

# Obtención de carotenoides a partir de la flor de cempoalxochitl (*Tagetes erecta*) mediante tratamiento enzimático

## Carotenoid extraction from marigold flower (*Tagetes erecta*) by enzymatic treatment

María Hernández-González<sup>1</sup>, Ana L. Salazar-González<sup>1</sup>, Anna Iliná<sup>2</sup>, Baltazar Rodríguez-Gutiérrez<sup>2</sup>, Ramiro López-Trujillo<sup>1</sup>, Xóchitl Ruelas-Chacón<sup>1</sup>, Oscar Noé Reboloso-Padilla<sup>1</sup>.

E-mail: mary12@yahoo.com

<sup>1</sup>Profr. Investigador Depto. Nutrición y Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah., México. C.P. 25315.

### Abstract

Natural pigments use in food industry, have become important in the present food industry. Carotenoids are plant pigments responsables of orange, yellow, red and green colors; marigold sun flower are great source. The objective of this study was to propose an enzymatic carotenoid extraction and identifying. This method include a pre-treatment with cellulases in aqueous medium and further filtering and pressing process in order to get these compounds, reducing the ecological impact and having free toxic remainders, colorants because not using organic dissolvent in contrast with conventional method. Was found the following conditions to carotenoid extracting: 8 hrs of contact, at a 0.1% (w/w) enzyme substrate relation, a temperature of 55 °C, pH = 4.5 and continuous shaking. Lutein was the principal carotenoid found in this extract.

**Key words:** *Tagetes erecta*, carotenoid, marigold sunflower, cellulases.

### Resumen

El uso de pigmentos naturales ha adquirido gran importancia en la industria alimentaria actual. Los carotenoides son pigmentos vegetales que proporcionan colores naranja, amarillo, rojo y verde; la flor de cempoalxochitl es una rica fuente de estos pigmentos. El presente trabajo se realizó con el objetivo de proponer un método de extracción enzimática y caracterización de carotenoides en pétalos de cempoalxochitl. Este método implica un pre tratamiento con celulasas en medio acuoso y procesos de prensado y filtrado; permite reducir el impacto al medio ambiente y obtener colorantes libres de residuos tóxicos, ya que a diferencia del método convencional, no utiliza solventes orgánicos en su proceso de extracción. Se determinaron las siguientes condiciones para la extracción de carotenoides de cepoalxochitl: 8 h de contacto con una relación enzimas sustrato de 0.1 % (p/p) a una temperatura de 55 °C, un pH = 4.5 y agitación constante. El carotenoide principal contenido en el extracto fue luteína.

**Palabras clave:** *Tagetes erecta*, carotenoides, cempoalxochitl, celulasas.

## Introducción

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

Los colorantes se pueden clasificar en función de su origen, donde se pueden distinguir los sintéticos o artificiales y los naturales; esta última denominación es atractiva en el área de los alimentos, ya que la palabra “natural” genera un prejuicio favorable (Multon, 2000)

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

Actualmente estas flores son utilizadas como complementos del alimento de aves de corral para alcanzar las pigmentaciones requeridas por el consumidor (Delgado 1997). El pigmento se extrae de la flor como una sustancia de origen lipídico, con solventes orgánicos, este proceso reporta pérdidas del pigmento (50 %). Lo anterior aunado al considerable problema ambiental y otros riesgos que implica el uso de solventes orgánicos, han llevado a la utilización de procedimientos de extracción acuosa y/o con un pre-tratamiento enzimático, que permitan incrementar los rendimientos de extracción y eliminar el uso de solventes orgánicos. Estos procedimientos han demostrado ser funcionales en la extracción de pigmentos, a nivel experimental, aunque todavía no se han utilizado a nivel industrial (Ávila y col., 1990).

La implementación de un pre-tratamiento enzimático con celulasas puede permitir la degradación de la celulosa contenida en los pétalos de la flor de cempoalxochitl, para obtener una mayor recuperación del pigmento mediante procesos de filtrado y prensado, obteniéndose de esta manera un producto libre de agentes tóxicos y de contaminantes. Por esta razón el objetivo de este estudio es proponer un método de extracción enzimática y la caracterización de carotenoides contenidos en pétalos de cempoalxochitl.

## Metodología Experimental

Se utilizaron pétalos de flor de cempoalxochitl, las cuales se desprendieron manualmente del capítulo y se secaron a temperatura ambiente, para posteriormente almacenarlas en oscuridad.

Se realizó análisis de ceniza, humedad, grasa, fibra cruda, celulosa y lignina, de acuerdo a los métodos establecidos por la (AOAC) en 1980, excepto las de celulosa, lignina, y fibra que se hicieron de acuerdo a Vansoest, *et al.* (1968).

Posteriormente se procedió a determinar la relación enzima sustrato y el tiempo de contacto que proporcionara los mejores rendimientos siguiéndose una cinética de reacción en función a la formación de azúcares totales y reductores, con lo cual fue posible obtener los valores de  $V_0$ .

