

Universidad Autónoma Agraria

“Antonio Narro”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL.



Obtención y evaluación de rendimientos en la extracción de colorante bixina mediante tratamiento enzimático a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana*).

Por:

Mauro Vázquez Jahuey

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Agosto del 2005

**Universidad Autónoma Agraria
“Antonio Narro”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL.

Obtención y evaluación de rendimientos en la extracción de colorante bixina mediante tratamiento enzimático a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana*).

Por:

Mauro Vázquez Jahuey

Tesis

Que se somete a consideración del H. jurado examinador como requisito parcial para obtener el título profesional de:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Aprobada por el comité de tesis.

Asesor principal

Sinodal

M. C. Maria Hernández González.

Dr. Ramiro López Trujillo

Sinodal

Sinodal

M. C. Xochitl Ruelas Chacón

Dr. Baltasar Gutiérrez Rodríguez

Coordinador de la División de Ciencia Animal.

Dr. Ramón F . García Castillo.
Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
Agosto del 2005

Agradecimientos

*A mi **Alma Terra Mater** que Fue mi casa por mas de cinco años y que será el orgullo de toda mi vida.*

*A la **M.C. Maria Hernández González** quien ha sido una excelente maestra, Asesora, amiga y un modelo a seguir en mi vida profesional.*

*A los maestros: **Xóchitl Ruelas, Oscar Noe Reboloso, Laura O. Fuentes, M. de Lourdes Caballero, Ramiro López , José Á. Daniel** quienes además de sus enseñanzas me brindaron su amistad y cariño.*

*A los laboratoristas **Carlos Arévalo Sanmiguel y Marisela** por su atención y apoyo brindado para la realización de esta tesis.*

*Al Ing. **Santana** por su apoyo.*

*Al **COECYT** Por el apoyo económico brindado a la presente tesis.*

*A todos los compañeros y amigos de la carrera pero en especial a **Ana Lilia Salazar, Manuel Tirado, Daniel A. Ortiz, Heberto, José Manuel, Dalia, Gabriela, Vanesa, Rosa linda, Laura, Alma Patricia, Luis Armando.** Por los hermosos momentos vividos a lo largo de la carrera.*

Mi mas sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a mi formación académica.

Dedicatorias

A Dios que me dio la dicha de vivir.

A mi mamá Teresa Jabuey Serón. A quien debo lo que soy y quiero ser.

A Nohemí Euan Hernandez

A mis hermanas Leticia y Bernardina

A mi abuelito Endino Vázquez

A todos mis tíos, primos y sobrinos pero en especial a mis tías Magdalena, Marina, Maria, a mi tío Héctor y Catarino, quienes me apoyaron económica y moralmente para continuar con mis estudios.

A mis amigos: Mario Trejo, José Luis Aldana, Juan F. Martínez, Raúl Trejo, Enrique Baxcajay, Alexander Hernández, julio Melchor.

Índice

Índice de Cuadros.....	iii
Índice de Figuras	iv
1. Introducción	1
1.1. Objetivos:.....	3
1.1.1. Objetivo General:.....	3
1.1.2. Objetivos Específicos:.....	3
1.1.3. Hipótesis.	3
2. Revisión de Literatura.....	4
2.1. Importancia de los colorantes.....	4
2.2. Clasificación de los colorantes.	4
2.2.1. Clasificación por su grupo cromóforo.	4
2.2.2. Clasificación por su certificación.....	5
2.2.2.1. Colorantes que no requieren certificación.	5
2.2.2.2. Colorantes que requieren certificación.	6
2.2.2.3. Normatividad.....	6
2.2.3. Clasificación dependiendo su origen o procedencia.....	9
2.2.3.1. Colorantes Sintéticos.....	10
2.2.3.2. Colorantes Naturales.	11
2.2.4. Los carotenoides.....	12
2.3. El achiote como fuente de colorante.	13
2.3.1. Características generales del achiote.....	14
2.3.2. Características fisicoquímicas del colorante de la semilla de achiote.	15
2.3.3. Bixina y norbixina.....	17
2.3.4. Importancia comercial de la bixina.....	17
2.4. Métodos de extracción de la bixina.	18
2.4.1. Dilución del pigmento en agua.....	18
2.4.2. Extracción por solventes volátiles.....	19
2.4.3. Extracción mediante tratamiento alcalino.	20
2.5. El uso de enzimas en la producción de colorantes naturales.....	21
2.5.1. Biodegradación (descomposición orgánica).....	22
2.5.2. Enzimas celulosas y hemicelulasas.....	23
2.5.3. Tecnología enzimática.....	23
3. Materiales y Métodos	25
3.1. Materia prima.....	25
3.2. Materiales y equipos.....	25
3.3. Reactivos.....	25
3.4. Metodología.....	26
3.4.1. Etapa 1.- Análisis de los componentes principales de la materia prima.....	26

3.4.2.	Etapa 2.- Determinación de la optima concentración de enzima inicial.....	26
3.4.3.	Etapa 3.- Determinación del tiempo de contacto, para la máxima extracción de pigmento.	26
3.4.3.1.	Recuperación del pigmento	27
3.4.4.	Etapa 4. Cuantificación del pigmento.	27
4.	Resultados.....	28
4.1.	Etapa 1.- Análisis de los componentes principales de la materia prima.....	28
4.2.	Etapa 2.- Determinación de la optima concentración de enzima inicial.	29
4.3.	Etapa 3.- Determinación del tiempo de contacto optimo para la máxima extracción de pigmento.	30
4.3.1.	Comparación entre tratamiento con y sin enzima.....	33
4.4.	Etapa 4.- Caracterización mediante espectroscopia infrarroja (EIR).....	34
5.	Conclusiones	36
6.	Resumen	38
7.	Literatura Citada	40
8.	Apéndice.....	45

Índice de Cuadros

	Pag.
Cuadro 1: Colorantes permitidos en México	7
Cuadro 2: Colorantes permitidos por la CEE y por la FDA	8
Cuadro 3: Colorantes exentos de certificación para la FDA	9
Cuadro 4: Carotenoides más comunes en la naturaleza	12
Cuadro 5: Composición química de la semilla de achiote	16
Cuadro 6: Composición del pigmento de del achiote.....	16
Cuadro 7: Análisis químico de la semilla de achiote	28
Cuadro 8: Velocidad inicial de reacción en función a la concentración de Enzima inicial	29

Índice de Figuras

	Pag.
Figura 1: Clasificación de los colorantes naturales	10
Figura 2: Presentación comercial del pigmento del achiote	13
Figura 3: planta de achiote	14
Figura 4: semilla de achiote.	15
Figura 5: Estructura química de la cis - bixina.	17
Figura 6: Estructura química de la norbixina.	17
Figura 7: Gráfica de medias de la velocidad inicial en función a la concentración de enzima mediante análisis de t student's.	30
Figura 8: Formación da azucares totales.	31
Figura 9: Formación de azucares Reductores.	31
Figura 10: Monitoreo de la máxima degradación del sustrato, con una concentración de Enzima 0.1% p/p.	32
Figura 11: Comparativo entre procesos con y sin tratamiento con celulasas, en base a gramos de pigmento recuperado.	33
Figura 12: Semilla despigmentada por acción de tratamiento enzimático y sin este.	34
Figura 13: Espectro Infrarrojo para pasta y colorante comercial.	35

1. Introducción

El color representa uno de los factores mas importantes en los alimentos que consumimos diariamente, pues con el nos formamos criterios de calidad, sabor y en el caso de algunas frutas de su estado de madurez, de tal forma que en muchos de los casos se acepta o se rechaza un alimento por su color. Por lo que ha sido uno de las mayores preocupaciones de la industria alimentaría.

Los colorantes para alimentos provienen básicamente de la síntesis química de algunos elementos y de la extracción de colorante que se encuentra depositado en organismos vivos como los tejidos de las plantas, insectos y en algunos otros organismos que contienen color, como es el caso de la semilla de achiote que contiene uno de los colores mas utilizados en el ramo de la industria alimentaria. Al igual que los otros colorantes de origen natural, el achiote a tomado una gran importancia debido a que no representa un riesgo de salud a diferencia de los colorantes provenientes de síntesis química, de los cuales se ha comprobado su responsabilidad en el desarrollo de enfermedades en los consumidores (Fenneman, 2000).

La bixina es considerada por la Organización Mundial de la Salud como un colorante permitido por comprobarse su inocuidad como aditivo alimentario, motivo por el cual se ha incrementado su demanda en los últimos años y ello a traído la necesidad de optimizar los métodos de su explotación (Seminario de agronomía, 1990).

El extracto del achiote presenta tonalidades rojo y anaranjados y se emplean en las industrias de la confitería, panadería, láctea y cárnica, además de que también se emplean en la industria de los cosméticos y la farmacéutica (Jaramillo, 1992).

El pigmento de la semilla de achiote puede obtenerse por medio de una extracción con diferentes tipos de solventes como el agua, alcohol, etanol, aceites, o mediante una solución alcalina. Los cuales cumplen la función de desprender el colorante que se encuentra impregnado en la capa de la semilla. (Sahaza, 2001).

El tipo de solvente que se emplee depende de la disponibilidad del productor tomando en cuenta que si se emplea el agua como disolvente (el cual es el mas económico), la extracción será mínima, así que de manera industrial se usan solventes

con mayor capacidad de dilución del colorante como son los aceites, alcoholes o las soluciones alcalinas. Pero actualmente los mercados potenciales de este producto no desean que se usen productos químicos para su extracción. Lo que quieren es que el producto sea lo mas orgánico posible (Rodríguez, 2002).

El colorante del achiote se encuentra depositado en la capa que recubre la semilla, formada de componentes insolubles como la celulosa, hemicelulosa y pectina. En la naturaleza existen enzimas que se encargan de degradar estos compuestos en azucares mas simples. Situación que puede aprovecharse para facilitar la liberación del pigmento en el achiote, sin la necesidad de emplear sustancias toxicas para lograrlo (Jaramillo, 1992).

El presente trabajo tiene como objetivo lograr la implementación de una técnica que facilite la liberación del pigmento digiriendo con enzimas celulasas la capa de materia celulosica en donde se encuentra depositado, establecer las condiciones de concentración de enzima, concentración de sustrato, así como el tiempo optimo para lograr que una solución que libere la mayor cantidad de colorante posible, para posteriormente filtrar las semillas y evaporar el liquido presente y obteniendo así el colorante listo para comercializarse. (García, *et al*, 1999).

1.1. Objetivos:

1.1.1. Objetivo General:

-Establecer condiciones óptimas para la obtención del pigmento bixina mediante el uso de celulasas.

1.1.2. Objetivos Específicos:

- a. Evaluar los componentes principales de la semilla de achiote.
- b. Establecer la concentración optima de enzima inicial para la degradación de celulosa y liberación del pigmento adherido a esta.
- c. Establecer el tiempo optimo para la máxima degradación de celulosa y liberación del pigmento adherido.
- d. Caracterizar el pigmento obtenido y evaluar los rendimientos de recuperación.

