

Evaluación del proceso de extracción alcalina de bixina de semillas de achiote (*Bixa orellana*)

Isabel Isaza Jiménez^a, Tatiana Jaramillo Valencia^a, Luisa Fernanda Posada Uribe^b,
Guillermo León Palacio González^{c*}

^a Estudiantes de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín Colombia de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín Colombia

^b Master y Ph.D en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Profesor, Co-Asesor del Proyecto de Grado, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia., Asesor del Proyecto de Grado, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

^{c*} Master y Ph.D en Química de Lehigh University, Profesor, Asesor del Proyecto de Grado, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

Resumen

La bixina es un compuesto coloreado natural encontrado en las semillas del achiote (*Bixa orellana*), la cual corresponde al carotenoide presente en mayor proporción, y es de gran interés para la industria química, cosmética, alimenticia y farmacéutica [1],[2]. En este trabajo, se evaluó la extracción de bixina de semillas de achiote empleando tres bases diluidas: hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) y trietanolamina (TEA). Se determinó que los rendimientos medios al variar el álcali de la extracción fueron de: $4.27 \pm 0.12\%$ (NaOH), $5.26 \pm 0.31\%$ (KOH) y $1.81 \pm 0.16\%$ (TEA), además se identificó el grado de pureza para cada base obteniendo valores de 1.95 ± 0.55 ppm, 2.05 ± 0.50 ppm y 1.74 ± 0.24 ppm, respectivamente. Posteriormente, se estudió la extracción variando el estado de la semilla, con el fin de determinar el rendimiento y la pureza de la bixina obtenida. Para ello se empleó como álcali el KOH según resultados previos. Esto permitió establecer que los procesos de extracción a partir de semilla molida permiten mayores rendimientos que los alcanzados con semilla entera, obteniendo valores de rendimiento medio de $35.36 \pm 0.44\%$ y $4.30 \pm 0.12\%$, correspondientemente. Adicionalmente, se evaluó el efecto del estado inicial de la semilla en el valor de pureza del metabolito extraído, registrando concentraciones de 0.80 ± 0.11 ppm (semilla molida) y 0.99 ± 0.12 ppm (semilla entera). Esta variación presentada no fue estadísticamente significativa, por lo que se consideró la semilla molida como el estado ideal para los procesos de extracción de bixina. Se determinaron las características físicoquímicas del metabolito, obteniendo un punto de fusión de 220°C , un porcentaje de biomasa de 79.40% y una humedad de 10.60% ; desarrollando la investigación mediante las técnicas instrumentales de espectrometría UV-Visible, espectroscopía infrarroja (FT-IR) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Bixin is a natural colored compound found in the seeds of annatto (*Bixa orellana*) which corresponds to the carotenoid present in bigger proportion and is of great interest for the chemical, cosmetic, food and pharmaceutical industry [1],[2]. In this work the extraction of bixin from the seed of annatto was evaluated using three diluted bases: sodium hydroxide (NaOH), potassium hydroxide (KOH) and triethalonamine (TEA). It was determined that when the alkali of the extraction was varied the average yields were: $4.27 \pm 0.12\%$ (NaOH), $5.26 \pm 0.31\%$ (KOH) y $1.81 \pm 0.16\%$ (TEA). In addition, the purity degree was identified for each base, obtaining values of 1.95 ± 0.55 ppm, 2.05 ± 0.50 ppm y 1.74 ± 0.24 ppm, respectively. Subsequently, the extraction varying the state of the seed was studied, in order to determine the yield and purity of the obtained bixin. For this, KOH was used as the alkali according to previous results. This allowed to establish that the extraction processes starting with milled seed, allow larger yields that the ones achieved with whole seed.

Obtaining average yield values of $35.36 \pm 0.44\%$ y $4.30 \pm 0.12\%$, correspondingly. Additionally, the effect of the initial state of the seed on the purity value of the extracted metabolite was evaluated, registering concentrations of 0.80 ± 0.11 ppm (milled seed) y 0.99 ± 0.12 ppm (whole seed). This variation presented was not statistically significant, so the whole seed was considered as the ideal state for bixin extraction processes. The physicochemical characteristics of the metabolite were determined, obtaining a melting point of 220°C , a biomass percentage of 79.40% and a humidity percentage of 10.60%; developing research using instrumental technics of UV-Visible spectroscopy, infrared spectroscopy (FT-IR) and high performance liquid chromatography (HPLC).

1. Introducción

Se estima que anualmente se producen alrededor de 10,000 toneladas de colorantes sintéticos, empleados en la industria textil, de cosméticos, alimenticia y farmacéutica; los cuales en su mayoría corresponden a pigmentos tipo azo [3], [4]. Del total de colorantes sintéticos usados, el 60% equivale a esta familia, por su bajo costo, buena intensidad y resistencia en la perdurabilidad del color [5], [6], sin embargo, estudios han demostrado que el uso de este tipo de colorantes puede causar afecciones a la salud y problemáticas medio ambientales; por lo que la investigación e implementación de pigmentos naturales ha ido incrementando, representando una alternativa viable a futuro en la sustitución de un porcentaje de la producción y comercialización de estos [7], [8], [9], [10].

Las semillas de achiote presentan un particular interés y han sido objeto de diferentes estudios a causa de su composición rica en proteínas y pigmentos (Tabla 1).

Tabla 1. Composición general de las semillas de achiote [11]

Componentes	Porcentaje
Lípidos	2.0 - 4.8
Pigmentos	1.0 - 6.3
Proteínas	12.1 – 17.0
Carbohidratos totales	50.0
Ceniza	5.4 - 6.9
Humedad	9.6 - 13.3

Los pigmentos de la semilla del achiote son principalmente del tipo carotenoides, representados en su mayoría por bixina, la cual se encuentra en un porcentaje mayor al 80% del total de material colorante [12], [13], [14]. Se considera un pigmento natural, no tóxico y con propiedades antioxidantes, lo cual representa una ventaja frente a otro tipo de colorantes empleados en diversas industrias como la de alimentos [1],[15]. Para la extracción de los colorantes de las semillas existen diferentes métodos, los cuales emplean solventes como acetona, acetato de etilo, agua y etanol [16], [17], [18], [19], [20]. Dentro de ellos, la extracción Soxhlet se encuentra como uno de los métodos de mayor eficiencia, pero demanda grandes cantidades de solventes, aumentando los costos de operación [21]. En contraste, otras metodologías como la extracción asistida por microondas (MAE) requiere tiempos de extracción cortos con poca cantidad de solventes, pero puede generar degradación térmica e isomerización *cis-trans* de los carotenoides [21]. Otros métodos como la extracción asistida por ultrasonido (EAU) se ha empleado por ser rápida y eficiente, aunque condiciones como tamaños de partícula pequeños (< 50 micras) para lograr un buen proceso, pueden presentarse como inconvenientes [21], [22]. Asimismo, la extracción acelerada de solventes (ASE) reduce tiempos de operación y la cantidad de solventes orgánicos requeridos, sin embargo, es de difícil aplicación a escala industrial a causa de la obstrucción por azúcares y pectinas, lo que hace que esta técnica sea limitada para extracciones en material vegetal [21]. Se ha reportado la ejecución de esta metodología en la extracción de bixina, obteniendo un rendimiento del 48.0% para una solución ciclohexano: acetona (60%:40%), mayor respecto a métodos más tradicionales como el Soxhlet con valores medios de 29.14%; ambos resultados a nivel de laboratorio. Respecto al grado de pureza alcanzado, se han reportado rangos entre 66.2% hasta 98.0%, dependiendo del método de extracción usado [23]. Por su parte, empleando fluidos supercríticos (FSC), se ha logrado eliminar la fracción lipídica de las

semillas, no obstante la eficiencia del proceso es muy baja, aumentando así los costos de operación [11], [21]. Otra técnica reportada es la extracción asistida por enzimas (EAE) que facilita la liberación de carotenoides intracelulares, mejorando el rendimiento del proceso hasta un 80%, sin embargo, los altos costos de las enzimas hacen inviable su aplicación [21].

Dentro de los métodos de extracción de bixina, el método de extracción con álcali es bastante empleado, siendo NaOH y KOH las bases más comunes [11], [19], [24], [25]. La obtención del colorante a partir de NaOH es un procedimiento de bajo costo, y ha sido utilizado a concentraciones de 0.5%, 2% y 5% obteniendo rendimientos alrededor de $2.15 \pm 0.96\%$ y $3.10 \pm 0.09\%$ [20], [26], [27]. Por su parte, el KOH es la base más recomendada, reportando en la literatura los mayores rendimientos con valores aproximados de $4.85 \pm 0.15\%$ y $6.04 \pm 0.93\%$ a concentraciones de 0.6%, 1% y 2% [18], [19], [24], [26].