Se determinaron las condiciones de reacción para lo cual se establecieron cinco tratamientos a diferentes concentraciones de enzima inicial, 1.0 %, 0.1 %, 0.01 %, 0.001 % y 0.0001 %, (p/p) en relación a 1 g de pétalos de flor deshidratada, usando buffer de acetatos con pH = 4.5, a temperatura de 55 °C y agitación continua. Los tratamientos se monitoreron a diferentes intervalos de tiempo en función a la formación de azúcares totales, mediante la técnica del fenol sulfúrico (Dubois, 1956) y azúcares reductores mediante la técnica del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

Una vez establecida la concentración enzima/sustrato óptima se corrió un nuevo experimento bajo las mismas condiciones manteniendo un testigo sin enzima, los cuales se monitorearon en función de la formación de azúcares totales y reductores a diferentes intervalos de tiempo así como a la liberación de pigmento. Las muestras se evaporaron y se filtraron a través de una malla de poro mediano, la muestra restante se lavo varias veces hasta obtener un filtrado claro.

El material obtenido se sometió a un proceso final de evaporación en horno a una temperatura entre 60-65 °C hasta la eliminación completa de la humedad residual. La recuperación del pigmento esta se determinó por el gravimétrico.

Los datos del análisis gravimétrico se sometieron a un análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ), para determinar las condiciones que ofrecen una mayor liberación de colorante.

Para determinar la pureza del extracto recuperado, se aplicó un análisis por espectroscopia infrarroja (IR) a los extractos obtenidos, mediante la preparación de la pastilla de KBr con la muestra del colorante en polvo y se analizó en un espectrofotómetro Perkin – Elmer.

Finalmente se procedió al análisis infrarrojo de la pasta obtenida la cual fue comparada contra un testigo químicamente puro de luteína.

## **Resultados y Discusión**

Los resultados del análisis químico fueron: 0.72 % de humedad, 4.17 % de celulosa, 2.92 % de lignina, 10.93 % de fibra cruda, 4.47 % de cenizas y 8.24 % de grasa. El componente que se encuentra en mayor porcentaje en los pétalos de la flor de cempoalxochitl es fibra cruda y la celulosa es el carbohidrato que se encuentra en mayor proporción, por ello se sugirió el uso de celulasas para romper las paredes celulares dentro de las cuales se encuentra el pigmento, y facilitar con ello su liberación.

La relación enzima sustrato y el tiempo de contacto que proporcionó los mejores rendimientos se muestran en el Cuadro 1 donde es posible observar que la los tratamientos de celulasa al 1.000 y 0.1 % fueron estadísticamente iguales pero superiores a los tratamientos de celulasa al 0.01 y 0.001 % los cuales no presentan diferencias significativas entre ellos ( $p \leq 0.05$ ), los rendimientos mas bajos se obtuvieron con la enzima al 0.0001 %. Debido a lo anterior se optó por el uso de las concentraciones de celulasa al 0.1 % y al 1.0 % ya que fueron las que presentaron mayores niveles de velocidad inicial. Estos resultados coinciden con lo reportado por Delgado (1997) en un estudio similar.

**Cuadro 1.** Medias de las velocidades iniciales en función a la concentración inicial de enzima

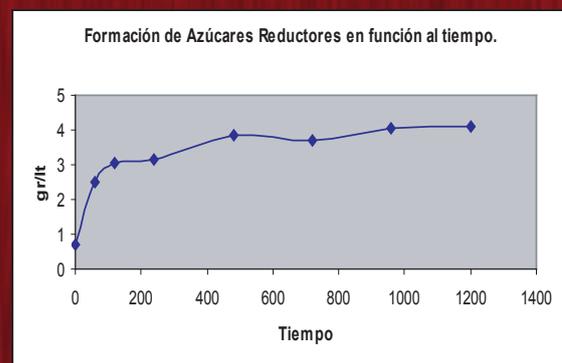
Celulasa E <sub>0</sub> %	V <sub>0</sub> mg mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
0.0001	0.004582
0.0010	0.011008
0.0100	0.011810
0.1000	0.014462
1.0000	0.014113

El tiempo optimo de reacción, para obtener la mayor recuperación del pigmento, tuvo como indicadores la formación de azúcares totales, (Fig. 1) azúcares reductores (Fig. 2) y liberación del pigmento (Figura 3), se reportan como las medias del análisis de varianza.

Como es posible apreciar en las Figuras 1 y 2 los máximos valores para la formación de azúcares tanto totales como reductores ocurrió a los 1200 min de contacto, se pudo observó que este valor fue estadísticamente igual al alcanzado en los tiempos 480 y 960 min, siendo superiores al resto de los valores presentados ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 1** Formación de azúcares totales en función al tiempo



**Fig. 1** Formación de azúcares totales en función al tiempo

La recuperación del pigmento se reportó como las medias del análisis de varianza, donde fue posible observar que los máximos rendimientos en la recuperación del pigmento se obtuvieron después de 480 min de contacto, este nivel fue superior a los que se presentaron previamente y estadísticamente igual a los que se presentaron en tiempos posteriores, por tanto se estableció este como el tiempo de contacto óptimo, el cual fue 15 veces inferior al reportado por Delgado (1997), en el que sugirió un tratamiento de 120 h para la mayor recuperación del pigmento empleando la misma relación enzima-sustrato, esta reducción en el tiempo de contacto, puede deberse a la naturaleza de las hidrolasas empleadas.

