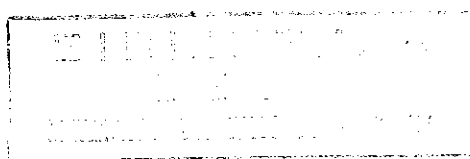


UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA



**OPTIMIZACION DE PARAMETROS DE EXTRACCION
DE COLORANTE DE ACHIOTE (*Bixa orellana*)**

GONZALO ENRIQUE MEJIA RETANA



Trabajo de graduación presentado para optar
al grado académico de

Licenciatura en Bioquímica

Guatemala, 1997

OPTIMIZACION DE PARAMETROS DE EXTRACCION
DEL COLORANTE DE ACHIOTE (*Bixa orellana*)

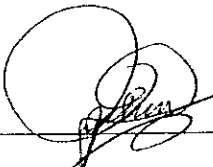
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

OPTIMIZACION DE PARAMETROS DE EXTRACCION
DEL COLORANTE DE ACHIOTE (*Bixa orellana*)

GONZALO ENRIQUE MEJIA RETANA

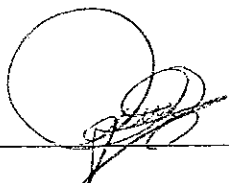
Trabajo de graduación presentado para optar
al grado académico de Licenciatura en Bioquímica

Vo. Bo.:

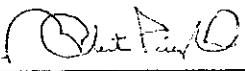
(f) 

Dr/ Victor Quiroa (Ph.D.)
Asesor

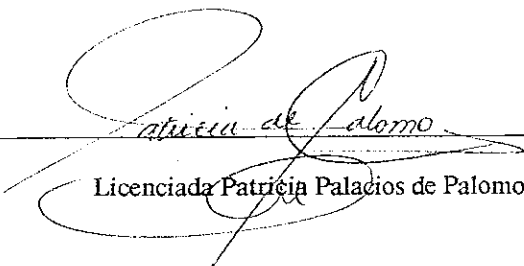
Tribunal:

(f) 

Dr. Victor Quiroa (Ph.D.)

(f) 

Licenciado Ronaldo Perez

(f) 

Licenciada Patricia Palacios de Palomo

Fecha de Aprobación: 18 JUN. 1997

A Dios

a mis Padres

a mi Esposa y

a mi Hija Marínés

AGRADECIMIENTOS

A Dios por esta meta alcanzada, ya que sin El este trabajo no hubiera sido posible.

A mis padres, por la confianza que tuvieron en mí al inscribirme en esta Universidad y la ayuda que me prestaron para que finalmente terminara este trabajo.

A mi esposa Maricruz, por su apoyo y consejos, por su cariño y también por escucharme varias noches para darme su opinión acerca de lo que iba discutiendo.

A Rony, por su ayuda, pero principalmente por su paciencia, para explicarme los resultados y la estadística de este trabajo, y por devolverme tan rápido los borradores de la Tesis para que los corrigiera.

Al Dr. Quiroa, por su asesoría para llevar a cabo este trabajo y por devolverme rápidamente el protocolo y los borradores de la tesis.

Y finalmente a Patty, por alentarme en todo momento a terminar mi carrera y no desperdiciar todos los conocimientos que adquiriré en esta Universidad.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron algunos de los parámetros involucrados en la extracción del colorante bixina que se encuentra en las semillas de achiote (*Bixa orellana*), para determinar si existe alguna correlación entre ellos y poder así establecer un procedimiento óptimo de extracción del pigmento. El patrón de comparación entre todos los parámetros fue el porcentaje de norbixina (p:p) presente en el polvo que se obtiene como producto final. Los parámetros estudiados fueron: dilución de extracción, concentración de álcali, acidez de precipitación, horas de sedimentación y temperatura de extracción. El tipo de semilla utilizada fue de alto y bajo contenido de bixina. Ambos tipos de semilla se diferencian en que la de alto contenido es semilla de la cosecha actual, mientras que la de bajo contenido pertenece a la cosecha del año anterior. Los resultados obtenidos indicaron que existen puntos óptimos para la extracción del pigmento en cuanto a concentración de álcali y horas de sedimentación para semilla de bajo contenido de bixina, así como puntos óptimos para la temperatura de extracción para semilla de alto contenido de bixina. Asimismo indicaron que algunos de los parámetros actualmente empleados en la extracción industrial de bixina se encuentran dentro del intervalo de condiciones óptimas.

CONTENIDO

RESUMEN	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	
A. La planta de achiote.....	2
1. Pigmentos de achiote y sus características.....	3
B. Métodos de extracción de los pigmentos de achiote.....	4
1. Extracción con aceite vegetal refinado.....	5
2. Extracción con álcali acuoso	5
3. Extracción con un solvente orgánico	6
C. La biosíntesis de bixina.....	6
D. Reacciones químicas e interacciones de los pigmentos de achiote.....	7
1. Hidrólisis de bixina a norbixina.....	8
2. Isomerización de bixina	9
3. Termólisis de bixina.....	10
4. Oxidación de bixina y norbixina.....	10
5. Interacción con otros componentes de los alimentos	11
E. Aplicación de colorantes de achiote	12
1. Extracto soluble en aceite.....	13
2. Extracto soluble en agua.....	13
III. JUSTIFICACION.....	15
IV. OBJETIVOS	
A. Objetivos Generales	16
B. Objetivos Especificos	16

V. METODOLOGIA	
A. Muestreo.....	17
B. Análisis.....	17
1. Análisis del contenido de norbixina en la semilla	17
2. Obtención del colorante en polvo.....	18
3. Análisis del contenido de norbixina en el colorante solido en polvo.....	18
VI. HIPOTESIS.....	19
VII. RESULTADOS	
A. Efecto del tipo de semilla	20
B. Efecto de la dilución de extracción.....	20
C. Efecto de la concentración de hidróxido de potasio.....	20
D. Efecto de la acidez de precipitación.....	24
E. Efecto de las horas de sedimentación	24
F. Efecto de la temperatura de extracción.....	24
VIII. DISCUSION.....	33
A. Análisis “Costo-Beneficio”	35
IX. CONCLUSIONES.....	37
X. RECOMENDACIONES.....	38
XI. BIBLIOGRAFIA.....	39
APENDICE.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Pigmentos principales de la semilla de achiote.....	4
2	Diagrama general de biosíntesis de carotenoides.....	7
3	Estructura del 9-cis beta caroteno	7
4	Hidrólisis de bixina a norbixina.....	9
5	Productos de degradación térmica del colorante bixina	10
6	Reacción de enlace entre pigmento e hidrocoloide	13
7	Pureza de norbixina vs muestreo vs tipo de semilla	21
8	Pureza de norbixina vs dilución vs tipo de semilla	22
9	Pureza de norbixina vs dilución de extracción.....	23
10	Pureza de norbixina vs concentración de álcali vs tipo de semilla	24
11	Pureza de norbixina vs concentración de álcali	25
12	Pureza de norbixina vs pH vs tipo de semilla	27
13	Pureza de norbixina vs acidez de precipitación	28
14	Pureza de norbixina vs horas de sedimentación vs tipo de semilla.....	29
15	Pureza de norbixina vs horas de sedimentación.....	30
16	Pureza de norbixina vs temperatura vs tipo de semilla	31
17	Pureza de norbixina vs temperatura	32

I. INTRODUCCION

El achiote es un material colorante de origen vegetal que se obtiene de una sustancia pastosa que se encuentra en el pericarpio de las semillas de la planta *Bixa orellana*. Este colorante ha sido utilizado desde tiempos antiguos en textiles y alimentos, así como en cosméticos. Actualmente este colorante se encuentra en varias presentaciones, como suspensión o solución de aceite vegetal, cristales, mezclas en polvo con otros colorantes, colorante semiprocésado y en solución alcalina acuosa.

Este trabajo involucra la evaluación de parámetros relacionados con la extracción alcalina acuosa que es el método más común de extracción del pigmento. De esta manera se logrará minimizar las características no deseadas que el colorante en polvo pueda tener, entre éstas, la turbidez en la solubilización y un bajo porcentaje de pureza.

La extracción alcalina acuosa se basa en la remoción del pigmento por abrasión y solubilización. Una vez obtenido el extracto, se agrega un exceso de ácido sulfúrico para precipitar el pigmento, que al ser secado da como resultado un colorante sólido soluble en álcalis.

Entre los parámetros que se estudiarán se encuentra: la temperatura de lavado, concentración de álcali, dilución de extracción y acidez en la precipitación. De la mejor combinación de éstos resultará una óptima extracción del colorante con propiedades adecuadas, de tal forma que el pigmento sea competitivo en el mercado.

Un análisis de costo-beneficio ayudará a evaluar si sería más rentable emplear las condiciones con rendimientos máximos (sugeridos por este estudio) o si resulta más conveniente seguir trabajando en las condiciones actuales (optimizar vrs. maximizar producción).

II. ANTECEDENTES

A. La planta de achiote

La planta de achiote es un miembro de la familia Bixaceae y tiene el nombre botánico de *Bixa orellana*. Esta puede ser un pequeño arbusto o un árbol de mediano tamaño, llegando a tener una altura de 2 -5 metros dependiendo de las condiciones climatológicas y la edad de la planta. El achiote crece mejor en regiones de clima caliente y húmedo; también crece en alturas hasta 1250 metros S.N.M. pero necesita bastante agua y suelos con un buen sistema de drenaje. El follaje es denso y por ello ha sido utilizado como rompeviento en plantaciones de café y té (Ingram y Francis, 1969).

La planta es originaria de América tropical, pero actualmente también es cultivada en muchos otros países como lo son: India, Africa del Este, Jamaica y Sri Lanka. En Kenya el achiote es utilizado como planta ornamental (Ingram y Francis, 1969).

El achiote presenta una gran variedad de colores, desde árboles con tallos verdes, flores blancas y vainas verdes hasta tallos rojos, flores rosa y vainas rojo oscuro. A pesar de estas diferencias, el pigmento producido por las semillas no tiene variación en su estructura. Lo que sí se puede observar es la diferencia en rendimiento al momento de extraer el colorante. Como rendimiento se entiende la cantidad de colorante por Kg de semilla. Se conocen varios niveles de rendimiento y se ha reportado hasta un 7% (p/p). Un contenido normal de colorante se encuentra en el orden de 2 - 3% (p/p) en base seca. En los últimos años se han llevado a cabo varios ensayos agrícolas con el achiote, siendo el principal objetivo maximizar el rendimiento de semilla por hectárea e incrementar el contenido de colorante en la propia semilla (Monge, 1967).

El fruto del achiote consiste de una vaina rugosa cubierta de espinas flexibles. A esta vaina se le conoce también como "pocha" y puede variar en tamaño y apariencia, puede ser redonda o elongada. El interior de las vainas se puede dividir en dos mitades las cuales contienen entre diez y cincuenta pequeñas semillas recubiertas de una pequeña capa de una resina suave, levemente pegajosa de color naranja/rojizo, la cual es la fuente del pigmento comercial (Bressani y Brahan, 1983).

La planta de achiote se propaga usualmente por semilla, aunque también se puede llevar a cabo una propagación vegetativa. La germinación de la semilla toma aproximadamente 2 semanas y luego las plántulas crecen rápidamente en 4 meses hasta un tamaño de 15 -25cm, cuando ya están listas para ser sembradas en el campo. Bajo condiciones favorables, la floración comienza después de 18 meses de su siembra y las cosechas completas de semilla se obtienen después de 3 - 4 años (Bressani y Braham, 1983).

Las vainas que contienen las semillas son recogidas una vez comienzan a madurar y por lo tanto, a abrirse. Esto ocurre dos meses después de la floración. Las vainas son tomadas del árbol con mucho cuidado para obtener otra cosecha de semilla el mismo año, pero estos casos son muy raros. Un rendimiento de 4.5 - 5Kg de semilla seca de un árbol por año es lo esperado (Monge, 1967).

Las vainas cosechadas se secan al sol para prevenir el crecimiento de mohos y también detener la germinación durante el almacenaje y transporte de la semilla. Durante el proceso de secado, las vainas que aún estaban cerradas se abren y se les sacan las semillas manualmente. Es importante luego de sacar las semillas, secarlas rápida y eficientemente, ya que esto afecta la calidad final de la semilla. La eficiencia de este proceso es vital, ya que la exposición a la luz, oxígeno y almacenaje prolongado conducen al deterioro del pigmento contenido en la semilla (Monge, 1967).

1. Pigmentos de achiote y sus características

Los extractos de achiote pueden dar una tonalidad que abarca desde amarillo a naranja y hasta naranja/rojizo; son de los colorantes más antiguos conocidos para el hombre y han sido utilizados desde tiempos inmemoriales como un colorante de alimentos y textiles, así como de cosméticos. En la actualidad la demanda del achiote se ha incrementado por su uso como colorante alimenticio en diferentes aplicaciones (Hernández et al., 1985).

Los principales pigmentos de las semillas de achiote son los diapocarotenoides C_{25} , conocidos como bixina y norbixina. Estos se encuentran en dos formas isoméricas principales; cis y trans (Figura No. 1) (Hereld, 1995).

