

Universidad Nacional de Ingeniería

PROGRAMA ACADEMICO DE INGENIERIA

QUIMICA Y MANUFACTURERA



**PROYECTO DE INVESTIGACION TECNOLOGICA
OBTENCION DE LA BIXINA A PARTIR DE LA CUBIERTA
DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE
(BIXA ORELLANA LINNEO)**

T E S I S

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE

INGENIERO QUIMICO

MIGUEL ANGEL CASTRO MOREANO

LIMA ★ PERU ★ 1978

RESUMEN

El presente tema de Investigación Tecnológica, tiene por finalidad la obtención de la Bixina (Bixa Orellana L.) a partir del colorante orgánico que se obtiene de la cubierta de las semillas de Achiote.

La Bixina obtenida del Achiote, es utilizado ampliamente en el consumo doméstico, como colorante de alimentos cotidianos, en la Industria Farmacéutica (en la preparación de diferentes medicamentos), en la industria textil (para teñir y colorear diferentes clases de telas) y especialmente en la industria de los alimentos para colorear productos lácteos (mantequilla, margarina, quesos, helados, chocolates, etc.) a los que se agrega un alto valor nutritivo por contener vitaminas "A", "D" y "C", Finalmente en la fabricación de cosméticos, es el colorante de suma importancia, por su cualidad y ausencia de toxicidad y poder alergizante.

La materia prima (semillas de achiote) es producida en gran cantidad en el territorio nacional. La estadística agraria reciente, indica que en el Perú, se producen más de 1545 tm. anuales en más de 3049 has. sembradas, cuyo rendimiento son superiores a los 600 kg. por ha. El valor estimado del achiote producido en el país, es en soles; \$ 4'300,256.00. Lima, Cuzco, Junín, Loreto, San Martín, Piura, Cajamarca, La Libertad, Huánuco, Ayacucho, Puno y Pasco son los Dptos. productores en orden

de cita.

La Organización Mundial de la Salud, ha prohibido terminantemente el uso de colorantes que pueden ser dañinos para la salud, en los alimentos: para ello recomienda el uso de colorantes orgánicos, dentro de los cuales la Bixina, es el más utilizado, no sólo por su gran calidad como colorante, usos múltiples y contenidos de vitaminas "A", "D" y "C", sino también por sus comprobadas propiedades no cancerígenas.

La constitución de la Bixina, extraída de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) han sido establecidas como el éster monometil de 3,5,7,9,11,13,15,17,19, del ácido tetracosadecanoico, el cual es un carotenoide (pigmentos naturales, generalmente de color amarillo, rojo o púrpura, que se halla en muchas plantas y grasas de animales). La Bixina, sus isómeros y sus productos de dimetilación tienen esencialmente absorción idéntica espectral en la región visible, además puede indicar que el color del extracto crudo es debido enteramente a estas sustancias, ya que el espectro de absorción del crudo, para la luz visible es super-imponible, ya sea en fracción bixina o sus isómeros. La bixina forma cristales rómbicos de color pardo rojizo que se funde a 198°C.

En cuanto a las técnicas y métodos, que se seguirán para la obtención de este cristal, lo primero que se expondrá, será la selección adecuada de la materia prima, para que con ella, usando la tecnología adecuada y los métodos de extracción de colorantes más convenientes, obtener la bixina de la semilla.

Es bien sabido que el achiote presenta diferentes variedades, cuyas semillas contienen cantidades variables de colorantes, de diferente calidad, para lo cuál escogeremos semillas representativas de las regiones productoras de achiote en el Perú, y con ellas se realizará los ensayos, con el fin de obtener un resultado más cercano a la realidad.

