



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COLORANTES
A PATIR DEL ACHIOTE (*annato*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO**

**PRESENTA
PATRICIA LÓPEZ VELÁZQUEZ**

**ASESOR
DRA. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA**

MORELIA, MICHOACÁN; NOVIEMBRE 2007



Todo lo que te viniere a la mano para hacer, hazlo según tus fuerzas;
Porque en el seol, adonde vas, no hay obra, ni trabajo, ni ciencia,
Ni sabiduría
Eclesiastés, 9:10

No hay nada peor que tu mente y fortaleza sea esclava de la sociedad,
Tu libertad es tu fortaleza, tu fortaleza es tu mente, tu mente son tus éxitos,
Tus éxitos son tus limitaciones, tus limitaciones la sociedad.

Patricia López Velázquez

DEDICATORIA

Dedico al ser divino que me ama y con su fortaleza me permite llegar a esta etapa de mi vida, a esa persona celestial que me dio los mejores padres, los mejores hermanos, a quienes amo, sin su ayuda mis esfuerzos hubieran sido inútiles.

A mis padres, quienes amo, por que han sido la fuente de inspiración de mi vida, mi Mami por sus sabios consejos, por sus acciones y lecciones de vida que me ha enseñado a lo largo de mi vida, por que me enseñó que no hay límites para lograr las metas, a mi Papi, por enseñarme que las cosas de la vida no son fáciles pero tampoco imposibles, que con perseverancia todo es posible, a estos seres maravillosos agradezco, por el tiempo que me han dedicado, por los cuidados, por todo aquello que me han dado, sus consejos me orientaron a tomar siempre buenas decisiones en mi vida, ellos son la fuente principal de mis logros.

A mis hermanos Esperanza, Lidia, Franco, Ana, y Homero, que siempre me han apoyado en mis decisiones, por que sin ellos mi vida no sería la misma, cada uno representa un complemento y un ejemplo en mi vida, por compartir conmigo alegrías y tristezas, por ese incondicional cariño, gracias, los amo.

A mis sobrinas Daniela, Gabriela, Jesús, Zuzet, y Franco que con su pureza me demuestran que fácil puede verse la vida, por que me envuelven en su mundo haciéndome participe de su inocencia y me demuestran el poder del amor.

Al hombre que amo, por su incondicional apoyo, su comprensión y amor, ya que aún sin conocerlo siempre supe que tendría a alguien como a él en mi vida, por compartirme sus sentimientos, enseñarme a disfrutar cada momento, dejarme entrar en su vida, aceptarme a pesar de nuestras diferencias, por amarme y demostrármelo en cada momento, por sus atenciones, sus virtudes, y porque siempre sabe como hacerme reír a pesar de cualquier circunstancia, Sergio Alberto por todo esto y más, Te Amo.

A la familia Carlos Velázquez, Ávila Víctor, por abrirme las puertas de su hogar, por todo el cariño y las atenciones recibidas, a mis amigos Janeth L., Consuelo A. Brenda, Elizabeth V., Claudia S, Ruth G., Claudia T. y Francisco M, Enrique M.

A todos ustedes con mucho Cariño

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a mi asesora Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga por el apoyo brindado para lograr mi meta, una gran persona que se ha ganado mi admiración y respeto, quien me ha enseñado que con perseverancia y paciencia podemos lograr nuestros objetivos, gracias por el tiempo dedicado para poder plasmar mi meta.

Agradezco a la M. en C. Remedios Cisneros Magaña, al Dr. Salomón R. Vázquez García, a la Dra. Maricela Villicaña Méndez, al Dr. Horacio González Rodríguez, al M. en C. Jaime Saucedo, M.en D.H. Teresa de Lourdes López González, por el apoyo brindado y el tiempo dedicado para la realización de esta investigación.

Al Ing. Jorge Orozco, al Ing. Leonardo Tenorio, al M. en C. Luis Nieto Lemus, al Dr. Rafael Maya Yescas, al Dr. Fernando Garibay, al Dr. Juan Zarate, por su apoyo moral y su calidad humana, que han hecho muy grata mi estancia en la Universidad Michoacana.

Al Ingeniero Salvador Pérez por alentarnos a realizar investigaciones basándonos en el conocimiento tradicional de nuestra cultura.

Agradezco también a la mesa de jurado, M. A. Guadalupe Martínez Hernández, Ing. Eric Saldivar Medina, Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga, Ing. Mario Flores Rico, por las observaciones y aportaciones hechas para la realización de este trabajo.

A la Universidad Michoacana que me abrió las puertas del Saber en la Facultad de Ingeniería Química, donde me transmitieron las bases y los conocimientos necesarios en mi formación como Ingeniero Químico.

CONTENIDO	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE DE CONTENIDO	III
GLOSARIO	VI
RELACIÓN DE TABLAS	VII
RELACIÓN DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.1.1 Nombres populares del achiote en México y otros países	1
1.1.2 Variedades	3
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
1.3 Justificación	4
1.4 Hipótesis	5
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	6
2.1 Cultivo	6
2.2 Sistema agroforestal	7
2.3 Tolerancia	7
2.4 Usos	8
2.4.1 Adhesivo	8
2.4.2 Cosmético	8
2.4.3 Insecticida	8
2.4.4 Medicinal	8
2.4.5 Características fisicoquímicas de la semilla del achiote	8
2.5 Mercados	9
2.6 Colorantes (Bixina, Norbixina)	10

	Página
2.7 Extracción rudimentaria del colorante	15
2.8 Extracción industrial	16
2.8.1 Bixina soluble en el aceite	17
2.8.2 Alkali acuoso	17
2.8.3 Propilenglicol	18
2.8.4 Degradación térmica	18
2.9 Análisis de extractos	18
2.10 Proceso de purificación	20
2.11 Cromatografía en capa delgada	20
2.12 Espectroscopia infrarrojo	22
2.13 Adsorción cromatográfica	22
2.14 Diseño de experimentos	23
2.14.1 Objetivos de un diseño de experimentos Box y Behnken	24
2.14.2 Diseño Box-Behnken	24
CAPÍTULO 3. DESARROLLO DEL TRABAJO	26
3.1 Selección del proceso de extracción del colorante	26
3.2 Variables de proceso	26
3.2.1 Concentración del disolvente	26
3.2.2 Relación cantidad de Semilla –Volumen de disolvente	27
3.2.3 Tiempo de agitación	27
3.2.4 Velocidad de agitación	27
3.2.5 pH	27
3.2.6 Temperatura de secado	27
3.2.7 Temperatura de agitación	27
3.3 Obtención del colorante	28
3.3.1 Método de extracción 1	28
3.3.2 Secado	29
3.3.3 Dilución de la muestra	29
3.3.4 Precipitación	30
3.3.5 Enfriamiento en desecador	30
3.3.6 Método de extracción 2	30

	Página
3.5 Metodología del análisis en espectrofotómetro	31
3.6 Cuantificación del colorante	32
3.7 Análisis en el espectrofotómetro infrarrojo	32
3.8 Separación de los colorantes (bixina y norbixina)	32
3.4 Desarrollo del diseño de experimentos para obtener las mejores condiciones de extracción	33
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	35
4.1 Resultados preliminares para los métodos de extracción 1 y 2	35
4.2 Identificación de colorante	36
4.3 Resultados del análisis en el espectrofotómetro	37
4.4 Análisis cromatográfico en capa fina	37
4.5 Resultados de la espectrometría infrarrojo	38
4.6 Resultados obtenidos de la separación de los colorantes presentes en la extracción	39
4.7 Resultados del diseño de experimentos Box-Behnken.	40
4.8 Balance de masa para el método de extracción 2	44
4.9 Diseño del proceso de extracción	46
CONCLUSIONES	48
Recomendaciones y sugerencias	48
BIBLIOGRAFÍA	49

GLOSARIO

- Carotenoide:** Sustancia que se encuentra en las frutas y vegetales de color amarillo y naranja, y en las verduras de hojas verde oscuro.
- Cromatografía:** Técnicas de separación selectiva de moléculas, en las que los componentes de una mezcla compleja pueden ser identificados y/o purificados.
- EINECS:** (Inventario Europeo de Sustancias Químicas Existentes), es un número de registro dado a cada sustancia química comercialmente disponible en la Unión Europea entre el 1 de Enero de 1971 y el 18 de Septiembre de 1981.
- Eritema:** Lesión cutánea caracterizada por enrojecimiento de la piel.
- Isómeros:** Propiedad de ciertos compuestos químicos que con igual fórmula química, proporciones relativas de los átomos que lo conforman, presentan estructuras moleculares distintas.
- Licopeno:** Pigmento vegetal, soluble en grasas, que aporta el color rojo característico a los tomates, sandías. Pertenece a la familia de los carotenoides como el β -caroteno.
- pH:** Potencial hidrógeno (pH) como el logaritmo negativo de la actividad de los iones hidrógeno $\text{pH} = -\log_{10} (\text{H}^+)$.
- Phyllum:** Filo o *phylum* es el rango de clasificación que está entre reino y clase (taxonomía).
- Pigmentos:** Pigmento sustancia colorante, obtenida de minerales o sustancias orgánicas que mezcladas con aglutinantes constituyen los diferentes tipos de pinturas o patinas.
- Sustrato:** Un sustrato o sustrato es una especie química que se considera, de forma explícita, objeto de la acción de otros reactivos.
- Taxonomía:** Ciencia de ordenar a los organismos en un sistema de clasificación compuesto por una jerarquía de taxones anidados.
- Tintes:** Sustancia con la que se le da color a un objeto o cosa (usualmente tejido, ropa o cabello) sobre el que ya tiene.
- Toxicidad:** Medida usada para medir el grado tóxico ó venenoso de algunos elementos.

RELACIÓN DE TABLAS

	Página
2.1 Características generales del achiote	7
2.2 Composición química, nutricional de la semilla y del colorante del achiote	9
2.3 Cronología de las investigaciones realizadas del achiote	11
2.4 Punto de fusión de la Bixina y Norbixina de acuerdo a sus isómeros	12
2.5 Usos permitidos de achiote y máximos niveles de adicción en alimentos	13
2.6 Carotenoides presentes en el pigmento del achiote dependiendo del método de extracción	18
2.7 Componentes de la extracción de las semillas del achiote con cloroformo	19
2.8 Contribución del achiote para la coloración de la margarina	20
2.9 Algunos adsorbentes en orden decreciente de actividad	20
2.10 Clasificación de los diseños experimentales de acuerdo a sus estructuras	24
2.11 Arreglo de un diseño Box-Behnken para tres factores	25
3.1 Factores y niveles para el diseño de experimentos	33
3.2 Combinación de los factores a estudiar	34
4.1 Resultados obtenidos del método 1 para la extracción del colorante	35
4.2 Resultados obtenidos del método 2 para la extracción del colorante	36
4.3 Resultados del diseño de experimentos Box-Behnken	41
4.4 Resultados del análisis de varianza para la extracción de Bixina.	41
4.5 Resultados de la extracción a las mejores condiciones	44
4.6 Resultados obtenidos del Balance de Masa	46
4.7 Equipos que se sugieren para ser utilizados para la extracción del achiote	47

RELACIÓN DE FIGURAS

	Página
1.1 (a) Fruto verde, semillas, (b) Fruto maduro, (c) Flor y (d) semillas del achiote (Sandi, 2003; Vázquez, 1999)	2
2.1 Formas que puede tener la semilla del achiote (IICA, 1989)	10
2.2 Formula Química y estructura: <i>cis</i> -Bixina $C_{24}H_{30}O_4$, (Norma Oficial Mexicana NOM-119-SSA1, 1994)	11
2.3 Formula química y estructura: <i>cis</i> -Norbixina: $C_{24}H_{28}O_4$, (Norma Oficial Mexicana NOM-119-SSA1, 1994)	12
2.4 Ruta de la biosíntesis de la Bixina (Giuliano y col., 2003)	13
2.5 Ruptura oxidativa del licopeno	15
3.1 Colorante en polvo obtenido de las extracciones	28
3.2 Diagrama de bloques para el método de extracción 1	29
3.3 Diagrama de bloques para el método de extracción 2	31
3.4 Curva de calibración del colorante del achiote	32
4.1 Colorante obtenido del achiote	37
4.2 Cromatografía en capa fina del colorante del achiote	37
4.3 Comparación de espectros en infrarrojo del achiote	38
4.4 Máxima longitud de onda para el colorante del achiote	39
4.5 Cromatografía en columna del achiote	40
4.6 Superficie de respuesta y contorno para la extracción del colorante en función de la relación semilla-volumen de KOH y de la temperatura.	42
4.7 Superficie de respuesta y contorno para la extracción del colorante en función de la relación semilla-volumen de KOH y del tiempo	43
4.8 Superficie de respuesta y contorno para la extracción del colorante en función de la temperatura y el tiempo	43
4.9 Diagrama de bloques para la extracción del colorante	45
4.10 Proceso de extracción del colorante del achiote	48

RESUMEN

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COLORANTES APARTIR DE ACHIOTE (ANNATO)

Por:

Patricia López Velázquez

Noviembre del 2007

Licenciatura en Ingeniería Química

Dirigida por: **Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga**

Los pigmentos naturales han tomado importancia en la industria alimenticia, ya que su toxicidad es nula, el estudio de ellos es importante. *Bixa orellana* (achiote, annato), es el pigmento carotenoide extraído de las semillas de la planta, de estas se obtiene Bixina y Norbixina. En México a pesar de las grandes producciones de achiote no existe ninguna empresa para la extracción del pigmento.

El presente estudio tiene como finalidad implementar la extracción de los colorantes del achiote, un método simple, económico, y con un rendimiento aceptable de la extracción, empleando medios alcalinos para la obtención del colorante, utilizando como disolventes el KOH y NaOH. El carotenoide obtenido de las extracciones fue la Norbixina que se identificó y comparó con un colorante comercial utilizando cromatografía en capa fina presentando un R_f de 0.75. Obtenido el colorante se efectuó la separación de grasas y otros componentes presentes por el método de cromatografía en columna por elución. Mediante espectrofotometría en infrarrojo se corroboró la presencia de ambos compuestos en el extracto, identificando el grupo carboxilo a 3385 cm^{-1} . Se empleó un diseño de experimentos Box-Behnken de 15 ensayos, de tres variables (Relación semilla: volumen de KOH, temperatura y tiempo) con tres niveles, que permitió encontrar las mejores condiciones para la extracción del colorante, encontrando que las variables más significativas fueron la relación semilla-volumen de KOH y temperatura.

El achiote tiene en su semilla un 8% de colorante y con el método utilizado (alcalino) se logró extraer alrededor de un 7.5 % del colorante de la semilla, efectuándose en un tiempo aproximado de 4 horas, lo que permitió establecer la metodología para el proceso de extracción del colorante del achiote.

SUMMARY

Extraction and Purification of Dyes from The Achiote (ANNATTO).

From:

Patricia López Velázquez

November 2007

Chemical Engineering Degree

Adviser: **Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga**

The natural pigments have taken importance in the food industry, since its entirety is null, the study of these is important, the annatto, *Bixa orellana* (achiote), is the carotenoide pigment extracted from the seeds of the plant, from these are obtained bixin and norbixin, in Mexico, despite the large achiote productions there is no company for the extraction of this pigment.

The present study has as purpose to implement the extraction of the colorings of the achiote, a simple, economic method, and with an acceptable yield of the extraction, using alkaline means for the obtaining of the coloring, using as dissolvent the KOH and NaOH. The obtained carotenoide of the extractions was the Norbixina that was identified and it compared with a commercial coloring using thin layer chromatography presenting at R_f 0.75. Obtained the coloring the separation was made of fatty and other present components for the chromatography method in column for elution. By means of adsorption in infrared you corroborate the presence of both compounds in the extract, identifying the group carboxyl to 3385 cm^{-1} . With the use a design of experiments Box-Behnken of 15 rehearsals, of three variables (Relations seed: volume of KOH, temperature and time) with three levels that he allowed to find the best conditions for the extraction of the coloring, finding that the most significant variables were the relations seed-volume of KOH and temperature.

The annatto has in his seed an 8% dye and with the method used (alkaline) was achieved 7.5% coloring of the seed, to be in a time of approximately 4 hours, it that was allowed to establish the methodology for the process of extraction of the coloring of the anatto.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se definen las clases de achiote que existen, el nombre con el que se le conoce en diversos lugares de México y en otros países, y la importancia que tiene esta planta como pigmento.

1.1 Generalidades

Los colorantes naturales se dividen en “tintes” y “pigmentos”. Los tintes se definen como compuestos que interaccionan químicamente con el sustrato coloreado (p. e. textiles). Por otro lado, los pigmentos, muy usados en la industria farmacéutica, no forman enlaces químicos con el sustrato, y para que pueda adherirse a la superficie del sustrato se tiene que mezclar con un adhesivo (Escobar, 2005).