En este trabajo se evaluaron tres medios alcalinos para el proceso de extracción: NaOH, KOH y TEA. Este último, considerado novedoso para este uso, debido a que no se encuentran reportes en el tema. Su selección se justifica al ser un compuesto orgánico lo que aumenta la afinidad con sustancias de ese tipo, en este caso un carotenoide; lo cual es acorde a la literatura, donde se especifica que esta clase de compuestos mejora el rendimiento de la reacción [18].

En este proyecto se evaluó de forma adicional el uso de las semillas de achiote enteras y molidas, con el fin de establecer si el tamaño de partícula afecta la extracción del metabolito. Se ha determinado que el estado de la materia prima puede influir de forma significativa en el rendimiento del proceso [2], [28]. Algunos autores reportan que la trituración de la semilla mejora el tiempo de extracción, el rendimiento, reduce el uso de solventes y mejora la calidad del extracto [28]. Por el contrario, otros autores argumentan que los mejores rendimientos se presentan cuando la semilla no es triturada, debido a que el pigmento se encuentra en la superficie de esta [2]. Por lo anterior, se planteó además de determinar el medio alcalino ideal para la extracción, evaluar si esta es mejorada por la trituración de la semilla, o sí, por el contrario, este paso puede ser eliminado en el proceso productivo, reduciendo los costos por compras de equipos de molienda.

En consecuencia, en esta investigación se estudió una alternativa técnicamente viable para la producción de un colorante natural, que a futuro permita mitigar el efecto de los colorantes azo, debido a la posible reducción en su consumo. Se buscó lograr un buen rendimiento respecto a los reportados en la literatura para la extracción de bixina y un buen grado de pureza aproximado, a partir de la implementación y comparación entre bases tradicionales y un medio alcalino no convencional. Además, la evaluación del colorante respecto al estado inicial de la semilla permitió un análisis desde diferentes enfoques.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención de las semillas

Las semillas de achiote (*Bixa orellana*) se obtuvieron de un mercado local en la Central Mayorista de Antioquia, las cuales no necesitaron ningún tratamiento previo a la experimentación.

2.2 Evaluación del medio alcalino para la extracción de bixina a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana*)

2.2.1 Proceso de extracción de bixina

Para la evaluación del proceso de extracción alcalina de bixina, inicialmente se prepararon las tres bases seleccionadas, NaOH, KOH y TEA a una concentración del 1.50% [24], [25]. Se empleó una relación 1:3 de semillas: álcali, tomando 10 gramos de semilla entera de achiote y 30 mL del medio alcalino correspondiente [24], [26]. Una vez entraron en contacto las semillas y la base, se agitaron a 140 rpm durante una hora [29]; posteriormente se dejaron en digestión por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se separaron las semillas del medio y se adicionaron a un nuevo recipiente para la repetición del proceso de digestión, bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Pasado el segundo periodo de digestión, se desecharon las semillas y se reunieron los dos extractos de bixina obtenidos. El proceso se realizó a temperatura ambiente [24]. Estas evaluaciones se desarrollaron con el álcali como único factor de variación y se realizaron tres réplicas de las extracciones para cada nivel, organizadas aleatoriamente; para un total de nueve ensayos.

Cuando finalizó esta etapa, se procedió a la neutralización del sistema aplicando H_3PO_4 al 10% sobre el material obtenido (extracto) en la digestión alcalina, empleando agitación constante. Este ácido se adicionó hasta que se alcanzó un pH de 2.0-2.5 [29].

Posteriormente, se realizó el cambio de polaridad de la suspensión, con el fin de lograr la floculación del colorante. Para ello se agregaron 46 gramos del floculante, constituido por un alcohol-éster entre tres y cuatro átomos de carbono, y se decantó el material para la recolección del sólido. Finalmente, la bixina cruda obtenida se secó al aire durante tres días [29].

2.2.2 Determinación de la pureza

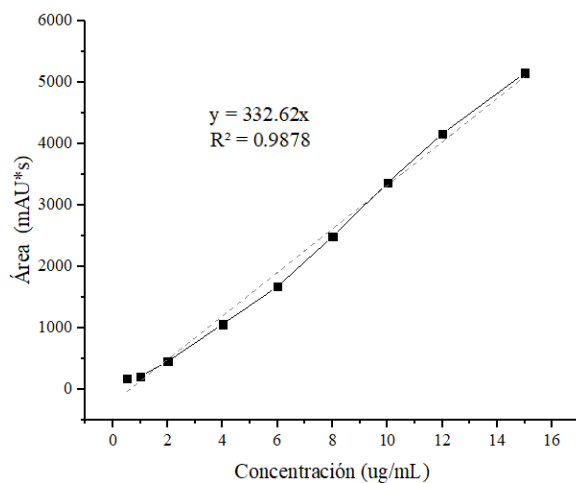
- **Estándar de bixina**

Para la determinación de la pureza, fue necesario obtener un estándar con el cual comparar los resultados de las mediciones y fijar estos valores como parámetros de referencia. El estándar comercial de bixina fue obtenido por medio de la empresa Colorquímica.

- **Medición en el HPLC**

Inicialmente, para la medición en el HPLC se preparó una solución inicial de la bixina estándar en metanol a una concentración de 50 ppm, esta con el fin de construir una curva de calibración (Gráfica 1) a partir de diluciones, obteniendo concentraciones de: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 ppm, requerida posteriormente para la cuantificación de las muestras y la obtención del valor de pureza de cada una de estas. La inyección de las diferentes soluciones de bixina se realizó acorde al protocolo de Renan Campos Chisté, et. [30]. Se ejecutaron modificaciones al método de acuerdo a las especificaciones del equipo empleado (HPLC Agilent Technologies modelo 1200) y de los instrumentos requeridos en la medición. Las muestras de bixina preparadas para la construcción de la curva se inyectaron en metanol a un volumen de 20µL y un flujo de 0.9 mL/min. Se utilizó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 de 5 µm, 250 mm x 4.6 mm a una temperatura de 29°C. La fase móvil consistió en un solvente A agua: ácido fórmico (98:2, v/v) y un solvente B compuesto de metanol: ácido fórmico (98:2, v/v) con un gradiente de A:B 70:30 a 40:60 en 15 minutos, después de 40:60 a 20:80 en 10 minutos y finalmente de 20:80 a 5:95 en 10 minutos, manteniendo este último por 10 minutos más. El espectro se obtuvo a una longitud de onda de 459 nm. Por último, posterior a la construcción de la curva, se realizaron las inyecciones al HPLC de los metabolitos obtenidos en el proceso de extracción mediante diferentes medios alcalinos, empleando las condiciones mencionadas anteriormente, y determinando así el valor de pureza de cada muestra, las cuales fueron inyectadas a una concentración de 10 ppm.

Los resultados obtenidos, permitieron la evaluación del factor tratamiento (NaOH, KOH y TEA) mediante la variable de respuesta pureza, relacionada en este caso con la concentración en unidades de partes por millón (ppm). Este valor fue calculado para cada muestra mediante la correlación del área del pico correspondiente a cada corrida, analizados mediante una tabla ANOVA con un nivel de confianza del 95% y con la previa verificación de los supuestos.



Gráfica 1. Curva de calibración de bixina estándar obtenida por HPLC

2.2.3 Determinación del rendimiento

Para el cálculo del rendimiento en peso seco, inicialmente se pesaron los 10 gramos de semillas de achiote, requeridos en el proceso de extracción, y se reportaron los valores reales empleando una balanza analítica marca Sartorius modelo Entris con una precisión de 0.0001 gramos. Luego, cuando se obtuvo la bixina cruda y se secó, se tomaron los pesos finales de las diferentes muestras. Por último, aplicando la Ecuación 1 se determinó la relación entre la cantidad de producto obtenido y la masa inicial de material vegetal.

Ecuación 1. Rendimiento [11]

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{masa de bixina obtenida}}{\text{masa inicial de semillas de achiote}} \times 100$$

Finalmente, con los resultados de rendimiento de bixina como variable de respuesta, se llevó a cabo la evaluación del medio alcalino (factor tratamiento), por medio del análisis de una tabla ANOVA con un nivel de confianza del 95% y con la verificación previa de los supuestos de la misma. Se realizó posteriormente el test de rangos múltiples requerido para determinar diferencias entre los niveles del tratamiento en evaluación.