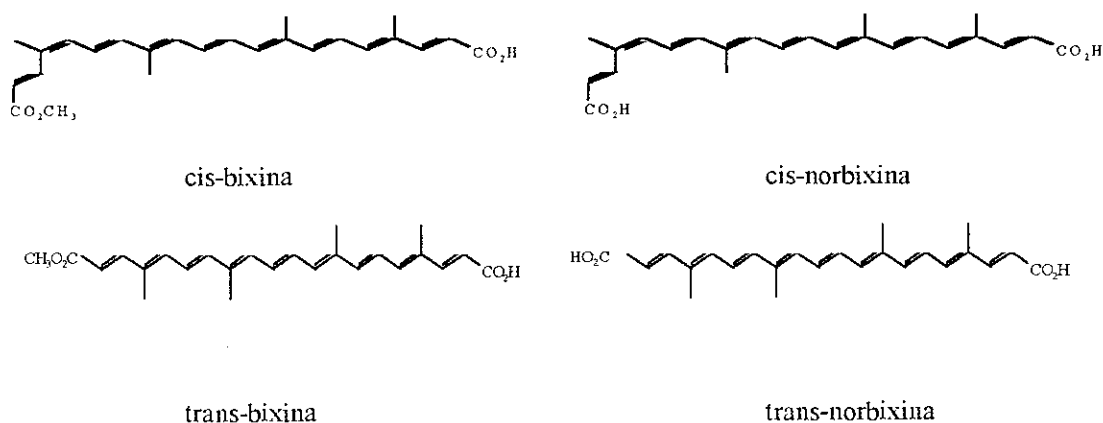


Figura No.1

Pigmentos Principales de la Semilla de Achiote (Hereld, 1995).

Para establecer la estructura química del pigmento que actualmente se conoce como bixina, hubo que esperar hasta 1825 cuando Boussingault la describió. Esto llevó a investigaciones científicas por varios autores. El pigmento fue cristalizado por primera vez en 1875. En 1917 Heiduschka y Panzer llevaron a cabo un análisis elemental, dando a conocer la fórmula empírica $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$. En el período de 1928 a 1933, Kuhn y sus colaboradores encontraron una fórmula estructural para la bixina y Karrer sintetizó perhidronorbixina, lo que confirmó esta fórmula (Chao, 1991).

A pesar de esto, no fue sino hasta 1961 que los detalles exactos de la estereoquímica de la cis-bixina, fueron establecidos por medio de estudios de Protones de Resonancia Magnética Nuclear (N.M.R.). La estereoquímica de la 9-cis bixina fue confirmada por una síntesis total reportada en 1970.

B. Métodos de extracción de los pigmentos de achiote

Para extraer el colorante, es de suponer que la semilla puede ser molida, pero es ventajoso no molerla, ya que así es más fácil la remoción del pigmento de la semilla, el cual se encuentra sólo en el exterior de la misma. A continuación se describen los tres métodos actualmente utilizados para extraer el pigmento de las semillas de achiote (Chao, 1991).

1. Extracción con Aceite Vegetal Refinado

La principal razón para emplear este método es para proveer de un color adecuado para productos que utilizan como base aceite o grasa, como es el caso de la margarina. Las semillas de achiote son sumergidas en aceite vegetal y luego por abrasión mecánica se remueve el pericarpio de las mismas. Este líquido relativamente viscoso, es calentado a baja presión a una temperatura que no exceda los 130°C, para disolver los pigmentos. Luego de esto, la solución es filtrada para remover materiales insolubles. Los principales pigmentos carotenoides de esta solución de aceite son cis-bixina y trans-bixina así como un producto de degradación térmica de color amarillo (Chao, 1991).

La solubilidad de la cis-bixina es relativamente débil en aceite y por medio de este método se obtiene una solución de 0.2 - 0.5% de pureza -del 3% total- en base oleosa. Esto depende del tiempo y temperatura de extracción, así como el tipo de aceite utilizado (Monge, 1967).

2. Extracción con Alkali Acuoso

Este método es empleado comúnmente para obtener extractos líquidos tanto hidrosolubles como miscibles en aceite. Estos son agregados a productos como sopas instantáneas, helados, cereales, etc. Se sabe que la bixina es un éster monometilado de un ácido dicarboxílico, el cual puede ser saponificado para ser transformado en un compuesto hidrosoluble. Esto se logra por medio de la formación de la sal de un hidróxido como por ejemplo el hidróxido de potasio (Tong, 1984).

Las semillas son colocadas en un tamiz y luego agitadas en una solución alcalina acuosa a una temperatura que no exceda los 70°C. Este proceso se repite hasta que la semilla quede con la menor cantidad de colorante posible (Tong, 1984).

El extracto alcalino se filtra para remover materiales insolubles y en esta etapa puede ser estandarizado y utilizado directamente como un colorante alimenticio. Alternativamente los pigmentos del extracto alcalino pueden ser concentrados por neutralización de la solución con un exceso de ácido. Esto da como resultado la precipitación del ácido dicarboxílico libre no disociado (norbixina) el cual es

insoluble en agua. Este precipitado es filtrado y lavado con agua antes de ser secado para dar finalmente un sólido con un contenido de 30 - 40% de pigmento total (Monge, 1967).

3. Extracción con un Solvente Orgánico

Este método se utiliza muy poco debido al alto riesgo que representa trabajar con solventes, aunque es el método para obtener cristales de bixina en su forma más pura. Los pigmentos del achiote pueden ser extraídos con un solvente permitido y adecuado como la acetona. Este extracto es filtrado y los pigmentos se cristalizan y lavan. Finalmente se remueve el solvente hasta alcanzar los niveles permitidos del mismo. Este método de extracción produce el extracto más concentrado que consiste mayormente de cristales de cis-bixina con mucho menor cantidad de trans-bixina y cis-norbixina. Estos cristales pueden ser disueltos o suspendidos en aceite o pueden utilizarse para producir una solución alcalina de colorante hidrosoluble (Hereld, 1995).

C. La Biosíntesis de Bixina

La bixina fue el primer cis-poliene que se encontró en la naturaleza y fue motivo de estudios estructurales y estereoquímicos, así como de una síntesis orgánica total. Al referirse al tema de biosíntesis de bixina es necesario resumir, de una manera general, la formación de los carotenoides y de una manera particular, la producción natural de apo-carotenoides (Isler, 1971).

La biosíntesis de carotenoides en el reino vegetal ha sido muy bien estudiada, y debido a que éstos son tetraterpenos, su biosíntesis sigue el patrón general de la mayoría de los terpenoides. La molécula inicial es la acetil coenzima A (Acetil CoA), la cual luego de una serie de pasos produce una molécula de 5 átomos de carbono, conocida como isopentenil pirofosfato (IPP). Esta molécula es considerada el precursor de los carotenoides y luego de varias condensaciones enzimáticas secuenciales forma otra molécula que contiene 20 átomos de carbono. A esta molécula se le conoce como tetraprenil pirofosfato (TPP), la cual luego produce los primeros carotenoides incoloros de 40 átomos de carbono (Figura No.2) (Isler, 1971).

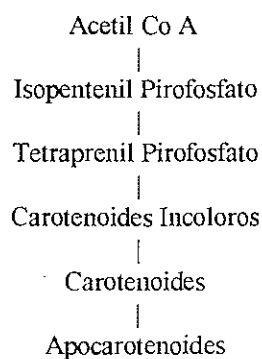


Figura No.2

Diagrama General de Biosíntesis de Carotenoides (Hereld, 1995).

Como se puede apreciar en la Figura No.2, se cree que los apo-carotenoides son producidos luego de la formación de los carotenoides incoloros. El término apo-carotenoide se refiere a aquellos carotenoides que tienen menos de 40 átomos de carbono en su estructura, resultado de la ruptura de ciertos dobles enlaces carbono-carbono. Esta ruptura de enlaces, que también se le conoce como degradación oxidativa, puede ocurrir en ambos extremos del esqueleto de 40 átomos de carbono. Por esta razón es que a la bixina se le reconoce como un diapo-carotenoide (Isler, 1971).

Un compuesto que también se ha encontrado en las semillas de achiote es el *trans*-geranilgeraniol. Este es importante, porque se sabe es un precursor de los carotenoides; de tal manera que esto confirma que la bixina es producida por la degradación oxidativa los carotenoides de 40 átomos de carbono. Esta suposición es bastante más clara si se compara la bixina con el isómero 9-cis del Beta-caroteno que se presenta en la naturaleza (Figura No.3) (Hereld, 1995).

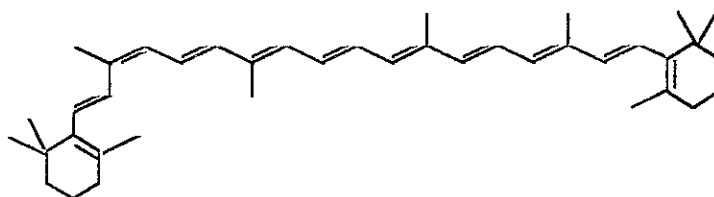


Figura No.3

Estructura del 9-cis Beta-caroteno (Hereld, 1995).

D. Reacciones Químicas e Interacciones de los Pigmentos de Achiote

Cuando se formulan extractos de achiote para la industria alimenticia es muy importante entender el comportamiento de los pigmentos, en particular los cambios químicos que pueden ocurrir y los efectos que éstos puedan causar. La composición exacta del extracto y por lo tanto su reactividad, dependerán del proceso de extracción utilizado, así como la temperatura, el período de calentamiento, el origen de la semilla y la edad del producto (Preston y Rickard, 1980).

El pigmento principal del achiote es la bixina, la cual posee la reactividad típica de los carotenoides. Además presenta dos características interesantes que se deben mencionar:

- i) la presencia de isómeros geométricos, siendo el 9'-cis el predominante.
- ii) la funcionalidad de los grupos terminales; en el caso de la bixina un éster metílico y un ácido carboxílico (Preston y Rickard, 1980).

El cromóforo de la bixina es el sistema conjugado de dobles enlaces carbono-carbono que le confiere el color particular a la misma. Desafortunadamente son estos dobles enlaces el origen de la susceptibilidad de la bixina al oxígeno, a lo que se debe la mayor pérdida de color como sucede con otros carotenoides (Preston y Rickard, 1980).

I. Hidrólisis de Bixina a Norbixina

Como se indicó anteriormente, la bixina es un éster monometilado de un ácido dicarboxílico y bajo condiciones alcalinas el grupo metilo puede ser saponificado, dando como resultado el ácido dicarboxílico libre llamado norbixina (Figura No.4). El prefijo "nor" se utiliza cuando átomos de carbono son removidos por procesos que no involucren la ruptura de un doble enlace carbono-carbono. De hecho la semillas de achiote poseen una mínima cantidad de cis-norbixina (Reith y Gielen, 1971).

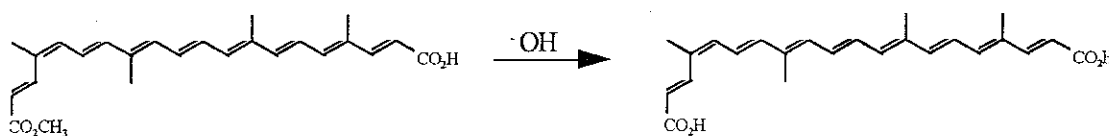


Figura No.4

Hidrólisis de Bixina a Norbixina (Hereld, 1995).

En presencia de un exceso de álcali el ácido dicarboxílico es disociado para formar así la sal del metal alcalino, usualmente potasio o sodio. Existen varias aplicaciones en las que se requiere que el colorante sea hidrosoluble, de tal forma que es así como se utiliza. A pesar de todo se pueden encontrar algunas dificultades, ya que en un ambiente ácido el carboxilato es reprotonado y produce el ácido dicarboxílico que es insoluble, por lo que precipita. Para prevenir que esto suceda se puede agregar un emulsificante y dependiendo del mismo se puede encontrar un método de producción para un extracto hidrosoluble que puede ser estable hasta un pH de 2 (Engelhardt, 1988).

Una reacción similar de la que se debe estar consciente es el intercambio del potasio por el calcio, presente en agua dura. Esto conduce también a la precipitación del pigmento, pero con el uso de un emulsificante se puede evitar la misma (Engelhardt, 1988).

2. Isomerización de Bixina

El aislamiento de una molécula más estable de bixina se llevó a cabo en 1913 y este descubrimiento condujo a estudios detallados de estereoquímica en el mismo. Las dos formas que se encontraron fueron denominadas lábil y estable, y se propuso que ambas poseían una relación geométrica cis-trans, como sucede con la reacción con yodo, la cual produce el cambio de la bixina estable a lábil. La estereoquímica real de las formas principales de la bixina fue establecida por medio de la técnica de espectroscopía de Protones de Resonancia Magnética Nuclear -N.M.R.- de sus siglas en inglés. Con esto se logró comprobar que el isómero 9'-cis y el todo-trans, representan la forma lábil y estable, respectivamente (Hereld, 1995).