Los aditivos que son utilizados como sustancias colorantes pueden ser obtenidos por síntesis química en la industria (colorantes sintéticos) o provenir de fuentes naturales como los vegetales (colorantes o pigmentos naturales). En los últimos tiempos los colorantes sintéticos han sido cuestionados debido a sus efectos toxicológicos, inclusive algunos han sido eliminados de algunas legislaciones, (Tocchini y Zerlotti, 2001). Lo anterior aunado a la tendencia que tienen los consumidores, sobre todo en los países desarrollados, comprar alimentos con un mínimo o nulo contenido de sustancias sintéticas; ello ha provocado que el uso de colorantes naturales vaya en aumento y sustituyendo a los sintéticos (Salas, 2003).

Los colorantes naturales han tomado gran importancia en la industria alimenticia, textil, láctica, cárnica, condimentaría, cosmética, farmacéutica, y otras. El color de presentación que se le da a estos productos es significativo para su venta, el achiote es uno de los colorantes naturales más utilizados en estas industrias, de esta planta se obtiene la Bixina y la Norbixina (en forma *cis* y *trans*), en la actualidad son pocas las empresas que se dedican a la extracción de estos colorantes (Kenia, Perú, Brasil e India), en México a pesar de las grandes producciones de achiote no existe ninguna empresa para la extracción de éstos.

1.1.1 Nombres populares del achiote en México y otros países

En México: axiote (náhuatl), acanguarica (purépecha, Michoacán), auau (totonaco, Veracruz), ornato, uruca, recaudo rojo (Yucatán), kiui, dúxub (maya), bosh (tzotzil, Chiapas),

achiotillo (Chiapas), cuypuc (popoluca, Veracruz), chancuarica, patuca (Morelos), joosh (tojolabal, tzeltal, Chiapas), uchuviá (zapoteco, Oaxaca), achi-ol (chontal, Oaxaca), achut (mixe, Oaxaca). En otros países: bija, uñañé, onoto, eroyá, chancanguaricá, pumacoa, rocou, chagerica, onoto, orellana, ranota, rocuyer (Francia), urucú (Brasil, Argentina, Galicia y Portugal), annato, lipstick tree (EU), (Smith y col., 1992).

Achiote, es el pigmento carotenoide extraído de las semillas del Orellana tropical de Bixa. El árbol del achiote fue nombrado en honor a Francisco de Orellana, explorador del Amazonas. Los aztecas utilizaron el extracto del achiote como un textil y tinte del cuerpo (las mujeres lo utilizaron como lápiz labial) y como colorante del alimento (fue agregado, con vainilla, a la bebida, al cacahuatl cacao), (Giuliano y col., 2003)

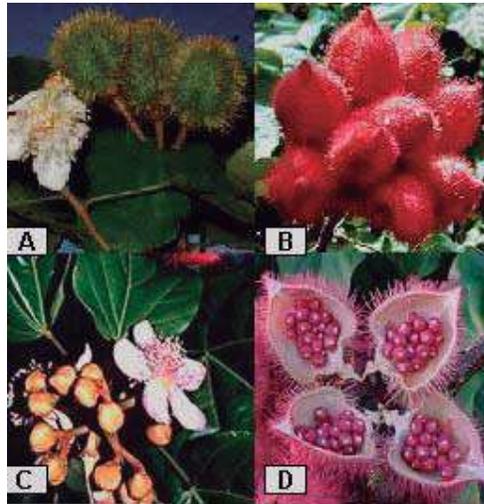


Figura 1.1. (a) Fruto verde, semillas, (b) Fruto maduro, (c) Flor y (d) semillas del achiote (Sandi, 2003; Vázquez, 1999).

1.1.2 Variedades

Empíricamente se conocen algunas variedades distinguidas por características de color y forma de las cápsulas (Compendio de Agronomía Tropical 1989).

- * Variedad de flor rosada y cápsula morada.
- * Variedad de flor blanca y cápsula verde.
- * Variedad con cápsula sin espina.

Las flores blancas tiene un 10.4 % de colorante, las flores rosadas tienen un 8.0 % de colorante, sin embargo, en los mercados nacional y extranjero no se establece diferencia de precios (Smith y col., 1992).

El color de los alimentos es un atributo que tiene mucho peso dentro del juicio del consumidor, este puede llegar a ser determinante para que un comestible sea aceptado o rechazado. La industria alimentaría utiliza una serie de sustancias, mejor conocidas como aditivos; que tienen como función primordial impartir alguna coloración en particular o simplemente resaltar la que por naturaleza tienen las materias primas o, en su caso, de los procesos tecnológicos en la coloración del producto final (Escobar, 2005).

Para abastecer la creciente demanda de colorantes naturales sin problemas de legislación, se procede a la extracción de los pigmentos presentes en los tejidos vegetales o animales por medio de diferentes métodos, cada uno presenta sus limitantes y ventajas.

El colorante obtenido de las semillas de achiote, esta compuesto en su mayoría por el carotenoide *Bixina*, que se utiliza en la industria láctica, cárnica, condimentaría, cosmética, farmacéutica, etc.; es un colorante natural exento de certificación. En la industria es necesario analizar las materias primas, los productos intermedios y los productos terminales, el laboratorio es el eje de la industria.

La *Bixina* se encuentra en forma *cis*, pero se transforma en la forma *trans* con los tratamientos térmicos utilizados habitualmente en la extracción del pigmento, con aceite caliente. La *Norbixina* tiene una estructura semejante, pero con los dos grupos ácidos libres, se utiliza como sal sódica, de modo que al mezclar el colorante con los alimentos, que tienen pH ácido, precipita la forma no ionizada. Esto tiene la ventaja de que el alimento queda coloreado, pero no “destiñe” (Food and Drug Administration “FDA”, 2001).

La Organización Mundial de la Salud “OMS” ha reconocido que su toxicidad es nula para el consumo humano así como para su aplicación en la piel y la C.C.E. autorizo su empleo (N°. E 160b).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Generar y evaluar las condiciones para la obtención del colorante *Bixina* y/o *Norbixina* a partir del achiote.

1.2.2 Objetivos específicos

- Encontrar las condiciones adecuadas para la extracción del colorante.
- Identificar los componentes presentes en el colorante.

- Realizar un diseño de experimentos para tener las mejores condiciones de la extracción de colorante.
- Implementar el proceso para la extracción y purificación del colorante del achiote.

1.3 Justificación

Hoy en día el uso de los colorantes es vital en los productos puestos en el mercado, esto debido a que en algunos se usan los colorantes para mejorar su apariencia y color, esto significa el rechazo o la aceptación de estos de parte del consumidor, esta situación no sólo es común, sino que se ha convertido en una necesidad.

Después de la segunda guerra mundial, el descubrimiento de los colorantes sintéticos (derivados del petróleo, del aluminio y del carbón) sustituyó el uso de los naturales. La importancia de los colorantes de origen vegetal había decaído. Actualmente se buscan colorantes naturales como sustitutos de los artificiales (Food and Drug Administration “FDA”, 2002).

En la década de los años 1970 se detectó que muchos de los colorantes sintéticos utilizados en la industria eran Cancerígenos. En los últimos años la industria de alimentos ha reducido considerablemente la lista de colorantes permitidos, y por el contrario ha comenzado a utilizar los colorantes naturales que de acuerdo con la legislación norteamericana no requieren certificación (Food and Drug Administration “FDA”, 2002).

Los colorantes sintéticos certificables son, aprobados para su uso por la Food and Drug Administration “FDA”. En los Estados Unidos existen ocho colores certificados que son: Amarillo #5, Amarillo #6, Azul #1, Azul #2, Naranja B, Rojo citrus, Rojo #40, Verde #3. Los aditivos colorantes exentos de certificación incluyen los pigmentos derivados de fuentes naturales tales como vegetales o animales, entre ellos se incluyen los colorantes obtenidos de las semillas (la pepa) del aguacate y del achiote así como extractos vegetales (Food and Drug Administration “FDA”, 2002; Programa conjunto FAO/OMS, 2006).

En 1990 la Food and Drug Administration “FDA” de Estados Unidos prohibió el uso de algunos colorantes sintéticos definitivamente. Si bien en la mayoría de los países las leyes sólo limitan el uso de los colorantes artificiales, las prohibiciones también alcanzaron a los naturales, el uso de colorantes se tiene que declarar en los empaques de todos los productos y, después de los escándalos mencionados, los consumidores prestan mucha atención a estas leyendas, evitando comprar alimentos que contienen colorantes, independientemente de su origen.

Los industriales han vuelto los ojos nuevamente hacia los colorantes naturales, dentro de los cuales la Bixina, extraída del achiote, tiene un gran potencial. Es una sustancia con alta resistencia a los agentes químicos, por lo que resulta muy apropiada para colorear todo tipo de alimentos y bebidas, (Smith y col., 1992).

El achiote tiene gran importancia económica y cultural en muchos países. Muchas son las estrategias que se han buscado para cambiar las formas de producción. Por su naturaleza química, los colorantes pueden ser inorgánicos y orgánicos. El cultivo del achiote no requiere de muchos cuidados, pero en la actualidad no existen muchas empresas que se dediquen a la extracción de sus colorantes.

Se sabe hasta el momento que el mejor rendimiento de las semillas del achiote se obtiene por medios alcalinos, aunque las empresas como Kalsec, Biocolor entre otras, están investigando la forma de aumentar este rendimiento o minimizar el tiempo de extracción. En este trabajo se realizarán extracciones con disolventes alcalinos, que permitirán encontrar las mejores condiciones de extracción para el proceso de obtención de colorantes del achiote.

1.4 Hipótesis

El desarrollo de un diseño de experimentos permitirá obtener las mejores condiciones de extracción del colorante, mediante la combinación de las variables de proceso: relación de Semilla de achiote-volumen de disolvente, temperatura de extracción, que no exceda de 60° C (a temperaturas mayores se degrada el carotenoide) y tiempo de agitación, el cual ayudará a desarrollar y describir la metodología adecuada para el proceso de extracción.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

En este capítulo se describen las características de la planta del achiote, su cultivo y la producción que se tiene en México y otros países, la planta además de utilizarse como colorante, se usa también como una planta medicinal, cada parte de ella es aprovechada, y su cultivo no requiere de gran cuidado.

Se hace referencia de la obtención de la síntesis de la Bixina y Norbixina de las extracciones que existen actualmente y de los usos permitidos de achiote y máximos niveles de adicción.

2.1 Cultivo

Países como México, con climas tropicales y semi-tropicales, presentan condiciones agroecológicas apropiadas para el cultivo del achiote, además de que existe un conocimiento tradicional de gran valor sobre la planta. Dada la creciente demanda de colorantes naturales en el mercado internacional y la excelente calidad de la Bixina, el cultivo de achiote tiene la posibilidad de ser económicamente rentable. Además, la extracción de los colorantes (Bixina y Norbixina) de la planta es relativamente sencilla, y es posible establecer pequeñas industrias caseras para procesar la semilla y extraer el colorante, que de esta manera tiene un mayor valor en el mercado.

Latino América produce el 60% del achiote del mundo, seguido por África (el 27%) y Asia (el 12%). Los precios para las semillas del achiote dependen de la producción y varía de US \$2000 por tonelada a US \$600 por tonelada entre 1985 y 1995 (Ministro de Agricultura, 2002). En el año 2000 Perú produjo 4,482 toneladas de semilla; otros países productores son Kenia, Costa de Marfil, Senegal, Brasil, Ecuador, Bolivia y Filipinas. En México, según el censo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de 2000, se produjeron en Campeche 515 toneladas, en Quintana Roo 721, en Tabasco 35 y en Yucatán 147 toneladas para consumo nacional (Smith y col., 1992).

Los principales países consumidores son Estados Unidos, Europa, China, Japón, India, Brasil y Argentina. Sudamérica, Europa y Estados Unidos, en donde se utiliza para mejorar la presentación de productos lácteos, quesos, mantequillas, margarinas, manteca, grasas, productos cárnicos, derivados de pescado, fideos, caramelos, helados, chocolates, palomitas de maíz, aderezos para botanas, bebidas refrescantes, y productos del cuidado del cuerpo, por

que tiene la característica de ser insípido, por lo que no altera el sabor de los alimentos. Otro uso industrial importante es en la elaboración de jabones y cosméticos, tanto que en inglés también se le conoce como *lipstick tree*, (Smith y col., 1992; Mercadante, 2003).

El caso del achiote es especial, debido a que su explotación industrial en el país, aún no se produce, sin embargo las posibilidades de producirlo son enormes, dada la serie de aplicaciones prácticas que tiene.

2.2 Sistema agroforestal

Puede adaptarse a sistemas de estratos múltiples, donde los estratos superiores no proporcionen una sombra densa. Árbol asociado a sistemas agroforestales de la sabana, en Tabasco: árbol-café, cacao, naranja (Tabla 2.1). Frecuentemente encontrada en el huerto familiar maya (Yucatán). Esta planta se ha empleado para rehabilitar sitios donde hubo explotación minera

Tabla 2.1. Características generales del achiote.

Extensión	Originaria de América tropical, posiblemente. Se extiende desde Brasil, Argentina, hasta México (<i>Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz, Yucatán</i>)
Hábitat	Prospera en climas de tipo cálido húmedos, semicálidos y templados, las condiciones óptimas para cultivar Achiote las reúnen aquellas regiones entre 100 y 800 m de altitud, con temperaturas medias entre 20 y 26 ° C y un máximo de 3 meses de época seca.
Producción	Empieza a producir semillas desde los 2 años, pero su producción normal comienza a los 4 años. Un pequeño árbol de Bixa puede producir de 4.5 a 5 kg. de frutos y 272 kg. de semillas. Las plántulas crecen rápidamente, a los 4 meses alcanzan una talla entre 15 y 20 cm.
Taxonomía	Reino- Bixa orellana, Clase- Magnoliopsida, Subclase- Dilenidas Orden- Violales, Familia- Bixaceas

Fuente: Zotyen, Q. C., (2002), DGEA. Nueva San Salvador.

2.3 Tolerancia

No tolera sombra densa, las plántulas no soportan la luz directa del sol, firme al viento, resistente al fuego, pestes y enfermedades, no es severamente afectado por plagas y enfermedades (Zotyen, 2002).

2.4 Usos

2.4.1 Adhesivo

De las ramas se obtiene una goma que es similar a la goma arábica.

Es comestible, (fruta, bebidas, dulces, semilla, aceite, verdura). Como condimento y saborizante de platillos exóticos mexicanos por ejemplo, la cochinita pibil y el pibil de pollo, platillos yucatecos (Zotyen, 2002).

2.4.2 Cosmético

El aceite de las semillas es emoliente y su contenido alto en carotenoides provee propiedades antioxidantes. Se usa en productos para el cuidado del cuerpo, como son: cremas, lociones y champú, (Zotyen, 2002).

2.4.3 Insecticida

Algunos indígenas de América del Sur usan el achiote, corteza, fruto (cáscara) adicionándole grasa para frotarse la piel y defenderse del piquete de los mosquitos. La mancha que deja es muy tenaz, (Zotyen, 2002).

2.4.4 Medicinal

Tiene propiedades y acciones: astringente, antiséptico, emoliente, antibacterial, antioxidante, expectorante, cicatrizante, febrífugo y antidisentérico. El uso de la hoja: propiedades diuréticas y antigonorréicas, eritema, erisipela, estomacal, vómito de sangre, hemorroides, dolor de cabeza y garganta, purgante, desinflamatoria, hipoglicemiante.

La utilización de la semilla y el fruto se consideran un antídoto eficaz contra envenenamiento por *Jatropha curcas* (dolores abdominales, diarrea, vómito, irritación de garganta, gastroenteritis) y *Manihotes culenta* (manifestaciones disneicas y hasta la muerte del sujeto). Semilla (molida): sarampión, viruela, estomáquico, enfermedades del riñón, disentería y febrífugo, astringente y ligero purgante. El aceite de las semillas puede usarse con buen éxito contra la lepra. La pulpa se usa para tratar quemaduras y ampollas. Raíz: digestiva y antitusiva (Compendio de Agronomía Tropical, 1989).

2.4.5 Características fisicoquímicas de la semilla del achiote

La composición tanto química como nutricional de la semilla del achiote es muy variada, como puede observarse en la Tabla 2.2 (Jaramillo y Muñoz, 1992).

Tabla 2.2. Composición química, nutricional de la semilla y del colorante del achiote

Composición química (%)		Composición (mg/100g)		Composición (g/100g)	
Humedad	8.0 – 13.0	Calcio	7	Proteínas	12.3-13.2
Proteína	13 – 14.24	Fósforo	10	Pectina	0.23
Celulosa	13.8	Hierro	1.4	Carbohidratos	39.91-47.90
Fibra Cruda	18.48	Vitamina A	45 mg	Cenizas	5.44-6.92
Almidones	11.45	Riboflavina	0.2	Taninos	0.33-0.91
Carbohidratos Totales	39.91	Ácido Ascórbico	12.5	Pentosanos	11.35-14.97
Energía (Kcal)	54	Tiamina	0.39	Carotenoides	1.21-2.30
Ceniza	4.50 -7.97	Niacina	1.46	Beta-caroteno	6.8-11.30 mg

Fuente: Jaramillo, M. C. A. y Muñoz, M. O. A. (1992). Medellín, Universidad Nacional. Facultad Nacional de Minas.