1.1.3. Hipótesis.

Es posible eficientar la obtención del pigmento bixina a partir de la semilla de achiote mediante el uso de celulasas en un medio acuoso.

2. Revisión de Literatura

2.1. Importancia de los colorantes.

El color representa una parte esencial en el desarrollo del hombre, en sus diversas manifestaciones sociales, culturales, ambientales, etc. Y se basa en una serie de procesos físicos, químicos, fisiológicos y psicológicos.

Las sensaciones que percibe el hombre cuando observa un objeto en particular las asocia con las cosas que lo rodean, esto es evidente en el área alimentaría, donde la relación entre el color y el sabor son muy importantes para que el consumidor adquiera un producto, porque tan sólo con verlo, lo sustituirá por otro si no cumple con sus propias “normas de calidad”, como el no tener un color homogéneo y consistente, además busca siempre una apariencia natural. En el área de alimentos, la aplicación de los colorantes es importante y se usan como aditivos, pues son constituyentes esenciales. De acuerdo con la “Food and Drugs Administration” (FDA, 1986) es cualquier colorante, pigmento u otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar o extraída, aislada o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente y que cuando es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos o cosméticos, al cuerpo humano o cualquier parte, por si misma es capaz (solo a través de una reacción con otra sustancia) de impartir color (Rodríguez, 2002; Fennema, 2000).

2.2. Clasificación de los colorantes.

Existen varias formas de clasificar a los colorantes, estas puede ser por su grupo cromóforo, esto es, el radical que les confiere un determinado color, por su certificación y por su procedencia o fuente de origen (Fennema, 2000).

2.2.1. Clasificación por su grupo cromóforo.

Todos los colorantes contienen un sistema de dobles enlaces conjugados. Un compuesto es coloreado debido a la presencia de grupos particulares, los cromóforos, que deben ser enlazados al sistema de dobles enlaces conjugados.

Las partículas cromóforas pueden ser coloreadas si un grupo llamado auxocrómico es introducido. Actualmente se han identificado estas identidades como sigue (García, *et al*, 1999):

- Auxócromos: donadores de electrones.
- Antiauxócromos: aceptadores de electrones.
- Cromóforos; sistema lineales o cíclicos de dobles enlaces conjugados.

“Al ensamble de estas unidades estructurales se llama cromógeno. Así de acuerdo con la estructura química responsable del color, se puede obtener una clasificación de diversos compuestos, según su contenido de cromóforo respectivo, por ejemplo: carbonilo (-C=C-), nitrosato(-NO-), etilénico(-C=C-)” (García *et al.*, 1999).

2.2.2. Clasificación por su certificación.

Se agrupa en dos bloques: aquellos colorantes que no requieren certificación y los que requieren certificación.

2.2.2.1. Colorantes que no requieren certificación.

Incluyen a los colorantes obtenidos de fuentes naturales, así como a los idénticos a los naturales, estos colorantes deben cumplir con las siguientes especificaciones (García, *et al*, 1999):

- Arsénico: no más de 3 mg/k
- Plomo: no más de 10 mg/k
- Mercurio: no más de 1 mg/k
- Perdidas por desecación: no más de 0.2 %
- Residuos de ignición: no más de 0.2%
- Espectrofotometría de absorción.
- Colorantes orgánicos naturales por cromatografía sobre papel, de capa fina y de columna.

Actualmente estas especificaciones están como anteproyecto de la Norma Oficial Mexicana (García, *et al*, 1999).

2.2.2.2. Colorantes que requieren certificación.

Incluyen a las sustancias químicamente sintetizadas con alto grado de pureza. Para asegurarse de que los lotes cumplan con las especificaciones y tolerancia permitidas deben de ser aprobados por organismos gubernamentales como en el caso de la FDA en los Estados Unidos. Los colorantes naturales no necesitan certificación (García *et al.*, 1999).

2.2.2.3. Normatividad.

“La Secretaria de Salud en el artículo núm. 664, establece que se prohíbe el uso de aditivos para las siguientes finalidades” (García *et al*, 1999):

- Encubrir alteraciones y adulteraciones en la materia prima o en el producto terminado.
- Disimular materia prima no apta para consumo humano.
- Ocultar técnicas y procesos defectuosos de elaboración, manipulación, almacenamiento y transporte.
- Reemplazar ingredientes en los productos que induzcan al error o engaño sobre la verdadera composición de los mismos.
- Alterar los resultados analíticos de los productos en que se agregan.

Dicho artículo implica que no deben utilizarse como materiales para adulteración, si no para restablecer el color original del producto, que por el proceso de elaboración y almacenamiento donde factores químicos y físicos le afectaran y su coloración natural disminuyó. Así pues los colorantes permitidos en México se muestran en el Cuadro 1 (García, *et al*, 1999).

Cuadro 1. Colorantes permitidos en México (García, *et al*, 1999)

Colorantes orgánicos naturales
Aceite de zanahoria (<i>Daucus carota</i>)
Achiote (<i>Bixa orellana</i>)
Azafran (estigmas de <i>Croccus sativus L.</i>)
b-caroteno
Caramelo
Clorofila
Cochinilla (extracto de <i>Crocus cacti L.</i> o carmín)
Curcuma (polvo y oleorresina de rizoma de <i>Curcuma longa</i>)
Extracto de tegumento de uva (enocianina)
Harina de semilla de algodón cocida y tostada (parcialmente desecada)
Jugo de frutas jugo de vegetales
Pimiento
Riboflavina
Xantofilas, flavoxantina, rubixantina, zeaxantina, los productos naturales aprobados que la contengan y otros.
Colorantes Orgánicos Sintéticos o Artificiales
Amarillo N° 5 (tartrazina)
Azul N° 2 (indigotina)
Rojo cítrico N° 2 (solo se permite para colorear)
La corteza de la naranja
Rojo N° 3 (eritrosina)
Rojo N° 40
Verde N° 3
Colorantes orgánicos minerales
Gluconato ferroso
Dióxido de titanio

Dependiendo del país, se permite el uso de determinados colorantes. A excepción de los sintéticos los colorantes poliméricos no se permiten en la Comunidad Económica Europea ni en Estados Unidos, mientras que otros que no se permiten en la Comunidad Económica Europea, se permiten en Estados Unidos (FDA), como es el

rojo allura, el azul brillante y el verde FCF. En el Cuadro 2 se muestran los colorantes permitidos por la Comunidad Económica Europea (CEE) y por la (FDA) y en el Cuadro 3 se muestra los colorantes exentos de certificación por este último país, en donde se excluyen a los colorantes sintéticos y están todos los naturales (García, *et al*, 1999).

Cuadro 2. Colorantes permitidos por la Comunidad Económica Europea (CEE) y por la Food and Drugs Administration (FDA) de Estados Unidos (García *et al.*, 1999).

Color	CEE	FDA
Sintéticos		
Rojo allura AC	No Permitido	Rojo N° 40
Azul brillante FCF	No Permitido	Azul N° 1
Carmoisina	E122	No Permitido
Eritrosina	E127	Rojo N° 3
Verde rápido	No Permitido	Verde N° 3
Indigotina	E132	Azul N° 2
Ponceau 4 R	E124	No Permitido
Amarillo Sunset FCF	E110	Amarillo N°6
Tartrazina	E110	Amarillo N° 5
Colores poliméricos	No Permitido	No Permitido
Naturales		
Antocianinas	E163	Permitido
Betaninas	E162	Permitido
Carotenoides	E160	Permitido
Clorofila	E140	Permitido
Riboflavinas	E101	Permitido
Idénticos a los naturales	Permitido	Permitido

Cuadro 3. Colorantes exentos de certificación para la Food and Drugs Administration (FDA) de Estados Unidos (García *et al.*, 1999)

1. Extracto de achiote 2.- Betabel deshidratado (polvo) 3.- Azul ultramarino 4.- Cantaxantina 5.-Caramelo 6.-b-apo-8-carotenol 7.-b-caroteno 8.- Extracto de cochinilla (carmín) 9.- Harina de semilla de algodón (parcialmente tostado) 10.- Glutamato de hierro 11.- Extracto de cáscara de uva (enocianina) 12.- Oxido de hierro sintético	13.- Jugo de frutas 14.- Jugo de Vegetales 15.- Harina de algas secas 15.- Tagetes y extracto (oro azteca) 16.- Aceite de Zanahoria 17.- Aceite de endospermos de maíz 18.- Páprika 19.- Oleorresina de páprika 20.- Riboflavina 21.- Azafrán 22.- Dióxido de Titanio 23.- Turmérico 24.- Olerresina turmérica
Naturales	Sintéticos
Riboflavina Clorofila Orchilla y curruma Xantofilas Bija, bixina, y norbixina Cohinilla y ác. Carmíco.	Verde A.M.y C.* Rojo núm. 3 A.M. y C.* Rojo núm. 5 A.M. y C.* Rojo núm. 6 A.M. y C.* Rojo núm. 40 A.M. y C.*

A.M. y C. (FDyC) significa alimentos y cosméticos, según la (FDA)

2.2.3. Clasificación dependiendo su origen o procedencia.

Los colorantes son obtenidos por fuentes naturales, ya sean microorganismos, vegetales, animales o minerales y aquellos producidos por síntesis química (sintéticos) incluyendo los idénticos a los naturales. En la Fig. 1 se muestra dicha clasificación (FAO/OMS 8°, 1966)

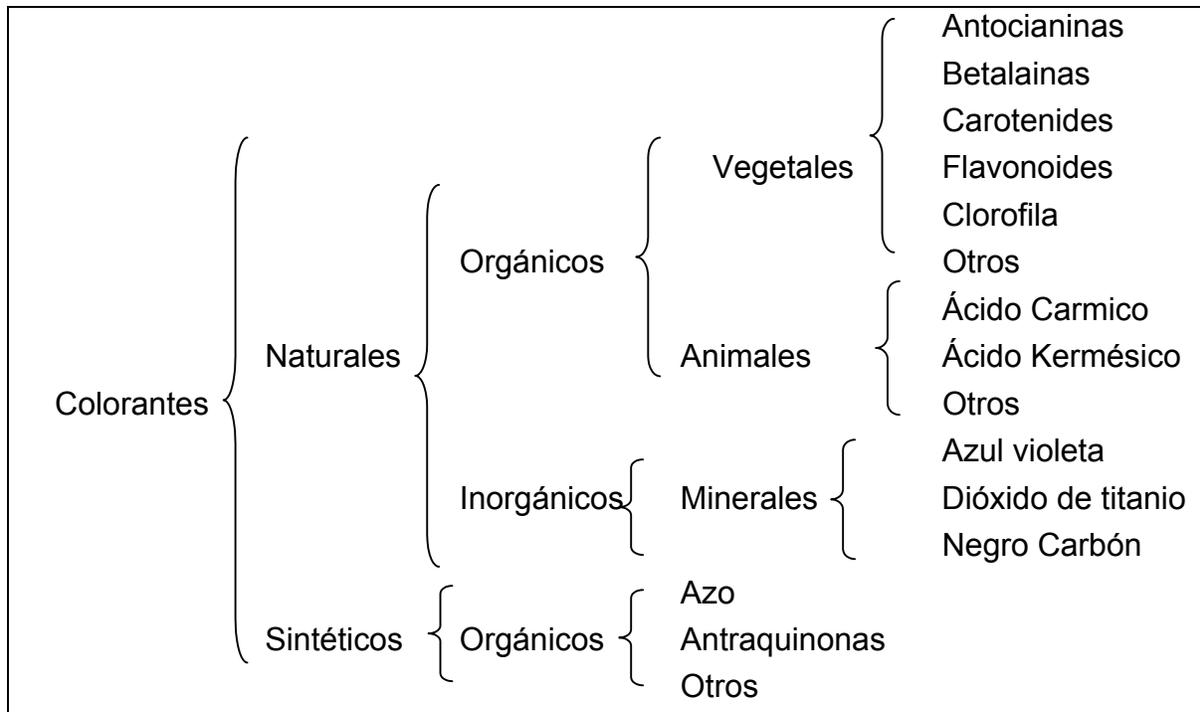


Fig. 1. Clasificación de los colorantes naturales (García *et al.*, 1999).