Los dos factores principales que producen la isomerización, tanto durante la extracción como en las aplicaciones alimenticias son la luz y el calor. Estas usualmente conducen a la formación del isómero

trans más estable. Es importante hacer notar esto ya que este isómero posee una baja solubilidad y además existe un cambio en la longitud de onda de absorbencia del colorante, así como un cambio en la tonalidad del mismo (Reith y Gielen, 1971).

3. Termólisis de Bixina

Se sabe que cuando la cis-bixina es tratada térmicamente, produce un cambio de color de naranja a una tonalidad más amarilla. Este cambio en la coloración se debe a la formación de m-xileno lo que conduce a la formación de un polieno de 17 átomos de carbono. Este absorbe a longitudes de onda más bajas y consecuentemente es más amarillo que el material inicial (Figura No.5). La termólisis sólo ocurre con la cis-bixina; el isómero trans no presenta las mismas reacciones. Esto demuestra evidentemente que el enlace cis de la bixina está involucrado en este proceso (Francis, 1987).

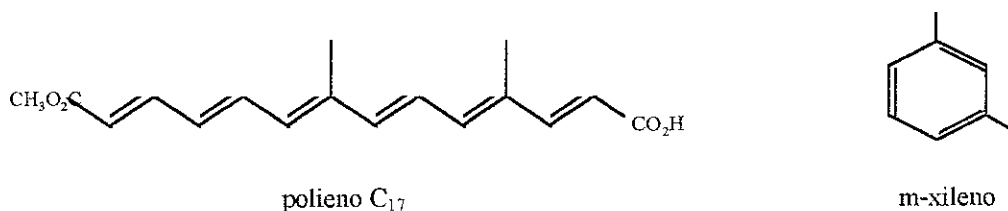


Figura No.5

Productos de Degradación Térmica del Colorante Bixina (Hereld, 1995).

El polieno de 17 átomos de carbono puede ser producido durante el proceso de extracción y principalmente sucede cuando se utiliza aceite caliente. Debido a que el polieno es amarillento y no naranja, la tonalidad de los extractos de achiote debe ser estandarizada (Francis, 1987). Esta molécula también posee un éster monometílico así como un ácido carboxílico como grupos terminales por lo que presentará reacciones similares a las de bixina en presencia de álcali (Isler, 1971).

4. Oxidación de Bixina y Norbixina

La reacción más importante de los extractos de achiote, particularmente en las aplicaciones, y común a muchos otros carotenoides, es la oxidación. Esto se puede notar cuando el pigmento es colocado en los alimentos y se obtiene como resultado la pérdida parcial o total del color del mismo, lo que es inaceptable (Isler, 1971).

La pérdida de color en presencia de oxígeno depende de la temperatura e intensidad de iluminación, así como de la disponibilidad de oxígeno. Si se exponen al aire, los pigmentos de achiote se descomponen lentamente, ya que se oxidan los sistemas conjugados de dobles enlaces que le dan el color característico al pigmento. Los productos pulverizados, que poseen un área de exposición mayor, son más susceptibles a la oxidación y algunas medidas deben ser tomadas para prevenir o limitar este efecto.

La exposición de los extractos a la luz actúa como un catalizador de la oxidación, acelerando la pérdida de color en presencia del oxígeno. En ausencia del oxígeno tiene un mínimo efecto; de tal forma que el grado de oxidación depende de la disponibilidad de oxígeno y exposición a la luz (Isler, 1971).

La incorporación de antioxidantes puede potenciar la estabilidad oxidativa, como es el caso del ácido ascórbico, pero debe ser utilizado necesariamente en productos o extracto acuosos (Chao, 1991).

Otros factores que deben ser considerados para evitar o limitar la oxidación son:

i) la temperatura de almacenaje; las altas temperaturas tienden a acelerar la oxidación. Esto es importante cuando se trabaja con extractos concentrados, por lo que el almacenaje en frío es beneficioso y recomendable.

ii) la interacción con iones metálicos en presencia o ausencia de aceites puede catalizar la degradación carotenoide. En el caso de sistemas de base oleosa, la ruta usual de pérdida de color es por medio de la oxidación de aceites insaturados.

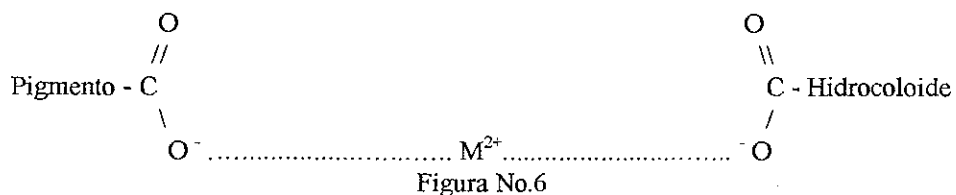
iii) la exclusión de aire donde sea posible es obviamente efectiva para prevenir la oxidación.

5. Interacción con otros componentes de los alimentos

Este tipo de reacciones son las más difíciles de predecir y por lo mismo controlarlas, debido a la naturaleza compleja de los sistemas alimenticios. De todas maneras bajo algunas circunstancias la interacción con un componente de un alimento en particular puede tener un efecto benéfico en términos de estabilidad (Hereld, 1995). Un ejemplo de esto es la coloración del queso, en donde la norbixina se une a la proteína (caseína), lo que previene sangrado del color. Esta interacción también debe ser considerada en producto con base de harina, donde la interacción con el gluten puede afectar la apariencia física del color final del producto (Hereld, 1995).

Como se indicó anteriormente, la acidez de los alimentos puede causar la precipitación de la norbixina insoluble, a pesar de que algunos productos son formulados especialmente para prevenir este efecto. La estabilidad hacia ambientes ácidos se puede lograr por medio de la formulación de extractos con un emulsificante. Son las propiedades particulares y la concentración del emulsificante las que dominarán el nivel de estabilidad logrado. De tal forma que una baja concentración de emulsificante evita la precipitación, pero ocurre un cambio de color lo que da como resultado un efecto batocrómico en el espectro de absorción (Hereld, 1995).

Otra interacción importante puede ocurrir con los compuestos que poseen grupos carboxilo, particularmente hidrocoloides, como lo es la pectina. Debido a que la norbixina contiene un grupo carboxilo, podría ocurrir una "reacción de enlace" entre el pigmento y el hidrocoloide, vía una reacción con un ión metálico divalente (Figura No. 6). Debido a que el hidrocoloide posee una larga infraestructura, esto provee protección de un daño potencial para el pigmento como la luz y el dióxido de sulfuro, como es el caso en la preparación de bebidas suaves que tienen turbidez debido a las gomas vegetales utilizadas para las mismas (Isler, 1971).



Reacción de Enlace entre Pigmento e Hidrocoloide (Hereld, 1995).

E. Aplicación de Colorantes de Achiote

Históricamente, el achiote ha sido utilizado para muchos propósitos: los indígenas del Brasil lo usaban en su cerámica y como repelente de insectos aplicándose en la piel. En las Filipinas, el achiote ha sido utilizado como un ingrediente en la cera de pisos, y aceites para madera y zapatos, barniz de uñas, laca de bronce y aceite de pelo. Además es utilizado como una especia o condimento (Ingram y Francis, 1969).

La producción comercial de extractos de achiote para la industria alimenticia comenzó en Estados Unidos y Europa y en 1870 fue utilizada inicialmente en mantequilla y queso, de aquí que se derivaran los nombres de “color mantequilla” o “color queso”. Otras aplicaciones surgieron en los años 60 debido a que algunos colorantes sintéticos fueron prohibidos (Ingram y Francis, 1969).

El uso de los colorantes de achiote se ha visto incrementado debido a la reacción de los consumidores en relación a los colorantes “azo” y una tendencia general hacia el uso de colorantes naturales (Hereld, 1995). Debido a que el achiote se presenta tanto de forma hidrosoluble como soluble en aceite, es muy versátil y puede ser utilizado en una gran gama de productos alimenticios. Las aplicaciones principales varían en cada país, ya que depende de sus alimentos y legislaciones (Francis, 1993). Las aplicaciones generales donde el achiote puede ser utilizado son postres, salsas, helados, bebidas y sopas instantáneas, cereales y repostería (Hereld, 1995).

1. Extracto Soluble en Aceite

Este tipo de pigmento consiste principalmente de bixina soluble en aceite, ya sea disuelta o suspendida en aceite vegetal comestible como acarreador. Tiende a ser utilizado en alimentos con alto contenido de grasas, debido a que el color permanece en la fase apolar del alimento. El contenido de bixina en estas preparaciones varía de 0.2% hasta 5% en una suspensión oleosa (Preston y Rickard, 1980).

La composición exacta del pigmento depende del proceso de manufactura ya que, como se indicó anteriormente, si el producto es sometido a temperatura, la formación del polieno amarillo de 17 átomos de carbono puede resultar en cambio de tonalidad. Esto es importante cuando se trabaja con grasas amarillas, donde una coloración especial es requerida (Preston y Rickard, 1980).

2. Extracto Soluble en Agua

Estos extractos no son más que norbixina disociada en una solución alcalina, usualmente hidróxido de potasio o sodio. De esta manera, la solución produce un color naranja-amarillo que en soluciones acuosas es transparente. Estos extractos también pueden encontrarse en polvo pero para que tengan la misma funcionalidad del extracto líquido deben disolverse en soluciones alcalinas (Tong, 1984).

Las soluciones estándar de norbixina no resisten ambientes ácidos y se ven afectadas por iones metálicos como el calcio. A pesar de esto pueden ser utilizados en alimentos ácidos pero depende de la acidez, matriz del alimento y método de adición. Por ejemplo una jalea puede ser coloreada con achiote si el extracto es adicionado antes que el ácido cítrico, ya que de esta manera la matriz gelatinosa protege el colorante (Hereld, 1995).

La aplicación más importante de un extracto hidrosoluble es en la coloración de quesos. En estos casos, como se indicó anteriormente, la norbixina se une a la caseína en la leche y es así como se estabiliza el pigmento, dándole una coloración naranja intensa al queso, que lo previene el sangrado del colorante (Hernández *et al.*, 1985).

III. JUSTIFICACION

En la actualidad el uso de productos y colorantes naturales se ha visto incrementado en relación a los sintéticos, debido a la fuente vegetal de la cual provienen y a que los colorantes artificiales actualmente utilizados, contienen sustancias dañinas al organismo, tales como las sales de bencen diazonio mejor conocidas como compuestos "azo".

Existen procedimientos de extracción de norbixina, pero debido a la alta confidencialidad de los mismos, no se conocen estudios de optimización. Lo que sí se conoce son las bases de la extracción, pero sin determinar los puntos (parámetros) óptimos de extracción se obtiene un producto de baja pureza, que presenta problemas de solubilización, turbidez, y pobre tinción.

Debido a lo anteriormente indicado, la determinación de los parámetros para la optimización de la extracción del colorante del achiote que se pretende en este estudio es relevante, puesto que es en base a éstos que se logra finalmente un extracto, ya sea líquido o sólido, con las características deseables para su comercialización y uso.

Así pues, correlacionando los distintos parámetros de: concentración de álcali, temperatura, pH de precipitación, relación semilla-volumen y tiempo de sedimentación, se espera encontrar la combinación ideal de éstos para lograr una extracción óptima, la cual será evaluada por medio de la determinación de la pureza del producto final obtenido en forma sólida.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivos Generales:

1. Optimizar los parámetros para la extracción alcalina acuosa del colorante de achiote, variando los mismos, hasta lograr encontrar una combinación ideal.

B. Objetivos Específicos:

1. Establecer una relación entre los parámetros: concentración de álcali, temperatura de lavado, dilución de lavado, acidez en la precipitación y tiempo de sedimentación, para determinar el punto óptimo de extracción (rendimiento máximo de bixina).
2. Demostrar, por medio de la pureza del producto, determinada con espectroscopía visible, que existe una relación óptima de los parámetros.
3. Determinar estadísticamente la mejor combinación para lograr una extracción alcalina acuosa del colorante que lo haga competitivo comercialmente.
4. Establecer si existen diferencias entre semillas de alto y bajo contenido de bixina bajo las mismas condiciones de experimentación.
5. Evaluar si los parámetros de extracción con rendimiento máximo son económicamente más atractivos que las condiciones actuales de extracción.

V. METODOLOGIA

A. Muestreo

Las semillas de achiote analizadas en este trabajo, provienen del área de Carchá, Departamento de Alta Verapaz. Las semillas fueron clasificadas como semilla “alta” y semilla “baja”. El criterio empleado para la clasificación de las semillas como altas o bajas fue establecido por medio de la determinación del contenido de norbixina así como la “edad” de las semillas; alta -recién cosechada- y baja -1 año más de almacenaje-.

Se trabajó con semillas tomadas aleatoriamente de un saco conteniendo semilla alta y otro con semilla baja, las cuales provienen del productor previamente secadas. La humedad promedio de las semillas almacenadas a una temperatura de 25°C varía de 4-5%.