2. 5 Mercados

Los principales países a quienes se les vende semillas de achiote son los Estados Unidos, Costa Rica, Puerto Rico, Venezuela, Canadá. Los principales países a quienes se les vende el derivado de achiote Bixina / Norbixina son: Estados Unidos (quien esta demandando este producto en diferentes concentraciones, siendo la más solicitada Bixina Cristal al 95%), Japón, Alemania, Holanda (Purdue University USA, 1989).

Los precios promedios de exportación presentan una tendencia creciente en los últimos años, de 2001 a 2005 pasaron de US \$1.8 mil por TM a US \$3.2 mil por TM. En los cinco primeros meses de 2006, los precios mantuvieron similar tendencia y crecieron 22% respecto a un periodo igual en el 2005; este resultado corresponde a los mejores precios pagados por Japón (16%) y Venezuela (85%). Según destinos, los precios promedio de exportación hacia los principales destinos peruanos (E.E.U.U., Venezuela y Japón) siguieron la misma tendencia. Hacia E.E.U.U. los precios promedios de exportación crecieron de US \$1.6 mil por TM a US \$8.3 mil de 2001 a 2005. En el mismo periodo los precios de exportación hacia Venezuela aumentaron de US \$972 a US \$1.03 mil por TM, mientras que hacia Japón fue de US \$30.3 mil por TM a US \$36.6 mil en 2005 (IEEM, 2007), según un estudio de mercado reciente (Alzate, 2005) el precio de venta de los colorantes sintéticos en polvo es de cerca de \$ 35,000 por kilo, mientras que el colorante natural en polvo tendría que venderse a unos \$ 50,000 a \$55,000 pesos por kilo.

Perú es el primer productor y exportador mundial de achiote, representando un 35% de la producción mundial, el otro 65% proviene de Kenya, Brasil, e India. El valor total de las exportaciones de achiote en 1998 fue de 2 448 miles de dólares, repartidos en achiote en grano (989.4 miles de dólares) y en extracto de achiote (1,459 miles de dólares).

2.6 Colorantes (Bixina, Norbixina)

Hay dos productos principales del achiote, la Bixina y la Norbixina, el pigmento se encuentra en la superficie en la porción carnosa (arilo rojo-naranja) que envuelve a la semilla del achiote (Figura 2.1), son compuestos algo diferentes químicamente entre ellos, siendo la Bixina soluble en las grasas e insoluble en agua y la Norbixina a la inversa, el aceite extraído de las semillas es la principal fuente de los pigmentos Bixina y Norbixina, clasificados como carotenoides.



Figura 2.1. Formas que puede tener la semilla del achiote (Compendio de Agronomía Tropical (1989).

Como con el resto de los carotenoides, los extractos del achiote son susceptibles a la degradación oxidativa. La Pérdida del color también ocurre por la exposición prolongada a la luz, temperatura elevada, y en presencia del dióxido de sulfuro (Preston y Richard, 1980; Collins, 1992). Desde que se conoce la Bixina en la naturaleza, su estereoquímica ha sido objeto de investigación (Tabla 2.3).

Por lo tanto, 136 años después de que la Bixina fue divulgada, la estructura del *cis*-Bixina fue demostrada para ser Bixina: 6'-Metil-hidrógeno-9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (Figura 2.2) y 6'-Metil-hidrógeno-9'-*trans*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato; Norbixina: ácido 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioico (Figura 2.3) y ácido 9'-*trans*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioico, también se conoce como Naranja 4, es un carotenoide y su número de registro comercial disponible en la unión europea es el de la Bija: 215-753-4; extracto de semilla de bija: 289-561-2 y Bixina: 230-248-7, (Administración Sanitaria Estatal, 1996). La principal materia colorante de los extractos de bija o achiote en aceite en el carotenoide Bixina es el éster dibásico simétrico (Directiva 1999/75/CE, 1995). La Bixina es insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y fácilmente soluble en éter y en los aceites. Su espectrometría Máxima en cloroformo de la Bixina es 502 nm, y de la Norbixina en solución diluida de KOH es 482 nm. (Norma Oficial Mexicana NOM-119-SSA1 1994).

Tabla 2.3. Cronología de las investigaciones realizadas del achiote

Cronología de investigaciones	
Boussingault (1825)	Primera aislamiento
Etti (1878)	Cristalización
Heiduschka y Panzer (1917)	Fórmula: C ₂₅ H ₃₀ O ₄
Herzig y Faltis (1923)	Isomerización
Barrer y col., (1929)	Isómero <i>cis</i> → <i>trans</i>
Kuhn/Ehmann (1929); Kuhn/L`Orsa (1931, 1932)	Constituyentes
Kuhn/Winterstein (1928, 1932); Kuhn col, (1929)	
Barrer y Solmssen (1937)	II- estructura <i>cis</i>
Barrer y Jucker (1950)	estructura 9- <i>cis</i>
Lunde y Zechmeister (1955)	7- <i>cis</i> para Me-Bixina (IR)
Barber y col., (1961)	estructura 9'- <i>cis</i> para Me-Bixina
Weedon (1967)	Me- <i>cis</i> -(natural) síntesis de la Bixina
Pattenden y col., (1970)	Me- <i>cis</i> -(natural) síntesis de la Bixina
Zechmeister y Escue (1994)	estructura 9- <i>cis</i>

Fuente: Preston, H. D. y Rickard, M. D. (1980), Food Chemistry pp.5, 47-56.

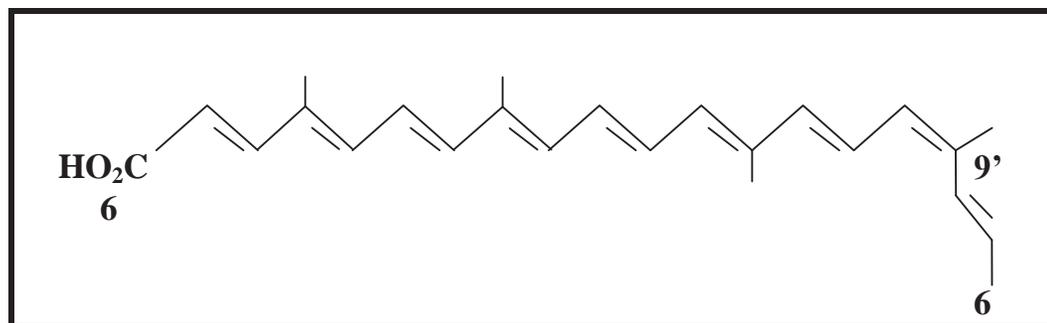


Figura 2.2. Fórmula química y estructura: *cis*- Bixina C₂₄H₃₀O₄ (Norma Oficial Mexicana NOM-119-SSA1, 1994).

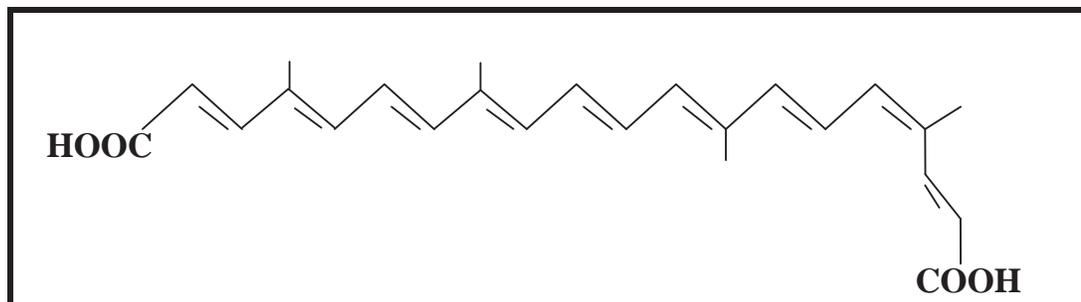


Figura 2.3. Fórmula química y estructura: *cis*- Norbixina: $C_{24}H_{28}O_4$ (Norma Oficial Mexicana NOM-119-SSA1, 1994).

Tabla 2.4. Punto de fusión de la Bixina y Norbixina de acuerdo a sus isómeros

	N° CAS	PM	Fórmula empírica	Punto de fusión (°C)
<i>Cis</i> -Bixina	6983-79-5	394.5	$C_{25}H_{30}O_4$	198; 189-190.5; 196.8; 217
<i>Trans</i> -Bixina	39937-23-0	394.5		204.0-206.6; 216-217
<i>Cis</i> -Norbixina	626-76-6	380.5	$C_{24}H_{28}O_4$	240
<i>Trans</i> -Norbixina	542-40-5	380.5		250

Fuente: Juárez S. O. (2005). Universidad Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

Tienen tonalidades de rojo al amarillo, dependiendo del pH, su color puede aclararse por calentamiento, lo que facilita la obtención del tono adecuado.

Cuando el colorante se extrae por vías alcalinas y después se acidifica para precipitar se obtiene de 30- 40 % de Norbixina, es un colorante fuerte, 1 litro de una solución del 1% es suficiente para colorear 16 toneladas de queso.

Un análisis no muy detallado los apocarotenoides encontrados en el achiote revelaron varios productos en la ruptura del licopeno [5-6], sugiriendo que el camino biosintético comienza en la hendidura oxidativa del licopeno, que rompe el licopeno en los 5-6 y 5'-6' enlaces dobles, seguido de una oxidación del aldehído y un transferencia de metil (Figura 2.4). Trabajos recientes en Estrasburgo han clarificado la base bioquímica y molecular de su biosíntesis de acuerdo a la Figura 2.5 (Giuliano y col., 2003).

En la Figura 2.5 se pueden observar los carbonos entre los cuales ocurre la ruptura oxidativa del licopeno para llegar a la Bixina y Norbixina. Abreviaturas: BiADH,

deshidrogenación del aldehído de la Bixina; CrtISO, isomerización del carotenoide; GGPP, difosfato del geranylgeranil; LCD, oxigenación de la hendidura del licopeno (di); nBMT, transferencia del metil de la Norbixina; PSY, síntesis del fitoeno; PDS, desaturación del fitoeno (Giuliano y col., 2003).

El uso de los colores para alimentos en el Reino Unido es controlado por la directiva de la Comunidad Europea (C. E., 1994), tienen una lista de colores permitidos y una lista de los alimentos a los cuales estos colores pueden ser agregados, y límites máximos apropiados para la adición. Las aplicaciones permitidas del achiote y los máximos niveles de la adición se presentan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Usos permitidos de achiote y máximos niveles de adicción en alimentos.

Tipo de alimentos	<i>Niveles máximos permitidos (mgkg⁻¹)</i>
Mantequilla, emulsiones de grasas, grasas esenciales libres	10
Decoraciones y envolturas	20
Panadería fina	10
Helados	20
Licores, incluyendo bebidas fortificadas con <15 % de alcohol por volumen	10
Saborizantes de quesos	15
Naranjas maduras, queso amarillo y blanco, quesos procesados sin saborizantes	15
Postres	10
Botanas: Papas, cereal o productos de almidón.	20
Cacahuates	10
Pescado ahumado	10
Cubierta de queso comestible	20
Palomitas, frutas saborizadas en cereales	25

Fuente: Scotter, J. M.; Wilson, A. L.; Appleton, P. G. y Castle L., (1998). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, pp. 1031-1038.

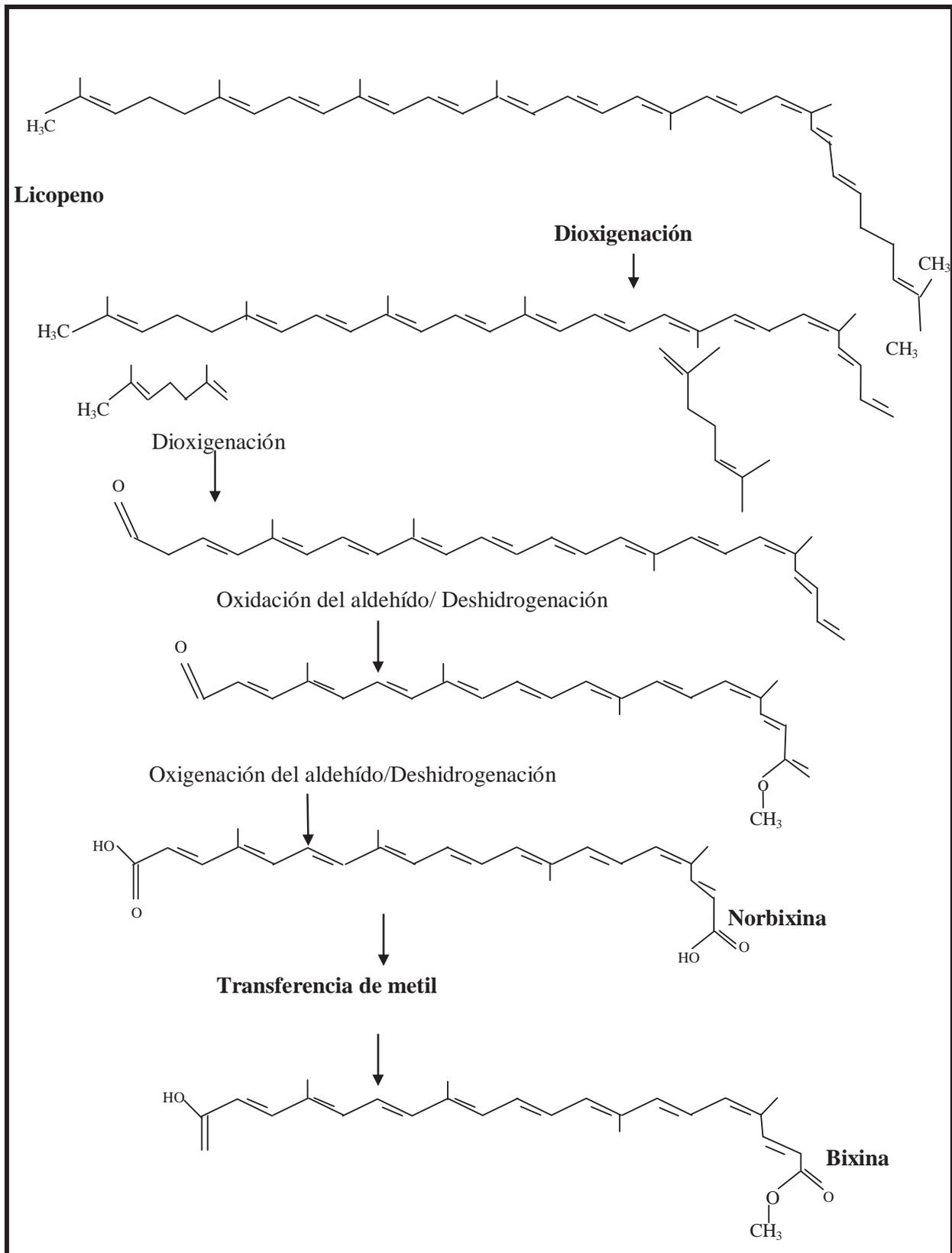


Figura 2.4. Ruta de la biosíntesis de la Bixina (Giuliano y col., 2003).

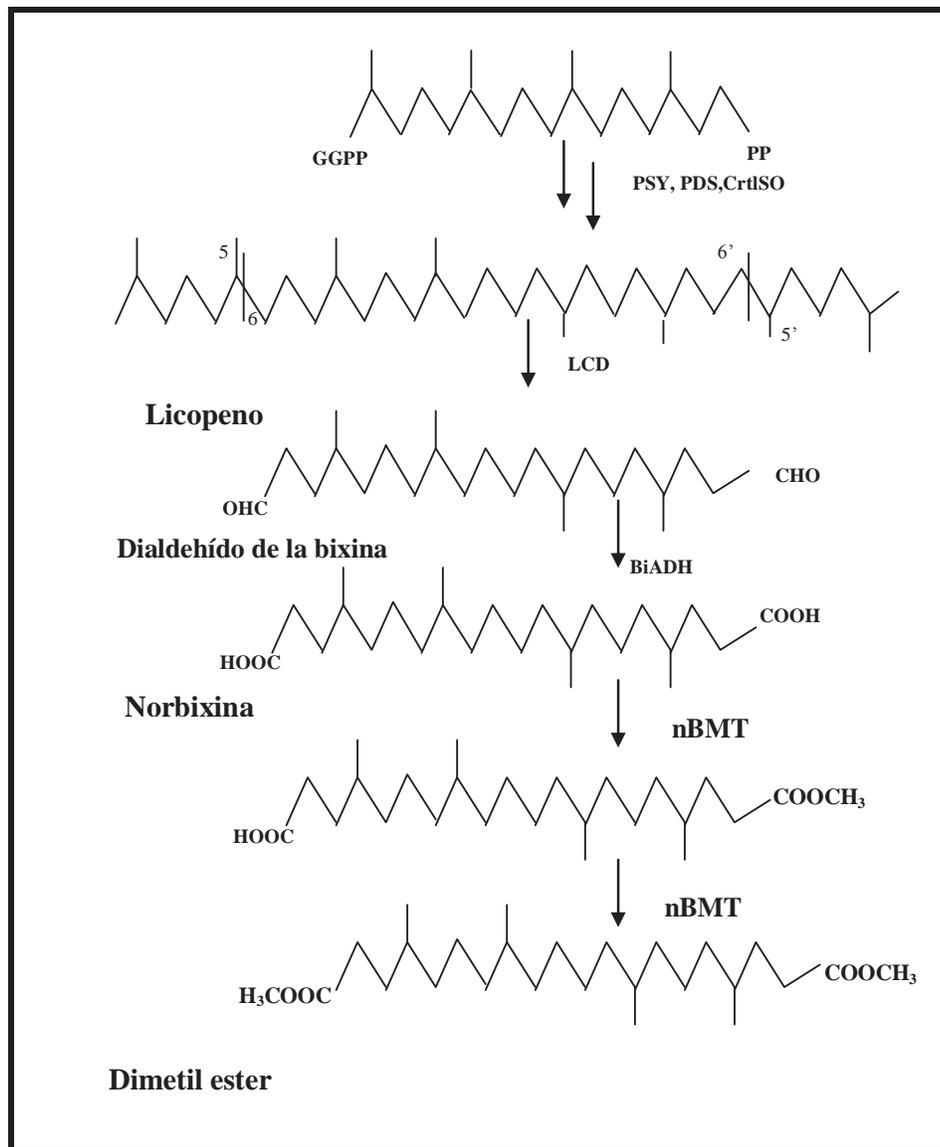


Figura 2.5. Ruptura oxidativa del licopeno.