2.3 Evaluación del efecto de la molienda en la extracción alcalina de bixina de semillas de achiote (*Bixa orellana*)

2.3.1 Reducción de tamaño

Para la evaluación del efecto de la molienda del achiote en la extracción, inicialmente se realizó la reducción de tamaño de las semillas empleando un molino de discos modelo Corona. Posteriormente, con el material obtenido se realizó un análisis granulométrico, empleando los tamices de la serie Tyler y un equipo vibratorio denominado ro-tap que permitiera la separación de las semillas molidas. Después del tiempo de tamizado (30 minutos), se calcularon los diámetros promedio de las partículas de achiote correspondientes a cada malla (Tabla 2).

Finalmente, se seleccionó el material contenido en el tamiz No.50 como la materia prima para la extracción de bixina, a causa de que se requería aumentar el área superficial del sólido con el propósito de mejorar la extracción, al favorecer el contacto entre el pigmento y el medio alcalino [31]. Al trabajar bajo este supuesto y de acuerdo a la malla elegida, se aseguró un tamaño de partícula promedio de semillas de achiote de 4.46×10^{-2} cm para las posteriores etapas del proceso.

Tabla 2. Tamices empleados en análisis granulométrico

Tamiz	Abertura* (cm)	Dp promedio* (cm)
4	47.50	47.50
8	23.80	35.65
10	19.99	21.89
30	5.94	12.97
50	2.97	4.46
Colector	-	1.49

*Valores de abertura y diámetro $\times 10^{-2}$

2.3.2 Proceso de extracción de bixina

Se evaluó el efecto de la molienda de las semillas de achiote en el rendimiento y pureza de la bixina, empleando la extracción alcalina con la base de mejores resultados, seleccionada en la etapa anterior. Para ello, se tuvo como factor de estudio el estado inicial de la semilla, con los niveles semilla molida y semilla entera. Se llevaron a cabo tres extracciones por cada nivel, empleando un único medio alcalino para la extracción del metabolito, realizando un total de seis ensayos. El proceso de extracción ejecutado tuvo las etapas descritas en el numeral 2.2.1, con las modificaciones enunciadas respecto al factor evaluado.

2.3.3 Determinación de pureza

Se utilizó la técnica de cromatografía líquida (HPLC) descrita anteriormente, para la determinación del valor de pureza de las muestras, mediante la curva de calibración construida a partir del estándar comercial de bixina, empleado como compuesto referencia para la cuantificación (ppm). La inyección de los metabolitos obtenidos mediante diferentes estados de la semilla se realizó siguiendo el protocolo de Renan Campos Chisté, et. [30] modificado, empleando las condiciones previamente mencionadas. Finalmente, con los resultados de pureza como variable de respuesta, se realizó la evaluación del estado de la semilla, mediante el análisis de una tabla ANOVA con un nivel de confianza del 95% y con la previa verificación de los supuestos.

2.3.4 Determinación del rendimiento

Para el cálculo del rendimiento se realizaron los pasos enunciados en el numeral 2.2.3, reportando los valores de peso de la bixina extraída y de las semillas de achiote enteras y molidas. Finalmente, con los resultados de rendimiento (variable de respuesta), se evaluó el factor estado de la semilla mediante un análisis estadístico unifactorial.

2.4 Evaluación de las características fisicoquímicas de la bixina obtenida de las semillas de achiote (*Bixa orellana*) por medio de extracción alcalina

Para la evaluación de las características fisicoquímicas de la bixina, se emplearon dos técnicas instrumentales y otras metodologías que permitieron la identificación y el análisis cualitativo del metabolito.

Inicialmente, se tomaron dos miligramos del colorante y se ubicaron en el lente del espectrofotómetro FT-IR UATR Spectrum Two de PerkinElmer, para la identificación de los grupos funcionales presentes en la bixina.

Luego, se realizó un barrido espectral mediante el espectrofotómetro UV-Vis Spectronic modelo Genesys 2PC a una longitud de onda de 350nm a 700nm, empleando acetona como disolvente; con el objetivo de determinar los picos de máxima absorbancia. Para ello, se tomó un miligramo del colorante y se disolvió en acetona, posteriormente se dispuso en la celda de medición. Ambas metodologías, se realizaron para el estándar y para las muestras extraídas mediante diferentes medios alcalinos y estados de la semilla.

Adicionalmente se determinó la humedad de las muestras. Para esto se pesó inicialmente el sólido obtenido, se introdujo en una estufa y se dejó a 105°C por dos horas. Luego, se sacó y se dejó enfriar, posterior a esto se pesó. Este procedimiento se realizó varias veces, hasta que el peso se mantuvo constante. Por último, aplicando la Ecuación 2, se determinó el porcentaje de humedad:

Ecuación 2. Porcentaje de humedad

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Para determinar la biomasa, inicialmente se pesó el material vegetal y se realizó el proceso de extracción. Posteriormente se tomaron las semillas obtenidas luego de la etapa de digestión y se pesaron para determinar la masa final. A continuación, se presenta la fórmula aplicada para la determinación de la biomasa.

Ecuación 3. Cantidad de biomasa

$$\text{Biomasa} = \frac{\text{peso biomasa final}}{\text{peso semillas inicial}} \times 100$$

Finalmente, se determinó el punto de fusión del pigmento. Como primer paso, se introdujo la bixina dentro de un tubo capilar y se selló el otro extremo de este. El tubo fue unido a un termómetro y sumergido dentro de silicona caliente para lograr el aumento de temperatura del sistema. Por último, se reportó el punto de fusión del metabolito correspondiente a la temperatura a la cual este cambió al estado líquido.

2.5 Análisis estadístico de los resultados

Para el presente proyecto de investigación se realizaron dos diseños de experimentos correspondientes a dos diseños unifactoriales, uno para el factor “medio alcalino”, con los niveles NaOH, KOH y TEA, y otro para el

factor “estado de la semilla”, con los niveles semilla molida y entera. Los demás factores presentes en el proceso de extracción se mantuvieron fijos. Se seleccionaron como variables de respuesta el rendimiento y la pureza, realizando tres réplicas por experimento. Para el análisis estadístico, se empleó el software R por medio de la plataforma RStudio y las librerías readr, lattice, car, lme4 y agricolae.

El primer diseño de experimentos se enfocó en la selección del mejor medio alcalino para la extracción de bixina a partir de semillas de achiote, mediante el análisis de la pureza y el rendimiento. Los valores obtenidos, correspondientes a las dos variables de respuesta, se evaluaron por medio de una tabla ANOVA con un nivel de confianza del 95% y con la verificación previa de los supuestos del ANOVA. Se realizó el test de Shapiro-Wilks para residuos con el fin de evaluar la normalidad, el test de Levene y Bartlett para evaluar la homocedasticidad y el estadístico de Durbin-Watson para descartar correlación o falta de independencia de residuos. Por último, se procedió a realizar el test de rangos múltiples Tukey-HSD para los diferentes niveles evaluados.

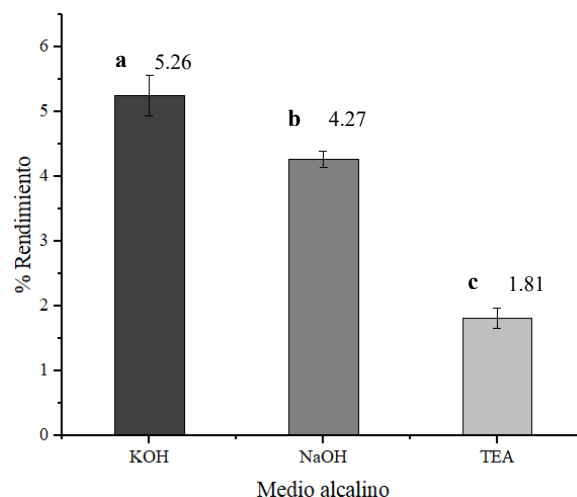
Posteriormente, mediante el segundo diseño de experimentos, se evaluó el efecto de la molienda de las semillas de achiote en el rendimiento y pureza de la bixina, empleando la metodología de extracción alcalina con la base de mejores resultados, determinada en el análisis de la primera fase experimental. Los resultados obtenidos, se evaluaron por medio de un test t para comparación de medias con una confianza del 95%, con la verificación previa de los supuestos de la regresión lineal. Esto con el fin de determinar el carácter cuasi-normal de los datos, la homogeneidad de varianzas de los residuos de los datos y la independencia de los errores, con los test previamente enunciados para los supuestos del ANOVA. Finalmente, se realizó el análisis estadístico y se seleccionó el estado de la semilla ideal para el proceso de extracción empleado.