2.2.3.1. Colorantes Sintéticos.

Los colorantes sintéticos han sido muy utilizados por las ventajas que estos presentan sobre los colorantes naturales en relación a su producción. Debido a los problemas ocasionados a la salud por los colorantes sintéticos, se examinó una lista de 80 colorantes, después de una larga serie de selecciones y estudios actualmente solo se aceptan 9 colorantes sintéticos con severas restricciones en su uso y de acuerdo con la FDA sólo ocho son comercialmente viables (García *et al.*, 1999).

Según la NOM-038-SSA1-1993 un colorante orgánico sintético es un compuesto derivado del carbono, obtenido por síntesis química y que se emplea como aditivo de color tanto en alimentos como en productos de perfumería y belleza.

La cláusula “Delaney” de la FDA originalmente adicionada en 1958, se basa en la determinación de cierto riesgo de cáncer por algunos aditivos coloridos, establece la prohibición de que ningún aditivo puede ser utilizado si se encuentra que induce cáncer, cuando es ingerido por el hombre o por algún animal. Así, por medio de esta cláusula

se prohíben los siguientes colorantes: azul núm. 6, rojo núms. 10,11,12,13; amarillo núm. 1 (aplicación externa), amarillo núm. 3 y 4 para medicamentos y cosméticos. Por otro lado, se prohíben para alimentos, medicamentos y cosméticos: el rojo núm. 2; violeta núm. 1, grafito y anaranjado B (García *et al.*, 1999; FAO/OMS 8°, 1966).

Muchos colorantes sintéticos o artificiales han sido prohibidos; como, el rojo núm. 2, en Estados Unidos remplazado por el rojo núm. 40 que no ha sido aprobado por la mayoría de los países. El colorante Azo fue prohibido en Suecia, en 1978 y en Noruega en 1980 (Gracia, *et al.*, 1999).

Además los colorantes artificiales han perdido popularidad porque se requiere productos con mejor calidad nutricional, ya que la mayoría de los consumidores busca bebidas saludables; por ejemplo enriquecidas con vitamina y pro vitaminas (Gracia, *et al.*, 1999).

2.2.3.2. Colorantes Naturales.

Según García *et al.*, (1999) estos presentan tres categorías: Los colorantes extraídos sin cambio a partir de materiales naturales normales o mediante procesos puramente físicos, Los colorantes que cambian durante su extracción a partir de materiales o colores extraídos de fuentes naturales pero que no son alimentos (por ejemplo, ácido carmíco), también pueden ser químicos sintetizados normalmente idénticos a los colores encontrados en fuentes naturales. La mayoría de estos productos (de los cuales el β -caroteno es un ejemplo) han sido probados en términos de pureza. Para su uso en alimentos, tiene una serie de restricciones como el contenido de colorante, pigmentos secundarios, impurezas químicas y metales pesados. Los mas comunes son los siguientes: curcumina (amarillo), riboflavina (amarillo), carmín cochinilla (rojo, rosa, violeta), clorofila y clorofilinas (verde), caramelo (marrón), bixina (anaranjado), extracto de pimentón (rojo), rojo remolacha (rojo), uno de los colorantes naturales de mayor importancia son los carotenoides (García *et al.* 1999, FAO/OMS,14° informe, 1970; Anónimo 2, 2003).

2.2.4. Los carotenoides.

Se encuentran en los tejidos vegetales en forma libre disueltos en lípidos y formando complejos con proteínas, carbohidratos y ácidos grasos los cuales generan diferentes colores. Se dividen en dos grupos según la manera en la que estos interaccionen, de acuerdo con su estructura química los cuales son: carotenoides y xantofilas (forma oxigenada de los carotenos). Los carotenoides forman un grupo de compuestos liposolubles que son de color amarillo, naranja y rojo, que se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza, como en plátanos, tomates, flores, chiles, achiote, etc. Existen más de 563 carotenoides de estructura conocida siendo los más comunes en la naturaleza los que se muestran en el Cuadro 4 (Baduy, 1988; Bauernfeind, 1981).

Cuadro 4. Carotenoides más comunes en la naturaleza (Badui, 1988; Bauernfeind, 1981):

Nombre	Donde se localizan
Fucoxantina	Algas.
Luteína	Cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i>).
Violaxantina	Plantas verdes.
Neoxantina	Plantas Verdes
α caroteno	Ampliamente difundido.
β caroteno	Ampliamente difundido.
Zeaxantina	Ampliamente difundido.
Licopeno	Tomate.
Capsaicina	Pimentón.
Bixina	Achiote.
Criptoxantina	Naranja y Maíz

Los carotenoides son hidrocarburos que tienen como unidad representativa a la molécula de isopreno (8 unidades normalmente) y básicamente cuentan con tres isómeros que son; α , β y γ . El mas común es el β -caroteno ($C_{40} H_{56}$) que tiene dos

anillos de ionona unidas a través de una cadena intermedia isoprenoide con diez dobles ligaduras conjugadas que contribuyen a la estabilidad y el color de los carotenoides, una de las mas importantes fuentes de extracción de carotenoides es el achiote de donde se obtiene la bixina (Badui, 1988; Deman, 1980).

2.3. El achiote como fuente de colorante.

El achiote es utilizado como fuente de colorante debido a los compuestos que lo forman que son la norbixina, orellina y bixina como colorante principal pues representa mas del 80 % de los colorantes que tiene la semilla la cual se encuentra en la cubierta exterior de esta y es de color rojo oscuro. “Es un ácido carotenóico de formula empírica $C_{25} H_{30} O_4$, que se presenta como isómero geométrico del tipo *Cis*, pero que puede convertirse en su forma *trans*, mas estable” (Jaramillo, 1992).

El colorante obtenido de la semilla de achiote se utiliza en la industria de los derivados lácteos, cárnicos, grasas, helados, cosméticos, condimentos, cerámica, pintura, tintes, jabones, esmaltes, lacas, barnices, teñido de seda y telas algodón, medicina e industria farmacéutica. Una de las presentaciones mas comunes es como la que se muestra en la Fig. 2 (Devia, 2003).



Fig 2 Presentación comercial del pigmento del achiote (anónimo 1, 2002)

2.3.1. Características generales del achiote.

El achiote (*Bixa orellana*), es originario de América tropical. Se cree que tiene sus orígenes en la hoya amazónica. Se usaba para pintura y tatuaje del cuerpo, como aun se hace en ciertas tribus nativas del sur de América, protege de la picadura de insectos, y se usaba para teñir telas de algodón y algunos utensilios de cocina, en la Fig. 3 se muestra la planta del achiote (Bernal, 1989; Sahaza, 2001).



fig. 3 Planta de achiote. (Anónimo 2, 2003)

La clasificación botánica del achiote es la siguiente (Devila, 2003): Subdivisión: Angiosperma, Clase: Dicotiledóneas, Orden: Apriétales, Familia: bixáceas, Genero: Bixa, Especies: B. Orellana Linneo, B. Sphaerocarpa Triana, B. Urucurana Willd, B. Purpurea Hort, etc.

La especie utilizada en la presente tesis B. Orellana Linneo

El rendimiento promedio de una plantación depende de ciertas variables, pero en promedio se obtienen 1 000 kg/ha de frutos secos, o hasta 2 000 en condiciones óptimas. La semilla representa entre 50 y 60% del peso total, es decir, en promedio se obtienen de 500 a 600 kg de semilla por hectárea (Canabio, 2005).

El achiote se puede desarrollar en distintos tipos de suelo pero crece de manera mas favorable en los suelos francos muy fértiles, cuando los suelos en los que crece están mal drenados estos limitan su desarrollo o incluso no hay crecimiento. Es muy resistente a la sequías, pero se desarrolla mejor con buenas condiciones de humedad. La temperatura optima de su desarrollo varía de los 24 a los 30 °C, fuera de éste rango puede presentar dificultades en su desarrollo. En la Fig. 4 se aprecia la semilla desgranada del achiote (Contreras, 1998).



Fig 4. Semilla de achiote. (anónimo 3, 1999)

2.3.2. Características fisicoquímicas del colorante de la semilla de achiote.

Los componentes principales de la semilla de achiote son (Córdoba; 1987; Mosquera, 1989; Jaramillo, 1992):

- Resina.
- Orellina (materia colorante amarilla).
- Bixina (materia colorante roja) (80%).
- Aceite volátil y aceite graso.

En los Cuadros 5 y 6 se muestran los componentes principales de la semilla de achiote señalando que es muy variada (Dávila, 2004).

Cuadro 5. Composición química de la semilla de achiote (Dávila, 2004).

Composición química (%)	
Humedad	8 – 13
Proteína	13 – 14.24
Celulosa	13.8
Fibra cruda	18.48
Almidones	11.45
Carbohidratos totales	39.91
Ceniza	4.50 – 7.97
Energía	54 kcal

Cuadro 6. Composición del pigmento de del achiote (Dávila, 2004).

Composición (g/100g)	
Proteínas	12.3 -13.2
Pectina	.23
Carbohidratos	39.91 – 47.90
Ceniza	5.44 -6.92
Taninos	.33 -.91
Pentosanos	11.35 – 14.97
Carotenoides	1.21 – 2.30
β - carotenos	6.8 – 11.30 mg

2.3.3. Bixina y norbixina.

La bixina es la parte de la semilla de achiote que presenta coloración, la cual es un carotenoide de color anaranjado, cuya fórmula es: cis-bixina (9-cis-6,6-diapocaroteno-6,6 dioato). Insoluble en aceite. Pero sometiénolo a un tratamiento térmico durante la extracción se convierte en trans-bixina (norbixina), la cual es de color rojo y soluble en aceite. El colorante producido comercialmente contiene alrededor del 0.2 – 0.25% de bixina. La Fig. 5 muestra la estructura química de la bixina y la 6 de la norbixina (Cheftel, 1989; Devia, 2003).