2.7 Extracción rudimentaria del colorante

Existen diversas formas de extraer el colorante de las semillas del achiote, unas muy rudimentarias y otras no tanto, finalmente, con el pasar del tiempo se han ido mejorando, a continuación se mencionan algunas de estas técnicas:

(a) Poner semillas en suficiente agua hirviendo por espacio de 6 horas o menos, se acelera este desprendimiento agitándolo con una cuchara o trozo de madera hasta que las semillas queden blancas; se cuela y el líquido obtenido se le somete a baño María para

evaporar el exceso de agua quedando en el fondo del recipiente un residuo o sustancia que se aglutinará entre sí según la consistencia que le haya dado el operador. Después de esta operación se moldea el producto de la forma más conveniente (Smith y col., 1992).

(b) Según la cantidad de semilla que se ponga en un recipiente se le agrega agua 1/2 o 3/4 del volumen total; se le agita fuertemente hasta que la capa colorante se desprenda de la semilla, luego se pasa el líquido a través de un tamiz fino; el líquido extraído se evapora hasta dejar el colorante de una consistencia pastosa capaz de poder ser moldeado. Una vez seco el colorante, está listo para el mercado.

(c) Las semillas son separadas de las cápsulas maduras, se colocan en suficiente agua hirviendo con el fin de que el colorante se desprenda fácilmente de éstas, luego se separan las semillas, se deja fermentar la pasta una semana aproximadamente, se elimina el agua quedando la pasta sola, que permite modelar el producto para darle la forma más conveniente y aceptada por el consumidor (Sahaza, 2003).

(d) Uno de los métodos más antiguos y prácticamente abandonados, consiste en machacar las semillas entre cilindros para formar una mezcla con el colorante del achiote. A la masa resultante se le agrega una cantidad suficiente de agua clara y se deja hirviendo por dos o tres horas, al retirarla del fuego, se exprime bien por medio de una prensa para sacarle el agua, de esta manera la pasta queda lista para empacarla y venderla directamente (Córdoba, 1987).

(e) Obtención del colorante de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) utilizando microorganismos celulolíticos. El proceso se basa en el uso de microorganismos productores de celulasas, capaces de degradar la pared celular de las semillas donde se encuentra el pigmento para facilitar su liberación en un medio acuoso, obteniéndose rendimientos del 81%, mayores a los ofrecidos por extracción acuosa y ligeramente menores que los obtenidos con tratamiento ácido-base (Hernández y col., 2002).

2.8 Extracción industrial

Para extraer el pigmento de las semillas secas del achiote se utilizan principalmente tres procesos comerciales (1) extracción directa en el aceite, (2) extracción directa en álcali acuoso, o (3) extracción indirecta con solventes, para cada uno de éstos se emplea varios métodos de extracción, de acuerdo con la disponibilidad de equipos y recursos. La mayor venta del achiote en el Reino Unido se extrae en forma directa (álcali acuoso ó aceite

caliente). Se utiliza el aceite caliente para facilitar la isomerización del 9 cis-Bixina a la trans-Bixina relativamente más soluble (Preston y Rickard, 1980).

2.8.1 Bixina soluble en el aceite

Las semillas del achiote, sumergidas en el aceite vegetal en una temperatura que no exceda de 70°C, son desgastadas mecánicamente para quitar el pericarpio de la semilla, por un proceso conocido como “*raspelling*”. La mezcla del pigmento en aceite se calienta bajo vacío en una temperatura que no deba exceder los 130°C. La solución se filtra para quitar los materiales insolubles (González y col., 2002). Los carotenoides principales incluyen el trans-Bixina, un producto amarillo y el cis-Bixina de la degradación térmica (Preston y Rickard, 1979).

Suspensión en aceite

a) El extracto del pericarpio en aceite comestible después de que el “*raspelling*” se centrifugue y las partículas más finas se mezclan con aceite para dar una suspensión en aceite. La carencia del tratamiento térmico es demostrada por la ausencia del producto amarillo de la degradación, cis y trans-Bixina que está presente.

(b) Extracción con solvente: el pigmento del achiote se extrae en un solvente conveniente por ejemplo la acetona, los extractos que son lavados con hexano, o algún otro solvente en el cual el pigmento es virtualmente insoluble, se quitan impurezas y olores indeseados, se muele en aceite comestible a un tamaño de partícula cerca de 10 micrones entonces se realizan para tener una suspensión microcristalina en aceite solventes incluyen la acetona, dicloro metano, dicloro etano, etanol, petróleo y propan-2-ol. Los carotenoides principales presentes son cis y trans-Bixina (Córdoba, 1987).

(c) Mono y di-glicéridos, entre otros: las extracciones usando los ingredientes de grado alimenticio tales como mono y di-glicéridos, los ácidos grasos libres o el glicol del propileno está también practicado (Preston y Rickard, 1980).

2.8.2 Álcali acuoso

La Norbixina es un ácido carboxílico que al agregarle un álcali acuoso, forma sales del álcali solubles en agua, lo cual hace posible extraer fácilmente el colorante. Las semillas se lavan con esta solución, el extracto y el lavado se acumulan y la solución roja oscura se

neutraliza con un exceso de ácido mineral, el cual precipita el pigmento. Luego se filtra, se lava y el líquido sobrante se separa hasta obtener la masa colorante para secar (Mosquera, 1989; Jaramillo y Muñoz, 1992).

2.8.3 Propilenglicol

El proceso de extracción con el propilenglicol se lleva a cabo en frío, debido a la alta solubilidad que tienen el pigmento en estas condiciones, el colorante obtenido se emplea para colorear especialmente derivados lácteos (Jaramillo y Muñoz, 1992).

2.8.4 Degradación térmica

Iversen y Lam, 1953, citado por Scotter y col., (2001) demostró que la Bixina, disuelta en el aceite vegetal u otros solventes, experimenta una serie compleja de isomerizaciones y degradaciones cuando se está calentado a altas temperaturas durante la extracción. A partir de una preparación comercial del achiote, se aisló el pigmento amarillo, usando el método cromatográfico en papel (Scotter y col., 2001).

2.9 Análisis de extractos

El análisis de los extractos para varios procesos comerciales mostraron los siguientes carotenoides (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Carotenoides presentes en el pigmento del achiote dependiendo del método de extracción.

Método de extracción	Carotenoides presentes
Bixina soluble en aceite	C ₁₇ Producto de degradación térmica Trans-Bixina y Cis-Bixina
Suspensión de Bixina en aceite	Cis-Bixina +algunos trans-Bixina
Extracción de Bixina con solvente	Cis Bixina + algunos trans-Bixina
Extractos solubles en agua (a) extracto de la semilla en álcali acuoso (b) hidrólisis en álcali acuoso o Extracción de Bixina con solvente	Cis y trans-Norbixina (NaOH o KOH)

Fuente: Juárez S. O. (2005).Universidad Federal de Santa Catarina. Florianópolis

El número y la concentración de los componentes presentes de menor importancia pueden ser debido al método extractivo, a la temperatura, al período de calentamiento, al origen de la semilla y a la vida de anaquel del producto, McKeown (1961) aisló 7 componentes con la extracción de cloroformo a partir de semillas de *Bixa orrellana* (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Componentes de la extracción de las semillas del achiote con cloroformo

Cromatografía en papel del extracto del achiote					
<i>Zona</i>	<i>identificación</i>	<i>color</i>	<i>Espectro</i>	<i>Extracto comercial (%)</i>	<i>Extracto de la semilla (CHCl₃)</i>
1	cis-Norbixina	Naranja	495, 465	4	2
2	Producto térmico	Amarrillo	423, 401.5	40	1
3	trans-Bixina	Rojo	501, 471	17	Nd
4	cis-Bixina	Naranja	494.5, 464.5	12	82
5		Naranja	488, 459	nd	3
6		Amarrillo claro	420, 400	9	1
7	Polienos, aldehídos	Naranja	variable	12	4

Nd = No detectado

Fuente: McKeown, G. G. (1961). J. Ass. Agric.Chem., 44 (2), 347-51.

Barnett y Espoy (1957), citado por Jaramillo y Muñoz (1992), pre-humedecieron las semillas en agua antes de la extracción en aceite caliente con o sin los ácidos grasos libres, tales como oleico. Kocher (1958) extrajo las semillas del achiote con el glicol alcalino del propileno, que rendiría las sales alcalinas de cis y/o de trans-Norbixina. Dendy (1966), citado por Jaramillo y Muñoz (1992), divulgó un método alcalino de la extracción, junto con un examen de los procesos patentados. Las diferencias entre los métodos son destacadas por su uso como agentes del colorante de la margarina (Tabla 2.8), que requiere un equilibrio de pigmentos rojos y amarillos. El colorante de Bixina soluble en el aceite se puede utilizar para el color de la margarina sin la pigmentación adicional, puesto que el pigmento al degradarse proporciona el color amarillo (Preston y Rickard, 1980).

Tabla 2.8. Contribución del achiote para la coloración de la margarina

Extracto	Rojo	Amarrillo
Bixina soluble en aceite	C25: trans-Bixina + algunos cis-Bixina	C1: degradación del producto
suspensión en aceite	C25: cis-Bixina + algunos trans-Bixina	pigmento amarillo requerido, curcumin

Fuente: Preston, H. D., y Richard, M. D. (1980). Food Chemistry 5, 47-56

2.10 Proceso de purificación

Es una operación de separación que tiene por objeto aislar una sustancia de la mezcla sólida o líquida en que se encuentra, mediante el uso de un disolvente. Por extracción se aíslan y purifican numerosos productos naturales, como vitaminas, alcaloides, grasas, hormonas, colorantes, así como las sustancias que intervinieron o se formaron en una síntesis orgánica. La extracción puede ser por el estado físico de los materiales: sólido-líquido y líquido y líquido. Por sus características, la extracción puede ser: discontinua (agitar una solución acuosa con éter etílico o isopropílico en un embudo de separación o mezclar un sólido con un líquido y luego separarlos por filtración). Si se extraen sólidos se usan aparatos tipo Soxhlet, si se extraen líquidos con líquidos inmiscibles en ellos, se usan extractores líquido-líquido.

2.11 Cromatografía en capa delgada

El adsorbente más empleado en la cromatografía en capa delgada es la gel de sílice. Para que adsorbentes se adhieran a la superficie rígida, se mezclan con 1-2 % de yeso (sulfato de calcio monohidratado). Como soporte se usa vidrio, láminas rígidas de poliéster o de aluminio. Como adsorbentes también se usan alúmina neutra activada, celulosa pulverizada o policaprolactama, nylon 6, o polivinilpirrolidona, PVT, (Domínguez, 1983).

Tabla 2.9. Algunos adsorbentes en orden decreciente de actividad.

Alumina*	Carbonato de calcio CaCO ₃
Carbón activado	Carbonato de potasio K ₂ CO ₃
Florisil (MgO, SiO ₂) anhidro	Carbonato de sodio Na ₂ CO ₃
Gel de sílice (ácido Silícico)	Talco (MgO, SiO ₂ hidratado)
Cal (CaO)	Azúcar C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Magnesia (MgO)	Inulina
Carbonato de magnesio (MgCO ₃)	Almidón
Fosfato de calcio (Ca(PO ₄) ₂)	Nylon 66 (policaprolactama)

* La actividad puede disminuirse añadiéndoles diversas cantidades de agua o modificarse según que sea ácida, neutra o alcalina. Se le estandariza según Brockmann, averiguando su capacidad para retener un grupo de compuestos azoicos.

Fuente: Domínguez, A. X., (1983), primera edición, Limusa, pp. 99

La muestra se coloca a 1-2 cm de un extremo de la placa, mediante un capilar, como una diminuta mancha circular o como una delgada raya. La placa se introduce a una cámara cromatográfica que lleva suficiente cantidad de una mezcla de disolventes, para que su superficie quede a unos 0.5 cm antes de la mancha o línea. La cámara se tapa mientras que los disolventes ascienden por capilaridad y comienzan a eluir y mover diferencialmente a los componentes de la mancha. Cuando los disolventes se aproximan a la parte superior de la placa, se saca, rayándose la placa a la altura alcanzada por el frente del disolvente. La placa se seca, se examina a la luz natural, luego con luz ultravioleta y finalmente se le aplica un *agente cromogénico*, que convierte en mancha colorida una incolora. El número de manchas determina el número mínimo de componentes de la mezcla, la distancia recorrida por el frente del *disolvente*, se denomina R_f y es una característica para cada sustancia. El agente cromogénico puede ser específico para ciertos grupos funcionales (Domínguez, 1983).

Donde:

$$R_f = \frac{a}{s} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

a = distancia recorrida por la mancha

b = distancia recorrida por el disolvente

2.12 Espectroscopia infrarrojo

En la actualidad gran número de problemas químicos, tales como identificación de sustancias (sólidas, líquidas o gaseosas) y grupos atómicos, análisis cuantitativo de mezclas, velocidad de reacciones químicas, han sido resueltos, tanto por los métodos químicos como por métodos físicos.

Los equipos de espectrometría para infrarrojo, para resonancia magnética y carbón-13, son indispensables en los campos de la Química Orgánica y la Bioquímica y sus industrias, tales como la petrolera, petroquímica, fabricación de fármacos, colorantes, antibióticos, hormonas, perfumes, entre otras. Los espectros para infrarrojo se emplean con fines de identificación, en el reconocimiento de la presencia o ausencia de enlaces químicos, en el análisis cualitativo de mezclas, exceptuando aquellas en las que existe una fuerte interacción intermolecular, análisis cuantitativo de mezclas cuando los componentes individuales son conocidos, determinación de velocidades de reacción y de las constantes termodinámicas de las sustancias analizadas, análisis y control de procesos químicos para los cuales se emplean espectrofotómetros pequeños, los que deben trabajar a una frecuencia o longitud de onda determinada (Domínguez, 1983).

2.13 Adsorción cromatográfica

Es la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución diferencial entre dos fases, una estacionaria y otra móvil. Hay varios tipos de cromatografía, según su naturaleza de las dos fases involucradas y si los compuestos son retenidos en la fase estacionaria por adsorción o partición. Según la naturaleza de las dos fases, las cromatografías pueden ser: sólido-líquido, (cromatografías en columna, en capa delgada y en papel, líquido-líquido y gas-líquido, en fase vapor (Domínguez, 1983). La adsorción es la capacidad de una sustancia sólida llamada *adsorbente*, para detener o concentrar selectivamente sobre su superficie inmóvil o estacionaria, gases líquidos que van en una disolución en movimiento. La adsorción se utiliza en diversas operaciones químicas, como: la decoloración con carbón, y en el análisis o separación cromatográfica. Este difiere del primero en que generalmente, los adsorbentes son sustancias incoloras y las condiciones experimentales se ajustan para obtener en una columna bandas coloreadas, por lo que se les llama *cromatogramas* (Domínguez, 1983).

La separación de estas bandas se incrementa añadiendo porciones frescas del disolvente (eluentes), esta operación se llama *revelado*. La separación cromatográfica de una mezcla en sus componentes se efectúa:

- Expulsando cuidadosamente el cromatograma, cortando después las bandas, mezclándolas separadamente con disolventes polares (eluentes) en los que la sustancia adsorbida pasa a la solución (elución).
- Percolando a través de la columna, eluentes puros y mezclas de ellos, cuya polaridad o constante dieléctrica aumentan gradualmente, eter de petróleo, benceno, éter isopropílico (9:1, 7:3, 5:5, 3: 7, 1:9 v/p), éter etílico- benceno (las mismas proporciones), benceno-cloroformo, cloroformo-acetona o acetato de etilo, benceno-acetona, etc.
- El número y abundancia de los compuestos de cada porción eluida puede averiguarse mediante las cromatografías en capa delgada o en papel.