En el proceso de extracción de los colorantes (annatto) de las semillas, se ensayarán diferentes tipos de solventes, la temperatura de extracción más adecuada, el pH óptimo, etc. Dentro de estos métodos existen: Lixiviación con agua y sustancias alcalinas, extracción con solventes (aceite comestible, glicol, cloroformo, etc.) Para poder aislar la bixina del annatto se ensayarán algunos métodos, tales como: El de ETTI, DUMONTAL, el de ZWICK, etc. Los cuáles representan métodos convencionales de extracción, que irán acompañados con posibles métodos hallados durante la investigación. Dentro de las variables o parámetros que se debe analizar se tiene la eficiencia de la extracción de colorantes contenido en las semillas por los diferentes solventes a ensayarse; luego se analizará la densidad, la concentración y calidad de los colorantes, así como los carotenos y la bixina contenida. Al analizar la Bixina obtenida en el laboratorio, el cuál es nuestro principal objetivo; se verá su forma de cristalización que toma al final del proceso, el color del cristal, su punto de fusión, bandas de absorción, análisis de cromatografía (para el reconocimiento de derivados), como los princi-

pales parámetros de investigación, además se incluirá las diferentes formas (a modo de referencia) de como se puede presentar la bixina en el mercado (como sal, metilado, polvo, acuoso etc) Todo este proceso de información será resumido en cuadros porcentuales los cuáles mostrarán las cualidades antes citadas. Un posible método de industrialización (proceso) será referido, el cuál será fácilmente aplicable a nuestra industria.

Por lo tanto; considerando que en la actualidad casi toda la producción de achiote es exportada a los EE.UU., Canada , Alemania Federal y Japón, países en los que se obtiene la Bixina pura, que luego tenemos que importar para su uso en las diferentes industrias ya citadas, teniendo que pagar altos precios y gastar numerosas divisas por la importación de un producto terminado pero que se obtiene de una materia prima producida, en el territorio nacional. La industrialización del achiote, podría evitar la exportación de la materia prima, obtenida en el país el colorante que la industria necesita; el fin pues de esta investigación, es tratar al grano, para aprovechar su colorante y establecer si fuera posible la tecnología más adecuada o en su efecto, dejar una información en bien de una futura industrialización.

I N D I C E

Contenido	Página.
I .- INTRODUCCION	1
II .- CONCEPTOS AGRONOMICOS DEL ACHIOTE	3
II.1. Clasificación Botánica	3
II.2. Características Principales	3
II.2.1. Producción	4
II.2.2. Variedades	5
II.2.3. Climas, etc.	6
II.3. Producción Nacional.	7
III .-COMPOSICION QUIMICA DEL ACHIOTE	8
III.1.Estructura Química	11
III.2.La Bixina y sus componentes relacionados	13
III.3.Análisis de Cromatografía;	17
-de papel,	
-de capa fina y columna.	
III.4.Colorante del Achiote: Annatto	20
IV .- EXTRACCION DE COLORANTES DEL ACHIOTE	22
IV.1. Factores que influyen en la extracción	23
IV.1.1. Tamaño del grano	23
IV.1.2. Solvente adecuado	23
IV.1.3. Temperatura óptima	24
IV.1.4. Agitación	24
IV.2. Métodos de Extracción.	25
IV.2.1. Lexiviación con agua.	25
- fría o	
- caliente.	

IV.2.2. Lexiviación con hidróxido de sodio.	27
IV.2.3. Extracción por medio del aceite comestible.	32
IV.2.4. Extracción por medio del propilen glicol alcalina.	38
IV.2.5. Extracción por medio del alcohol etílico u tricloro-etileno.	43
IV.2.6. Extracción por medio del cloro - formo.	44
IV.2.7. Extracciones diversas.	46
IV.3. Especificaciones de color.	53
IV.4. Pruebas Experimentales.	56
IV.4.1. Composición de las diferentes preparaciones de annatto obtenidas por los diferentes métodos en el laboratorio.	65
IV.4.2. Resultados.	66
V .- OBTENCION DE LA BIXINA.	70
V.1. Pruebas en el laboratorio, Métodos.	70
V.1.1. Método de Etti.	71
V.1.2. Método de Dumontal.	71
V.1.3. Método de Zwich	72
V.1.4. Método de Heiduscha y Panzer.	72
V.1.5. Método complementado para la obtención de la Bixina, estableci-	