B. Análisis

1. Análisis del contenido de norbixina en la semilla:

Inmediatamente después de seleccionar las semillas, se procedió al análisis y el procedimiento es el siguiente:

- a) Pesar 25 gramos de semilla.
- b) Hervir la semilla con una solución de jabón de aceite de castor.
- c) Enfriamiento.
- d) Hacer diluciones 1:100 (v:v) y 2:100 (v:v).
- e) Obtener la lectura de absorbencia a 481nm en un espectrofotómetro de haz simple, utilizando una celda de vidrio óptico de 1 cm de paso.

Para la semilla de alto contenido de bixina un intervalo de absorbencia entre 0.474 y 0.502, corresponde a una concentración de bixina entre 3.3% y 3.5%. De la misma manera para la semilla de bajo contenido de bixina un intervalo de absorbencia entre 0.258 y 0.287 corresponde a una concentración de bixina entre 1.8% y 2.0%.

2. Obtención del colorante en polvo:

- a) Pesar 300 gramos de semilla.
- b) Lavado con solución alcalina acuosa.
- c) Tamizado del extracto líquido.
- d) Precipitación con ácido sulfúrico.
- e) Filtración al vacío.
- f) Secado del residuo.
- g) Trituración del sólido en mortero.

3. Análisis del contenido de norbixina en el colorante sólido en polvo:

- a) Pesar 1 gramo de muestra.
- b) Agregar agua e hidróxido de potasio al 45%.
- c) Calentamiento a 90°C.
- d) Enfriamiento.
- e) Hacer diluciones 4:100 (v:v) y 1:100 (v:v).
- f) Obtener la lectura de absorbencia a 481nm en un espectrofotómetro de haz simple, utilizando una celda de vidrio óptico de 1 cm de paso.

VI. HIPOTESIS

Es posible obtener un conjunto de parámetros óptimos para extraer el colorante bixina de la semilla de achiote por medio del procedimiento de solubilización en solución alcalina.

VII. RESULTADOS

Este estudio demuestra que existe un conjunto óptimo de parámetros en la extracción del colorante de achiote (*Bixa orellana*). Los datos obtenidos fueron analizados por ANDEVA y los resultados para los efectos promedio de las variables fueron los siguientes: la pureza de norbixina depende del tipo de semilla ($p < 0.001$), de la concentración de hidróxido de potasio ($p < 0.001$), de la acidez de precipitación ($p < 0.003$), de las horas de sedimentación ($p < 0.001$) y de la temperatura ($p < 0.001$), pero no depende de la dilución de extracción ($p = 0.497$).

A. Efecto del tipo de semilla

Se utilizaron dos tipos de semilla, alta en bixina y baja en bixina. Cada tipo se analizó 5 veces, observándose claramente que existe diferencia en la cantidad de pigmento presente en las mismas. Por lo tanto se observa un efecto del tipo de semilla sobre la pureza de norbixina del extracto final. La semilla alta producirá siempre un extracto con mayor cantidad de norbixina que la semilla baja ($p < 0.0001$) (Figura No.7).

B. Efecto de la dilución de extracción

La dilución de extracción se varió para determinar si con un mayor volumen se lograba remover más pigmento de la semilla. Existe diferencia significativa entre semilla de alto y bajo contenido de bixina (Figura No.8), pero estadísticamente no existe un efecto de la dilución sobre la concentración del pigmento ($p = 0.497$) (Figura No.9).

C. Efecto de la concentración de hidróxido de potasio

La extracción del colorante involucra dos lavados con hidróxido de potasio, siendo el primero siempre más concentrado que el segundo a manera de dejar decolorada la semilla. Existe diferencia significativa entre la semilla de alto y bajo contenido de bixina (Figura No.10). Se observó un efecto de la concentración únicamente sobre la semilla de bajo contenido de bixina ($p < 0.0001$) (Figura No.11).

Figura No.7

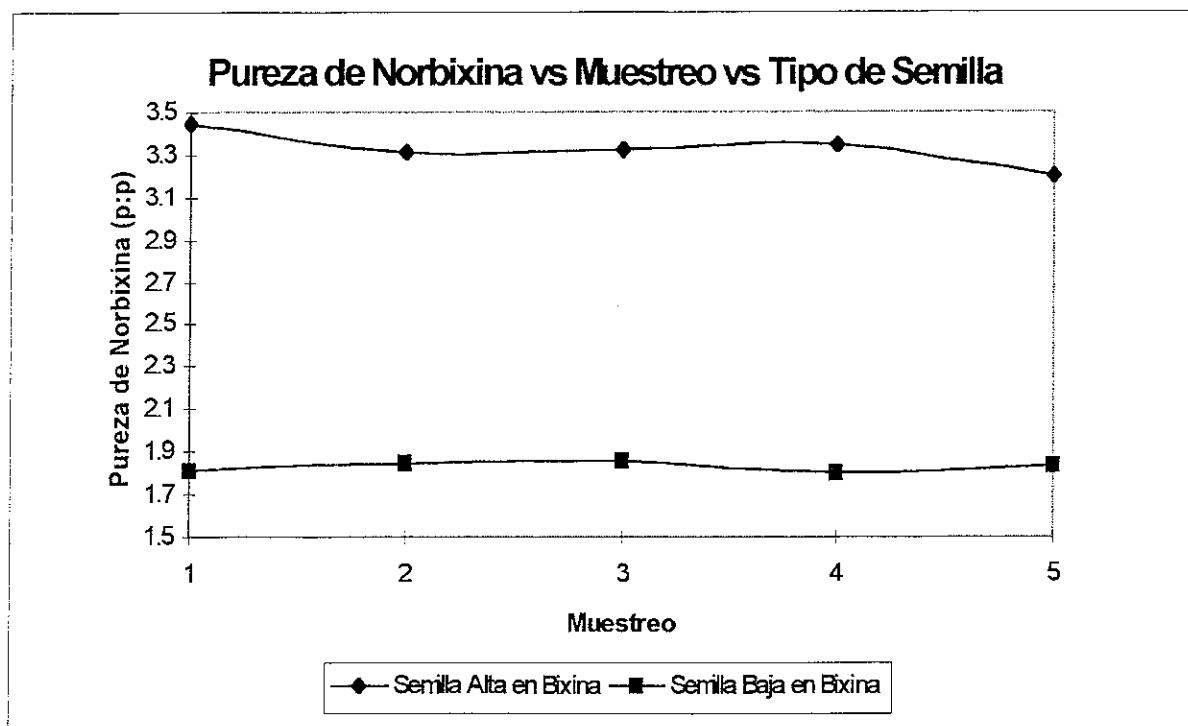


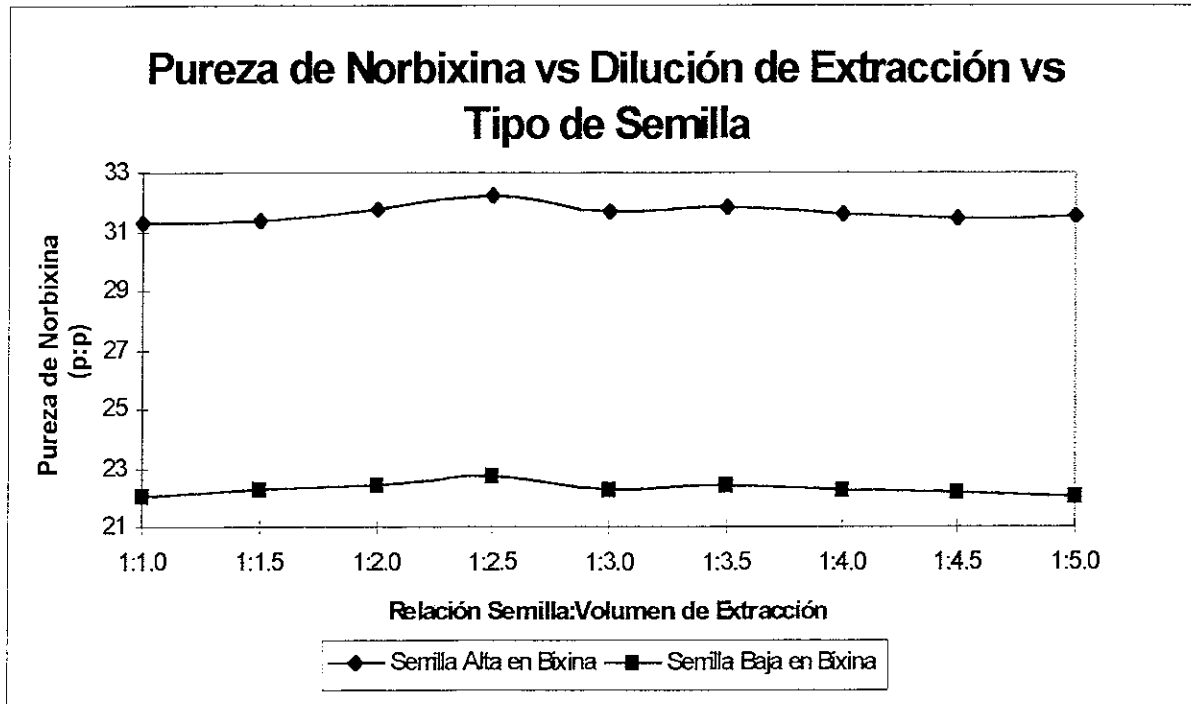
Figura No.8

Figura No.9

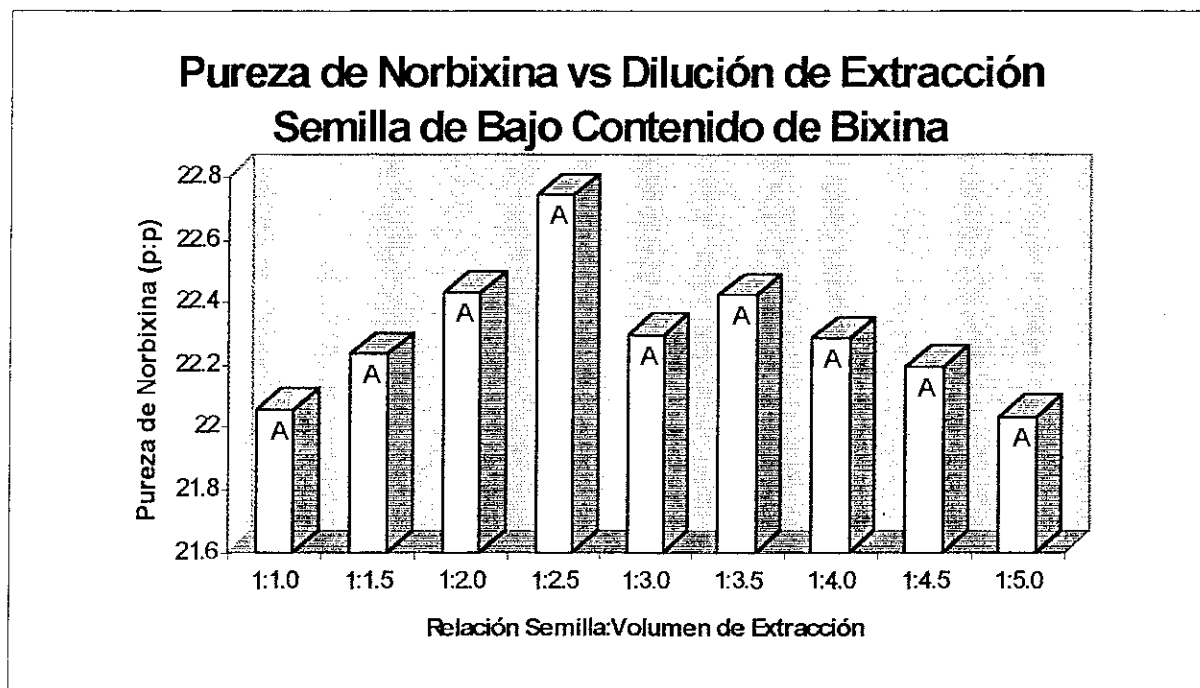
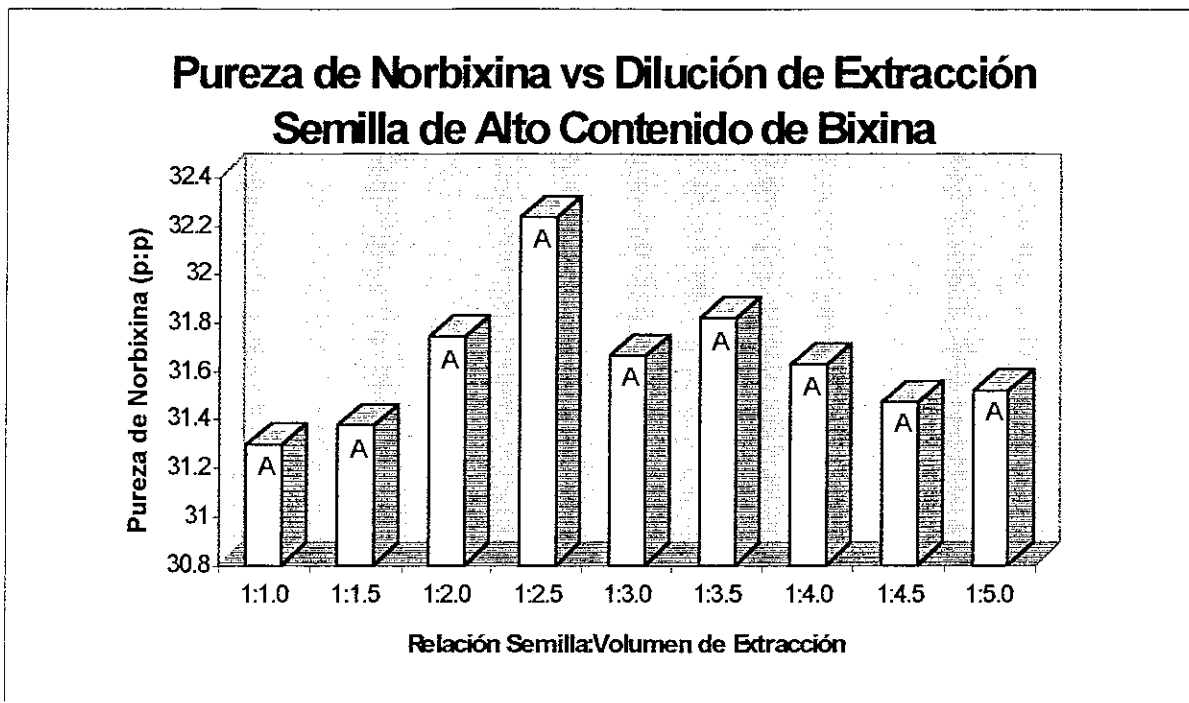