3. Resultados y análisis

3.1 Evaluación del medio alcalino para la extracción de bixina a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana*)

Analizando el proceso de extracción de bixina por medio de diferentes álcalis, se logró determinar la influencia de estos en la cantidad de material colorante obtenido, lo cual se comprobó mediante los rendimientos calculados. Los valores presentados en la Gráfica 2 permiten evidenciar que el uso de KOH en la obtención de bixina es el álcali que logra mayor recuperación del producto de interés, con un valor de rendimiento medio de $5.26 \pm 0.31\%$, porcentaje comparable con los datos encontrados en la literatura, donde se reportan rendimientos aproximados de $4.85 \pm 0.15\%$ y $6.04 \pm 0.93\%$ a concentraciones de 0.6%, 1% y 2% [24], [26], [18],[19]. [18],[19]. Esto es acorde a lo demostrado en artículos científicos e indexados, donde se menciona que el medio alcalino por el cual se logra la mayor extracción del pigmento es el KOH [26].

Por su parte, para la extracción con NaOH, la relación semillas enteras vs. material colorante extraído alcanzó un valor de $4.27 \pm 0.12\%$. Este resultado, si bien es similar con los datos encontrados en la literatura de $2.15 \pm 0.96\%$ y $3.10 \pm 0.09\%$ [26], [27], [20], presenta una leve desviación al ser superior en un 49.65% y 27.40% respectivamente; esto se podría justificar en el proceso de extracción de las nueve muestras obtenidas correspondientes al primer diseño de experimentos, en el que no se realiza una etapa de purificación, por lo que probablemente, la masa de las impurezas es tenida en cuenta para el cálculo de este porcentaje. Adicionalmente, la diferencia entre los resultados teóricos y experimentales se puede deber a la metodología de extracción empleada, ya que a pesar de que se obtuvieron mediante el uso del mismo medio alcalino, el método y el procedimiento de extracción varía, lo que repercute en la cantidad del producto final.

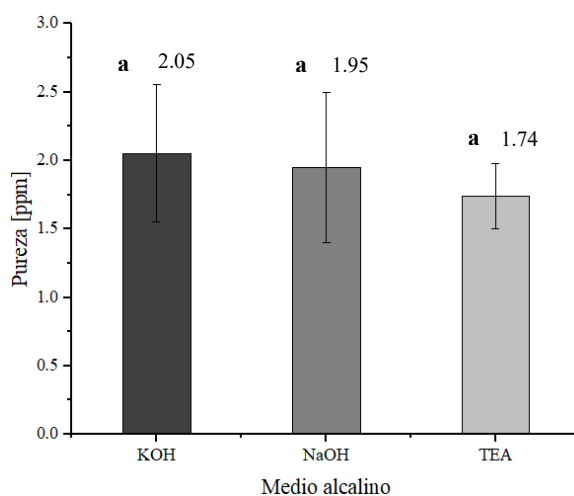


Gráfica 2. Porcentaje de rendimiento medio vs. medio alcalino

*Letras distintas representan grupos estadísticos significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Para la extracción con TEA se registraron los rendimientos más bajos, con un valor medio de $1.81 \pm 0.16\%$, lo que permite afirmar que este álcali no representa un medio ideal para la obtención de este tipo de pigmento; lo anterior teniendo como único enfoque la cantidad de material extraído. Esto se justifica en la baja alcalinidad de la TEA al ser una base menos fuerte que el NaOH y el KOH, condición que desfavorece la extracción del metabolito, ya que al ser la bixina un ácido relativamente débil requiere de una base fuerte para la obtención de la mayor cantidad de pigmento. Lo mencionado, se evidencia en los resultados de rendimiento, en los que el KOH al ser el álcali más fuerte logra la mayor recuperación del colorante a partir de una masa fija de material vegetal.

Al evaluar la calidad del extracto obtenido mediante los diferentes medios alcalinos, se determinó, por una cuantificación en el HPLC la pureza en cada nivel de tratamiento. En la Gráfica 3 se presentan las concentraciones medias donde se evidencia que la diferencia entre estas no es significativa, por lo que el álcali no representa un factor de variación determinante en los valores de pureza.



Gráfica 3. Grado de pureza medio vs. medio alcalino

*Letras iguales representan grupos estadísticos sin diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%.

Adicionalmente, se expone el cromatograma de la bixina estándar (Colorquímica), el cual contiene las mismas señales que el presentado en el protocolo, donde identifican el pico **b** (Figura 1) como bixina, lo anterior sustentado mediante espectroscopía de masas [30]. Si bien, aunque se obtiene igual separación de componentes,

se observan diferencias en los tiempos de retención del metabolito, el cual teóricamente eluye a un tiempo de 38.65 minutos [30], contrario al valor obtenido experimentalmente de 35.18 minutos (Figura 2). Esta variación se puede justificar en la marca del equipo, y la referencia y el posible desgaste de la columna empleada, lo que podría afectar los resultados del HPLC, así este se haya realizado bajo las mismas condiciones.

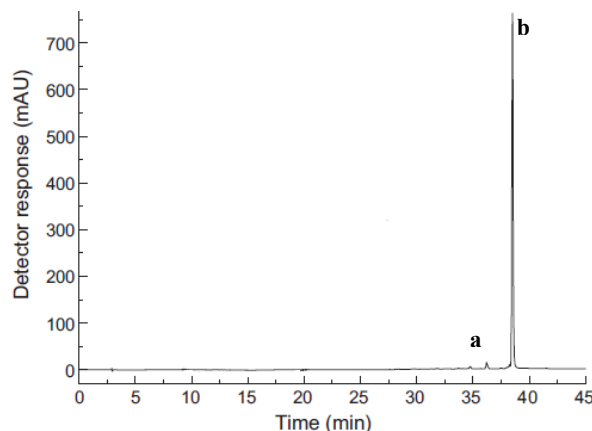


Figura 1. Cromatograma del protocolo empleado para HPLC [30]

Respecto a los picos seleccionados dentro del cromatograma de bixina estándar para la construcción de la curva, se tomaron las dos señales expresadas, ya que si bien, en diferentes artículos se menciona que el mayor pico corresponde a este metabolito, no se contaba en esta investigación con la posibilidad de realizar otras técnicas que identificaran el contenido de cada uno de estos y posteriormente asegurar que el pico mayor presentara únicamente bixina. Por lo tanto, para las muestras extraídas se consideró el área de ambas señales para su cuantificación, las cuales fundamentadas en la teoría contienen; pico **c**: *cis*-bixina o *trans*-norbixina [23]; compuestos que por su semejanza en la estructura molecular son afines y eluyen a las condiciones dadas, y pico **d**: en su mayoría bixina.

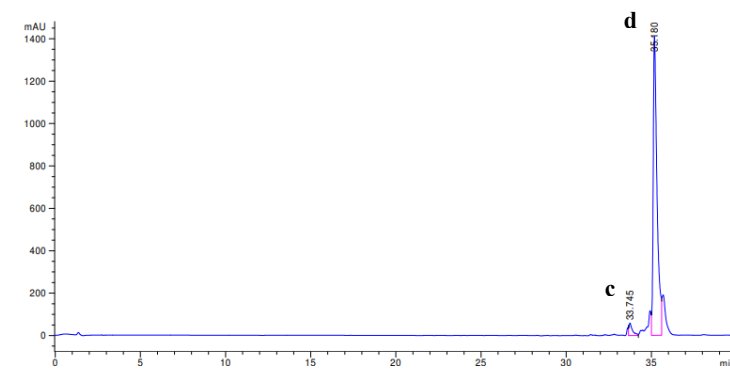


Figura 2. Cromatograma de bixina estándar (Colorquímica) obtenido por HPLC

A continuación, se presenta el cromatograma del metabolito extraído empleando KOH (Figura 3). Cabe mencionar, que las señales obtenidas para las nueve muestras de bixina (con los tres medios alcalinos) son comparables entre sí, por lo que únicamente se expone uno de estos.

Se puede observar que, aunque se obtienen los dos picos característicos del cromatograma, estos presentan una menor resolución al poseer un ancho de banda mayor, lo que se puede justificar en el contenido de impurezas de las muestras, al no realizar un proceso de purificación que mejore la definición de las señales.