En la Tabla 2.11 aparecen los adsorbentes más satisfactorios. Algunos adsorbentes son ácidos, otros alcalinos y otros neutros, por lo que los dos primeros tipos son incompatibles con ciertas sustancias, (Domínguez, 1983).

Los eluentes deben disolver rápida y completamente a las sustancias adsorbidas y ser sustancias más polares que los compuestos adsorbidos, para desplazarlos del adsorbente. El orden de polaridad creciente depende del adsorbente y material adsorbido.

2.14 Diseño de experimentos

Un diseño de experimentos permite plantear distintas estrategias para seleccionar, controlar analizar e interpretar diferentes condiciones de estudio de la extracción. El diseño de experimentos permite mejorar el rendimiento de los procesos y la calidad de los productos, además nos permite interpretar, diseñar y evaluar de manera crítica la información generada de los experimentos. Un buen diseño es aquel en el que las condiciones seleccionadas y manipuladas en el experimento no están confundidas con variables extrañas o de ruido referente al material experimental a su manejo en el experimento, al ambiente o al tiempo.

Por lo tanto el diseño experimental está compuesto por:

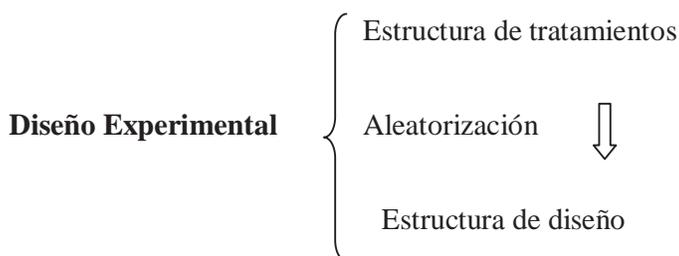


Tabla 2.10. Clasificación de los diseños experimentales de acuerdo a sus estructuras

Estructura de tratamiento	Estructura de diseño
Un factor: (k niveles)	<i>Completamente aleatorizado</i>
Arreglo factorial: (2 o más factores)	<i>Bloques completamente aleatorizado</i>
Arreglo factorial fraccionado	<i>Cuadro latino, greco latino</i>
Arreglo factorial en parcelas divididas	<i>Bloques incompletos</i>
Arreglo factorial anidado	<i>Parcelas divididas</i>

Fuente: Castaño, T. E. y Domínguez, D. J., (2003). Estrategia y Análisis en Ciencia y Tecnología, Guanajuato, Gto., M ISBN: 968-5733-01-05.

2.14.1 Objetivos de un diseño de experimentos Box y Behnken

Realizar con pocas corridas la estimación de un modelo de segundo orden, el cual permitirá explicar el desempeño de la variable respuesta, predecir resultados y obtener condiciones (tratamientos) óptimas de operación.

2.14.2 Diseño Box-Behnken

Este diseño se forma combinando un diseño 2^2 con bloques incompletos balanceados. Por ejemplo, considere un experimento cuyo interés está en tres factores cada uno con tres niveles, una alternativa de diseño es un factorial 3^3 que implica 27 tratamientos; un diseño tipo Box-Behnken permite tener un menor número de tratamientos (Castaño y Domínguez, 2003).

1.- Se obtienen las posibles combinaciones de los 3 factores en bloques de 2 factores; las posibles combinaciones representan el número de bloques.

$$\binom{3}{2} = \frac{3!}{2! \cdot 1!} = \left(\frac{1 \times 2 \times 3}{1 \times 2 \times 1} \right) = 3 \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

2.- Se pone el diseño 2^2 en cada uno de los bloques; para fijar ideas considere que el 2^2 se coloco en el primer bloque.

Suponga que el 2^2 corresponde al primer y segundo factor, en este caso para el tercer factor del bloque se escribe una columna con cuatro ceros que representa el nivel intermedio. Esta disposición se realiza en los dos bloques restantes alternando los factores, es decir, 2^2 en el segundo bloque se utiliza para los factores 1 y 3, la columna con cuatro ceros para el factor 2, por último en el tercer bloque el 2^2 se utiliza para los factores 2 y 3, la columna de ceros se asignan al factor 1. El diseño Box-Behnken se completa agregando un tratamiento extra en

cada bloque, éste es la combinación de los tres factores en su nivel intermedio y es referido como una replica al centro, (Castaño y Domínguez, 2003).

Para enfatizar la construcción del diseño, considere a $c_1 = (-1, 1, -1)'$ y $c_2 = (-1, -1, 1, 1)'$, el nivel intermedio en cualquiera de los factores se indicará por una columna de ceros $ic = (0,0,0,0)'$, los valores que se muestran en estas columnas corresponden a los codificados. Con X_i , $i = 1, \dots, k$ se indica a las variables codificadas para los factores en estudio. La estructura del diseño Box-Behnken, se presenta en la Tabla 2.10, los tres factores se han denotado por A, B y C.

Tabla 2.11. Arreglo de un diseño Box-Behnken para tres factores.

Bloque	A	B	C
b_1	C_1 0	C_2 0	ic 0
b_2	ic 0	C_1 0	C_2 0
b_3	C_1 0	ic 0	C_2 0

Fuente: Castaño, T. E. y Domínguez, D. J., (2003). Estrategia y Análisis en Ciencia y Tecnología. Guanajuato, Gto., M ISBN: 968-5733-01-05.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DEL TRABAJO

En este apartado se describen los métodos a desarrollar para llevar a cabo la extracción del colorante, se mencionan las características de los ensayos necesarios para la selección del disolvente adecuado y las variables de procesos a controlar que nos proporcionarán las condiciones adecuadas para el tratamiento de la semilla.

3.1 Selección del proceso de extracción del colorante

Una de las técnicas más utilizadas para extracción sólido-líquido es el método Soxhlet, donde se utilizan temperaturas elevadas, en este trabajo es muy importante tener el control de la temperatura ya que la semilla del achiote está compuesta por carotenoides y a temperaturas elevadas se degradan, en el método Soxhlet no se puede tener el control de la temperatura de extracción, por lo que este método es poco factible.

En el capítulo 2 se presentaron algunos métodos industriales y rudimentarios para el proceso de extracción de los colorantes del achiote, uno de los métodos mencionados es empleando una solución alcalina, se optó por esta técnica, por que es uno de las más eficientes, se trabajó con la potasa y la sosa como disolventes, ya que son económicos y muy aceptados. Para la acidificación del colorante se utilizó el ácido sulfúrico a baja concentración (2 Normal) los disolventes se recuperaron por destilación al vacío.

3.2 Variables de proceso

Se manejaron diferentes variables de proceso unas más significativas que otras, las variables serán las mismas para ambos métodos con excepción de la temperatura de agitación que sólo se tomó en cuenta en el segundo método, entre las variables más significativas se tienen las siguientes: Relación semilla-disolvente, tiempo de agitación, velocidad de agitación, pH, temperatura de secado y temperatura de extracción.

3.2.1 Concentración del disolvente

Se emplearon concentraciones de disolvente bajas (2 % p/v) para no degradar el colorante, es una variable importante por que de ésta depende el desprendimiento del colorante. Considerando que en estudios realizados anteriormente se han trabajado con concentraciones de 0.5 % p/v a 2 % p/v (Mosquera, 1989; Jaramillo y Muñoz, 1992).

3.2.2 Relación cantidad de Semilla–Volumen de disolvente

Se consideró como variable de proceso ya que indica cual debe ser el volumen adecuado de disolvente para un peso determinado de semillas. En los ensayos se manejaron relaciones de 1:3, 1:4, y 1:5.

3.2.3 Tiempo de agitación

El tiempo de agitación es una variable a considerar, por que es indispensable para obtener buenos rendimientos, y puede controlarse mejor la temperatura para retirar la máxima cantidad de colorante sin desprender impurezas, se trabajaron diferentes tiempos de agitación para el primer método, 45 y 10 minutos y para el segundo 15, 30 y 45 minutos.

3.2.4 Velocidad de agitación

Es importante la agitación, cuando se tienen mezclas de líquidos inmiscibles entre sí o de líquidos y sólidos o se vaya formando un precipitado y haya posibilidades de adsorción, o donde se puede liberar calor localmente. Cuando se trabaja con mezclas heterogéneas, la agitación es indispensable para obtener buenos rendimientos, ya que así se puede controlar mejor la temperatura y en la mayor parte de las reacciones se puede disminuir el tiempo para completarlas y elevar rendimientos (Domínguez, 1983). Para la extracción se manejo una velocidad baja de agitación (60 rpm).

3.2.5 pH

Para que la presentación final del colorante sea en polvo se precipitó el colorante con ácido sulfúrico antes de filtrar. El pH que se manejo fue en un intervalo de 2 - 2.5 (Jaramillo y Muñoz, 1992).

3.2.6 Temperatura de secado

Se realizó el secado a una temperatura de 55 °C, ya que el principal componente del colorante son carotenoides y a temperaturas elevadas pueden degradarse.

3.2.7 Temperatura de agitación

Es una variable importante por que al combinar la agitación con la temperatura se puede disminuir el tiempo de extracción y obtener altos rendimientos, se probaron temperaturas de 40, 45 y 50 °C, respectivamente, esta variable de proceso se empleó en el segundo método de extracción.

3.3 Obtención del colorante

Una vez que se seleccionó el método de extracción más conveniente, a la vez se analizaron las variables de proceso que más influencia tienen en la extracción se realizó el diseño de experimentos para la obtención del colorante.

3.3.1 Método de extracción 1

Se retiró la humedad a la semilla y se dejó en reposo durante 12 horas, con cada uno de los disolventes (KOH y NaOH), se separó la solución coloreada y a las mismas semillas se les agregó más disolvente agitándose durante 45 minutos, se separó nuevamente la solución coloreada obtenida y a la semilla se le efectuó un último lavado agitándose durante 10 minutos, a la solución coloreada obtenida (solución básica) se le agregó ácido sulfúrico (disminución de pH), obteniéndose una suspensión del colorante, se retiraron las sales formadas y se seco en la estufa, y al final se trituro, obteniéndose un polvo.



Figura 3.1. Colorante en polvo obtenido de las extracciones

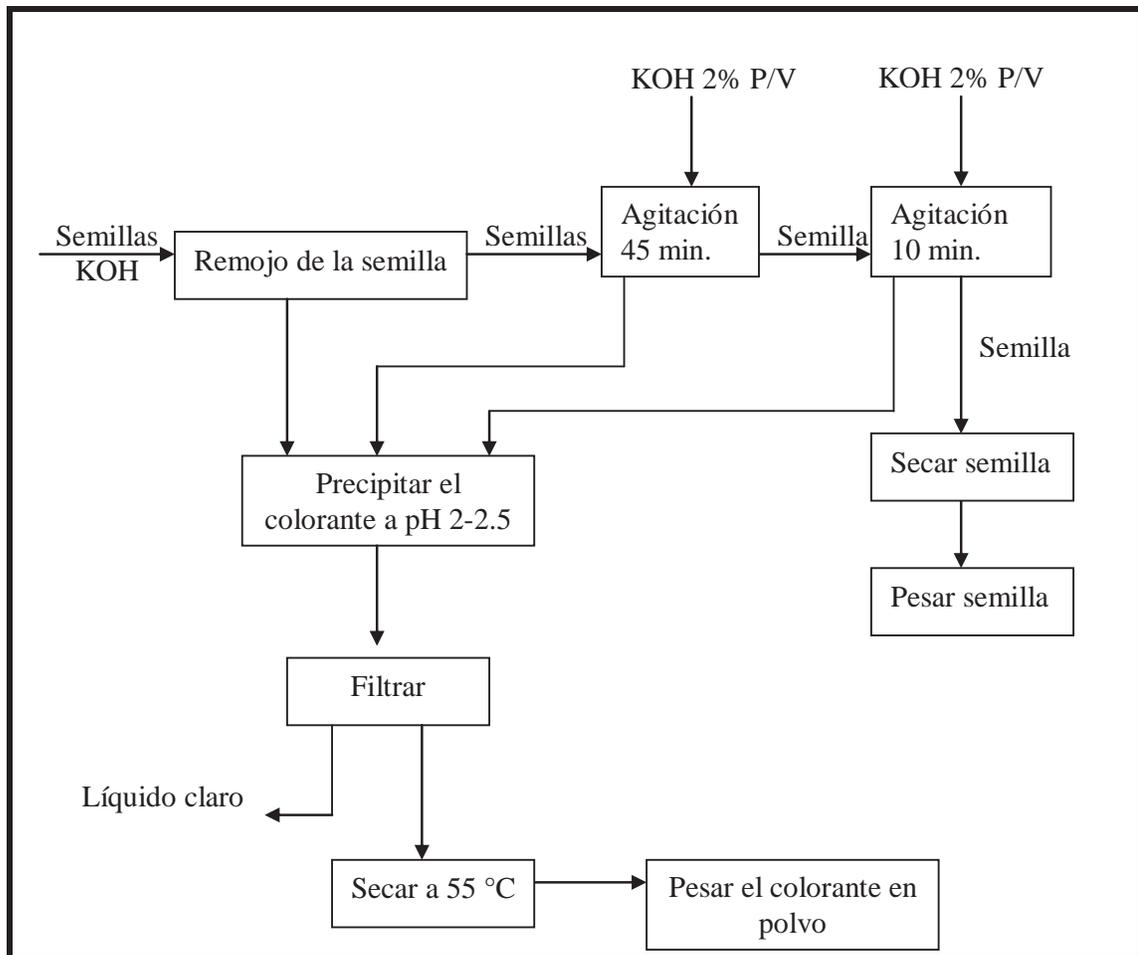


Figura 3.2. Diagrama de bloques para el método de extracción 1.

3.3.2 Secado

Se determinó la humedad de las semillas, dejando un peso determinado en la estufa a 55° C, durante 3 horas, hasta alcanzar un peso constante, la diferencia de peso sirvió para calcular el porcentaje de humedad. Después de tres horas se introdujo al desecador durante 15 a 20 min.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{W_{inicial} - W_{final}}{W_{inicial}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

3.3.3 Dilución de la muestra

En cada corrida se emplearon 4 gramos de semilla, se prepararon los disolventes de extracción (solución alcalina), se utilizó KOH y NaOH en solución 2% p/v, en una relación de semilla-volumen de disolvente de 1:3, las semillas pesadas se dejaron en remojo por un período de 12 horas.

3.3.4 Precipitación

Condiciones óptimas para la precipitación.

- a) Utilizar soluciones diluidas.
- b) Adición lenta de reactivo con agitación, resbalando el reactivo con el agitador.
- c) Elección del pH ya que los iones adsorbidos dependen mucho de la carga de los iones primarios adsorbidos que pueden estar influenciados por el pH. Si lo que se quiere separar son aniones se precipita en medio básico y los cationes en medio ácido, siempre y cuando el precipitado no sea soluble en esos ácidos, si se precipita en medio ácido, queda contaminado con aniones y a la inversa.
- d) Se precipitó utilizando H_2SO_4 diluido a 2.0 N hasta obtener un pH de 2 a 2.5, el ácido se adicionó lentamente.

Una vez sedimentado el colorante, se retiraron con una pipeta Pasteur, las soluciones formadas por el H_2SO_4 y KOH o NaOH (solución acidificada) tratando de dejar en el vaso de precipitados solo el colorante sedimentado, en seguida se dejó secar en el horno a 55°C.

3.3.5 Enfriamiento en desecador

Se retiró el colorante de la mufla y se colocó en el desecador (aproximadamente 20 minutos) hasta que se alcanzó la temperatura ambiente.

Se realizó este mismo procedimiento pero con relación de semilla: disolvente de 1:3, 1:4 y 1:5, se analizaron los resultados obtenidos.

3.3.6 Método de extracción 2

Se retiró la humedad de la semilla, y se le adicionó la solución alcalina (KOH o NaOH), se calienta a una temperatura de 45 °C y se agitó lentamente a 60 rpm por un período de 45 minutos, se retiran las semillas, se le agregó un poco más de disolvente, y se agita nuevamente a la misma temperatura por un período de 30 minutos, se lava con otro poco de solución alcalina (KOH y NaOH).

La solución coloreada (solución básica) que se obtuvo se precipitó mediante la adición de ácido sulfúrico, una vez obtenida la suspensión del colorante, se retiran las sales formadas y se seca en la estufa. La pasta se muele y se obtiene el colorante en polvo.

Este método se basó en una técnica rudimentaria que se practica en las zonas rurales de Costa Rica (Dirección de Mercadeo y Agroindustria, 2005). Se llevó a cabo esta metodología tomando en cuenta la influencia de las variables de proceso, como son la temperatura, tiempo de agitación y relación de volumen disolvente, la variable diferente del método 1 a utilizar es

la temperatura, juega un papel importante ya que acelera la extracción, así este método es otra opción para la obtención del colorante del achiote. Este método se efectuó también con una relación de semilla: volumen de disolvente de 1:3 y 1:4.