Figura No.10

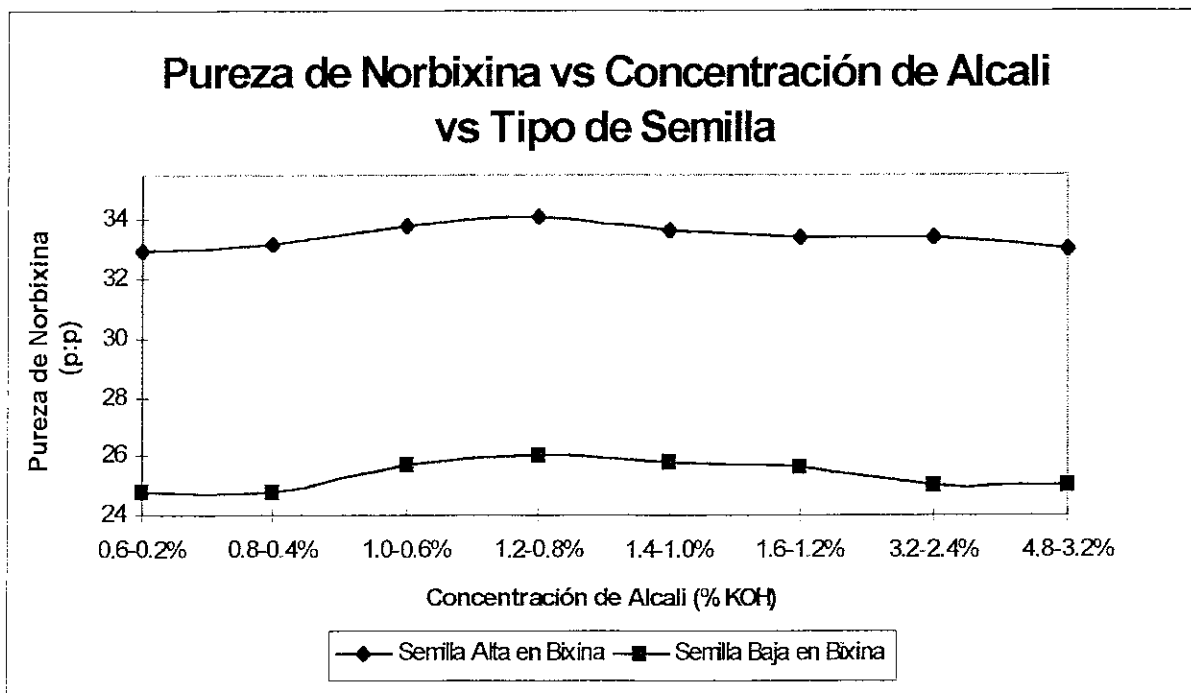
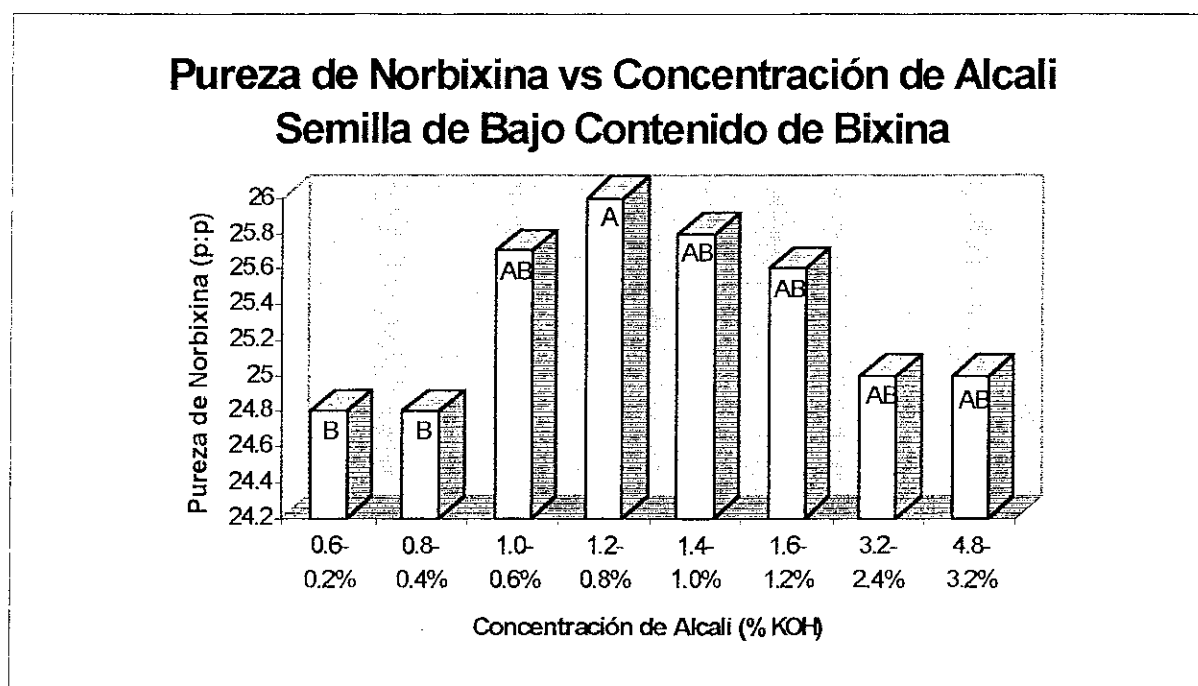
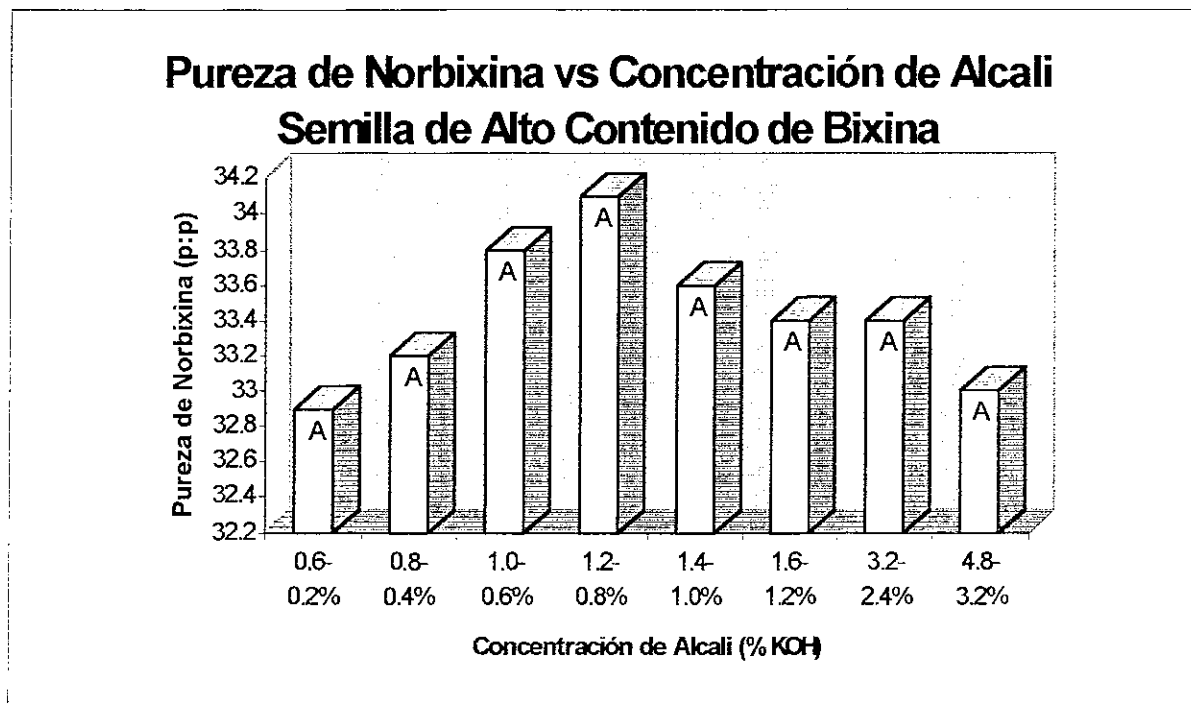


Figura No.11



D. Efecto de la acidez de precipitación

La acidez de precipitación se varió para determinar si a un pH alto se lograba obtener un mejor producto final, y reducir de esta manera el consumo de ácido sulfúrico. Se varió la acidez dentro de un intervalo donde se nota a simple vista que se produce la precipitación del pigmento (1.50 - 2.15). Existe una diferencia significativa entre los tipos de semilla utilizados (Figura No.12). Se puede observar un efecto de la acidez sobre la pureza del extracto final solamente para la semilla de alto contenido de bixina ($p < 0.0001$) (Figura No.13).

E. Efecto de las horas de sedimentación

A manera de reducir el tiempo de sedimentación necesario para la precipitación del pigmento y posterior filtración, se varió el mismo para determinar si se observaba un efecto sobre la pureza del extracto. Se determinó una diferencia significativa entre los tipos de semilla utilizados (Figura No.14). Existe un efecto de las horas de sedimentación sobre la pureza final de extracto ($p < 0.0001$), tanto para la semilla de alto como para la semilla de bajo contenido de bixina (Figura No.15).

F. Efecto de la temperatura de extracción

La temperatura es un factor importante a considerar, ya que el proceso de extracción es una hidrólisis alcalina, la cual necesita de calor para llevarse a cabo. Se observó una diferencia significativa entre semilla de alto y bajo contenido de bixina (Figura No.16). Asimismo se observó un efecto de la temperatura sobre la pureza de norbixina del extracto final ($p < 0.0001$) para ambos tipos de semilla (Figura No.17).