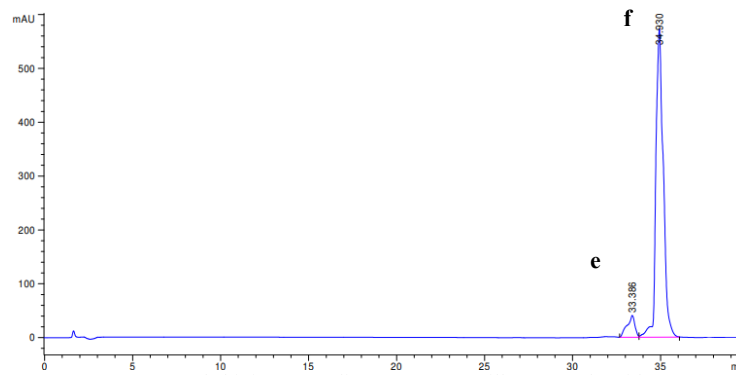


Figura 3. Cromatograma de bixina en medio KOH con semilla entera obtenido por HPLC

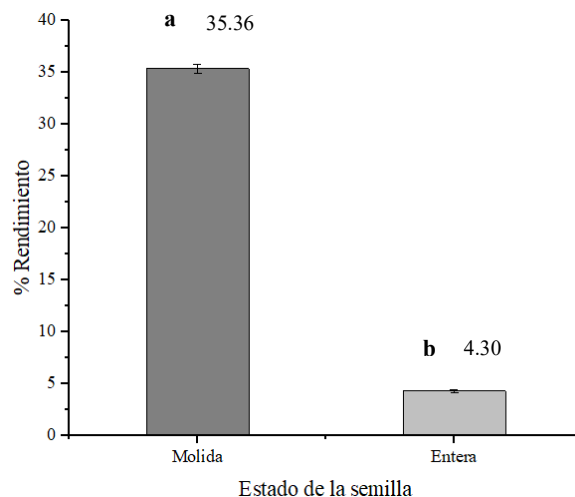
Mediante un análisis estadístico, empleando la tabla ANOVA, se logró determinar el buen ajuste del modelo a los datos y el efecto que tiene el medio alcalino en el porcentaje de rendimiento, observando diferencias significativas para los niveles del factor tratamiento y estableciendo diferencias entre estos para esta variable de respuesta (valor $p=7.6 \times 10^{-5}$). Por su parte, los valores de R^2 (0.958) y R^2 (0.944) ajustado nos permiten afirmar la buena precisión del modelo y la alta relación entre la variable predictiva y la variable de respuesta. Finalmente, posterior a la verificación de los supuestos del ANOVA se realizó el test de Tukey, el cual permitió concluir que la media de los tres álcalis empleados es estadísticamente diferente, siendo mayor la media cuando se aplicó KOH, posteriormente NaOH, y la media más baja se alcanzó cuando se aplicó TEA. Al analizar la variable de respuesta pureza, se encontró que no existen diferencias significativas entre los niveles (valor $p=0.885$), por lo que el medio alcalino empleado, no afecta el grado de pureza obtenido en las muestras.

3.2 Evaluación del efecto de la molienda en la extracción alcalina de bixina de semillas de achote (*Bixa orellana*)

Se realizó un análisis sobre el efecto de la molienda de las semillas del achote en el proceso de extracción, determinando la influencia del estado de estas en la cantidad de material colorante obtenido. Para la ejecución de esta etapa, se tomaron los resultados logrados en el primer diseño de experimentos, el cual permitió seleccionar el KOH como el mejor medio de extracción de bixina, es decir, el álcali se mantuvo como un factor fijo en este proceso.

Los valores presentados en la Gráfica 4 permiten evidenciar que la semilla molida en la obtención del metabolito es el estado que logra mayor recuperación del producto de interés, con un rendimiento medio de $35.36 \pm 0.44\%$, porcentaje comparable con los datos encontrados en la literatura, donde se reportan rendimientos aproximados de 41% y 47.5%, obtenidos con una solución de KOH al 2% [26]. Adicionalmente, realizando una comparación entre los valores medios alcanzados para cada estado de la semilla, se determinó una diferencia del $31.06 \pm 0.33\%$ entre ambos rendimientos, lo cual se justifica en el rompimiento de las paredes celulares de las semillas, generado en el proceso de molienda, esto facilita la extracción en conjunto de lípidos, proteínas, carbohidratos y otros compuestos que aumentan la cantidad de material colorante extraído.

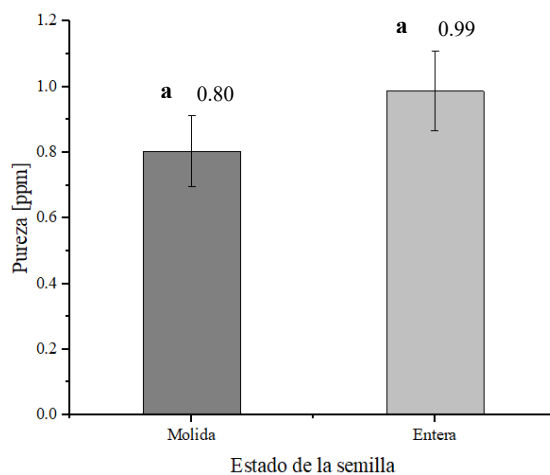
Por lo tanto, aunque el proceso de molienda aumenta la relación semillas vs. material colorante extraído, es posible afirmar que este rendimiento presenta mayor proporción de impurezas, lo cual se evidencia en la concentración (ppm) promedio alcanzada para la muestra molida (0.80 ± 0.11 ppm), la cual es inferior en 0.18 ± 0.01 ppm al valor de semilla entera, lo que nos indica que la cantidad de la de bixina efectiva obtenida es menor.



Gráfica 4. Porcentaje de rendimiento medio vs. estado de la semilla

*Letras distintas representan grupos estadísticos significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Se evaluó la calidad del extracto obtenido mediante los diferentes estados de semilla por una cuantificación en el HPLC. En la Gráfica 5 se presenta la pureza en cada nivel de tratamiento, donde se evidencia que la diferencia entre estos no es significativa, por lo que iniciar el proceso de extracción a partir de semilla molida o entera, no representa un factor de variación determinante en los valores de pureza.



Gráfica 5. Grado de pureza medio vs. estado de la semilla

*Letras iguales representan grupos estadísticos sin diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%.

A continuación, se expone uno de los cromatogramas del metabolito extraído a partir de semilla molida (Figura 4), ya que las señales obtenidas a partir de este estado de semilla son comparables entre sí. Para el caso de semilla entera, el cual se presentó en la Figura 3, se puede observar que el área del pico correspondiente a los isómeros de la bixina (pico e) es menor comparativamente con el área resultante para la semilla molida (pico g). Esto es acorde con los valores de pureza obtenidos en esta etapa de la experimentación, ya que si bien, los resultados son similares, con una diferencia de 0.18 ± 0.01 ppm, se logra extraer un pigmento de mayor pureza a partir de semilla entera, por lo tanto, la señal que representa estas sustancias estructuralmente semejantes es de un área menor.

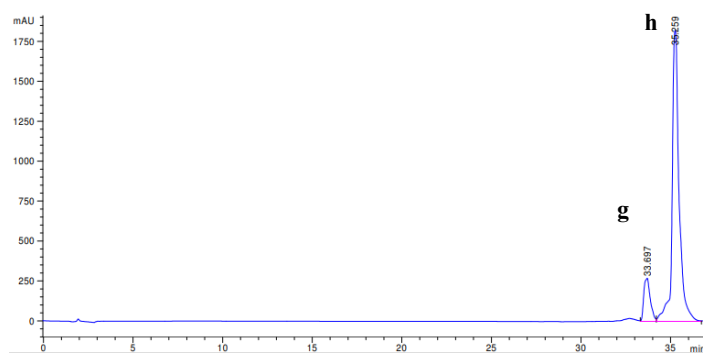


Figura 4. Cromatograma de bixina en medio KOH con semilla molida obtenido por HPLC

Mediante un análisis estadístico, se logró determinar el efecto que tiene el estado de la semilla en la cantidad de material coloreado obtenido. A partir de la tabla ANOVA, se logró determinar el buen ajuste del modelo a los datos y el efecto que tiene el estado de la semilla en el porcentaje de rendimiento, observando diferencias significativas para los niveles del factor y estableciendo diferencias entre estos para esta variable de respuesta (valor $p=2.81 \times 10^{-7}$). Por su parte, los valores de R^2 (0.999) y R^2 (0.999) ajustado nos permiten afirmar la buena precisión del modelo y la alta relación entre la variable predictiva y la variable de respuesta. Finalmente, posterior a la verificación de los supuestos del ANOVA se realizó el test de Tukey, el cual permitió concluir que la media de los dos estados de la semilla es estadísticamente diferente, siendo mayor la media cuando se empleó semilla molida y menor cuando se inició el proceso con semilla entera. Al analizar la variable de respuesta pureza, se encontró que no existen diferencias significativas entre los niveles (valor $p=0.326$), por lo que el estado de la semilla no afectó el grado de pureza obtenido en las muestras. En conclusión, se selecciona semilla molida como el estado de semilla ideal para los procesos de extracción de bixina desde el enfoque y el alcance propuesto para el proyecto.