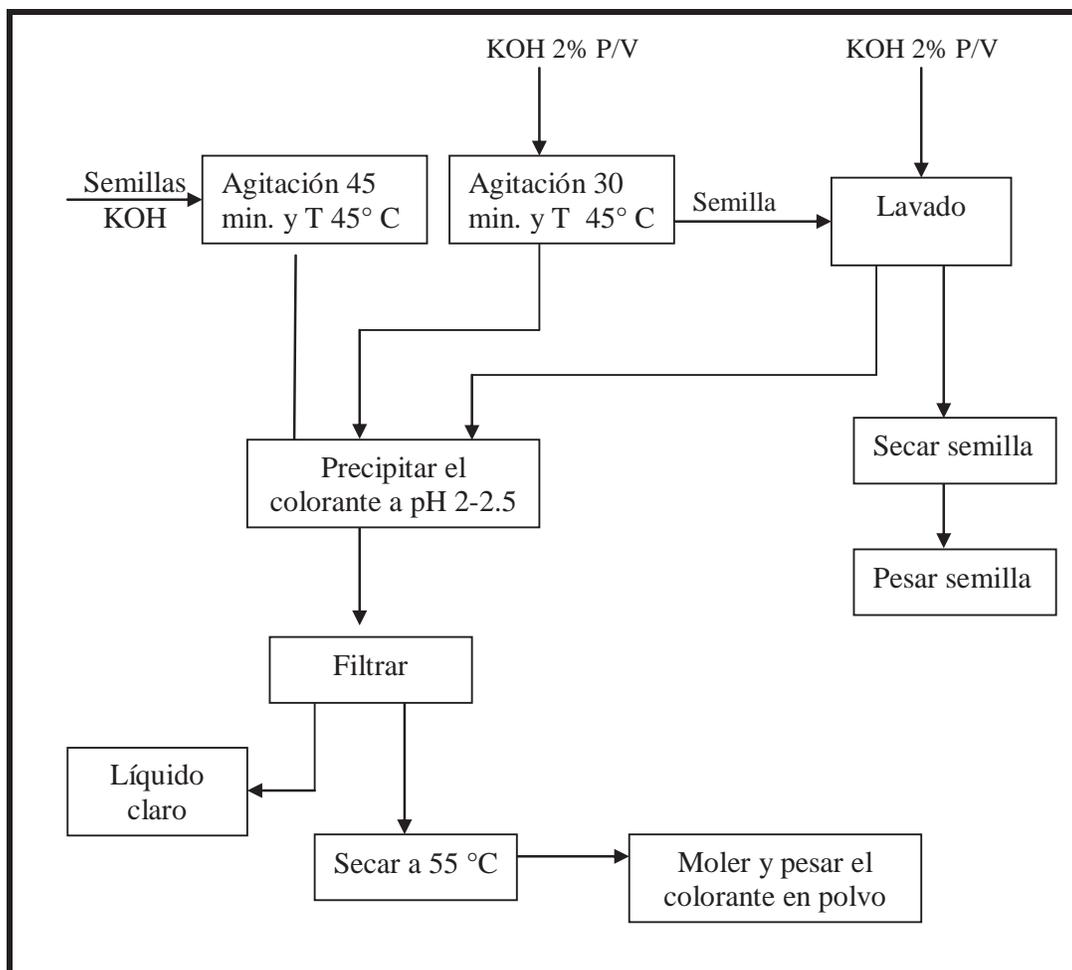


Figura 3.3. Diagrama de bloques para del método de extracción 2.

3.5 Metodología del análisis en el espectrofotómetro

Se realizó el barrido para determinar la máxima absorbancia utilizando un espectrofotómetro, Spectronic 20 Genesys. Para encontrar la longitud de onda a la cual el colorante tiene la máxima absorbancia, se tomó 0.01 gramos de muestra del colorante y se diluyó con 1 ml de KOH al 5%, luego se tomó 0,5 ml de la solución anterior y se llevó a un matraz volumétrico de 100 ml y se aflojó con solución al 5% de KOH. Mediante el espectrofotómetro se hizo un barrido de absorbancia entre 400 y 500 nm, este procedimiento se realizó para cada extracción efectuada, a diferentes condiciones, obteniéndose siempre el mismo rango de absorbancia máxima localizadas en longitudes cercanas de 450 a 480 nm, en

esta investigación se presenta únicamente la cromatografía de la corrida confirmatoria del colorante extraído.

3.6 Cuantificación del colorante

Se elaboró la curva de calibración para conocer la concentración del colorante obtenido de las extracciones de la Tabla 3.2, se diluyó el colorante a diferentes concentraciones y se tomó la lectura de la máxima absorbancia de cada concentración, para la dilución se utilizó KOH 5%. En la Figura 3.4 se presenta la curva de calibración obtenida.

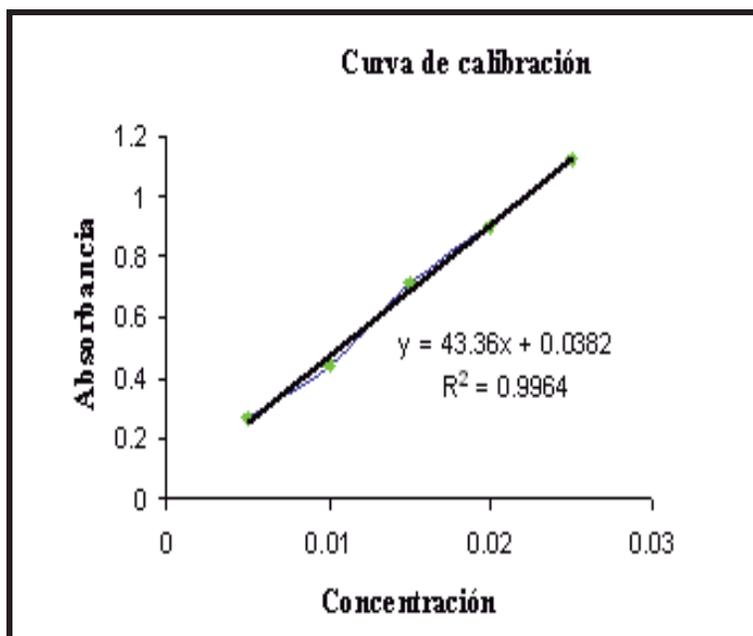


Figura 3.4. Curva de calibración del colorante del achiote.

3.7 Análisis en el espectrofotómetro infrarrojo

El espectro de infrarrojo del colorante se obtuvo con un equipo Bruker. Para interpretar el espectro de infrarrojo obtenido primero se localizan las bandas de estiramiento, observando su intensidad y después las de flexión que las confirman, de acuerdo a lo reportado por (Koji Nakanishi, 1962; Wingrove y Caret, 1999).

3.8 Separación de los colorantes (Bixina y Norbixina)

Se colocaron 2 ml de una solución acuosa de achiote en un vaso de precipitados y se añadió ácido sulfúrico de 2 N hasta obtener un pH ácido. La Norbixina se separó en forma de precipitado rojo (NOM-119-SSA 1994). Se añadieron 25 ml de benceno y luego se agitó con

fuerza, después de la separación se elimina la fase acuosa y se lavó la solución bencénica con 25 ml de agua, hasta que desaparezca la reacción ácida (se lavó 3 veces) y se centrifugó la solución (generalmente emulsificada) de Norbixina en benceno, se decantó la solución limpia de Norbixina y se deshidrato por medio de sulfato sódico anhidro. Se vertió 1 ml de la muestra en la parte superior de la columna de silica gel, y la Norbixina forma como la Bixina, una zona rojo- anaranjada en la superficie de la silica tratada con metanol y cloroformo con una relación 7:3 v/v.

3.4 Desarrollo del diseño de experimentos para obtener las mejores condiciones de extracción

Se eligen las condiciones de extracción de la segunda metodología para la elaboración del diseño de experimentos Box-Behnken, tomando en cuenta las siguientes variables de proceso: cantidad de semilla-volumen de disolvente, temperatura de extracción, tiempo de agitación.

El peso utilizado de la semilla en todos los ensayos fue de 4 gramos, esta cantidad de semilla fue tratada con diferentes relaciones de cantidad de semilla-volumen de KOH al 2% p/v, en la Tabla 3.1 se muestran las variables y los niveles estudiados mediante el diseño de experimentos.

Tabla 3.1. Factores y niveles para el diseño de experimentos.

Factores/Niveles	-1	0	1
A: cantidad de semilla-volumen de KOH	1:3	1:4	1:5
B: Temperatura (°C)	40	45	50
C: Tiempo (min.)	15	30	45

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

En el software Statgraphics 2.0 se generó una matriz de 15 ensayos con los factores considerados, los cuales se muestran en la Tabla 3.2, estas combinaciones se efectúan siguiendo la técnica de la metodología 2 y se pesa el colorante obtenido de cada combinación de factores.

Tabla 3.2. Combinación de los factores a estudiar.

Experimento	Cantidad de semilla-volumen de KOH (ml)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	1	-1	0
2	0	0	0
3	0	1	1
4	-1	0	1
5	-1	1	0
6	0	-1	1
7	0	0	0
8	1	0	1
9	1	1	0
10	-1	-1	0
11	0	0	0
12	0	1	-1
13	1	0	-1
14	-1	0	-1
15	0	-1	-1

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y ANÁLISIS

En este capítulo se analizan los resultados obtenidos de los ensayos preliminares realizados, los resultados del diseño de experimentos Box-Behnken para obtener las mejores condiciones para la extracción del colorante, así como el modelo obtenido del diseño, además se propone el diseño de proceso que puede ser utilizado a nivel industria.

4.1 Resultados preliminares para los métodos de extracción 1 y 2

En la Tablas 4.1 y 4.2 se presentan los resultados obtenidos para los experimentos preliminares del método 1 y 2, respectivamente.

De cada fruto del achiote empleado se obtienen aproximadamente de 30-45 semillas, no tienen aroma, son de dureza consistente y entre más frescas se encuentran se obtienen mejores rendimientos, se observó de un mismo fruto que pueden encontrarse semillas rojas y naranjas que al tocarse se impregna el colorante en la piel.

Las semillas a tratar requieren un tiempo de secado de 3 horas a una temperatura de 55°C, ya estandarizado el peso de la semilla se realizaron ensayos con 2 disolventes (KOH y NaOH) con diferente relación de semilla: volumen de disolvente y puede observarse de la Tabla 4.1 que la mejor extracción se tuvo con el disolvente KOH, con una relación semilla: disolvente 1:4. El tiempo de secado que requiere la pasta es de 4 a 5 horas.

Tabla 4.1. Resultados obtenidos del método 1 para la extracción del colorante.

Experimento	Disolvente	Gramos de semilla	Relación semilla:disolvente	Gramos de semilla agotada	Gramos de colorante
1	KOH	4	1:3	3.8364	0.3248
1	NaOH	4	1:3	3.8420	0.3336
2	KOH	4	1:4	3.9449	0.3675
2	NaOH	4	1:4	3.9618	0.3923
3	KOH	4	1:3	3.9006	0.3378
3	NaOH	4	1:3	3.8872	0.3093
3	KOH	4	1:4	3.8819	0.3692
3	NaOH	4	1:4	3.9460	0.3546
3	KOH	4	1:5	3.8664	0.3523
3	NaOH	4	1:5	3.9057	0.3414

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

Tabla 4.2. Resultados obtenidos del método 2 para la extracción del colorante.

Experimento	Disolvente	Gramos de semilla	Relación semilla:disolvente	Gramos de semilla agotada	Gramos de colorante
4	NaOH	4	1:3	3.8832	0.3397
4	NaOH	4	1:4	3.8695	0.385
5	KOH	4	1:3	3.8795	0.3698
5	KOH	4	1:4	3.8426	0.4226
6	KOH	4	1:5	3.7929	0.4148
6	NaOH	4	1:5	3.8632	0.3892

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

De los resultados presentados en la Tabla 4.2 se obtuvieron mejores rendimientos con una relación semilla – volumen de disolvente de 1:4, utilizando como disolvente el KOH.

En ambos métodos, el KOH fue el disolvente que permitió extraer la mayor cantidad de colorante y la técnica con la que se obtiene mejor rendimiento fue con el método 2, la diferencia que se tiene entre los métodos es mínima, pero en cantidades grandes de extracción puede ser muy significativa. Una de las ventajas de la segunda metodología es, que el tiempo en que se realiza la extracción es relativamente corto, esto se logra por la intervención de la temperatura y de la agitación.

4.2 Identificación de colorante

Empleando una solución alcalina se obtuvo de las semillas del achiote un polvo rojo (Figura 4.4), de la información encontrada se sabe que en solución alcalina se obtiene la Norbixina, uno de los pigmentos del achiote, para la identificación se usan técnicas de análisis espectrofotométrico, como Uv-Vis, cromatografía en capa delgada y espectroscopia infrarroja.



Figura 4.1. Colorante obtenido del achiote.

4.3 Resultados del análisis en el espectrofotómetro

En el capítulo 2 se hizo mención de que los picos representativos de cada colorante presentan sus máximos, Norbixina en solución diluida de KOH un valor de 453 nm. Bixina en cloroformo de 502 nm (NOM-119- SSA, 1994). Se observa en la Figura 4.4 que la máxima absorbancia obtenida del colorante extraído en laboratorio es de 450 nm., con lo encontrado en la literatura se corrobora que el pigmento obtenido es la *Norbixina* (Figura 4.4).

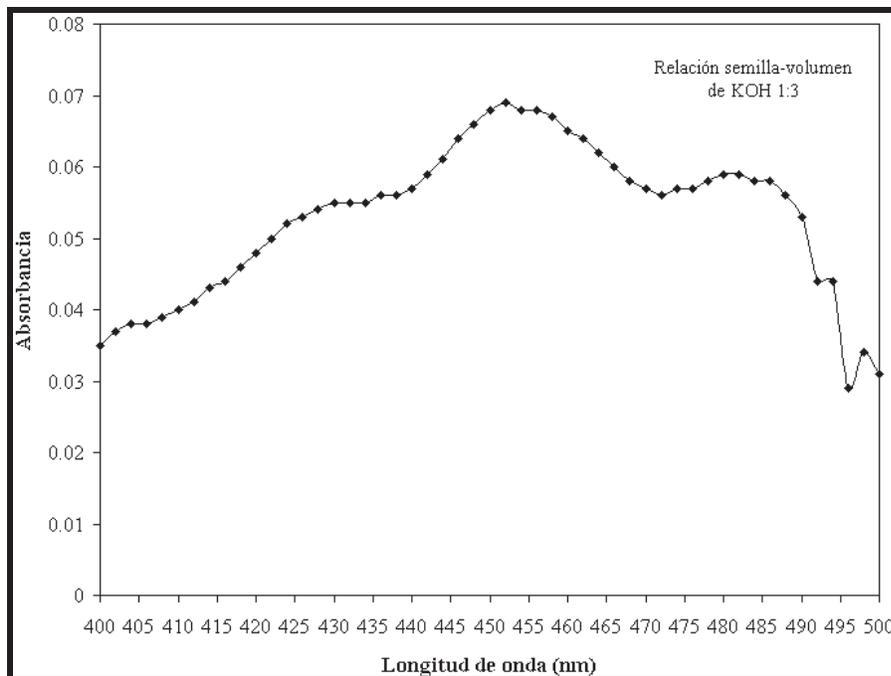


Figura 4.4. Máxima longitud de onda para el colorante del achiote.

4.4 Análisis cromatográfico en capa fina

Se seleccionó como eluyente el acetato de etilo y metanol con una relación de 7:3, entre otros eluentes se encuentran, el éter de petróleo y cloroformo (Domínguez, 1983).

De los eluentes mencionados, todos separan un solo componente entre la parte intermedia y el 80% de la placa. Sin embargo utilizando como eluyente metanol, el colorante se logra separar ligeramente en dos componentes, uno en la parte intermedia de color rojo-anaranjado y el otro un poco más arriba, en la literatura revisada se encuentra que la Norbixina, se separa en la parte un poco más arriba de la parte intermedia de la laminilla (Jaramillo y Muñoz, 1992).

Al realizar la cromatografía en capa fina se examinó a la luz natural y luego con luz ultravioleta y en ambos se encontró un solo componente localizado un poco más arriba de la parte intermedia (Figura 4.2). Se obtuvo el factor de retención en un intervalo de 0.75.

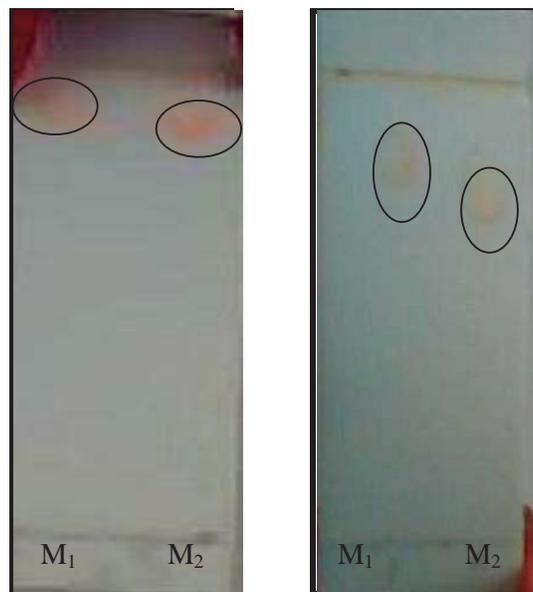


Figura 4.2. Cromatografía en capa fina del colorante del achote.