Figura No.12

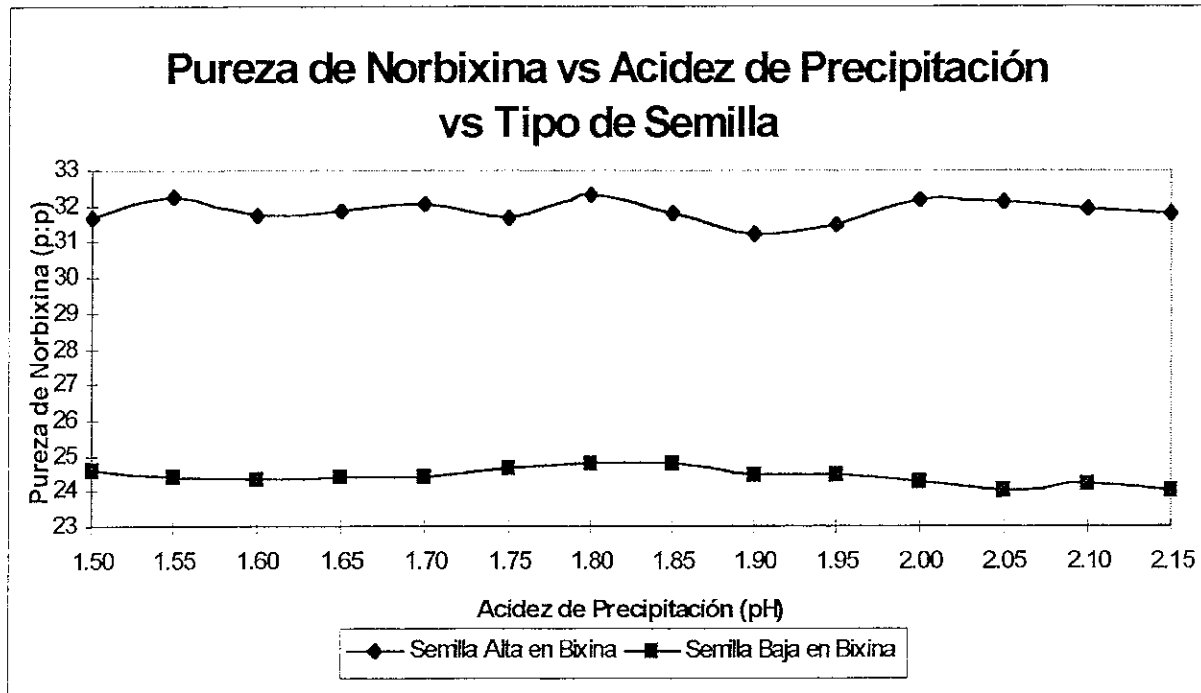


Figura No.13

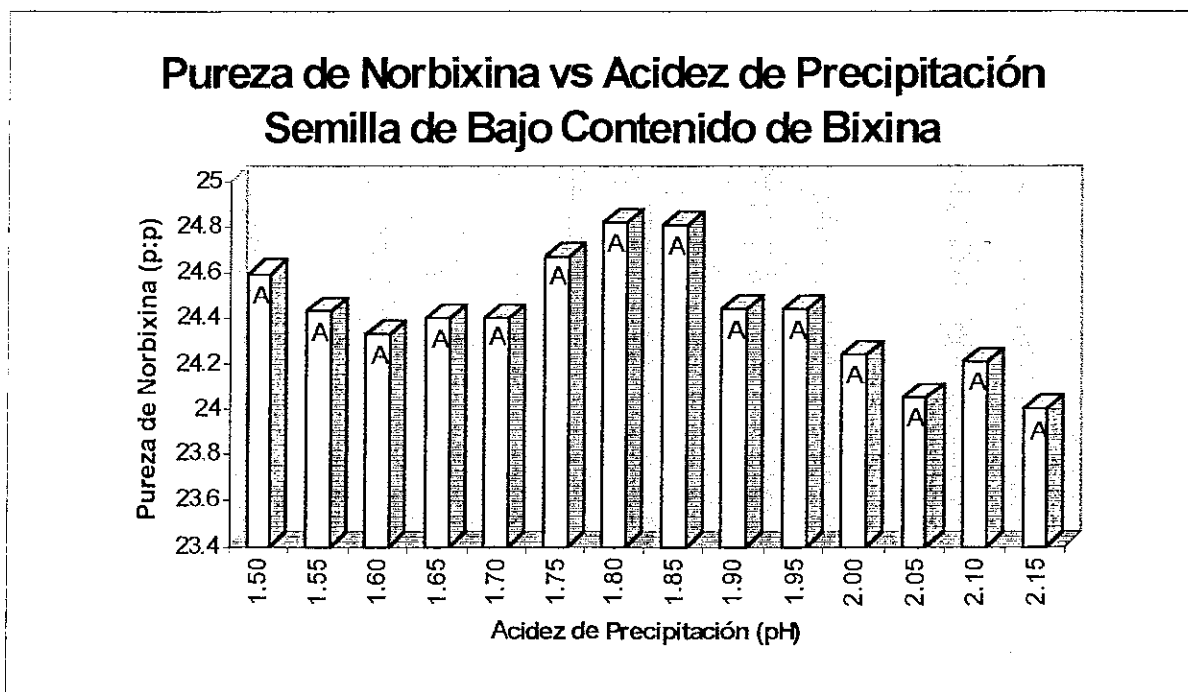
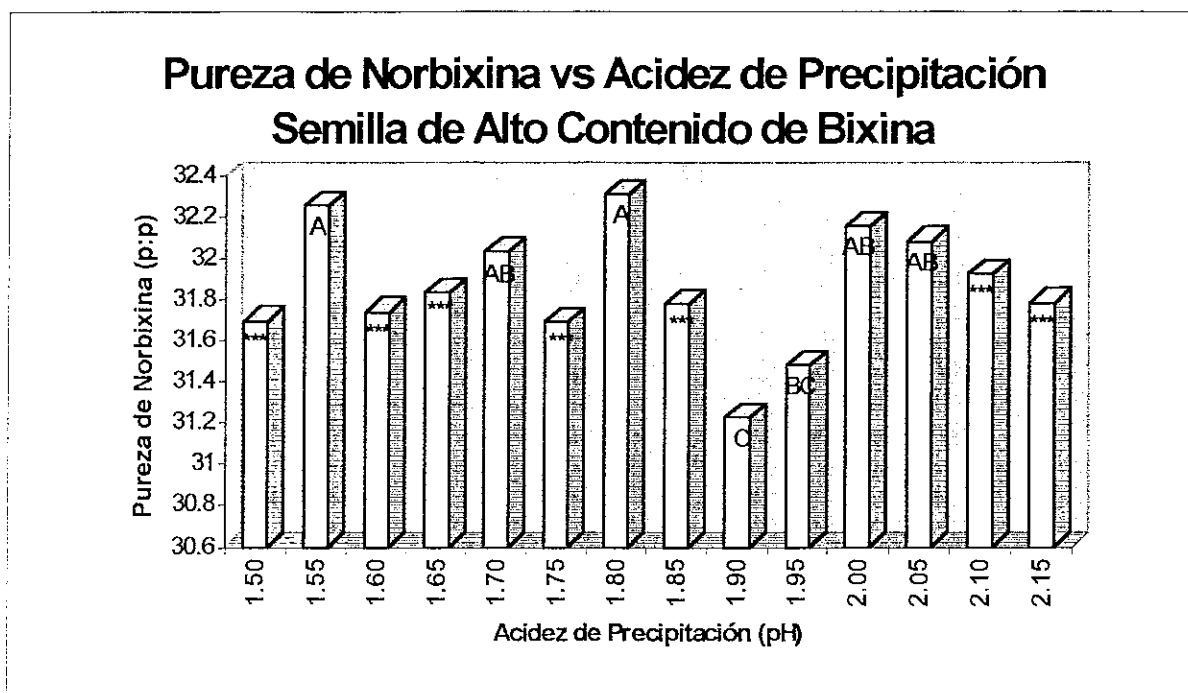


Figura No.14

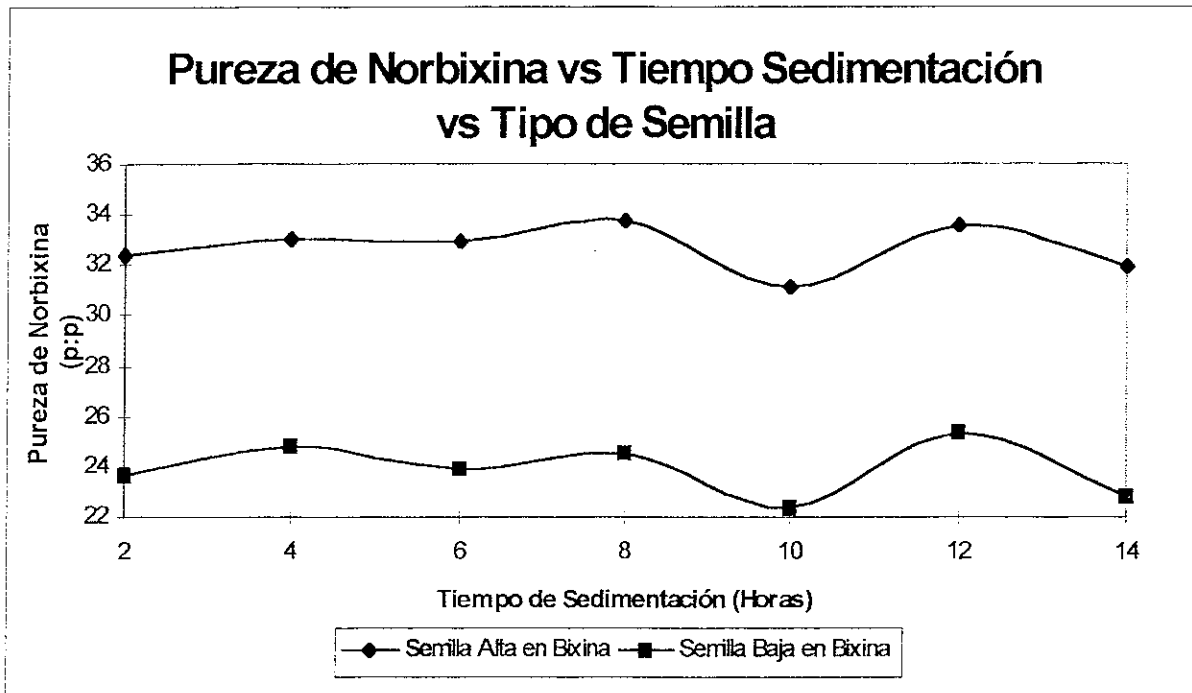
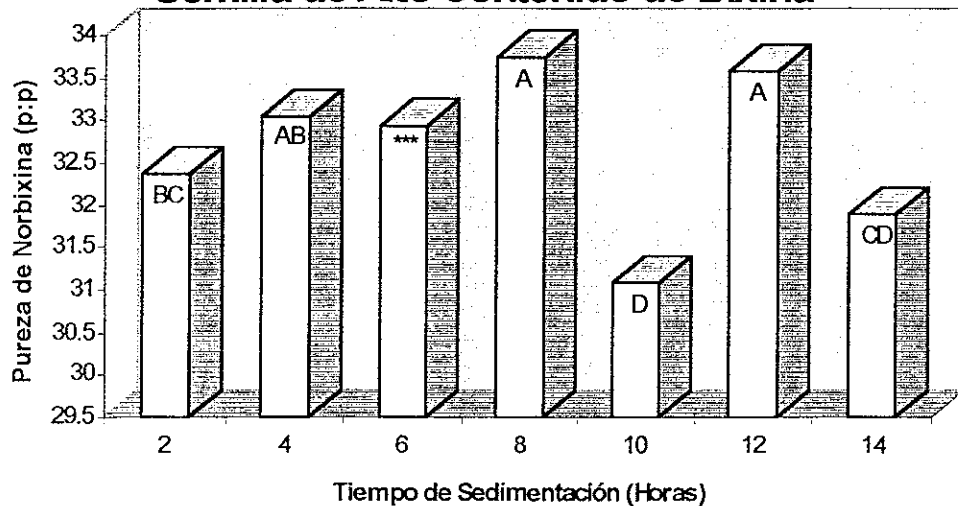