do en la investigación.	73
V.2. Determinación de Calidad.	74
V.2.1. Porcentaje de Pigmentos.	76
V.2.2. Porcentaje de Bixina	78
V.2.3. Análisis de Cromatografía	79
V.2.3.1. Método de Análisis.	80
V.3. Pruebas en el laboratorio	83
V.3.1. Resultados.	85
V.4. Consideraciones.	88
VI.- MÉTODO SEMI-INDUSTRIAL DE PRODUCCIÓN DE ANNATTO	89
VII.- INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE COSTOS.	97
VII.1. Inversiones.	98
VII.2. Costos Variables.	102
VII.3. Costos Fijos.	106
VIII.-OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES.	111
IX .- BIBLIOGRAFIA.	113

INVESTIGACION TECNOLOGICA

Tema:

"OBTENCION DE LA BIXINA A PARTIR DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE"
(Bixa Orellana L.)

I .- INTRODUCCION.

La Bixa Orellana, nombre con el que se le conoce al Achiote, es un gran arbusto nativo de América Tropical, y es cultivado, ahí, en El Caribe, en La India, en el este de Africa y desde hace mucho en nuestra región nacional. La planta florece a un nivel de 4000-pies, y se propaga por medio de sus semillas. Los frutos son recolectados cuando su madurez esta pronta y son puestos a secar. Al secarse la cáscara se rebientan, lo que facilita el desgranado.

El pigmento puede ser extraido de la semilla, a este extracto se le llama anato. El anato es usado exclusivamente para dar color a los alimentos y tintes, a parte de una serie de usos que se le dan actualmente. Solo 2-4 por ciento de pigmento es obtenido de las semillas.

Muchos de los indios americanos eran habilísimos creadores de colorantes. Actualmente a lo largo del amazonas hay indios que se pintan la cara con un encarnado brillante llamado "urucu". Lo obtienen de la roja envoltura carnosa de la semilla de la bixa. Este colorante color fuego, es uno de los colores rojos más durables que se conoce, prueba de ello, es el descubrimiento hallado en los templos de nuestros antecesores, los incas, de una pequeña-

cantidad, que según los estudiosos al respecto, deben tener aproximadamente unos tres mil años de antigüedad. En realidad el nombre con el que se le conoce varía de acuerdo al lugar, por ejemplo, en Alemania le dicen el Kuku, en Francia y en Inglaterra Koucou, en Italia Bixa, en Portugal Oriana urucu, en los Estados Unidos Annatto.

El principal pigmento de las semillas del Achiote, es la Bixina, el cuál es un carotenoide, los cuales también se hallan en muchas plantas y grasas de animales.

La Absorción compleja del espectro que da las diferentes preparaciones de annatto, no son parejos, esto es por la cantidad de pigmentos considerables que no son Bixina, existentes en estas preparaciones. Esto es, los productos intermedios que se forman en la elaboración de extracción. Se ha demostrado que la bixina disu en un aceite vegetal y en otros solventes, dan una serie de complejos de isomerización y reacciones de degradación cuando es calentado para extraerlo.

Bajo un punto de vista espectrofotométrico el bixina y sus productos de transformación pueden ser agrupados en dos clases para determinaciones combinadas. La primera clase, incluye la Bixina y sus isómeros, los cuales exhiben un máximo de cerca de 500 a 470 mu. de cloroformo. Los pigmentos amarillos comprenden la segunda clase, indicando un máximo de cerca de 404 y 428 mu en el mismo solvente. Lo interesante de las preparaciones de extracción del achiote, es conocer el porcentaje de Bixina que contiene el

preparado, como también el porcentaje total de pigmentos. Dentro de los puntos de investigación se darán métodos para calcular estos porcentajes.

II .↵ CONCEPTOS AGRONOMICOS DEL ACHIOTE.

La investigación realizada, ha tenido como materia prima , producto nacional. Los principales productores de achiote en el Perú por cantidad producida.son: Lima, Cuzco, Junín, Loreto, San Martín, Piura, Cajamarca, La Libertad, Huánuco, Ayacucho, Puno y Pasco.