Donde M_1 es el colorante comercial y M_2 el colorante obtenido del laboratorio, se observa que se desplaza un solo componente, ambos a la misma distancia

4.5 Resultados de la espectrometría infrarrojo

En la Figura 4.3 se muestra el resultado obtenido del espectrofotómetro en infrarrojo, realizado tanto para la muestra comercial como para la obtenida en laboratorio, se encuentra una diferencia con la banda a 1250 cm^{-1} , se concluye que existe esta diferencia por que la muestra comercial contiene restos de semilla triturada y la que se obtiene en el laboratorio no contienen restos de semilla, en general el espectro en infrarrojo del colorante comercial se comporta similarmente al extraído en el laboratorio, localizándose en ambos el carboxilo que identifica a la Norbixina en 3385.10 cm^{-1} .

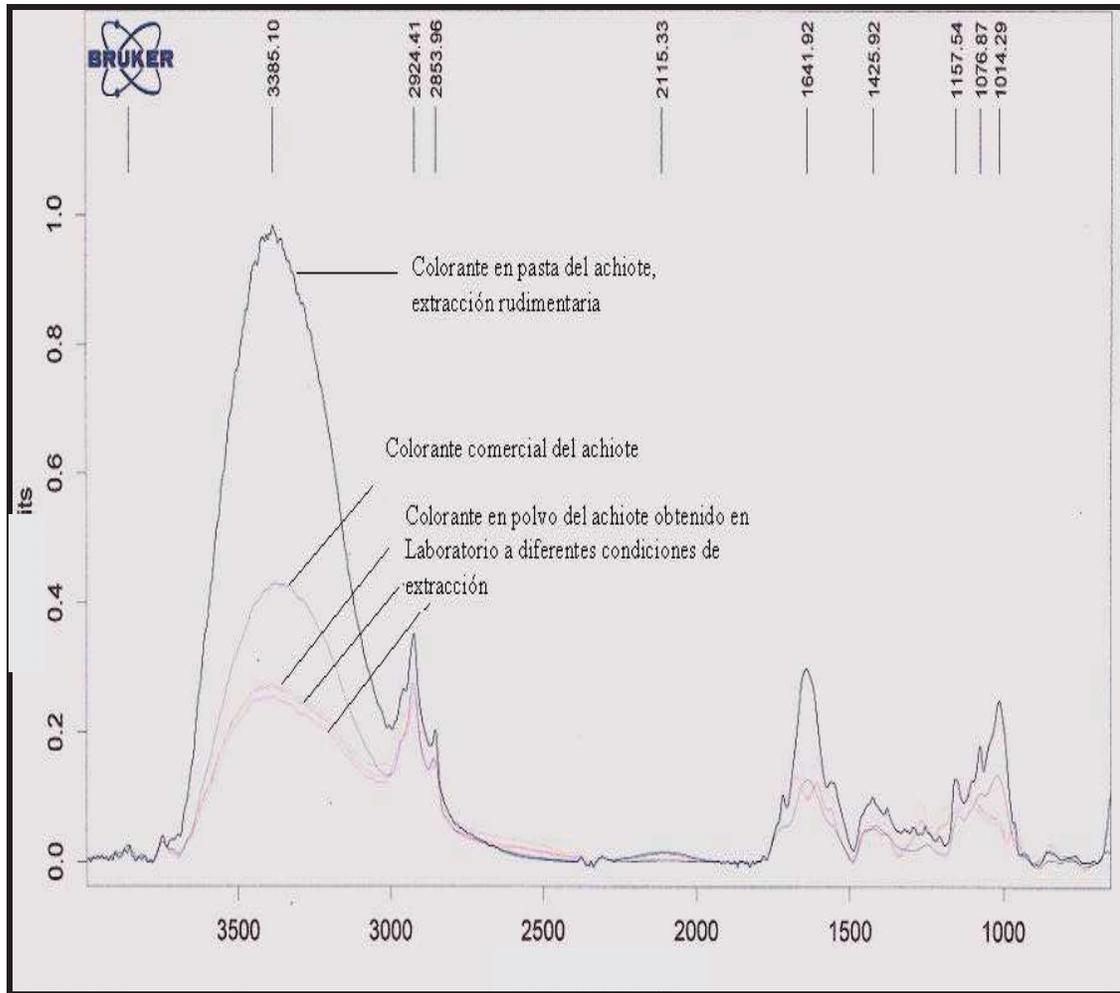


Figura 4.3. Comparación de espectros en infrarrojo del achiote.

4.6 Resultados obtenidos de la separación de los colorantes presentes de la extracción

En la Figura 4.5 la Norbixina es adsorbida enérgicamente en la superficie de la alúmina, formando una zona rojo-naranja en la superficie de la columna, obteniendo así la purificación de la Norbixina.

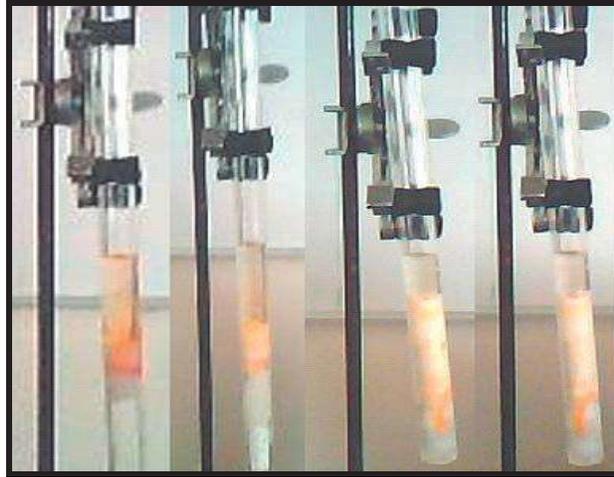


Figura 4.5. Cromatografía en columna para la separación del colorante.

4.7 Resultados del diseño de experimentos Box-Behnken

En la Tabla 4.3 se presentan los resultados de las combinaciones que se analizaron con el diseño de experimentos para obtener el modelo que permitió obtener las mejores condiciones para la extracción del colorante.

Tabla 4.3. Resultados del diseño de experimentos Box-Behnken.

Experimento	Gramos de Semilla agotada	Gramos de Colorante	Concentración de Norbixina g/l
1	3.8515	0.2072	0.046951
2	3.8857	0.2051	0.059382
3	3.8965	0.3262	0.032537
4	3.8803	0.3025	0.028478
5	3.8815	0.286	0.041185
6	3.9066	0.2767	0.026541
7	3.8568	0.2865	0.033575
8	3.8761	0.2138	0.029792
9	3.8728	0.259	0.019091
10	3.914	0.2892	0.034958
11	3.8955	0.2289	0.043423
12	3.8597	0.2777	0.027625
13	3.8783	0.2399	0.036573
14	3.8088	0.3063	0.034313
15	3.8139	0.195	0.033436

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

En la Tabla 4.4 se presenta el resultado del análisis de varianza que se obtiene del diseño de experimentos y se encontró que las variables más significativas son la relación cantidad de semilla-volumen de disolvente (KOH) y la temperatura.

Tabla 4.4. Resultados del análisis de varianza para la extracción de Bixina.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrado	F	<i>p</i>
A: KOH	0.708288	1	0.708288	0.70	0.4422
B: Temperatura	1.62534	1	1.62534	1.60	0.2620
C: Tiempo	0.512634	1	0.512634	0.50	0.5096
AA	0.658909	1	0.658909	0.65	0.4576
AB	6.03711	1	6.03711	5.93	0.0590
AC	0.000353824	1	0.000353824	0.00	0.9858
BB	2.06856	1	2.06856	2.03	0.2133
BC	0.848935	1	0.848935	0.83	0.4030
CC	1.89425	1	1.89425	1.86	0.2307
Error Total	5.08837	5	1.01767		

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

R-Cuadrada = 73.0463 %

En la Tabla 4.4 los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se dividen en la variabilidad de la variable respuesta y en segmentos fraccionados para cada uno de los efectos. Y analiza el grado de significación de cada efecto, comparando la media cuadrada con la estimación del error experimental. En este caso, la interacción AB tiene un valor de *p* cercano a 0.05, indicando que son significativamente diferentes al cero en un 95 % de nivel de confianza. El coeficiente de regresión indica que el modelo ajustado explica el 73.0463 % de la variabilidad del colorante extraído.

En las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8, se muestran las gráficas de superficie de respuesta y de contorno en función de las variables estudiadas, relación de semilla-volumen de KOH y temperatura; relación semilla-volumen de KOH y tiempo; temperatura y tiempo, respectivamente.

En la Figura 4.6 conforme se incrementa la temperatura y la relación semilla-volumen de KOH, se favorecería la extracción, pero físicamente esto no es posible ya que la temperatura puede degradar el colorante.

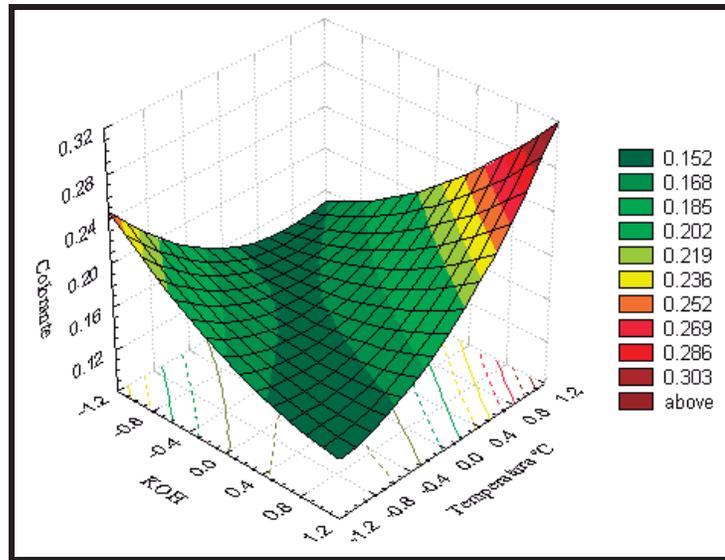


Figura 4.6. Superficie de respuesta y contorno para la extracción del colorante en función de la relación semilla-volumen de KOH y de la temperatura.

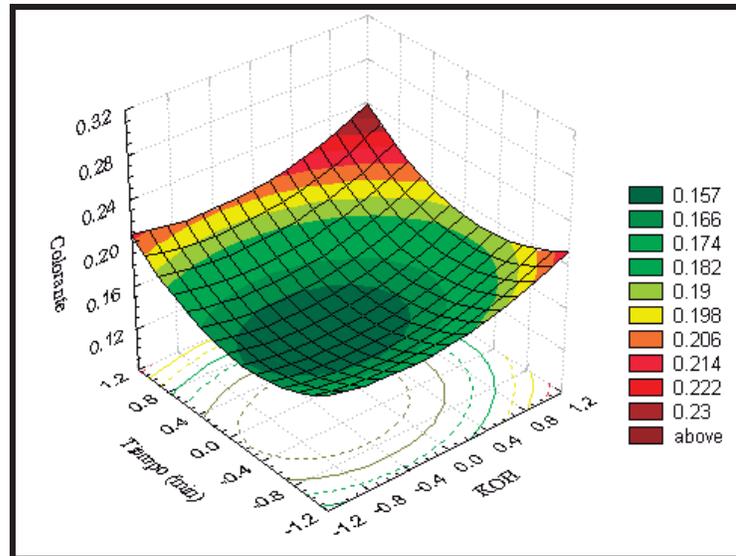


Figura 4.7. Superficie de respuesta y contorno para la extracción del colorante en función de la relación semilla-volumen de KOH y del tiempo.

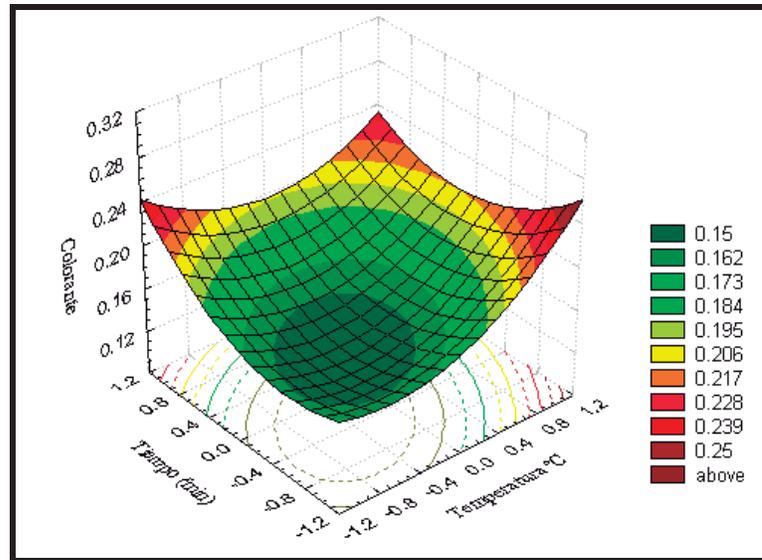


Figura 4.8. Superficie de respuesta y contorno para la extracción del colorante en función de la temperatura y el tiempo.

Del análisis de regresión del diseño de experimentos para la variable respuesta, se obtiene el modelo de segundo orden en función de las variables estudiadas (relación semilla-volumen de KOH, temperatura, tiempo de agitación).

La ecuación del modelo es:

$$\text{Colorante} = 0.134196 + 0.011902 (A) + 0.0180296 (B) + 0.0101256 (C) + 0.0168976 (A^2) + 0.0491411 (AB) + 0.000376205 (AC) + 0.0299396 (B^2) - 0.0184275 (BC) + 0.0286504 (C^2)$$

Del modelo obtenido se encontró que las mejores condiciones para la extracción fueron una relación semilla-volumen de disolvente 1:5, temperatura 50° C y 45 minutos de agitación. Se realizó la extracción por triplicado y los resultados se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Resultados de la extracción con las mejores condiciones.

Exp.	Disolvente	Gramos de semilla	Relación semilla: disolvente	Gramos de semilla agotada	Gramos de colorante	Concentración de Norbixina g/l
1	KOH	4	1:5	3.8625	0.2985	0.036135
2	KOH	4	1:5	3.8801	0.2953	0.046259
3	KOH	4	1:5	3.8626	0.2852	0.041808

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

Se obtuvo una desviación estándar en la absorbancia de 0.22 y en la concentración de 0.00507.

4.8 Balance de masa para el método de extracción 2

Se realizó el Balance de Masa para la metodología seleccionada con la finalidad de conocer cuanto se debe obtener teóricamente del pigmento, tomando en cuenta que la semilla utilizada tiene un 8% de pigmento y 92 % de impurezas, con estos datos se podrá comparar cuanto se obtiene experimentalmente del pigmento (Figura 4.9).

$$\rho = m / v \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

$$\rho_{\text{KOH}} = 2 \times 10^3 \text{ Kg} / \text{m}^3 \quad v = 20 \text{ ml} = 2 \times 10^{-5} \text{ m}^3$$

$$m_{\text{KOH}} = \rho * v = 0.04 \text{ Kg}$$

$$\rho_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1.8 \times 10^3 \text{ Kg} / \text{m}^3 \quad V_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 5 \text{ ml} = 5 \times 10^{-6} \text{ m}^3$$

$$m = \rho * v = 0.009 \text{ Kg de H}_2\text{SO}_4$$

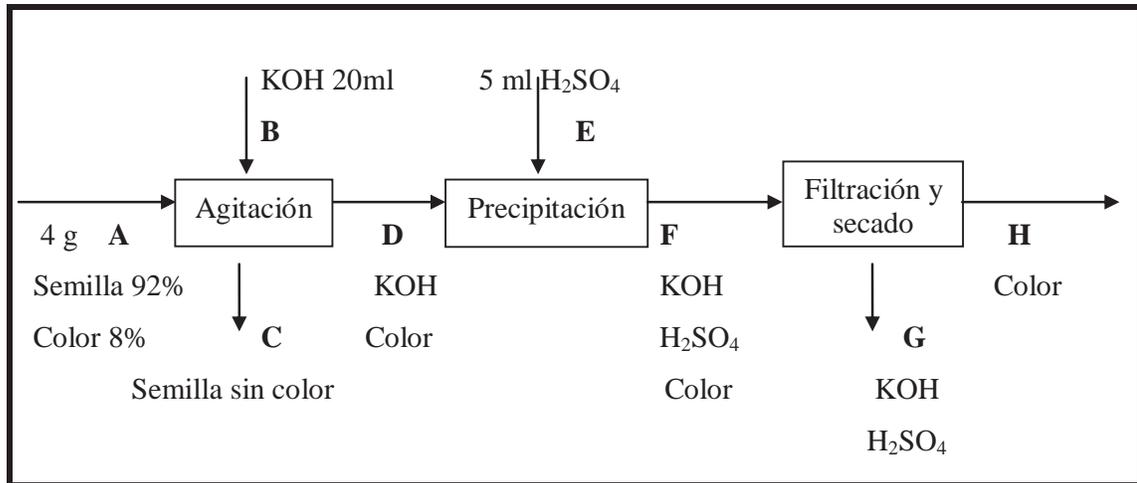


Figura 4.9. Diagrama de bloques para la extracción del colorante

Balance de masa Global del proceso

$$A + B + E = G + C + H \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

$$0.004 \text{ kg} + 0.04 \text{ kg} + 0.009 \text{ kg} = 0.049 \text{ kg} + 0.00368 \text{ kg} + 0.00032 \text{ kg}$$

$$0.53 \text{ kg} = 0.53 \text{ kg}$$

En la Tabla 4.6 se presentan los resultados obtenidos del balance de masa para la extracción del achiote, se tomo como base de cálculo 4 gramos, debido a que ésta es la cantidad de semilla utilizada en cada ensayo.