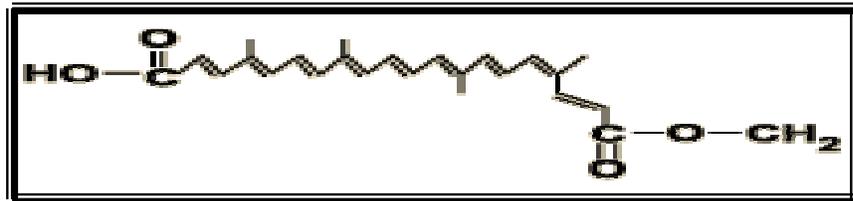


Fig. 5 Estructura química de la bixina. (Anónimo 4, 2005)

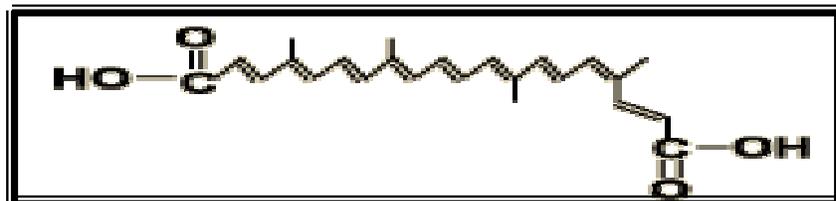


Fig. 6 Estructura química de la norbixina. (Anónimo 5, 2005)

2.3.4. Importancia comercial de la bixina.

Uno de los principales productores de achiote es Perú que en el año 2000 produjo 4,482 toneladas de semilla; otros países productores son Kenia, Costa de Marfil, Senegal, Brasil, Ecuador, Bolivia y Filipinas. En México, según el censo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación del 2000, se

produjeron en Campeche 515 toneladas, en Quintana Roo 721, en Tabasco 35 y en Yucatán 147 para consumo nacional (Canabio, 2005).

Los principales países consumidores son Estados Unidos, Europa, China, Japón, India, Brasil y Argentina (Juárez, 2000).

Estados Unidos importa este producto con una inversión de aproximadamente \$200 millones de dólares al año, con un crecimiento de 10%. Los países europeos como Inglaterra, Holanda y España han incrementado el uso de los colorantes naturales por la falta de seguridad de los colorantes sintéticos (Juárez, 2000).

En el ámbito nacional la oferta esta representada por un pequeño grupo de empresas que se dedican a importar y exportar este producto los cuales tienen una utilidad de aproximadamente 23 millones de dólares al año con un incremento anual del 10 % y los productores internacionales están representados por varios países Latinoamericanos, Europeos y Africanos (Juárez, 2000).

2.4. Métodos de extracción de la bixina.

Los productores de colorante a partir de la semilla de achiote emplean diferentes formas de extracción, de acuerdo a su capacidad económica, con diferentes niveles de rendimientos y cada una con sus propias ventajas y desventajas como se muestra continuación (William, 1980).

2.4.1. Dilución del pigmento en agua

Se lleva a cabo mediante la agitación mecánica de la semilla en un medio acuoso.

1. **Extracción:** la semilla es cocinada en agua caliente alrededor de 5 horas con agitación mecánica.
2. **Filtración:** se realiza una filtración mecánica para separar los residuos vegetales de la solución acuosa.

Estos residuos se lavan con agua para recuperar la mayor cantidad de colorante posible de las semillas.

3. **Concentración:** se evapora el agua que contiene la solución mediante calentamiento.
4. **Mezclado:** la pasta obtenida en la concentración se mezcla con grasas vegetales o animales y otros aditivos que permitan obtener un producto con una concentración de bixina adecuada a las necesidades de los consumidores.
5. **Empaque:** la pasta obtenida se envasa.

Esta técnica presenta varios problemas:

- a) Los rendimientos de extracción son bajos, ya que se utiliza el agua como disolvente, en el cual la bixina es poco soluble.
- b) La bixina se degrada por efecto de las altas temperaturas aplicadas durante la extracción.
- c) Se favorecen las condiciones para la proliferación de los microorganismos, dado el elevado contenido de humedad de la pasta verde y deficientes condiciones higiénicas.
- d) La calidad del colorante se encuentra estandarizada, y la obtenida por este método no coincide con ese estándar.

Pero tiene como ventaja bajos costos de extracción y la ausencia de contaminantes derivados del proceso (Sahaza, 2001).

2.4.2. Extracción por solventes volátiles.

La extracción del colorante del achiote por medio de solventes es la más tradicional. Si bien se han venido variando los tipos de solventes debido a la poca afinidad que presenta la bixina con el agua. Así pues, se consideran como solventes: el agua, el aceite comestible, glicoles alcalinos, o solventes volátiles, tales como el hexano, etanol, acetona, tricloroetileno, etc., cualquiera de los productos mencionados tienen la finalidad de remover el colorante presente en la capa de la semillas de achiote

siguiendo los procesos que se mencionan a continuación (Mosquera, 1989; Jaramillo, 1992):

1. **Extracción.** Se pone en contacto la semilla con el solvente y se somete a una agitación mecánica hasta liberar la mayor cantidad de colorante.
2. **Filtración.** Se pasa el líquido por un tamiz en donde se retiene la semilla.
3. **Concentración.** Se destila el solvente mediante calentamiento dejando solamente el polvo del colorante seco.

Este método presenta la ventaja de ser la más rápida y de mayor rendimiento ya que el porcentaje de recuperación puede ser mayor al 70 % del total del colorante lo cual es mucho mayor que la extracción acuosa. Por otro lado el uso de solventes como el hexano que es el solvente orgánico que más se usa para realizar este tipo de extracciones, es riesgoso ya que forma con el oxígeno del aire mezclas explosivas y además su inocuidad no está totalmente aceptada, es decir que sus restos pueden acarrear problemas para la salud, por lo que es sumamente necesario que no queden restos de este, así como incrementos significativos en el costo del proceso de extracción (Mosquera, 1989; Jaramillo, 1992; Mattea, 2002).

2.4.3. Extracción mediante tratamiento alcalino.

1. **Extracción:** esta se realiza solubilizando la bixina o colorante del achiote, en solución alcalina (hidróxido de sodio), a una temperatura de 41 °C, por un período de 20 minutos.
2. **Filtración:** en esta etapa se separan los residuos vegetales, de la solución coloreada.
3. **Precipitación:** la bixina en solución se insolubiliza precipitándola mediante la adición de solución ácida de concentración 20 % v/v.
4. **Filtración y lavado:** la bixina sólida se separa por filtración y se lava para eliminar todos los residuos de ácido que pudieran estar presentes.

5. **Secado:** Finalmente la bixina se seca a una temperatura de 60 °C hasta alcanzar un contenido de humedad del 5 %.

Desventajas:

- a. Eleva los costos de producción.
- b. En caso de que no se purifique de forma correcta resulta toxico

Ventajas:

- a. El tiempo de extracción es relativamente corto.
- b. La extracción se realiza a temperaturas controladas e inferiores a las requeridas para la degradación de la bixina (60-70 °C).
- c. Debido a los cambios bruscos de pH la proliferación de los microorganismos es baja.
- d. La humedad del producto terminado es reducida (Devia, 1999).

2.5.El uso de enzimas en la producción de colorantes naturales.

Los colorantes naturales provenientes de frutas como las antocianinas de la uva, los carotenos de la zanahoria y la clorofila de la alfalfa, se tienen que macerar o moler las biomásas secas antes de la extracción con diversos solventes orgánicos, cuando es realizado de manera tradicional. Este paso es crítico debido a que de la efectividad de esta molienda dependerá la cantidad de colorante extraído.

Una de las alternativas para aumentar la cantidad de producto a obtener en la extracción es la adición de enzimas, generalmente pectinolíticas y celulolíticas a la biomasa, para así mejorar el rendimiento de este paso, al actuar destructivamente sobre los compuestos. La cual tiene la ventaja de que no es necesario un cambio completo del proceso de obtención tradicional, lo que implica una modificación menor y facilidad de instalación, además la adición de enzimas no es una técnica nueva pues se ha empleado desde 1930 para clarificar jugos de frutas. (García, *et al*, 1999; Delgado 1997).

La adición de enzimas pectinolíticas o mezclas de estas con amilasas, durante o después del macerado se ha ensayado a nivel piloto con amplias posibilidades. El empleo de estos biocatalizadores se ha propuesto principalmente en la remoción de sólidos del extracto crudo para la obtención de antocianinas de la uva, agregándole pectinasas y amilasa fúngica, permitiendo su acción durante 4–14 días. También se ha ensayado en la extracción de los pigmentos la adición de 1000 unidades/kg. de material de celulasa, pectinasa, polisacaridasa y proteinasa por 2 horas en agitación a 40 °C en uvas, frambuesas, flores de *Delphinium* en la extracción de antocianinas y betabel, para producir betalinas. Sin embargo puede extenderse a cualquier proceso de extracción de colorantes naturales a partir de frutas y vegetales (García, *et al*, 1999).

También se ha propuesto el uso de lipasas para la extracción de carotenos a partir de la páprika. La adición de enzimas se efectúa antes de la extracción bajo agitación durante 8 horas, aumentando la eficiencia de extracción del pigmento (García *et al.*, 1999).

2.5.1. Biodegradación (descomposición orgánica)

Se refiere a la digestión, asimilación y metabolización de algún compuesto orgánico el cual es llevado a cabo por medio de enzimas presentes en bacterias, hongos, protozoarios y otros organismos. Esto debido a que todo compuesto sintetizado biológicamente puede ser descompuesto de la misma manera. En el caso de la celulosa, lignina y otros compuestos fibrosos presentan dificultades para su degradación debido a sus características químicas (Wiseman, 1985).

“La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxigeno (aeróbica) o en su ausencia (anaeróbica). La primera es más completa y libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético. Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor energía” (Branco, 1984).

2.5.2. Enzimas celulosas y hemicelulasas

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal como es el caso de la capa de la semilla de achiote la cual puede ser degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos o formando un complejo denominado "celulosoma", como en los clostridios y en bacterias del rumen (Ramírez, 2003)

Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en hongos mesófilos, tales como *Trichoderma reesei* Sin embargo, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación a nivel industrial (Lynd *et al.*, 2002).

Las celulasas son productos biotecnológicos que están a disposición en forma comercial desde hace tiempo. Producidas a través de fermentaciones microbianas de hongos mesófilos, tales como *Trichoderma reesei*. Actualmente se emplean pectinasas provenientes de *Aspergillus niger* y *A. oryzae*, en la obtención de colorantes naturales para el área alimentaria y son permitidas por la Code of Federal Regulations (CFR) y la FDA. En nuestro país no son muy empleadas las enzimas para este fin (García *et al.*, 1999).

2.5.3. Tecnología enzimática.

El descubrimiento de las enzimas y su papel como agentes catalíticos, vino a contribuir a la solución de muchos de los problemas que se tenían en la industria de los alimentos, como las enzimas ablandadoras de carne, o las enzimas clarificadoras de jugo y cervezas entre otras aplicaciones que si bien no son muchas se siguen descubriendo nuevas aplicaciones para las enzimas constituyendo una solución en busca de problemas que solucionar. Además los procesos antiguos en donde participan enzimas pudieron comprenderse y de esta manera controlarse a voluntad (García *et al.*, 1999).