Figura No.15

Pureza de Norbixina vs Tiempo Sedimentación Semilla de Alto Contenido de Bixina



Pureza de Norbixina vs Tiempo Sedimentación Semilla de Bajo Contenido de Bixina

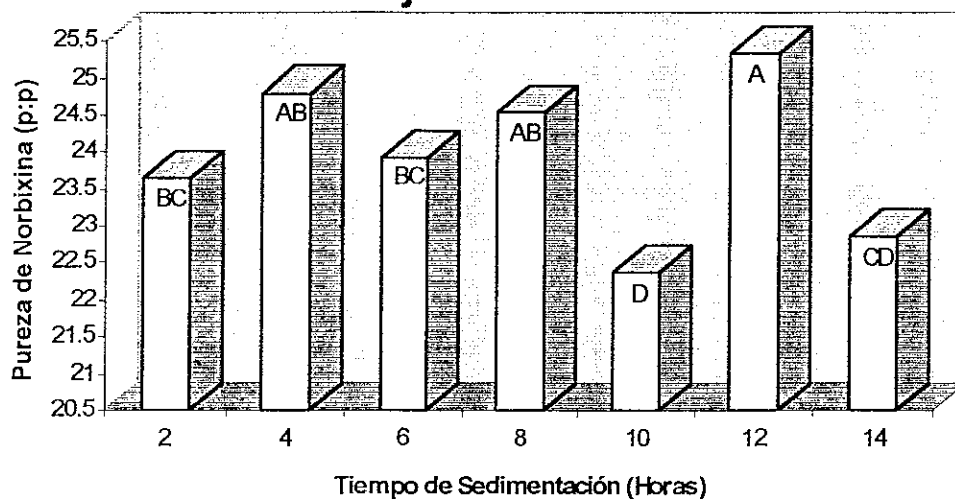


Figura No.16

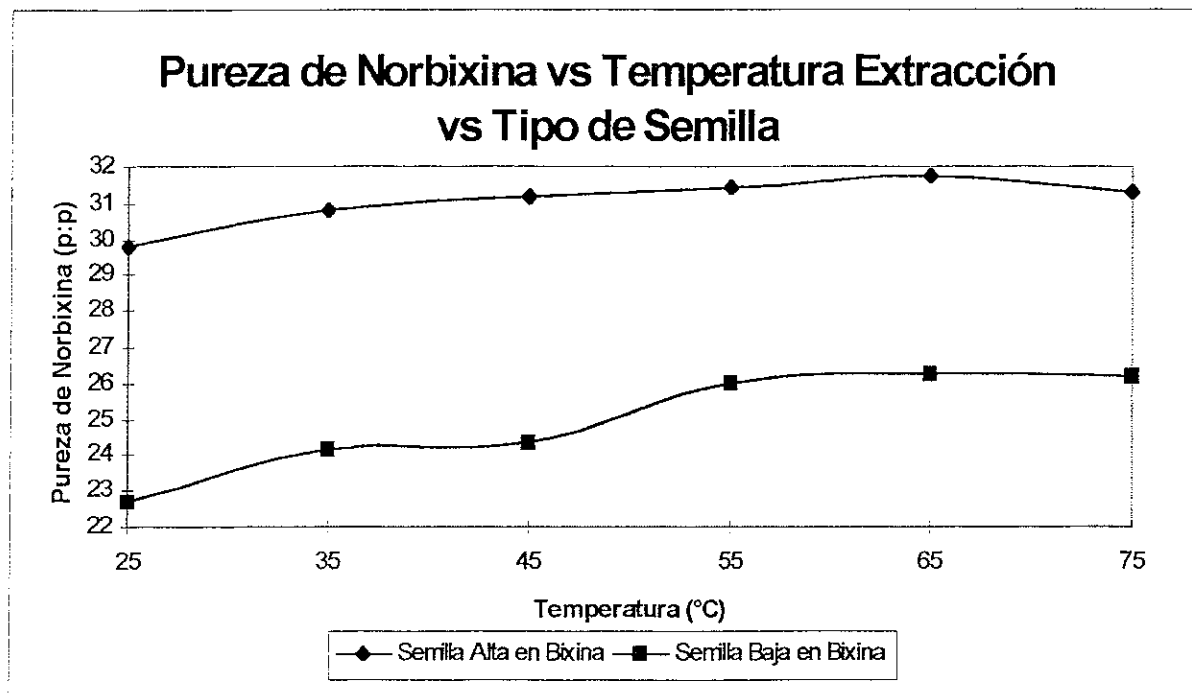
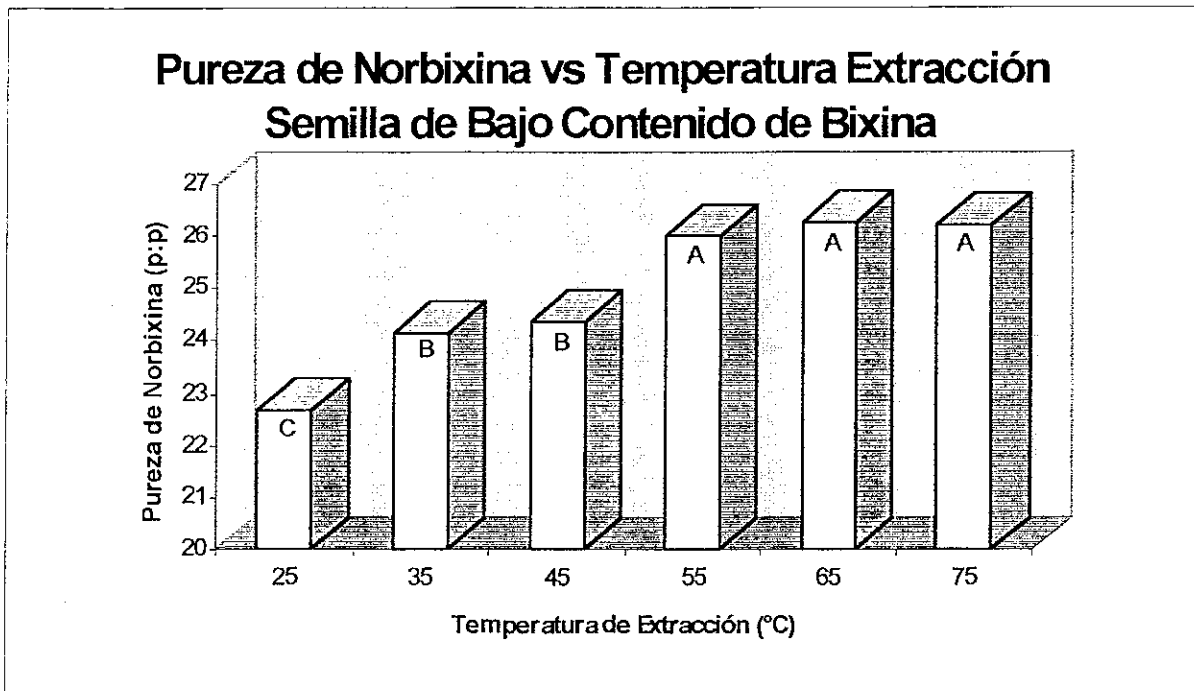
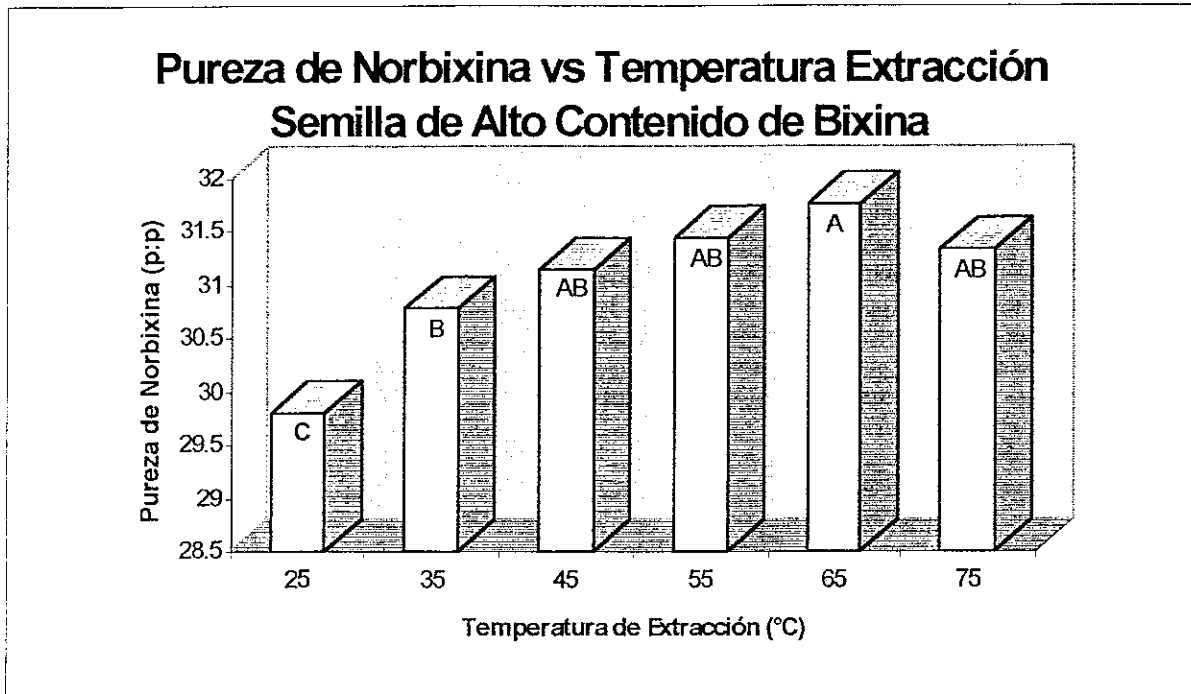


Figura No.17

VIII. DISCUSION

Los resultados demuestran claramente que el rendimiento de norbixina depende del tipo de semilla que se utiliza, ya que el porcentaje de bixina es mayor en semilla fresca o “alta”, pues se obtiene un extracto con 32% de pureza mientras que con semilla “baja” se obtiene un 22% de pureza. Esta diferencia es altamente significativa ($p < 0.0001$). El pigmento del achiote tiende a oxidarse durante el almacenaje de las mismas. Esta oxidación produce la pérdida de color de la molécula de bixina presente en las semillas, ocasionando de esta manera que la pureza de norbixina en el extracto final sea baja en semilla que no se procesa pronto.

La dilución de extracción es un parámetro que no afecta significativamente la pureza del extracto final ($p = 0.497$), ya que no se observa un aumento drástico de la pureza en el mismo, aunque se observa un aumento muy sutil en la Figura No.9 para ambos tipos de semilla, logrando únicamente aumentar el volumen de extracto, lo cual no es deseable cuando se trabaja a niveles industriales, por razones de espacio, tiempo y capacidad de equipo.

La concentración de hidróxido de potasio afecta significativamente ($p < 0.0001$) la pureza de norbixina del extracto final. El hidróxido de potasio, por medio de una hidrólisis alcalina (saponificación), convierte al pigmento presente en las semillas (bixina), en el componente principal del extracto final (norbixina). Se intentó descubrir, si a mayor concentración de álcali aumentaría el contenido de norbixina, pero no sucedió así. Esto se debió a que al concentrar gradualmente la solución de extracción se saturó el medio con hidróxido de potasio, lo que dió como resultado la cristalización del mismo en el producto final. Esto se comprobó por medio de la solubilización del polvo en agua, y posterior medición del pH.

Se observó claramente un efecto de la concentración de hidróxido de potasio sobre el rendimiento de la semilla de bajo contenido de bixina (Figura No.11) para una concentración de hidróxido de potasio de 1.2% y 0.8%. Para la semilla de alto contenido de bixina no se logra diferenciar entre tres distintas

concentraciones de hidróxido de potasio, pero a largo plazo podría ser que la concentración con rendimiento máximo fuera 1.2% y 0.8% ó 1.0% y 0.6%, para obtener productos con alta pureza.

La acidez de precipitación afecta de manera significativa la pureza del extracto final ($p=0.003$), aunque se observó un raro comportamiento del pigmento respecto a la pureza (Figura No.13), principalmente para la semilla de alto contenido de bixina. La molécula de norbixina, por sus componentes, debe tener un solo punto de precipitación, por lo que este comportamiento sugiere dos hipótesis que faltaría comprobar; (a) los tres puntos de acidez donde aumenta el rendimiento de producto sólido, 1.55, 1.80 y 2.00 se deben a la precipitación de tres pigmentos de tipo carotenoide, que absorben a la misma longitud de onda que la norbixina, o (b) los tres puntos de acidez donde aumenta la pureza, representan tres puntos óptimos de precipitación del pigmento. Dado que es difícil que un compuesto tenga más de un pH de precipitación, la hipótesis (a) es la más probable y puede verificarse analizando la composición de los tres extractos por medio de un análisis infrarojo (IR) u otra técnica que sugiera diferencias en la identidad de los posibles pigmentos.

El comportamiento del pigmento respecto a la pureza de norbixina del extracto final, es menos marcado en la semilla de bajo contenido de bixina, debido a que posiblemente por degradación, los pigmentos se han convertido en uno solo, es decir con la misma estructura y composición, y por lo tanto se observa un solo punto de precipitación. Estas hipótesis puede ser comprobadas con la ayuda de un análisis infrarojo (IR).

Las horas de sedimentación afectan significativamente el contenido de norbixina del producto final ($p<0.0001$) aunque nuevamente se observó un comportamiento muy raro en ambos tipos de semilla. Esto podría sugerir de nuevo la hipótesis de los tres diferentes compuestos, mencionada anteriormente. No se cuenta con una explicación del porqué de este comportamiento, solamente que el menor porcentaje de pureza a las 10 horas podría representar un paso de transición entre degradación y formación de dos compuestos.

La temperatura de extracción mostró un efecto altamente significativo para ambos tipos de semilla ($p < 0.0001$). La extracción del colorante es una hidrólisis alcalina y por lo tanto necesita de calor para ser llevada a cabo. Se observan tres temperaturas para las cuales la pureza del extracto es buena, por lo que el rango de 55°C a 65°C, que incluye las condiciones actuales, es óptimo para la extracción del colorante.

A. Análisis “Costo-Beneficio”

A nivel industrial es muy importante hacer este tipo de investigaciones, ya que los resultados ayudan a ajustar procesos ya existentes e implementarlos si se carece de ellos. Asimismo, los costos de producción en una planta industrial deben ser controlados para sacar la mayor utilidad del producto que se fabrica. A continuación se presenta una comparación entre los puntos que actualmente se utilizan en el proceso para cada parámetro de estudio, con los resultados obtenidos, así como una justificación de cómo deben ser interpretados los resultados obtenidos para extrapolarlos a nivel industrial.

El tipo de semilla que se utilice debe ser lo más reciente posible, para obtener así productos de la más alta pureza. Actualmente por cuestiones de almacenaje se ha perdido una cantidad considerable del pigmento presente en las semillas. Puesto que el costo de extracción es aproximadamente el mismo, procesar semilla de bajo contenido de bixina resulta un 31% más caro que procesar semilla de alto contenido. Dado que las propiedades pigmentantes dependen de la pureza de norbixina del extracto, la semilla de alto contenido de bixina dará como resultado un producto de mejor calidad y con un mayor atractivo comercial.

La dilución de extracción, no afecta la pureza del extracto, aunque se podría interpretar que la dilución 1:2.5 sea la óptima, por el pequeño aumento en pureza de norbixina que se observa en la Figura No.9 para ambos tipos de semilla. Actualmente se utiliza la dilución 1:1 y por razones de espacio no se puede aumentar a la dilución “óptima” porque se reduciría la capacidad de proceso de la planta y la utilidad que se obtendría al subir aproximadamente un punto de porcentaje de pureza no justifica el aumento en el volumen de extracción. En este caso, es mejor procesar un mayor número de lotes por día y aprovechar así que la semilla es reciente y no permitir su degradación.