3.3 Evaluación de las características fisicoquímicas de la bixina obtenida de las semillas de achiote (*Bixa orellana*) por medio de extracción alcalina

3.3.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se realizaron 16 mediciones en el espectrofotómetro FT-IR, correspondientes al estándar de la bixina y a las muestras obtenidas mediante la ejecución de los dos diseños de experimentos.

Para el análisis de la bixina estándar se realizó una comparación entre el infrarrojo obtenido y cuatro espectros reportados en la literatura. En la Tabla 3 se presentan las principales bandas de absorción de los espectros teóricos y los valores obtenidos en la presente investigación.

Tabla 3. Señales de espectros FT-IR (cm^{-1})

Bixina estándar [23]	Bixina estándar [23]	Bixina estándar [32]	Bixina estándar (Colorquímica)	Vibraciones
3420	3417	3432	3179	Estiramiento del OH del grupo -COOH
2957	-	2971	-	Doblamiento H-C-H
2917	2924	2919	2918	Doblamiento del H-C-H de alcanos y alquenos
2850	2853	2850	-	Doblamiento del H-C-H -Estiramiento de alcanos y alquenos
1731	1717	1713	1716	Estiramiento del C=O del -COOH
-	-	1631	-	Estiramiento C=C
1620	1617	-	1608	Doblamiento del O-H
-	1562	-	1561	Doblamiento del O-H
-	-	1518	1516	Estiramiento C=C
1469	-	1458	-	Estiramiento C=C
-	1426	1432	1426	Estiramiento C=C

1378	1378	1380	1378	Doblamiento en balanceo de los grupos CH ₃
-	-	1350	-	Estiramiento simétrico del grupo CH ₃ del O-CH ₃
-	1256	-	1254	Estiramiento del C=O
1220	-	-	-	Estiramiento del C=O
1180	-	1200	1209	Vibración simétrica y asimétrica del grupo -C-O-C estiramiento del C=O
-	1160	1160	1158	Vibración simétrica y asimétrica del grupo C-O-C
-	963	-	962	Vibración de balanceo del CH ₂
-	846	-	849	Acoplamiento de vibraciones de estiramiento C-O
-	826	-	826	Vibración del metileno terminal
720	722	-	727	Vibraciones de balanceo del CH ₂ de <i>cis</i> -carotenoide

En las primeras dos columnas, se observan las vibraciones de dos espectros de bixina, los cuales corresponden a un estándar comercial y al pigmento extraído mediante una metodología específica de estudio, encontrados en el artículo “*Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method*” [23]. Las dos columnas adicionales, presentan las bandas observadas para una bixina de alta pureza de la compañía Aldrich Milwaukee [32] usada en la investigación “*Separation of norbixin from Bixa orellana seed raw dye by Aliquat-336*” y el estándar de bixina (Colorquímica) empleado en esta investigación.

Al analizar las vibraciones de estos cuatro infrarrojos se encuentra que ninguno de ellos coincide completamente en todas sus bandas, sin embargo, se observa que existe una buena correlación entre estos espectros.

Realizando una comparación entre la bixina de la compañía Aldrich [32] y el estándar empleado en dicho trabajo, se observa que ambos poseen la señal del grupo C=O casi a la misma frecuencia, 1713cm⁻¹ y 1716cm⁻¹ respectivamente, lo que indica que la bixina utilizada en esta investigación corresponde a un metabolito con un bajo nivel de impurezas, al presentar un valor semejante respecto a la banda de este grupo funcional, pico característico de la misma. Además, desde 2919cm⁻¹ hasta 1160cm⁻¹ [32] estos pigmentos presentan siete absorciones con longitudes muy similares, con variaciones inferiores al 0.80%. Lo anterior, permite afirmar que el estándar de bixina fue el adecuado para su aplicación como espectro patrón en el análisis de las muestras extraídas mediante diferentes medios alcalinos y estados de semilla.

En la Figura 5 se pueden observar las principales bandas de absorbancia correspondientes al estándar de bixina, listados en la Tabla 3.

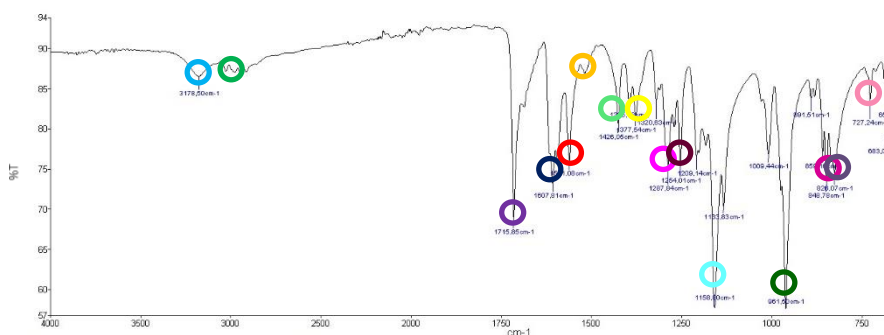


Figura 5. Espectro FT-IR de bixina estándar

*Los picos señalados corresponden a las bandas características de la bixina

Para el análisis de los pigmentos extraídos mediante diferentes bases diluidas y estados de semilla, se realizó una comparación frente al espectro estándar, a partir de la identificación de las moléculas presentes en el material. Para ello, se reconoció la estructura molecular de la bixina (Figura 6), la cual contiene en sus extremos un ácido carboxílico y un éster, determinados como los grupos funcionales principales, además de las insaturaciones que posee en su cadena carbonada.

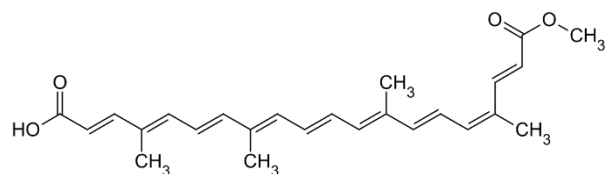


Figura 6. Estructura molecular de la bixina [30]

La bixina, denominada de acuerdo a su nomenclatura química como metil hidrógeno 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato incluye dentro de sus bandas más importantes los siguientes picos característicos: la vibración -OH (3171cm^{-1}), el doblamiento H-C-H ($2922\text{-}2854\text{cm}^{-1}$), el estiramiento C=O (1716cm^{-1}), la deformación axial asimétrica C=C (1612cm^{-1}), el estiramiento C-O ($1254\text{-}1175\text{cm}^{-1}$) y la vibración del grupo metileno (962cm^{-1}), estas asignaciones corresponden a los datos teóricos encontrados para este compuesto [17]. En la Tabla 4, se pueden observar las bandas principales identificadas en las diferentes muestras de bixina. Si bien, se obtuvieron tres espectros para cada tipo de base empleada (NaOH, KOH y TEA) y para cada estado de semilla (entera y molida) únicamente se presenta los valores de un espectro por nivel, ya que no se evidencian diferencias aparentes en las señales de absorción entre réplicas.