Para que una enzima pueda ser utilizado a nivel industria se consideran los siguientes aspectos:

- a) Debe ser un proceso simple y aplicable bajo condiciones que minimicen el crecimiento de microorganismos contaminantes.
- b) Las enzimas que se empleen deben ser económicas, realmente disponibles.
- c) El manejo de las variables: pH, tiempo de acción, temperatura, y concentración de los componentes participantes deben ser óptimos (Duckjovich, 1995).

Hay factores que influyen en la actividad catalítica de los enzimas como son el pH, la temperatura y la presencia de los cofactores. Entre los cuales se encuentran las siguientes (Wiseman, 1985):

pH. Las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos-COOH; amino NH₂; tiol-SH; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica, este es el llamado pH óptimo. La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad (Wiseman, 1985).

Temperatura. Los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10 °C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (Wiseman, 1985).

3. Materiales y Métodos

3.1. Materia prima.

- **Semilla de achiote** (*Bixa orellana*). La cual fue recolectada en un mercado del estado de Chiapas, en el municipio de Villa Flores.
- **Enzima celulaza** donada por la Facultad de Ciencias Química de la Universidad Autónoma de Coahuila.

3.2. Materiales y equipos.

Baño Maria con agitación Felisa. Modelo: 373. Serie: 1231097

Agitador magnético: Thermolyne.

Agitador tipo bortex. Genie Mixer. Modelo: 58223.

Balanza analítica marca AND HR-200. Serie: 89003. Hecho en Japón.

Foto colorímetro marca Termospectronic. Hecho en USA.

Refrigerador.

Potenciómetro digital Cornig modelo 3D.

Desecador.

Termómetro.

Micro pipeta 1/100 µl. Marca Drad

Coladores

Material de vidrio y equipo necesario para el análisis químico proximal.

Material de laboratorio de vidrio de uso común.

3.3. Reactivos.

Solución amortiguadora acetatos, pH 4.5 (Lynch *et, al.*, 2002).

Agua destilada.

Fenol sulfúrico

Ácido Dinitro Salicilico (D. N. S.)

Sacarosa

Reactivos necesarios para análisis proximal según técnicas oficiales de la AOAC (Lynch, 1987).

3.4. Metodología.

El presente trabajo consistió en cuatro etapas, en donde se establecen las condiciones de trabajo en dicho experimento, los cuales se presentan a continuación.

3.4.1. Etapa 1.- Análisis de los componentes principales de la materia prima.

Una vez que se obtuvo la materia prima se procedió a un análisis químico de la semilla de achiote con la finalidad de cuantificar los contenidos de celulosa, fibra, lignina (Tejada,1992), humedad, grasa, cenizas y mediante el uso de las técnicas oficiales de la AOAC (Lynch, 1987).

3.4.2. Etapa 2.- Determinación de la concentración optima de enzima inicial.

Se establecieron 4 tratamientos a diferentes concentraciones de enzima inicial las cuales fueron: 1.0, 0.1, 0.01 y 0.001 % en relación (p/p) con la semilla de achiote la cual fue de 1 gr., siendo las condiciones del medio de reacción pH 4.5 utilizando para ello una solución buffer acetatos (Lynch *et al.*, 2002), temperatura 55 °C, con agitación continua (siendo estas las condiciones recomendadas por el proveedor). El proceso fue monitoreado a diferentes intervalos de tiempo (5, 60, 120, 240, 480, y 700 minutos) en función a la formación de azúcares totales y reductores mediante las técnicas del fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) y del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

3.4.3. Etapa 3.- Determinación del tiempo de contacto, para la máxima extracción de pigmento.

Se estableció un medio de reacción bajo las siguientes condiciones pH 4.5 utilizando para ello una solución buffer acetatos (Lynch *et al.*, 2002), temperatura 55 °C, con

agitación continua (siendo estas las condiciones recomendadas por el proveedor), y las concentraciones de sustrato inicial y enzimas fueron en relación al 0.1%, teniendo como control un medio bajo las mismas condiciones pero sin presencia de enzima, el proceso se monitoreo a diferentes intervalos de tiempo en función a la formación de azúcares totales y reductores mediante las técnicas del fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) y del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). y en función a la liberación y recuperación del pigmento.

3.4.3.1. Recuperación del pigmento

Una vez terminada la biolixiviación se sometieron las soluciones al proceso de liberación de pigmento el cual consistió en calentar los medio a una temperatura de 70 °C durante 30 minutos, después se agitaron constantemente para garantizar una mejor liberación. Las semillas despigmentadas se separaron del medio liquido con la ayuda de un tamiz de poro mediano, posteriormente el medio liquido se sometió a una evaporación a 60 °C en una estufa de secado hasta tener el pigmento a peso constante a fin de determinar su peso seco, y poder determinar el porcentaje de recuperación.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{colorante recuperado (g)} - \text{sólidos agregados}}{\text{muestra (g)}} \times 100$$

3.4.4. Etapa 4. Cuantificación del pigmento.

Se determino la pureza del colorante recuperado empleando el método de espectroscopia –infrarroja (EIR), para lo cual se determino la pureza de una muestra comercial, que sirvió de comparativo.

4. Resultados

4.1. Etapa 1.- Análisis de los componentes principales de la materia prima.

De acuerdo a los análisis realizados de la semilla de achiote se obtuvieron los resultados que se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Análisis componentes principales de la semilla de achiote

Compuesto.	%
Humedad	1.61 %
Celulosa	9.74 %
Lignina	3.76 %
Fibra cruda	16.9 %
Ceniza	3.51 %
Grasa	4.52 %
Bixina	1.4

Los resultados obtenidos presentan como componente mayoritario la fibra cruda (16.9 %) y la celulosa (9.74 %), lo cual hace factible el uso de enzimas capaces de degradar a este sustrato ya que es en la porción de la cascarilla donde se encuentra adherido el pigmento, la cual está constituida principalmente por fibras de este tipo.

Se puede apreciar que para el porcentaje de grasa obtenido es muy similar al reportado por Vázquez (2001), el cual es de 4.6%.

Devia (2003) reporta un contenido 18.48 % de fibra cruda el cual es similar a lo determinado en este trabajo y un 13.8 % de celulosa, la cual es mayor al que le fue determinado a la semilla con la cual se trabajó.

Las diferencias de contenido de cada uno de los componentes analizados en relación con los reportados por otros autores puede deberse a las diferentes condiciones de la

semilla como la variedad, el estado fisiológico de madurez, así como el tiempo y condiciones de almacenamiento de la semilla con que se trabajó.

4.2. Etapa 2.- Determinación de la optima concentración de enzima inicial.

En la presente etapa se determino la concentración optima de enzima sustrato para llevar a cabo el proceso mediante el seguimiento cinético de la reacción.

Se contemplo la variación de la concentración de enzima inicial y se monitoreo la formación de azúcares totales como parámetro indirecto obteniéndose los datos de velocidad inicial los cuales sirvieron como indicador de la eficiencia del proceso.

Los datos de velocidad (V_0) inicial se presentan el Cuadro 8 y son expresados como las medias del estudio efectuado, los cuales fueron sometidos a un análisis de t-student "s (apéndice A) con una $P \leq 0.05\%$, de donde es posible apreciar que las concentraciones de 1.0 y 0.10 % son las que presentan una mayor actividad, no habiendo diferencias significativas entre estas. También se observa que conforme se disminuyó la concentración de enzima la velocidad inicial de reacción también descendió siendo la de 0.01% diferente y menor que las anteriores seguida por la de 0.001 y 0.0001 %, respectivamente. Como se aprecia en el Cuadro 8 y puede reafirmarse en la Fig. 7 donde se muestran dichas diferencias.

Cuadro 8. Velocidad inicial de reacción en función a la concentración de enzima inicial

Concentración de Enzima inicial (%)	V_0 mg/ml/min.
1.0000	0.0115
0.1000	0.0105
0.0100	0.0080
0.0010	0.0045
0.0001	0.0010

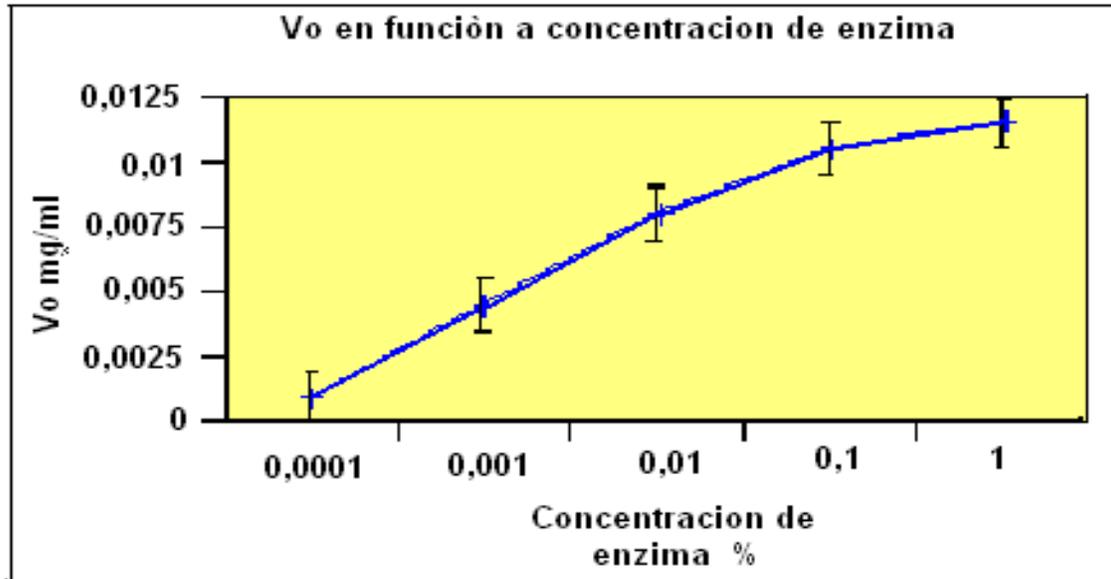


Fig. 7. Medias de la velocidad inicial en función a la concentración de enzima.

Los resultados muestran claramente que a mayor concentración de enzima inicial, la velocidad de reacción se ve incrementada hasta que se llega a un punto máximo donde el incremento estadísticamente no es significativo, por lo cual se seleccionó la concentración de 0.1 % ya que hará mas rentable el proceso.

La concentración antes determinada concuerda con lo reportado por Delgado (1997), quien en un estudio similar utilizando como sustrato flor de Cempoalxochitl reporta que la relación optima enzima sustrato es de 0.1% p/p.