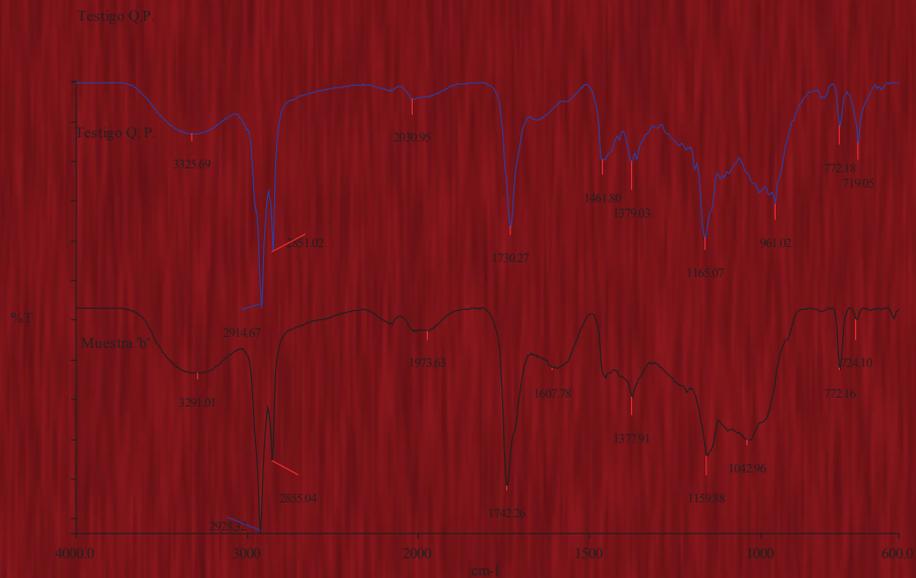
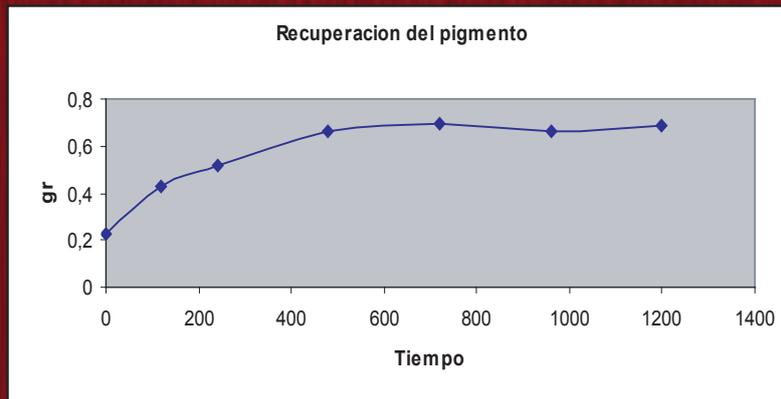


Figura 4. Espectro de Infrarrojo para la pasta obtenida.

El espectro IR exhibió un pico a los  $1742\text{ cm}^{-1}$  lo cual indica según Philip y Berry (1975), que se trata de la presencia de luteína, la grafica superior tomada como patrón presenta el pico a los  $1730.26\text{ cm}^{-1}$ , cercano a los  $1725\text{ cm}^{-1}$  lo cual indica que la muestra es una oleorresina de la luteína y que se encuentra enlazada a los ácidos grasos.

## Conclusiones

Es posible concluir que el componente mayoritario de los pétalos de la flor de cempoatlxochitl es la fibra cruda en la cual la celulosa es carbohidrato que se encuentra en mayor proporción.

La relación enzima-sustrato óptima es la de 0.1 % ya que es la que permitió la máxima formación de producto.

El tiempo de contacto óptimo se estima en 480 min.

El producto obtenido presenta un pico a los  $1725\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la presencia de luteína, la cual se encuentra en forma de mono ester o libre.

## Literatura Citada

- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Thirteenth edition. 353 p.
- Badui, D. S. 1988. Química de los alimentos. Addison Wesley Longman de México, S. A. DE C. V. México D. F., México.
- Delgado V., F. y Paredes-López, O. 1997. Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flower (*Tagetes erecta*). Food Chem. 58(3): 255-258.
- Dubois, M., Guilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 530.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Multon, J. L. 2000. Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias. 2da. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 343-345.
- Philip, T. y Berry, J. W. 1996. A Process for the purification of lutein-fatty acid esters from marigold petals. J. Food Sci. 41: 163-165.
- Vansoest, P. J. y Wine, R. H. 1968. Determinación de fibra por el método ácido detergente/ determinación de lignina, celulosa y silicio por el método de permanganato. J. Anal. Chem. 51: 780.