La concentración de hidróxido de potasio que se utiliza actualmente es 1.6% y 1.2%. Esta es alta para la concentración que podría ser óptima, la cual es 1.2% y 0.8%. Este resultado es muy importante porque representa una reducción de costos, por lo que la utilidad que se obtendría de la venta sería mayor.

La acidez de precipitación, se comportó de una manera extraña, pero aún así el pH de precipitación es 1.80. Esto indica que el proceso actual está bien, pero se debe hacer un análisis infrarrojo (IR) para comprobar si el compuesto que precipita en este punto es norbixina y no otro posible derivado de tipo carotenoide.

Las horas de sedimentación al igual que la dilución de extracción son importantes, ya que en una planta industrial el tiempo vale dinero, por lo que mientras menos tiempo se espere, es mejor. Actualmente se deja sedimentar 8 horas, ya que la precipitación se realiza al final del día para dejar que sedimente durante la noche. De nuevo se debe realizar un análisis infrarrojo (IR) para comprobar que el producto final contenga en su mayoría norbixina y no otro derivado del achiote, que fue una de las hipótesis planteadas con anterioridad.

En cuanto a temperatura respecta, cualquiera de las tres (55°C, 65°C y 75°C) llevaría a cabo la saponificación, pero el costo de elevar diez o veinte grados, representa tiempo y consumo de energía. Por lo que mientras más baja sea la temperatura, menor será el costo y más rápido se llevará a cabo la hidrólisis.

IX. CONCLUSIONES

A. El contenido de norbixina en el extracto final, es mayor si el pigmento se extrae de semillas con alto contenido de bixina, es decir, recién cosechadas (no almacenadas).

B. La dilución de extracción no afecta la pureza del extracto final, por lo que por razones de costo se debe trabajar con la menor dilución posible.

C. La concentración óptima de hidróxido de potasio para maximizar la extracción del colorante de las semillas es 1.2% para el primer lavado y 0.8% para el segundo lavado. Este resultado implica reducción de costos actuales de extracción, ya que la concentración de hidróxido de potasio empleada hasta ahora era 1.6% y 1.2%, respectivamente.

D. La acidez de precipitación actual (pH 1.80) está situada en el intervalo óptimo (pH 1.55 a pH 2.00) para la extracción de norbixina.

E. El tiempo actual de sedimentación (8 horas) se encuentra dentro del intervalo óptimo (8 a 12 horas) para la extracción de norbixina.

F. Se determinó que la temperatura óptima de extracción del colorante de achiote oscila entre 55°C y 75°C, por lo que por razones de costo, aún la menor temperatura producirá un extracto final con buena pureza.

G. El análisis costo-beneficio mostró que el único parámetro que necesita ser modificado en el actual procedimiento de extracción, es la concentración de hidróxido de potasio.

X. RECOMENDACIONES

- A. Realizar el presente estudio con semillas de una sola especie de achiote, para que los resultados que se obtengan sean más representativos y estables respecto a cada parámetro de estudio.

- B. Utilizar el rendimiento y no sólo la pureza de norbixina como parámetro de comparación, para obtener resultados que respondan directamente a un análisis de costos.

- C. Estudiar otros parámetros de extracción como el porcentaje de grasa en el extracto final y la humedad de las semillas utilizadas.

- D. Realizar este tipo de extracción, utilizando solventes para determinar si ésto facilitaría la obtención del colorante, así como la pureza del producto final.

- E. Realizar un análisis infrarrojo (IR) de cada uno de los extracto obtenidos en los puntos máximos, para los parámetros de acidez de precipitación, así como horas de sedimentación y comprobar así que se trata de norbixina, lo que se obtiene al final de la extracción.

- F. Establecer parcelas con las semillas de mejor rendimiento y hacerlas accesibles a los productores de achiote, sobre la base de contratos previamente establecidos.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Bhalkar, S., P. Dubash. 1983. Methods of extraction of annatto from the seeds of *Bixa orellana* (Food color). *The Indian Journal of Dairy Science*. 2: 157-161.
2. Bressani, R., J. Braham. 1983. Chemical composition, amino acid content and nutritive value of the protein of annatto seed (*Bixa orellana*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 33:356-376
3. Chao, R. 1991. Annatto Extract Composition. *Journal of Food Science*. 1:56-60
4. Dendy, D. 1966. Annatto the pigment of *Bixa orellana*. *East African Agricultural and Forestry Journal*. 32: 126-132.
5. Engel, C. 1979. Bixin and Norbixin. *Leatherhead Food R.A. Scientific & Technical Survey No.117.1:5-7*
6. Engelhardt, J. 1988. Annatto Extract Pigments. *Natcol Quarterly Information Bulletin*. 2:10-11
7. Francis F. 1987. Lesser-known food colorants. *Food Technology*. 4:62-68.
8. Francis, F. 1993. Papers Presented at INF/COL No 1.
9. Hereld, P. 1995. *Natural Colors for Foods, Confectionery and Beverages*.
10. Hernández C., M. Vizcarra, E. Vernon, A. Torreblanca. 1985. Efficient utilization of the annatto seed (*Bixa orellana*). *Tecnología de Alimentos*. 5:18-20, 22-24.
11. Ingram, J.S., Francis B.J. 1969. Annatto tree (*Bixa orellana*): occurrence, cultivation, preparation and uses. *Tropical Science*. 11: 97-102.
12. Isler, O. 1971. Carotenoids.
13. McKeown, G. 1965. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 4:48-50
14. Monge, F. A. 1967. Industrial (extraction) feasibility of "Achiote" (*Bixa orellana*). *Politecnica*. 1: 39-46.
15. Preston, H., M. Rickard. 1980. Extraction and chemistry of annatto. *Food Chemistry*. 5:47-56.
16. Reith, J., J. Gielen. 1971. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts. *Journal of Food Science*. 36: 861-864.

17. Sampathu, S., N. Krishnamurthy. 1981. Natural food colors. *Indian Food Packer*. 35:97-105.
18. Tong, L.B. 1984. Preparation and the chemistry of natural food colors from annatto plant. *Food Technology*. 3: 298-304.
19. Wurts, M., R. Torreblanca. 1983. Analysis of annatto seed (*Bixa orellana*, L.) and of the generated waste during extraction of its pigments. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 33:606-619.

APENDICE

*** ANALISIS DE VARIANZA ***

PUREZA
POR MUESTRA
POR SEMILLA

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	G.L.	Promedio de Cuadrados	F	Signif de F
Efectos Promedio	55.899	5	11.180	2134.295	0.000
MUESTRA	0.129	4	0.032	6.168	0.000
SEMILLA	55.769	1	55.769	10646.807	0.000
Interacciones de 2 vías	0.205	4	0.051	9.785	0.000
MUESTRA SEMILLA	0.205	4	0.051	9.785	0.000
Explicado	56.104	9	6.234	1190.068	0.000
Residual	0.471	90	0.005		
Total	56.575	99	0.571		

----- ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA PARA SEMILLA ALTA -----

Variable PUREZA
vs Variable MUESTRA

Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	Razón de F	Prob. F
Entre grupos	4	0.3116	0.0779	10.3526	0.0000
Dentro grupos	45	0.3386	0.0075		
Total	49	0.6502			

----- ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA PARA SEMILLA BAJA -----

Variable PUREZA
vs Variable MUESTRA

Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	Razón de F	Prob. F
Entre grupos	4	0.0227	0.0057	1.9193	0.1236
Dentro grupos	45	0.1328	0.0030		
Total	49	0.1555			

*** ANALISIS DE VARIANZA ***

PUREZA
POR DILUCION
POR SEMILLA

Fuente de Variacion	Suma de Cuadrados	G.L.	Promedio de Cuadrados	F	Signif de F
Efectos Principales	3933.935	9	437.104	342.290	.000
DILUCION	9.453	8	1.182	.925	.497
SEMILLA	3924.481	1	3924.481	3073.205	.000
Interacciones de 2 vías	.513	8	.064	.050	1.000
DILUCION SEMILLA	.513	8	.064	.050	1.000
Explicado	3934.447	17	231.438	181.236	.000
Residual	206.874	162	1.277		
Total	4141.321	179	23.136		

----- ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA PARA SEMILLA ALTA -----

Variable PUREZA
vs Variable DILUCION

Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F Razon	F Prob.
Entre grupos	8	6.2587	.7823	.8571	.5560
Dentro grupos	81	73.9355	.9128		
Total	89	80.1942			

Test de rangos múltiples

Procedimiento Tukey-HSD
Rangos para el nivel .050

4.51 4.51 4.51 4.51 4.51 4.51 4.51 4.51

El rangos arriba son tablas de rangos.
El valor actualmente compuesto con Promedio de (J)-Promedio de (I) es..
.6756 * Rango * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

Ninguno de los dos grupos es diferente significativamente al nivel 0.050

SUBGRUPO 1

Grupos	Grp 1	Grp 2	Grp 8	Grp 9	Grp 7
Promedio de	31.2940	31.3700	31.4700	31.5170	31.6250
Grupos	Grp 5	Grp 3	Grp 6	Grp 4	
Promedio de	31.6620	31.7380	31.8160	32.2300	

----- ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA PARA SEMILLA BAJA -----

Variable PUREZA
vs Variable DILUCION

Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F Razon	F Prob.
Entre grupos	8	3.7072	.4634	.2824	.9700
Dentro grupos	81	132.9385	1.6412		
Total	89	136.6456			

Test de rangos múltiples

Procedimiento Tukey-HSD
Rangos para el nivel .050

4.51 4.51 4.51 4.51 4.51 4.51 4.51 4.51

El rangos arriba son tablas de rangos.
El valor actualmente compuesto con Promedio de (J)-Promedio de (I) es..
.9059 * Rango * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

Ninguno de los dos grupos es diferente significativamente al nivel 0.050

SUBGRUPO 1

Grupos	Grp 9	Grp 1	Grp 8	Grp 2	Grp 7
Promedio de	22.0340	22.0550	22.1920	22.2310	22.2830

Grupos	Grp 5	Grp 6	Grp 3	Grp 4
Promedio de	22.2930	22.4200	22.4270	22.7390

*** ANALISIS DE VARIANZA ***

PUREZA
 POR CONCENTRACION
 POR SEMILLA

Fuente de variacion	Suma de Cuadrados	DF	Promedio de Cuadrados	F	Signif de F
Efectos Principales	.265	8	.033	465.531	.000
CONC	.003	7	.000	5.393	.000
SEMILLA	.262	1	.262	3686.494	.000
Interacciones de 2 vías	.000	7	.000	.301	.953
CONC SEMILLA	.000	7	.000	.301	.953
Explicado	.265	15	.018	248.423	.000
Residual	.010	144	.000		
Total	.275	159	.002		

----- ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA PARA SEMILLA ALTA -----

Variable PUREZA
 vs Variable CONCENTRACION

Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	Razon de F	F Prob.
Entre grupos	7	.0013	.0002	2.2585	.0390
Dentro grupos	72	.0059	.0001		
Total	79	.0073			

Test de rangos múltiples

Tukey-HSD Procedimiento
Rangos para El .050 nivel -

4.41 4.41 4.41 4.41 4.41 4.41 4.41

El rangos arriba son tablas de rangos.
El valor actualmente compuesto con Promedio de (J)-Promedio de (I) es..
.0064 * Rango * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

Ninguno de los dos grupos es diferente significativamente al nivel 0.050

SUBGRUPO 1

Grupos	Grp 1	Grp 8	Grp 2	Grp 6	Grp 7
Promedio de	.3291	.3296	.3315	.3342	.3344

Grupos	Grp 5	Grp 3	Grp 4
Promedio de	.3365	.3384	.3415

----- ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA PARA SEMILLA BAJA -----

Variable PUREZA
vs Variable CONCENTRACION

Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F Razon	F Prob.
Entre grupos	7	.0015	.0002	3.6623	.0019
Dentro grupos	72	.0043	.0001		
Total	79	.0058			

Test de rangos múltiples

Tukey-HSD Procedimiento
Rangos para El .050 nivel -

4.41 4.41 4.41 4.41 4.41 4.41 4.41

El rangos arriba son tablas de rangos.
El valor actualmente compuesto con Promedio de (J)-Promedio de (I) es..
.0055 * Rango * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(*) Denota pares de grupos significativamente distintos a un nivel de 0.050

Promedio	Grupos
.2484	Grp 1
.2485	Grp 2
.2502	Grp 8
.2502	Grp 7
.2559	Grp 6
.2566	Grp 3
.2576	Grp 5
.2604	Grp 4 * *

SUBGRUPO 1

Grupos	Grp 1	Grp 2	Grp 8	Grp 7	Grp 6
Promedio de	.2484	.2485	.2502	.2502	.2559

Grupos	Grp 3	Grp 5
Promedio de	.2566	.2576

SUBGRUPO 2

Grupos	Grp 8	Grp 7	Grp 6	Grp 3	Grp 5
Promedio de	.2502	.2502	.2559	.2566	.2576

Grupos	Grp 4
Promedio de	.2604