4.3. Etapa 3.- Determinación del tiempo de contacto optimo para la máxima extracción de pigmento.

Una vez determinada la concentración de enzima con la cual es mas factible realizar el proceso, se procedió al análisis del tiempo al que es mas conveniente realizar el proceso, tomando como criterio tanto la degradación de sustrato (fibras, manifestado como la formación de azúcares totales y reductores), así como la mayor recuperación de colorante en el menor tiempo posible. Las Fig. 8 y 9 muestran el comportamiento de la formación de azucars totales y reductores respectivamente. Los resultados en estas graficas se presentan como las medias estimadas por mínimos cuadrados (Apéndices B y C)

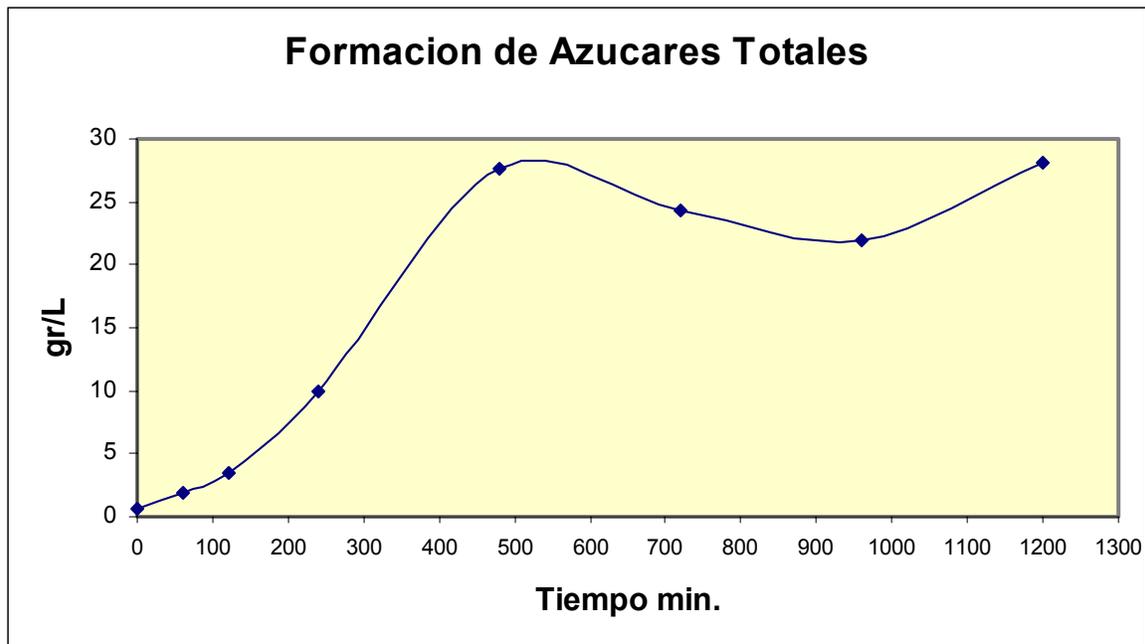


Fig. 8. Formación da azucres totales.

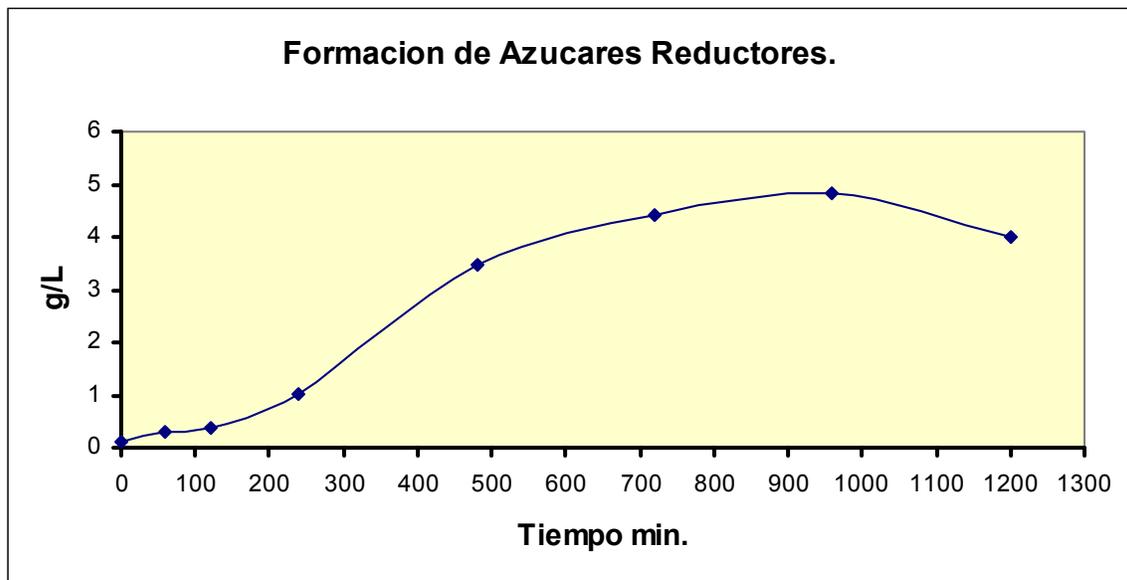


Fig. 9. Formación da azucres reductores.

De donde fue posible apreciar que la mayor formación de azúcares totales se obtuvo tanto a los 480 como a los 1200 minutos no encontrándose diferencias significativas entre dichos tiempos siendo estadísticamente diferentes al restos de los tiempos e iguales entre sí.

En tanto que para la formación de azúcares reductores se puede observar que la máxima formación se dio a los 960 minutos seguido de los 720 minutos los cuales son superiores y diferentes al resto de los tiempos monitoreados.

En el proceso de degradación de celulosa tiene como producto final la obtención de sus componentes estructurales la glucosa como lo cita Wiseman (1985), donde muestra el modo de acción de la celulasa en sistemas enzimáticos celulosa-celulasa, lo cual confirma la acción de monitorear la formación de azucares tanto totales como reductores para medir la acción catalítica de la enzima.

La Fig. 10 muestra el comportamiento de la recuperación del pigmento liberado durante las cinéticas realizadas, expresándose como las medias de los análisis de mínimos cuadrados (Apéndice D).

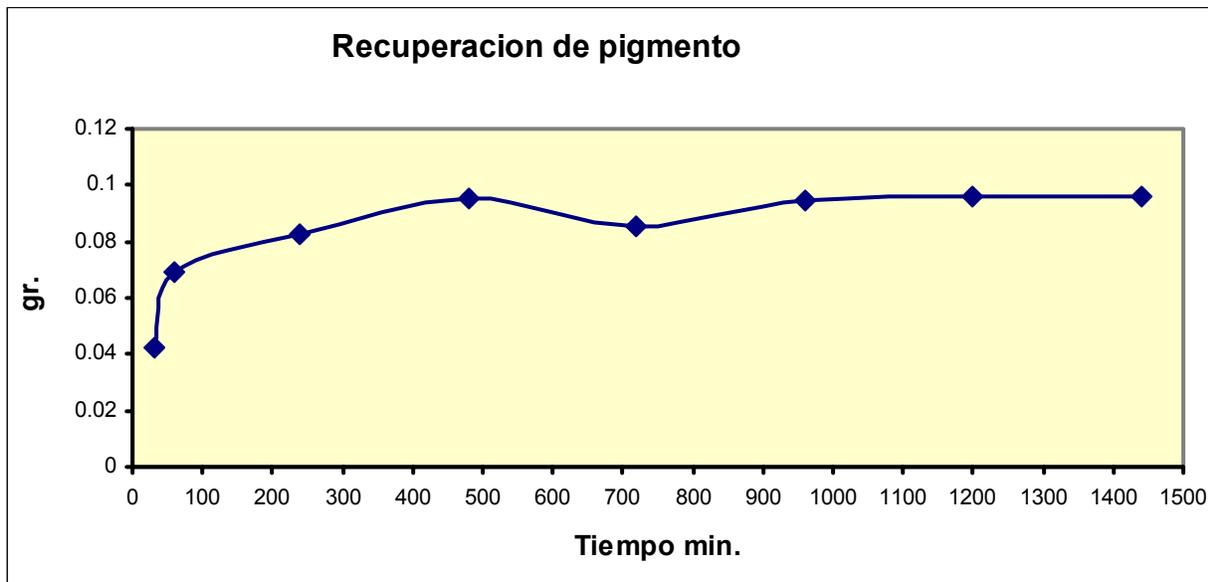


Fig. 10. Monitoreo de la máxima degradación del sustrato, con una concentración de Enzima 0.1% p/p.

De acuerdo al criterio tomado para el establecimiento de tiempo optimo de recuperación de pigmento el cual consiste en obtener la mayor recuperación de pigmento en el menor tiempo posible, se puede decir que a pesar de que a los 960 minutos se muestra la mayor degradación de las fibras a las que se encuentra adherido el pigmento, reflejado como la formación de azucares reductores, no puede tomarse como el optimo ya que desde los 480 minutos se tiene la recuperación más elevada del

colorante y en los tiempos siguientes se mantiene ese nivel de tal forma que para fines prácticos se define a este como el tiempo optimo de contacto.

4.3.1. Comparación entre tratamiento con y sin enzima.

A la par del tratamiento mediado enzimáticamente, se realizó un tratamiento sin la adición de esta a fin de comparar la eficiencia de un proceso sobre el otro, en función a la recuperación del pigmento.

Los resultados se presentan en la Fig. 11 donde se puede apreciar claramente que el proceso mediado por enzimas supera ampliamente al tradicional. Los resultados de dicha grafica se presentan como la media estimada por minimos cuadrados (Apéndice E).

Los resultados de la recuperación del pigmento muestran una eficiencia del 64% para el tratamiento tradicional y del 90 % para el mediado enzimáticamente.

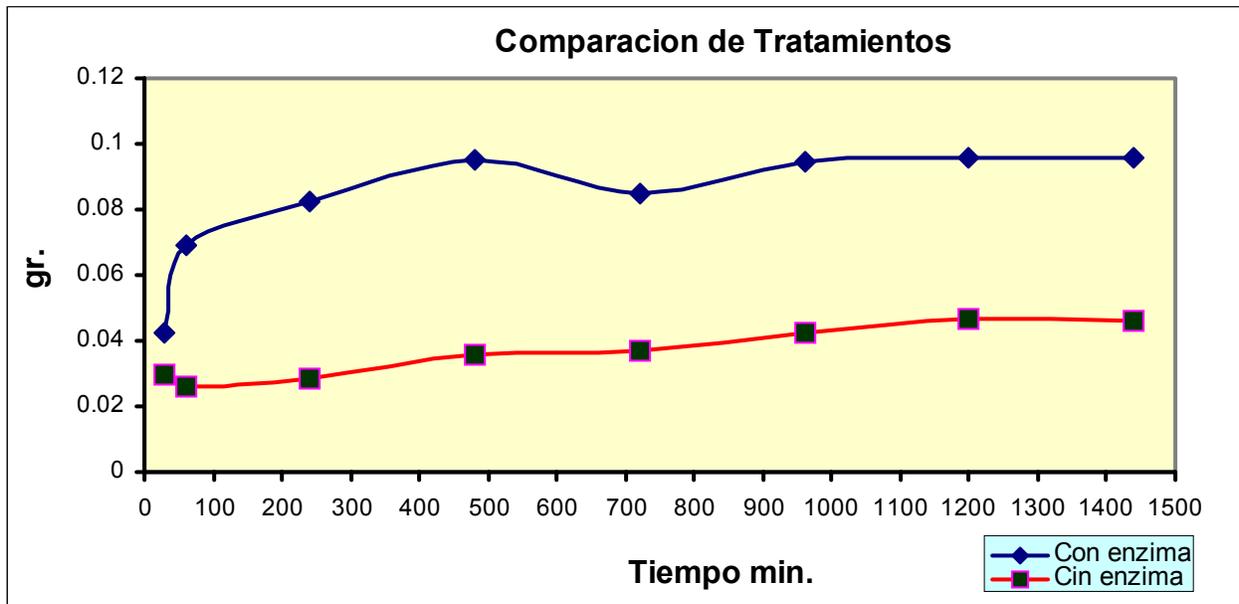


Fig. 11 Comparativo entre procesos con y sin tratamiento con celulasas, en base a gramos de pigmento recuperado.