Tabla 4. Señales de espectros FT-IR experimentales para cada nivel (cm^{-1})

Bixina estándar	KOH	NaOH	TEA	Molida	Vibraciones
3179	3170	3198	3186	3193	Estiramiento del OH del grupo -COOH
2918	2919	2916	2920	2922	Doblamiento del H-C-H de alcanos y alquenos
1716	1715	1716	1716	1717	Estiramiento del C=O del -COOH
1608	1607	1606	1606	1608	Doblamiento del O-H
1561	1563	1562	1562	1563	Doblamiento del O-H
1516	1510	1508	1520	1509	Estiramiento C=C
1426	1425	1425	1425	1426	Estiramiento C=C
1378	1377	1377	1377	1378	Doblamiento en balanceo de los grupos CH_3
1254	1254	1253	1254	1254	Estiramiento del C=O
1209	1209	1208	1209	1209	Vibración simétrica y asimétrica del grupo -C-O-C estiramiento del C=O
1158	1158	1157	1159	1160	Vibración simétrica y asimétrica del grupo C-O-C
962	961	961	961	962	Vibración de balanceo del CH_2
849	848	847	848	849	Acoplamiento de vibraciones de estiramiento C-O
826	825	825	826	827	Vibración del metileno terminal
727	740	726	726	730	Vibraciones de balanceo del CH_2 de <i>cis</i> -carotenoide

De manera cualitativa, analizando las diferencias en los espectros de cada álcali, se observa que poseen una alta similitud frente al estándar, lo que permite afirmar que el metabolito obtenido es bixina para cada tipo de extracción realizada. Lo anterior, se soporta además en la presencia de los picos característicos de dicho pigmento, los cuales se exponen en la Figura 7. Adicionalmente, se identificó que los números de onda mostrados para la bixina extraída mediante las tres bases de estudio son bastante similares, presentando la mayor diferencia en la vibración correspondiente al estiramiento del -OH, sin embargo, las bandas de estos espectros comparativamente frente al estándar presentan una variación que no supera el 0.60%

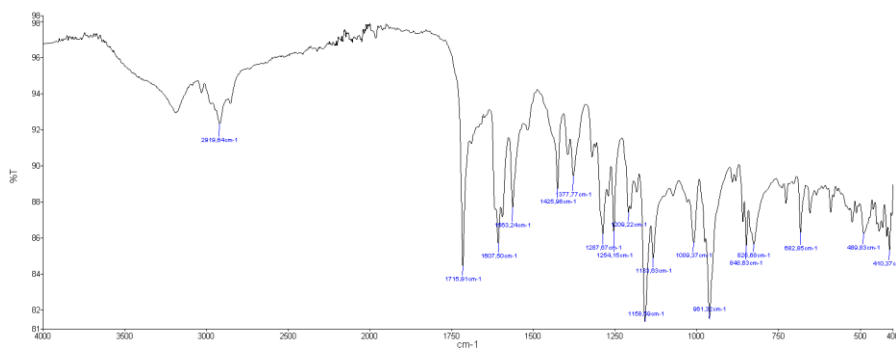


Figura 7. Espectro FT-IR de bixina extraída a partir de semilla entera en medio KOH

Respecto al análisis del segundo diseño de experimentos, únicamente se presentan las absorciones correspondientes al estado de la semilla molida, ya que para la semilla entera los valores coinciden con el medio KOH, debido a que en la segunda etapa sólo se realizó la extracción empleando esta base diluida. Al evaluar las vibraciones del metabolito obtenido a partir de este estado de la semilla, se determina que los valores para las tres réplicas presentan alta similitud entre sí. Adicionalmente, comparando el estándar de bixina frente a las bandas de absorción identificadas en este espectro, las cuales se exponen en la Figura 8, se determina que son bastante similares presentando una variación inferior al 0.45%.

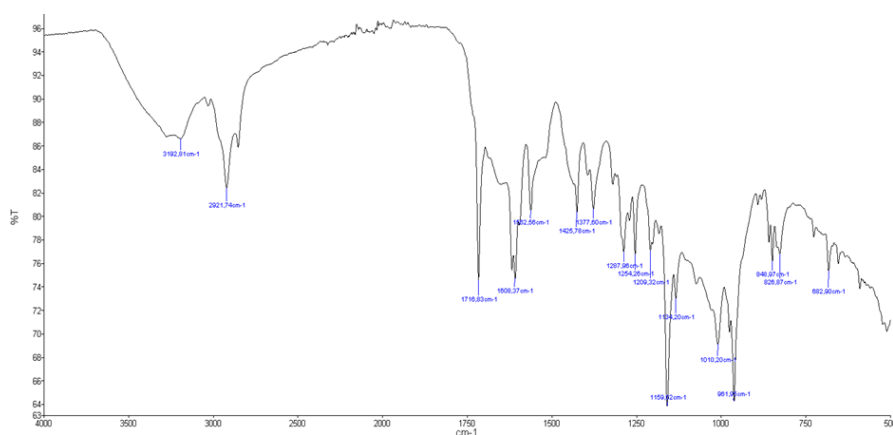


Figura 8. Espectro FT-IR de bixina extraída a partir de semilla molida en medio KOH

Finalmente, mediante la comparación de estos espectros y las diferencias identificadas respecto al estándar se puede indicar el contenido de otros posibles compuestos en el extracto. De acuerdo a literatura encontrada sobre el tema, se sugiere la presencia de carotenoides menores, como el β -caroteno, la criptoxantina, la luteína, la zeaxantina y la metil bixina, sustancias que podrían justificar las variaciones mencionadas [23].

3.3.2 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Se realizó la medición en el espectrofotómetro UV-Vis del estándar empleado, el cual presentó los picos de máxima absorbancia característicos de la bixina, a un λ de: 487, 457 y 429 nm (Figura 9). Adicionalmente, comparando estos valores frente a los espectros obtenidos para las muestras experimentales correspondientes a los dos diseños de experimentos, se identificó que estos coinciden totalmente con los presentados en la literatura, además se determinó que el método de extracción (medio alcalino y estado de la semilla) no genera una variación aparente en las longitudes de onda obtenidas para cada metabolito. Lo anterior, permite verificar por medio de este estudio colorimétrico que el producto obtenido es bixina.

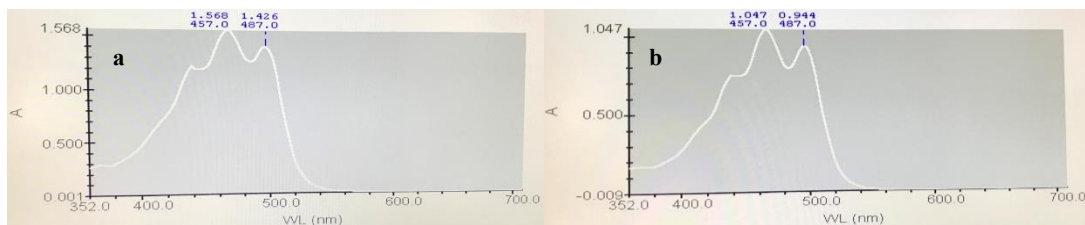


Figura 9. a) Espectro UV-Vis de bixina estándar b) Espectro UV-Vis de bixina extraída en medio KOH con semilla molida

Cabe resaltar que este análisis no es totalmente riguroso, ya que sin realizar un posterior proceso de purificación, esta técnica se limita a reportar que en el contenido de la muestra evaluada se encuentra presente la sustancia de interés, aunque existan otros compuestos encontrados en el extracto, los cuales no son detectables o diferenciables mediante esta metodología instrumental como fue el caso de esta investigación. Lo anterior, se fundamenta en el funcionamiento y la teoría aplicada por el espectrofotómetro UV-Vis, el cual identifica los grupos cromóforos para el análisis de la sustancia, razón por la cual compuestos similares como la bixina y norbixina pueden obtener el mismo espectro. Por tal motivo, se desarrollaron métodos como la espectrofotometría infrarroja para la identificación del metabolito y el HPLC para la determinación del grado de pureza de las muestras obtenidas en el proceso.

3.3.3 Punto de fusión, biomasa y humedad

Se determinó el punto de fusión del estándar mediante el método del capilar, para el cual se obtuvo un valor de 216°C, presentando una variación de 0.46% respecto al reportado en la literatura (217°C) para este metabolito [33]. Adicionalmente, se realizó la medición para una de las muestras de bixina extraída (seleccionada aleatoriamente), obteniendo un valor de 220°C, con una diferencia de cuatro grados comparativamente frente al estándar empleado en esta investigación. Esta discrepancia en los resultados se puede justificar en la falta de pureza del producto, ya que la metodología de extracción empleada se enfoca en la separación del pigmento de otros compuestos contenidos en la semilla como: lípidos, proteínas y carbohidratos, y no en la separación entre bixina y demás tipos de colorantes químicamente similares como la norbixina.

A continuación, se presentan los valores de las demás propiedades fisicoquímicas determinadas:

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de la bixina

Propiedades fisicoquímicas	
Humedad	10.60%
Biomasa	79.40%

4. Conclusiones

Mediante la aplicación de un proceso de extracción alcalina a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana*) se logró la obtención del colorante natural bixina, determinado como el metabolito de interés e identificado mediante la ejecución de diferentes técnicas instrumentales. Se evidenció el efecto que posee la variación del álcali en la cantidad final de material colorante obtenido, alcanzando la mayor recuperación de bixina mediante el empleo de KOH, con un rendimiento medio de $5.26 \pm 0.31\%$. Lo anterior, fundamentado en su alta alcalinidad, siendo considerado como una base fuerte. Para la evaluación de la calidad del extracto, se determinó el grado de pureza obtenido mediante las diferentes bases diluidas, donde se identificó que los resultados registrados para cada nivel no poseen diferencias significativas, por lo que el álcali no representó un factor de variación en los valores de pureza encontrados. Por lo tanto, mediante el análisis en conjunto de las dos variables de respuesta mencionadas, se determinó como medio alcalino ideal para la extracción de bixina el KOH.

