20-33.
- Paz F.F.J. (2008). Determinación de la composición química de la madera obtenida del primer clareo en árboles de Melina (*Gmelina arborea* Roxb.), de una plantación proveniente del departamento de Izabal. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos. Guatemala.
- Pribnow D., Mayfield M., Nipper V., Brown J. (1989). Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 264: 5036-5040.
- Rayner A.D.M., Boddy L. (1988). Fungal decomposition of wood, its biology and ecology. John Wiley and Sons LTD. Inglaterra. 587p.

- René B.S.R., Ávila C.L.E., Rutiaga Q.J.G. (2013). Componentes químicos de la madera de cinco especies de pino del municipio de Morelia, Michoacán. *Madera y Bosques* 19(2): 21-35.
- Ríos S., Eyzaguirre J. (1992). Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma austrialis*. *APPL. Microbiol. Biotechnol.* 37: 667-669.
- Rossingnon J. (1859). Manual del Cultivo del añil y del Nopal. Extracción del Índigo, Educación y Cosecha de la Cochinilla. Extracción de los principios colorantes de varias plantas tintoriales. Paris, Librería de Rosa y Bourent. <http://books.google.com/books?id=BZUUAAYAAJ&orintsec=titlepage&hl>
- Rüttiman J.C., Cullen D., Lamar R. (1994). Manganese peroxidases of the white rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 599-605.
- Rüttimann C., Schwember E., Salas L., Cullen D., Vicuña R. (1992). Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 16: 64-76.
- Sarkar S., Martínez A., Martínez M. (1997). Biochemical and molecular characterization of manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1339: 23-30.
- Schoemaker H., Lundell T., Hatakka A., Piontek K. (1994). The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignin models and lignin by lignin peroxidase- the redox cycle revisited. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 321-322
- Shimada M., Higuchi T. (1991). Microbial, enzymatic and biomimetic degradation of lignin. Pp: 557-619
- Stiling D.R. (1996). Ecology; theories and applications. 2a. ed. Prentice Hall. New Jersey. Pp: 539.
- Sutherland J., Selby A., Freeman J., Evans F., Cerniglia C. (1991). Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3310-3316.
- Teh L.S., Francis F.J. (1988). Stability of anthocyanins from *Zebrina pendula* and *Ipomea tricolor* in a model beverage. *J. Food Sci.* 53: 1580-1582.
- Thomas G.V., Prabhu S.R., Reeny M.Z., Bopaiah B.M. (1998). Evaluation of lignocellulosic biomass from coconut palm as substrate for cultivation of

- Pleurotus sajorcaju* (Fr). Singer. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 14: 879-882.
- Thurston C. (1994). The structure and function of fungal laccases. Microbiology. 140: 19-26
- Tien M. (1987). Properties of ligninase from *Phanaerochaete chrysosporium* and their possible applications. CRC. Crit. Rev. Microbiol. 15: 141-168.
- Tien M., Kirk T. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanaerochaete chrysosporium* Burds. Science 221: 661-663
- Tien M., Kirk T. (1998) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods Enzymol. 161: 283-249.
- Tour U., Winterhalter K. (1995). Enzyme of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants of wood decay. J. Biotechnol. 41: 1-17.
- Triana C.C.F. (2010). Producción de etanol a partir de residuos del cultivo de café. Tesis de Posgrado. Universidad nacional de Colombia sede Manizales.
- Valenzuela J. (1977). Cambios biogeoquímicos de la fruta del guamúchil (*Pithecellobium dulce*) durante su desarrollo. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Pp: 39.
- Vignoth S, Martínez R.I, Jiménez P.F. (1981). Tecnología de la madera. Química inorgánica descriptiva. Publicado por Reverte. Pp: 1-315
- Von Elbe J.H., Maing I., Amundson C.H. (1974). Color stability of betanin. J. Food Sci. 39: 334-337.
- Waldner R., Leisola M., Fietcher A. (1988). Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 400-407.
- Warmi (2002). Tintes naturales. Consultado: 21 de junio del 2013. Disponible en: <http://www.warmi.hypermart.net/tintesnaturales.htm>.
- Wissgott U., Bortlik K. (1996). Prospects for new natural food colorants". Trends in Food Science and Technology. 7: 298-302.
- Whitaker J.R. (1994). Principles of enzymology for the food science. Second edition. Marcel Dekker INS. New York. USA. Pp. 301-328.

Zabel R., Morrell J. (1992). Wood Microbiology. Academic Press. San Diego, U. S. A.
476 p.