En la Fig. 12 puede apreciarse el efecto que causa el tratamiento enzimático sobre la semilla presentándose una que ha sido puesta en contacto con la enzima en medio

acuosa y otra en el mismo medio sin enzima, donde es posible apreciar visualmente que la segunda tiene una gran cantidad del pigmento aun adherido a la cascarilla en relación con la primera en la que se observa una mínima cantidad de este y que es fácilmente desprendido a través de métodos mecánicos en un medio acuoso.

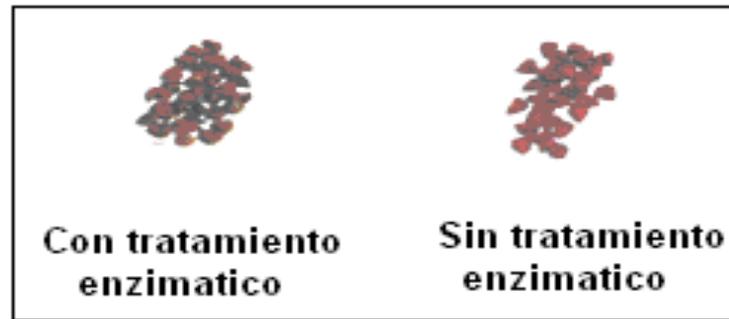


Fig. 12. Semilla despigmentada por acción de tratamiento enzimático y sin este.

Campos y Salvá (1997) Reportan un 40 % de recuperación con el método de extracción con agua el cual es menor al 60 % obtenido en el presente trabajo, lo cual puede deberse al tiempo de exposición de la semilla en el agua el cual fue de 8 horas a una temperatura de 55 °C en comparación a las 5 horas reportados por el autor.

Por otra parte, se reporta que la extracción con métodos alcalinos ofrece rendimientos superiores al 70% (Pérez, 2003, Vázquez, 2001). De acuerdo con Devia (2003), el colorante de la semilla de achiote puede extraerse hasta en un 90% aplicando el método alcalino.

Es evidente que la extracción de colorante mediante tratamiento enzimático supera al método de extracción con agua e iguala al tratamiento alcalino, además de ofrecer la ventaja de que no se usaron productos químicos de riesgo a la salud humana.

4.4. Etapa 4.- Caracterización mediante espectroscopia infrarroja (EIR)

En la Fig. 13 se muestra un espectro de infrarrojo para la pasta colorante recuperada mediante el uso de celulasas el cual es contrastado contra una muestra comercial de achiote.

En esta figura se puede observar la similitud entre ambas muestras, aunque la muestra comercial presenta unos picos más pronunciados.

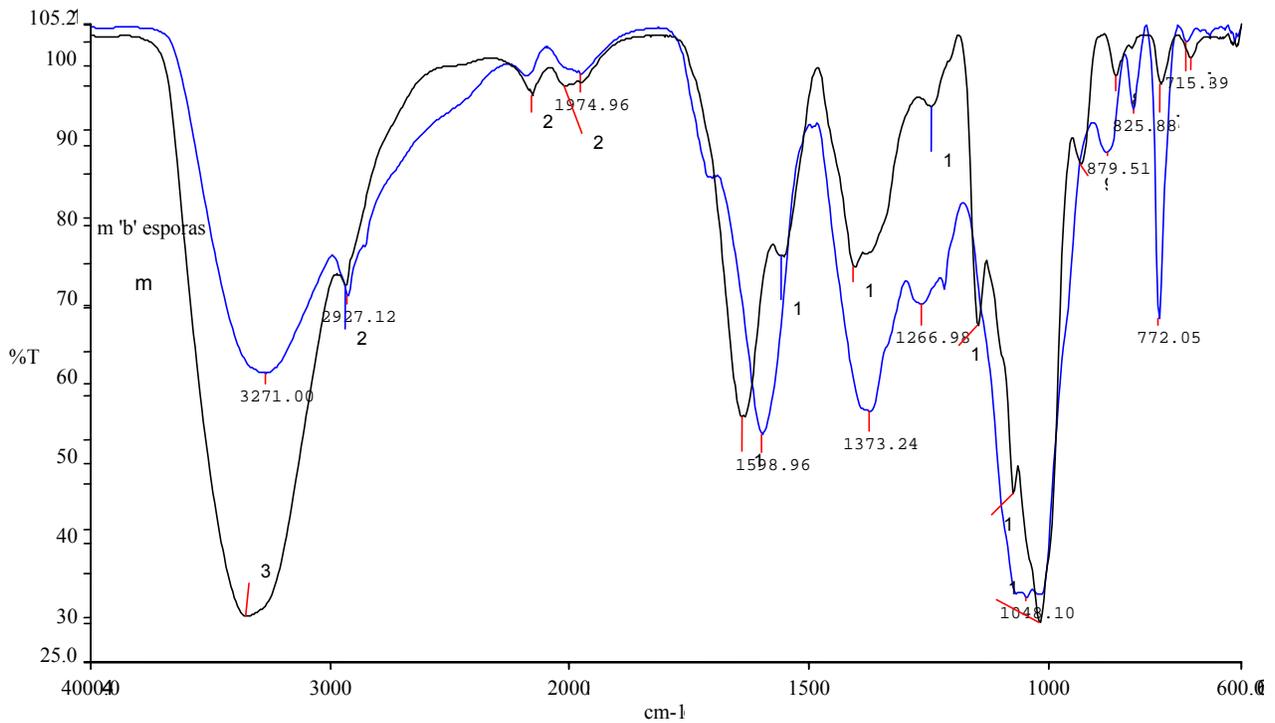


Fig. 13. Espectro Infrarrojo para pasta y colorante comercial, en donde el color azul es para la muestra con aplicación de enzima y el color negro es el comportamiento de la muestra comercial.

Estos espectros muestran un pico sobresaliente cercano a 1600 cm^{-1} , el cual es representativo de los grupos carbonilos, característicos de la estructura de la bixina. Así como en la muestra obtenida se presenta un pico en el intervalo de los 1700 a 1880 cm^{-1} aproximadamente, que aunque no es muy sobresaliente es característico de los dobles enlaces presentes en las estructuras orgánicas, las cuales son características de la bixina.

El extracto recuperado presenta impurezas como restos de fibras y sustancias solubles como azúcares.

5. Conclusiones

Del análisis de los componentes de la semilla del achiote se encuentra que los componentes mayoritarios son la fibra cruda representa el 16.9% y la celulosa con el 9.74%, por lo cual las celulasas son las enzimas mas adecuada para degradar la pared celular de la semilla en cuestión lo que facilita la liberación del pigmento adherido a esta.

A fin de establecer las condiciones del proceso se decidió que la relación enzima sustrato óptima para el mismo es de 0.10 %, similar a la reportada por Delgado (1997) en un estudio similar sobre flor de cempoatlxochitl, ya que fue la que presentó mejor actividad al comparar las velocidades iniciales obtenidas a concentraciones menores, no presentando diferencias significativas con la concentración del 1.0 %, por lo cual es la primera la seleccionada por conveniencia económica.

El tiempo de contacto óptimo para lograr la mayor liberación del pigmento resulto ser a los 480 minutos ya que es el tiempo en que se da la máxima formación de azúcares, resultado de la degradación del polímero al que se encuentra adherido el pigmento, siendo además el tiempo mínimo en que se da la mayor recuperación de pigmento, en los estudios realizados, teniendo así que las concentraciones de pigmento obtenidas en tiempos anteriores al establecido son inferiores y las obtenidas posteriormente no son estadísticamente idiferentes.

Comparando los rendimientos obtenidos entre procesos mediados con el uso de enzimas y sin este es posible observar que el método enzimático es cinco veces mas efectivo que el tratamiento tradicional empleado para dicho propósito, además de presentar la ventaja de no generar residuos tóxicos, como lo puede hacer el que se lleva a cabo mediante el uso de solventes orgánicos (Jaramillo, 1992), que es tan efectivo, en función a rendimientos, como el propuesto en el presente trabajo, pero con la desventaja toxicológica antes mencionada.

En cuanto a la caracterización espectral es posible concluir que el tratamiento aquí propuesto es adecuado ya que la pasta obtenida presenta los picos característicos para la bixina, cercanos a 1600 cm^{-1} , representativo de los grupos carbonilos, así como el de

1700 a 1880 cm^{-1} característico de los dobles enlaces presentes en las estructuras orgánicas que se encuentran en la bixina.

La desventaja que el presente tratamiento implica es que las condiciones del medio deben mantenerse controladas en lo referente a pH y temperatura que deben ser de 4.5 y 55° C respectivamente durante 8 horas, así como la necesidad de adquirir la enzima comercial lo cual eleva los costos. Teniendo por otro lado la ventaja de incrementar cinco veces los rendimientos de extracción sin que esto represente un riesgo para la salud del consumidor al no integrar partículas tóxicas en el producto durante el proceso, así como el de no generar desechos tóxicos durante el mismo.

6. Resumen

La producción de colorantes naturales para su empleo en la industria alimentaría se ha visto incrementada en los últimos años debido a las campañas en contra de los colorantes de origen químico a los que se le atribuyen diferentes problemas a la salud. Por esta razón se busca mejorar los métodos de extracción de los colorantes naturales ya que algunos presentan deficiencias en su extracción y otros incurren en el empleo de sustancias con un grado de toxicidad que compromete la salud de los consumidores.

Tal es el caso de la extracción del colorante bixina de la semilla de achiote (*Bixa orellana*), en donde se emplea sosa cáustica diluida, propilen glicol y otros disolventes de menor importancia que a pesar de que son eliminados una vez terminado el proceso quedan impregnadas partículas que con una ingesta prolongada producen intoxicación en el organismo. Con el achiote el riesgo se incrementa pues es uno de los colorantes naturales más demandados por la industria alimentaría.