La variedad de este grano en nuestras regiones varían, es por eso que se tomarán para todas las pruebas las más representativas, entre estas tenemos: Junín, Cuzco, y Huánuco. Los siguientes puntos darán la morfología general del Achiote.

II.1. Clasificación Botánica.

La podemos clasificar (1), de la siguiente manera:

clase : Dicotiledóneas

orden : Parietales.

Sub-orden: Cistinae.

Sub-división: Angiosperma.

Familia: Bixáceas.

Género : Bixa.

Especie: Bixa Orellana Linneo.

II.2. Características principales.

El Achiote es un arbusto o árbol, que mide de 3 a 6 metros,

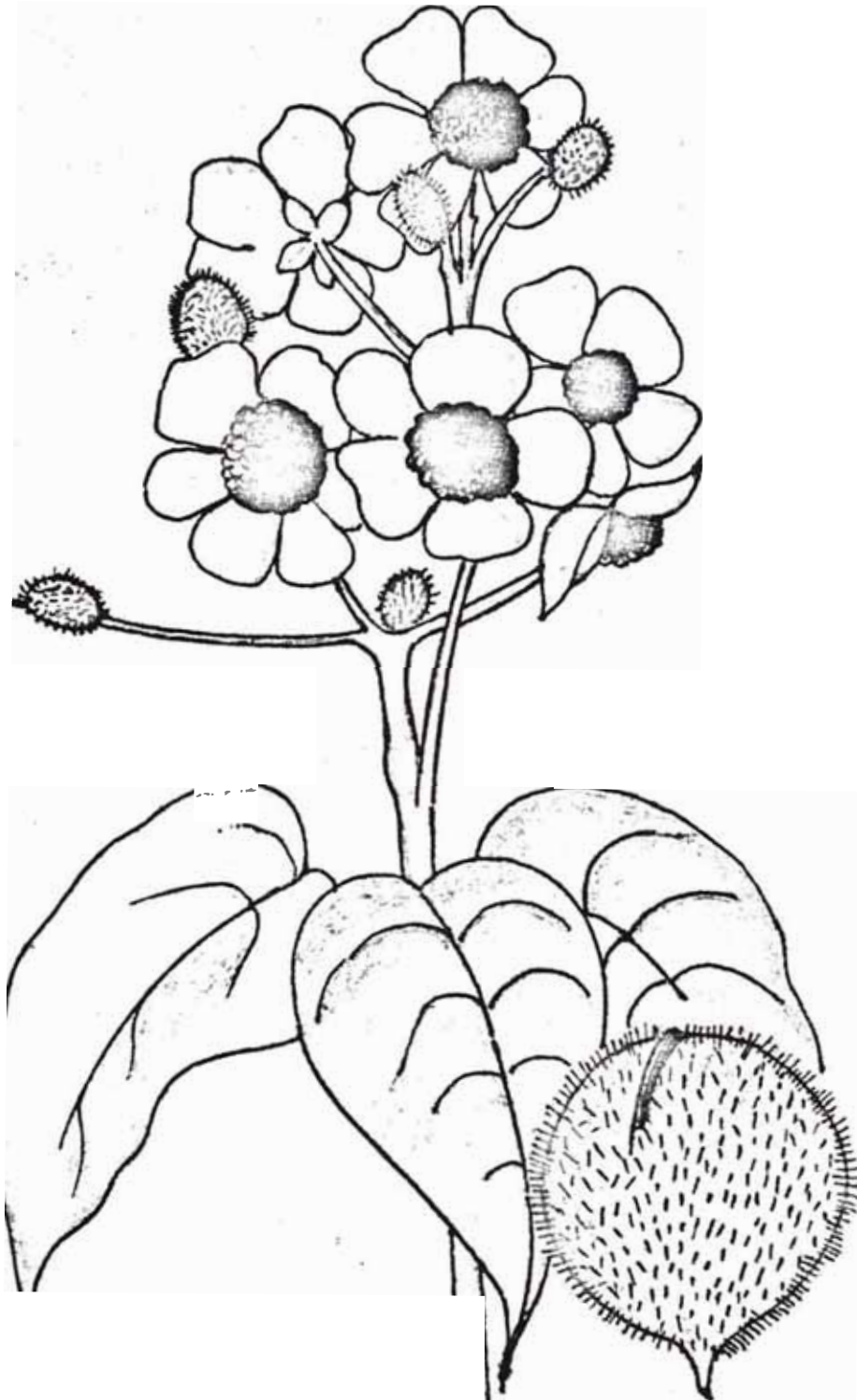
llegando a alcanzar excepcionalmente hasta los 10 metros de altura. Las hojas son acorazonadas (2), inflorescencia racimosa, el tamaño y color de las flores varían de acuerdo al colorante que poseen, variando este color claro hasta oscuro y los más grandes producen un color rojo claro.