Se evaluó el proceso de extracción alcalina de bixina mediante la variación del estado de la semilla, molida o entera, lo cual permitió evidenciar el efecto que posee este factor sobre la cantidad final de colorante obtenido. Se determinó que el proceso de extracción a partir de semilla molida alcanzó mayores rendimientos, reportando un valor medio de $35.36 \pm 0.44\%$, el cual representó estadísticamente un valor significativo. Para la determinación de la pureza del extracto obtenido, se identificó que los resultados encontrados para cada estado de la semilla no son significativamente diferentes, por lo que iniciar el proceso a partir de material molido o no molido, no genera un efecto en la concentración final (ppm) del metabolito extraído. En consecuencia, mediante la evaluación simultánea de las dos variables de respuesta analizadas, se determinó la semilla molida como el estado ideal para los procesos de extracción de bixina.

Se determinó el punto de fusión (220°C), porcentaje de humedad (10.6%) y porcentaje de biomasa (79.40%), correspondientes a las características físicoquímicas de la bixina, las cuales permitieron identificar y concluir que el metabolito obtenido a través de la metodología aplicada corresponde al colorante de interés; lo anterior justificado en la comparación de los valores teóricos y el estándar comercial empleado, respecto a los resultados obtenidos; a través de las técnicas instrumentales realizadas. Así mismo, de manera cualitativa se determinó la presencia de impurezas, que disminuyen la calidad del extracto, por lo que se recomienda para futuras experimentaciones la aplicación de tecnologías y procedimientos con etapas posteriores de purificación que permitan obtener un metabolito con un mayor grado de pureza.

Referencias

- [1] M. A. S. Barrozo, K. G. Santos, y F. G. Cunha, «Mechanical extraction of natural dye extract from Bixa orellana seeds in spouted bed», *Industrial Crops and Products*, vol. 45, pp. 279-282, feb. 2013.
- [2] L. M. Rodrigues, S. C. Alcázar-Alay, A. J. Petenate, y M. A. A. Meireles, «Bixin extraction from defatted annatto seeds», *Comptes Rendus Chimie*, vol. 17, n.º 3, pp. 268-283, mar. 2014.
- [3] E. Forgacs, T. Cserhádi, y G. Oros, «Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review», *Environment International*, vol. 30, n.º 7, pp. 953-971, sep. 2004.
- [4] Z. Aksu, «Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*», *Process Biochemistry*, vol. 38, n.º 10, pp. 1437-1444, may 2003.
- [5] L. Ayed, A. Mahdhi, A. Cheref, y A. Bakhrouf, «Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: Biototoxicity and metabolites characterization», *Desalination*, vol. 274, n.º 1-3, pp. 272-277, jul. 2011.
- [6] D. Rawat, R. S. Sharma, S. Karmakar, L. S. Arora, y V. Mishra, «Ecotoxic potential of a presumably non-toxic azo dye», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 148, pp. 528-537, feb. 2018.
- [7] IHS Markit, «Dyes - Chemical Economics Handbook (CEH)», jun-2019. [En línea]. Disponible en: <https://ihsmarkit.com/products/dyes-chemical-economics-handbook.html>. [Accedido: 07-jul-2019].
- [8] A. Engel, «Colouring markets: The industrial transformation of the dyestuff business revisited», *Business History*, vol. 54, n.º 1, pp. 10-29, feb. 2012.
- [9] Tecnas, «Ficha técnica Color Natural Annato 4%», Tecnas, ene. 2016.
- [10] Colorganics, «Ficha técnica Colorante Natural Annato ref: AN0101-WS», Colorganics, oct. 2017.
- [11] S. Alcázar, F. Osorio, T. Forster, y A. Meireles, «Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation», *Food Research International*, vol. 99, pp. 393-402, sep. 2017.

- [12] J. F. Reith y J. W. Gielen, «Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts», *Journal of Food Science*, vol. 36, n.º 6, pp. 861-864, sep. 1971.
- [13] J. Teixeira da Silva, J. Dobránski, y R. Rivera Madrid, «The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L. (achiote)», *Planta*, vol. 248, n.º 2, pp. 267-277, ago. 2018.
- [14] T. M. Garcia Silveira y D. R. Tapia-Blácido, «Is isolating starch from the residue of annatto pigment extraction feasible?», *Food Hydrocolloids*, vol. 77, pp. 117-125, abr. 2018.
- [15] S. Tay-Agbozo, S. Street, y L. Kispert, «The carotenoid Bixin found to exhibit the highest measured carotenoid oxidation potential to date consistent with its practical protective use in cosmetics, drugs and food», *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 186, pp. 1-8, sep. 2018.
- [16] T. Taham, F. A. Cabral, y M. A. S. Barrozo, «Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies», *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 100, pp. 175-183, may 2015.
- [17] A. P. R. Bitencourt *et al.*, «Preparation of aqueous nanodispersions with annatto (*Bixa orellana* L.) extract using an organic solvent-free and low energy method», *Food Chemistry*, vol. 257, pp. 196-205, ago. 2018.
- [18] D. Raddatz-Mota *et al.*, «Chemical characterization and quantification of the pigment extraction yield of seven Mexican accessions of *Bixa orellana*», *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, vol. 15, n.º 3, pp. 727-740, 2016.
- [19] P. Ibrahim Silva, A. M. Nachtigall, y P. C. Stringheta, «Efficiency Of Solvents In The Obtention And Characterization Of Annatto (*Bixa Orellana* L.) Pigments», *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, vol. 28, n.º 1, pp. 115-124, 2010.
- [20] S. Cunha y J. S. Matos, «Beyond caipirinha: Brazilian cachaça as solvent to organic synthesis and dye extraction.», vol. 40, pp. 1253-1258, oct. 2017.
- [21] R. K. Sain y Y. S. Keum, «Carotenoid extraction methods: A review of recent developments», *Food Chemistry*, vol. 240, pp. 90-103, feb. 2018.
- [22] M. C. Bubalo, S. Vidovic, I. R. Redovnikovic, y S. Jokic, «New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents», *Food and Bioproducts Processing*, vol. 109, pp. 52-73, may 2018.
- [23] W. Rahmalia, J.-F. Fabre, y Z. Mouloungui, «Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method», *Procedia Chemistry*, vol. 14, pp. 455-464, ene. 2015.
- [24] J. E. Devia Pineda y L. Saldarriaga Calderón, «Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*)», *Revista Universidad EAFIT*, vol. 39, n.º 131, p. 15, 2003.
- [25] Z. C. Reyes Buenafe, T. M. Cano Morales, y M. J. Mérida Meré, «Extracción y evaluación del colorante natural de achiote (*Bixa orellana* L.) como sustituto del colorante E-102 amarillo no. 5 (tartracina) en la elaboración de un yogurt», Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2015.
- [26] J. R. V. Martínez y C. A. C. Sosa, «Aportaciones a las Ciencias Alimentarias», Universidad Juárez Autónoma Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México, 2017.

- [27] C. L. S. da Costa y M. H. Chaves, «Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica», *Química Nova*, vol. 28, n.º 1, pp. 149-152, feb. 2005.
- [28] T. Taham, D. O. Silva, y M. A. S. Barrozo, «Improvement of bixin extraction from annatto seeds using a screen-topped spouted bed», *Separation and Purification Technology*, vol. 158, pp. 313-321, ene. 2016.
- [29] G. L. Palacio González, *Ensayos preliminares*. Prodesquim Ltda., 2018.
- [30] R. C. Chisté, F. Yamashita, F. C. Gozzo, y A. Z. Mercadante, «Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds», *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, n.º 1, pp. 57-63, ene. 2011.
- [31] C. L. C. Albuquerque y M. A. A. Meireles, «Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process», *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 66, pp. 86-95, jun. 2012.
- [32] P. Sharma, M. M. Bora, S. Borthakur, P. G. Rao, y N. N. Dutta, «Separation of norbixin from *Bixa orellana* seed raw dye by Aliquat-336», *Environmental Progress & Sustainable Energy*, vol. 32, n.º 1, pp. 134-138, 2013.
- [33] S. Budavari, M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, y J. F. Kinneary, Eds., *The Merck Index*, 12.^a ed. USA: Whitehouse Station, NJ, 1996.