En el presente trabajo se plantea una alternativa para mejorar los métodos de extracción del colorante de la semilla de achiote sin la necesidad de recurrir al empleo de materiales tóxicos. El cual consiste en romper las cadenas de celulosa que forman gran parte del material en donde se encuentra adherido el colorante y de esta manera hacerlo más disponible para ser recuperado por el método tradicional. Para lograr esto se empleó una enzima celulasa comercial, la cual actúa sobre la celulosa de la capa de la semilla de achiote, degradándola a azúcares más simples.

Para determinar la concentración de enzima con la que era más factible obtener mejores resultados de recuperación de pigmento, se estudió la actividad de cuatro diferentes concentraciones de enzima (0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001%, relación (p/p) los cuales actuaron sobre un gramo de semilla.

Para determinar el tiempo en el que existe una mayor actividad enzimática sobre la semilla se monitoreó un rango de tiempo de (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas), en donde se inactivó al enzima una vez terminado el tiempo establecido. Y se procedió a la

cuantificación de la formación de azúcares totales y reductores. Además se graficó la cantidad de colorante recuperado en cada tiempo.

Posteriormente se procedió con el método de recuperación mecánica. El cual consistió en someter al medio inactivado a calentamiento a una temperatura de 100 °C durante 15 minutos, sometiéndose posteriormente a agitación mecánica.

Se comparó la diferencia entre el tratamiento con enzima y el tratamiento sin esta pero bajo las mismas condiciones. Dicha diferencia se estableció comparando los pesos de colorante recuperado de cada tratamiento.

En lo que se refiere al análisis espectral se observó que los picos característicos para la bixina, son cercanos a 1600 cm^{-1} , representativo de los grupos carbonilos, así como el de $1700\text{ a }1880\text{ cm}^{-1}$ característico de los dobles enlaces presentes en las estructuras orgánicas que se encuentran en la bixina,. La muestra comercial tuvo un comportamiento similar.

7. Literatura Citada

- **Anónimo 1.** [www.montosogardens.com/ bixaceae.htm](http://www.montosogardens.com/bixaceae.htm), 2003
- **Anónimo 2.** [cocinamexicana.com.mx/ glosario/glosariotexto.html](http://cocinamexicana.com.mx/glosario/glosariotexto.html), 2002
- **Anónimo 3.** [www.sunpackers.com.pe/ data-products.htm](http://www.sunpackers.com.pe/data-products.htm), 1999
- **Anónimo 4.** http://www.kalsec.com/es/products/annatto_source.cfm, 2005
- **Anónimo 5.** http://www.kalsec.com/es/products/annatto_source.cfm, 2005
- **BADUI, D. S.** 1993. Química de los alimentos. Addison Wesley Longman de México, S. A. DE C. V. México D. F., México.
- **BAUERNFEIND, J.C** 1981. Natural Food colors. En: Carotenoids as Colorants an Vitamin A Precursors. J.C Bauernfeind (Ed). Academic Press, N.Y., USA, p, 1-45.
- **BERNAL, h y Correa, J.E.** *Bixa orellana*. 1989. Especies promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Tomo II. Santa Fe Bogota: Guadalupe Ltda.
- **BRANCO, S.M.,** Limnología Sanitaria, Estudio de la Polución de Aguas continentales. General Secretariat of the Organization of American State Washington, D.C. 1984. 120 p. Monografía científica Nro 28, serie Biología, OEA , pagina 119, WETZEL, R. 1981. *Limnología*. Omega. Barcelona, pagina 6949.
- **CAMPOS, G. D. y Salvá, R. B.** 1997. Utilización de enzimas en la extracción del colorante a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana* L.). Tesis Lic. Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú

-
- **CANABIO** 2005 Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Dirección de Mercadeo y Agroindustria Área Desarrollo de Producto Ficha Técnica de industrialización de ACHIOTE (bixa orellana). http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/achiote.html

 - **CHEFTEL** , Claude-Jean., Chefel, Besancon, Pierre, 1989. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos. Vol. II. Zaragoza, España. Ed. Acribia. p. 31.

 - **CONTRERAS** G. J. A. 1998. El cultivo del Achiote. INIFAP. División Forestal. Tecnologías llave en mano. Serie 1998. p. 165-166.

 - **CÓRDOBA** V., J.A 1987. "El achiote: Cultivo, Beneficio y Posibilidades de exportación". Revista ESSO Agrícola. Vo. 34. No. 1. pp. 3-7.

 - **DELGADO**-Vargas, F. Paredes, López, O. 1997. Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flower (*Tagetes erecta*). Food chemistry. 58(3); 255-258.

 - **DEMAN** J.M. 1980. Color. Chapt. 6, En: Principles of Food Chemistry. 2nd. Ed. AVI Publishing Company Inc. Weport, Connecticut, USA. P.15-51.

 - **DEVIA**, J and Saldarriaga, L. 2003. Planta Piloto para Obtener Colorante de la Semilla de Achiote (*Bixa Orellana*). Julio- Septiembre 2003. Universidad EAFIT. Medellín, Colombia. pp. 8-22

 - **DUBOIS**, M. Guilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". Anal. Chem. 28:530.

- **DUCKJOVICH**, A.; **ESQUIVEL**, G. 1995. Extracción, purificación y caracterización de la proteasa del trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) y su posible aplicación en la industria alimentaria. Tesis de maestría en biotecnología de enzimas. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, Mexico.

- **FAO/OMS 8°** Informe del comité mixto de expertos en aditivos alimentarios. Normas de identidad y pureza para los aditivos alimentarios y evaluación de su toxicidad: colorantes alimentarios y algunos anti microbianos y antioxidantes. Roma, 1966.

- **FAO/OMS 14°** informe del comité mixto de expertos en aditivos alimentarios. Evaluación de los aditivos en los alimentos, FAO/OMS. Roma, 1970.

- **FDA** 1986 Food and Drug Administration. Radionuclides in Foods- Derived Intervention Levels. Compliance Policy Guide 7119.14, Section 560.750; 1986.

- **FENNEMA**, R. O. 2000. Química de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 773-805.

- **GARCÍA**, M., **QUINTERO**, R. y **LÓPEZ-MUNGUÍA**, A. 1999. Biotecnología alimentaria. Ed. LIMUSA. México D. F., México. pp. 479-502

- **JARAMILLO** Moreno, C. A. **Muños** Moreno, O. A. 1992. Extracción del colorante de achiote. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Medellín: Universidad Nacional. Facultad Nacional de Minas. Departamento de Procesos Químicos.

- **JUÁREZ** Rojop, Gladis M.I. 2000. Proyecto agroindustrial de producción intensiva de achiote (*Bixa orellana L*) en Tabasco.

- **LYND**, L. R.; P. J. Weimer, W. H. van Zyl y I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 66 :506-577.
- **LYNCH**, M. J. R., S. S. Mellor, D. L. Spare, D. P. Inwood, H. M. J. 1987. Métodos de Laboratorio. Vol 2. 2ª ed. Nueva Editorial Interamericana. México, D. F. pp. 1446-1447.
- **MATTEA**, M. 2002, Extracción de productos naturales a partir de especies vegetales. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Corto, Córdoba Argentina, Año No 2.
- **MILLER**, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars" *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- **MOSQUERA** P., J et al. 1989. Factibilidad técnica e industrial de la extracción del colorante del achiote. Trabajo de grado ingeniero químico. Medellín: Universidad de Antioquia. Facultad de ingeniería.
- **NOM-038-SSA1-1993** Colorantes orgánicos sintéticos. Especificaciones sanitarias generales. Publicación en DOF: 7 feb. 1995.
- **PÉREZ**, M. y Becerra, R. 2003. El achiote. *Biodiversitas*, Boletín bimestral de la CONABIO. 46: 7-11
- **RAMÍREZ**, P. y COHA, J. M. 2003. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Perú Biol.* [en línea] 10(1)
- **RODRÍGUEZ** Montoya Martha Catalina. 2002. Importancia de los colorantes en la industria alimentaria.

- **RODRÍGUEZ**-Esquivel, I.R. Extracción enzimática de bixina de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L.). Proyecto de Graduación. Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos, San José (Costa Rica). P. 39. San José. Universidad de Costa Rica. CR. 1994.

- **SAHAZA** Cardona, D.P. 2001. El achiote. Disponible en: www.unalmed.edu.co/~crsequed/ACHIOTE.htm .

- **SEMINARIO DE AGRONOMÍA** (1990). El achiote (*Bixa orellana* L.). Memorias del seminario de agronomía Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de agronomía.

- **TEJEDA** Hernández Irma. 1992. Control de calidad y análisis de los alimentos para animales. México, D.F.

- **VAZQUEZ**, H. C. 2001. Estudio preliminar de la degradación de bixina en polvo en los diferentes tipos de empaques y temperaturas establecidas. Tesis Lic. Instituto Tecnológico de Villahermosa. Villahermosa, Tabasco, México.

- **WILLIAM G.** 1980. Schultz. Method of Removing Pigment From Annatto Seed.. El Cerrito, California, EEUU.

- **WISEMAN, A.** 1985. Manual de Biotecnología de los enzimas, ed. Acribia, Zaragoza España.

8. Apéndice

Apéndice A :T studennt's Vo enzimas

Level					Least Sq Mean
1	A				0,01150000
0,1	A				0,01050000
0,01		E			0,00800000
0,001			C		0,00450000
0,0001				D	0,00100000

Apéndice B: T student's de azucares reductores para tiempo optimo.

Level					Least Sq Mean
0,001,1200	A				28,101862
0,001,480	A				27,562040
0,001,720	A	B			24,346581
0,001,960		B			21,936943
0,001,240			C		9,974808
0,001,120				D	3,418714
0,001,60				D	1,869660
0,001,0				D	0,641371

Apéndice C: T student's de azucares reductores para tiempo optimo.

Level						Least Sq Mean
0,001,960	A					4,8198350
0,001,720	A	B				4,4223393
0,001,1200		B	C			3,9900626
0,001,480			C			3,4633807
0,001,240				D		1,0118255
0,001,120				D	E	0,3862665
0,001,60					E	0,2958362
0,001,0					E	0,1229256

Apéndice D: T student's recuperacion de pigmento para tiempo optimo

Level						Least Sq Mean
0,1200	A					0,53290000
0,1440	A					0,53260000
0,480	A					0,52895500
0,960	A					0,52580000
0,720	A	B				0,47295000
0,240		B				0,45800500
0,60			C			0,38315000
0,30				D		0,23576000

Apéndice E: T student's comparación de tratamientos con enzima y sin enzima.

Level										Least Sq Mean
0,1200	A									0,53290000
0,1440	A									0,53260000
0,480	A									0,52895500
0,960	A									0,52580000
0,720		B								0,47295000
0,240		B								0,45800500
0,60			C							0,38315000
0,1200				D						0,26975000
0,1440				D						0,26590750
0,960				D	E					0,23820000
0,30				D	E					0,23576000
0,720					E	F				0,21477500
0,480						F	G			0,18777500
0,240							G	H		0,16727500
0,60								H	I	0,13660000
0,30									I	0,11911000