Tabla 4.6. Resultados obtenidos del Balance de Masa.

Corriente Kg	Composición de las corrientes
A = 0.004	$X_{A \text{ colorante}} = 0.08$ $X_{A \text{ semilla}} = 0.92$
B = 0.04	$X_{B \text{ KOH}} = 1$
C = 0.00368	$X_{B \text{ Semilla}} = 1$
D = 0.04032	$X_{D \text{ colorante}} = 0.007937$ $X_{D \text{ KOH}} = 0.992063$
E = 0.009	$X_{E \text{ H ácido}} = 1$
F = 0.04932	$X_{F \text{ KOH}} = 0.811027$ $X_{F \text{ H}_2\text{SO}_4} = 0.182482$ $X_{F \text{ color}} = 0.006489$
G = 0.049	$X_{G \text{ KOH}} = 0.816324$ $X_{G \text{ H}_2\text{SO}_4} = 0.183674$
H = 0.00032	$X_{H \text{ color}} = 1$

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

4.9 Diseño del proceso de extracción

Con base a los resultados obtenidos se establecen los siguientes parámetros para cada una de las variables estudiadas.

Relación cantidad de semilla/volumen de disolvente 1:5 p/v (peso/Volumen)

Concentración de disolvente KOH: 2 % p/v (Peso//Volumen)

Tiempo de agitación: 45 minutos a 60 rpm

Temperatura: 50° C

Costo de Ácido Sulfúrico 18800/Tonelada

Costo de Hidróxido de potasio 9200/Tonelada

El costo del achiote es de \$2.00 pesos por kilogramo al sur de México, y para la extracción, según un estudio de mercado reciente el precio de los colorantes naturales están cotizados en \$50,000 a \$55,000 peso por kilo (Alzate, 2005). Obteniendo una producción de 24 toneladas anuales de la planta de extracción se obtienen una ganancia de \$1,200,000,000.00 pesos.

Para el diseño de la planta piloto se establecen como criterios una producción diaria de 100 kilogramo por día de colorante, trabajando 25 días por mes, para tener esta producción se procesan 10 lotes de producción de 10 kilogramos. Se estima un porcentaje de rendimiento de producción del 93 %.

Análisis económicos realizados para plantas pilotos muestran que el negocio de los colorantes naturales es rentable. Esto lo han demostrado empresas de la ciudad como C.I. Tecnacol, Alsec Ltda., así como empresas de Estados Unidos Kalsec Inc. O de Chile, Biocolor (Escobar, A., 2005)

En la Tabla 4.7, se presentan los equipos a emplear y sus características para llevar a cabo el proceso de extracción del colorante.

Tabla 4.7. Equipos que se sugieren para ser utilizados en la extracción del achiote.

Equipo	Cantidad	Características	Costo
Silo almacenamiento para semilla	1	V= 6.6 m ³ , L= 4.3m, D=1.41;	US \$ 50,000
Tanque de almacenamiento de KOH al 2%	1	V= 34m ³ , L=7.5m, D=2.5; Acero inoxidable	US \$ 2400.00
Tanque de almacenamiento H ₂ SO ₄	1	V=8.4m ³ , L=4.6m, D=1.53m;Acero inoxidable	US \$ 932.00
Tanque de agitación	1	V=0.84m ³ , L=2.13m, D=0.71m; Acero inoxidable	US \$ 200.00
Tanque de precipitación y suspensión coloreada	1	V=0.93m ³ , L=2.2m; D= 0.74.	US \$ 218.00
Control de temperatura	1	Termopar de 70° C	US \$ 49.00
Bomba centrifuga	5	1 Hp, 380 volt. 1.9 Amp. Caudal 110 L/min,	US \$ 995.00
Filtro prensa	1	Capacidad 1m ³ por lote.	US \$ 6000.00
Secador	1	Sacador para 15 Kg de colorante	US \$ 17000.00
Molino	1	Motor 1 HP, muele a base de discos con rendimiento de 150 kg/h.	US \$ 4800.00

Fuente: Obtenida en el presente estudio.

Los cálculos realizados están estimados para trabajar en el Sur de México (Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, y Yucatán), aunque se deberá realizar un estudio de mercado detallado y profundo para conocer la localización de la planta.

En la Figura 4.10 se muestra el diagrama del proceso propuesto para una extracción de 10 kilogramos de colorante del achiote por lote.

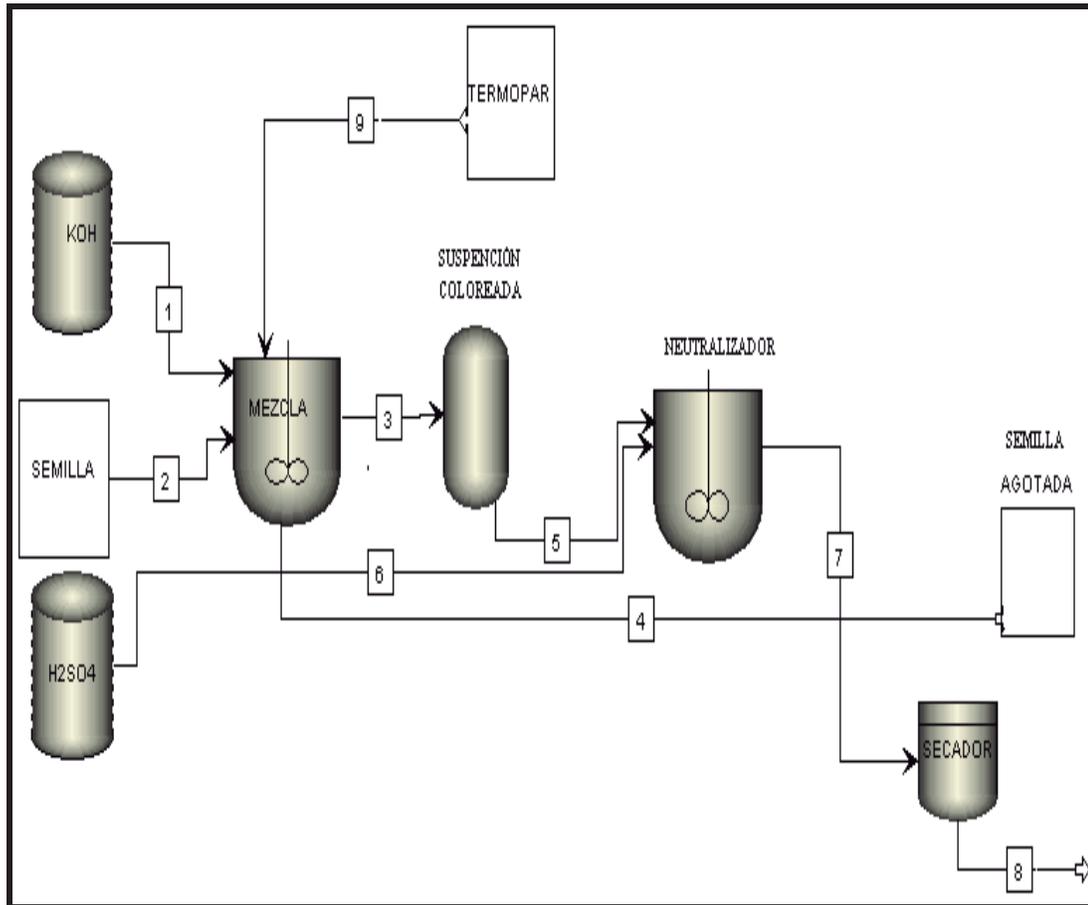


Figura 4.10. Proceso de extracción del colorante del achiote.

NOMENCLATURA DE LAS CORRIENTES

1	Hidróxido de potasio al 2% p/v	6	H_2SO_4 al 2.5 N
2	Semilla del achiote	7	Suspensión acidificada
3	Suspensión coloreada	8	Colorante en polvo
4	Semilla Agotada		
5	Suspensión coloreada		

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que:

- La extracción del colorante en medio básico fue adecuada, y el diseño de experimentos, teniendo como variable respuesta la cantidad de colorante extraído, permitió encontrar las mejores condiciones para la extracción: cantidad de semilla volumen de solvente (1:5), temperatura 50 °C y tiempo de agitación de 45 minutos.
- Del análisis en el espectrofotómetro uv-visible se encontró la máxima absorbancia del colorante obtenido en el laboratorio, así como del colorante comercial y en ambos fue de 450 nm.
- En la cromatografía en capa delgada se obtuvo un R_f de 0.75 tanto para el colorante comercial como para el obtenido en el laboratorio.
- Del espectro en infrarrojo, la muestra comercial y la obtenida en el laboratorio se comportan similarmente, se localizo en ambos el carboxilo que identifica la Norbixina a 3385.10 cm^{-1} , con una diferencia mínima a 1250 cm^{-1} .
- Del balance de masa realizado para el proceso de extracción del achiote, se obtuvo que teóricamente se debe tener un 8 % de colorante en relación al peso de la semilla, con el método alcalino utilizado se logró obtener el 93 % del colorante de la semilla.
- El presente estudio permitió establecer la metodología para el proceso de extracción del colorante del achiote.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

- Dar inicio y seguimiento a un estudio integral, ingeniería de proyectos, para la construcción de la planta piloto para la extracción del achiote.
- Realizar un estudio y el análisis económico, para el proceso de extracción y purificación del colorante.

- **Administración Sanitaria Estatal, (1996).** Normas de Identidad y Pureza de los Colorantes utilizados en los Productos Alimenticios.
- **Alzate, M. y (2005).** Pulverización de colorantes naturales a escala industrial. Proyecto de Grado de Ingeniería de Procesos. Medellín: Universidad EAFIT. ISSN 1692-0694
- **Castaño, T. E. y Domínguez, D. J., (2003).** Estrategia y Análisis en Ciencia y Tecnología. Centro de investigación en matemáticas, CIMAT. Centro de investigación en Matemática, A.C., Jalisco s/n, Mineral de Valencia, Guanajuato, Gto., M ISBN: 968-5733-01-05.
- **Collins, P., (1992).** The role of annatto in food coloring. *Food Ingredients and Processing International*, February, 23-27.
- **Compendio de Agronomía Tropical (1989).** Editado por el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y el Ministerio de Asuntos Extranjeros de Francia. San José de Costa Rica. 1989. Páginas 629 a 633. Purdue University (USA)
- **Compendio de Agronomía Tropical, (1989).** Editado por el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y el Ministerio de Asuntos Extranjeros de Francia. San José de Costa Rica.
- **Córdoba, V. J. A., (1987).** El Achiote: Cultivo, Beneficio y posibilidades de exportación En: Revista ESSO Agrícola. Vol. 34, No. 1; pp. 3-7. □□□ □□□□□□□□
- **Directiva 1999/75/CE de la comisión, (1995).** Diario Oficial N° L 206, pp. 46, fecha 5. 8. 1999.
- **Domínguez, A. X., (1983).** Química Orgánica Experimental, primera edición, Limusa, pp. 79 – 112.
- **Escobar, A., (2005).** Pulverización de Colorantes Naturales Por Secado por Atomización Grupo de Investigación Desarrollo y Diseño de Procesos, departamento de ingeniería de procesos director de grupo de investigación; Documento 33-072005 ISSN 1692-0694
- **FDA, (2001).** Food and Drugs Administración, color additives <http://vm.cfsan.fda.gov/mow/sfoodadd.html>.
- **Giuliano, G., Rosati, C. y Bramley, M., (2003).** Bioquímica del achiote; IENEA (Italian National Agency for New Technologies, Energy and the Environment), Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey TW20 OEX, UK. Vol.21 No.12 December 2003.
- **González, E. M., González, C M., Cerezal, M. P, y García, Y., (2002).** Estudio de la extracción de colorante de bija empleando como disolvente aceite vegetal; Alimentaría,

- Revista de tecnología e higiene de los alimentos. N° 334, 2002, pp. 131-134. ISSN 0300-5755.
- **Hernández, G., Tirado, G.; Juan, M.; Iliná, A.; López, T.; Reboloso, P.; Ruelas, C. (2002).** Obtención del colorante de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) utilizando microorganismos celulolíticos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Universidad Autónoma de Coahuila.
 - **IEEM (2007). Investigación Estratégica y Económica de Mercados (2007).** fuente, SUNAT, http://www.centrum.pucp.edu.pe/centrumaldia/mercados/mercado_achiote.htm, Santiago de Surco Lima, Perú.
 - **Jaramillo, M. C. A. y Muñoz, M. O. A. (1992).** Extracción de colorante del achiote, Trabajo de grado (Ing. Químico). Medellín, Universidad Nacional. Facultad Nacional de Minas. Departamento de Procesos Químicos.
 - **Juárez, S. O. (2005),** Caracterización, Extracción, y purificación por cromatografía de los componentes del Urucum. Universidad Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico Departamento de Ingeniería química e ingeniería en alimentos, Florianópolis.
 - **Koji, Nakanishi, (1962).** Absorción espectroscópica de infrarrojo Holden- Day, Inc., and Nankodo Company Limited, Tokio.
 - **McKeown, G. G. (1961).** Paper chromatography of bixin and related compounds. J. Ass. Agric.Chem., 44 (2), 347-51. ISBN 968-6034-36-6.
 - **Mercadante, A. (2003).** Método para la determinación de la adición del color del achiote en los bocadoillos del maíz. Department of Food Science, Faculty of Food Engineer, State University of Campinas. Brazil.
 - **Ministro de Agricultura (2002).** analysis of annatto (*bixa orellana*) food coloring formulations.determination of coloring components and colored termal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection, Fisheries and Food, CSL Food Science Laboratory, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UQ, United Kingdom, J. Agric. Food Chem.Vol. 46, No. 3.
 - **Mosquera, P. (1989).** Factibilidad Técnica e Industrial de la Extracción de Colorante del Achiote. Trabajo de Grado (Ingeniero Químico). Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Química. Medellín, Colombia.
 - **Murillo G. O. M. Tecnóloga de Alimentos Dirección de Mercadeo y Agroindustria, (2005).** Área Desarrollo de Producto Tecnóloga de Alimentos. Degradation products by gas chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 484-488.

- **Norma Oficial Mexicana NOM-119-SSA1 (1994).** Bienes y Servicios. Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes orgánicos naturales. Especificaciones sanitarias. México.
- **Preston, H. D. y Rickard, M. D. (1979).** Extracción y Química del annatto; Food Industries Limited, Bromborough Port, Wirral, Merseyside, Great Britain.
- **Preston, H. D., y Richard, M. D. (1980).** Extracción y bioquímica del achiote. Alimentos químicos, Food Chemistry 5, 47-56.
- **Programa conjunto FAO/OMS, (2006).** Sobre normas alimentarias comité del codex sobre aditivos alimentarios 39ª reunión Beijing (China), propuestas de revisión al sistema internacional de numeración para los aditivos alimentarios.
- **Revista Universidad EAFIT, (2003).** Volumen 39 N° 131. ISSN-0120-341X. Colombia.
- **Sahaza, C. D. P. (2003).** El Achiote. Página web: <http://www.unalmed.edu.co/~crsequed/ACHIOTE.htm> (14/03/03).
- **Sandi, M. P., (2003).** El achiote, boletín bimestral de la comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Año 7, n° 46, 7-11.
- **Scotter, J. M.; Wilson, A. L.; Appleton, P. G. y Castle L., (1998).** Análisis del annatto (*Bixa orellana*) Formulación para la coloración de alimentos. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, pp. 1031-1038.
- **Scotter, M. J.; Castle, L.; Honeybone, C. A. y Nelson, C., (2001).** El desarrollo de método y el análisis de comidas para la coloración de comida del achiote. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, UK. Food Additives and Contaminants , Vol. 19, No. 3, 205±222.
- **Smith, N.; Williams J.; Plucknett D. L. y Talbot J. P., (1992).** Tropical forest and their crops. Comstock Cornell, Ithaca. www.analitica.com/art. Leatherhead Food R. A. Research Report 431.
- **Tocchini, L. y Zerlotti A., (2001).** Extracción e Determinación, de Bixina e Norbixina en Coloríficos, UNICAMP, Campinas, CEP 13083-970. Mercadan@obelix.unicamp.br
- Trópica. Tomo II. Ed. IICA 1989. San José, Costa Rica.
- **Wingrove, A. S. y Caret L. R., (1999).** Química Orgánica; primera edición; Oxford.
- **Zotyen, Q. C., (2002).** Compendio Cultivo del achiote, *Bixa orellana* I; División de Agronegocios, DGEA. Nueva San Salvador.