Siendo el fruto, lo que constituye la parte más importante de esta investigación, su conocimiento será más detallado.

Este es una pequeña cápsula que no solo tiene una forma, presentan una forma hemisférica, ovoide, elipsoidal, cónicas, etc. cubiertas de espinas largas y suaves en la mayoría de los cultivos, lisa en algunos mutantes africanos, son rojos en la madurez y se abren en dos valvas, las paredes son delgadas y en lado interno de cada valva hay una placenta que se prolonga en una membrana blanca adherida en parte a las paredes del fruto. Cada pared lleva numerosas semillas cónicas o triangulares de 3-4 mm. de largo y que tienen 2-3mm. en la base, recubierta por una membrana fina y blanquizca; debajo de esta hay una capa de estructura acuosa, que tiene el colorante, en él cuál conforme madura el fruto, aparece en la superficie de las semillas en papilas rojas que llegan a cubrir las por completo.

II.2.1. Producción.

La producción de achiote, varía de acuerdo a cada región, pero en general, se puede tener un rendimiento de 500-600 Kg/ha. y en máximo de 1500-2000 Kg/ha. (de acuerdo a la fertilidad del suelo donde se siembra el achiote). El achiote puede ser cosechado -



"El Achiote"

Fig.II.2.1. *Bixa Orellana* L. (veáse en la parte inferior al fruto).

en inicio después de los 2 a 3 años. Se dará mayor énfasis a nuestra producción anual, en el punto de análisis de costos, donde su conocimiento será de gran ayuda para hacer el estudio de factibilidad económica.

II.2.2.Variedades.

Principalmente, las variedades que presenta este grano, radican en el fruto. También se conoce variedades por el color de sus frutos. Las semillas de forma cónica, se dicen que son las más rendidoras que los de forma hemisférica, no por contener más colorante en la semilla, sino por producir más frutos (3).

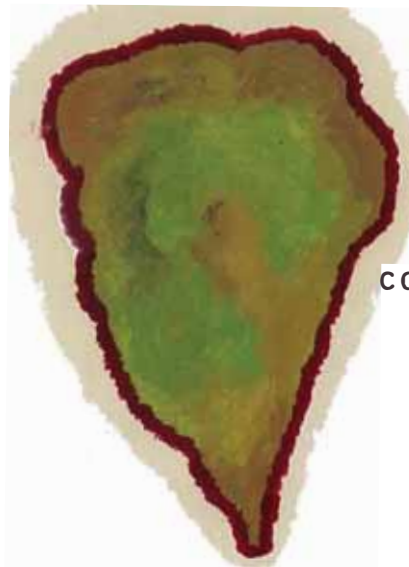
Los estudios que se han realizado sobre los colorantes, que tiene las semillas de Bixa Orellana L. en el país han sido muy pocas. Cabe mencionar en este punto, los estudios realizados por García Guillinta en el año de 1956 (UNA), ref. (5), donde tomando muestras de semillas de Tumbes, Chanchamayo y el Cuzco, obtiene los siguientes resultados:

TABLA II.22.1

Región		Cuzco	Chanchamayo	Tumbes
Annatto (%) (colorante)	prom.	23.7	23.5	22.2
Bixina (%) (Cristales)	prom.	6.0	6.3	6.2
Tamaño del grano(mm)	prom.	3.0	3.0	3.0
forma	T r i a n g u l a r			
Humedad(%)	prom.	12.7	12.1	11.9
cenizas(5)	prom.	6.4	6.5	6.8



a. Semilla de Achiote.



colorante.

b. Corte transversal de la semilla

Fig. II.2.2. Semilla de Bixa Orellana L.

podemos deducir, que las muestras de semillas de Chanchamayo y la de Tumbes (según tabla) son las más satisfactorias.

II.2.3.Climas.

En la revista de Agricultura Tropical (4) y también en los Fundamentos de Cultivos Tropicales (3), llegan a la conclusión - que para la producción de achiote no se requiere de suelos muy exigentes y de climas áridos cálidos (como las regiones de Tumbes, Piura, etc.). De acuerdo a esto vemos que el achiote se produciría en forma óptima en toda nuestra región tropical, particularmente en la región de la selva. Este es un producto que crece desde el nivel del mar hasta cerca de 3000-4000 pies de altura.

La contribución que nos da el colorante de las semillas de achiote, teniendo como principal pigmento la Bixina, para la utilización en las diversas facetas industriales, son muy importantes, por eso es consecuente informar, a estas diversas utilidades.

En el campo doméstico:

Generalmente, su uso es empleado en la alimentación humana, pero también hoy en día, se puede utilizar como alimentos para las aves de corral, porque se ha comprobado, que después de la separación del colorante del achiote, lo que resta es una sustancia con gran cantidad de vitamina A. Habíamos dicho que el achiote se dá de comer a las aves de corral para que estas pongan huevos con yemas bien rojas, las cuales serían nutritivos para el mismo hombre por el aumento de carótenos (es el que se manifiesta por

el color).

En el campo medicinal:

Su conocida acción antiséptica viene siendo usada desde hace mucho tiempo. Los colorantes obtenidos pueden servir para colorear productos medicinales, y a la vez agregar sustancias (como la vitamina A, D y C), nutritivas a ellas. Tenemos los estudios de De Jesús, en sus ensayos Biológicos del annatto para la actividad de la vitamina A; los de Ampiee, M, en la Vitamina A y la provitamina A en el annatto (Rev. Biol. Trop. Univ. Costa Rica, 4:227-223, 1956); la de Santamaría y Martines en la actividad de la Vitamina A de las semillas de achiote (Federation Proc. 18:2143, 1959); y la que es la más importante; la de Squibb y Guzmán en la Retención de la Carotina y de la riboflavina y niveles séricos de vitaminas en las ratas carentes de vitamina A alimentadas con 4 forrajes, Achiote y aceite de palma africana (B. of Sanit. Panamer., Suppl. 1:62:68, 1953). Lamentablemente estudios recientes no se han hecho, los cuales se han estancado por la presencia de productos sintéticos coloreados, no recomendados.

En el campo industrial:

Es el campo donde más nos interesa y en donde más se puede aplicar. Se puede utilizar en la industria de los tejidos como un buen tinte, para las pinturas como los barnices; para dar color a aceites esenciales, etc. Los colores del achiote resisten mucho tiempo a la acción del Hipoclorito de sodio, y los diferen-

tes estearatos (jabones), pero son oxidados con el aire produciendo compuestos homólogos. La utilización en la tintura de productos lácteos es primordial, ej., para teñir la margarina, la mantequilla, los quesos, galletas, postres, conos de helados, pasteles, etc.

II.3. Producción Nacional.

Se ha establecido que en el Perú, se producen más de 1545-tm. anuales, en más de 3049 has. sembradas, cuyos rendimientos son superiores a los 600 kg. por ha. (estadística 75).

La mayoría de esta producción se destina a la exportación.

Los principales productores de Achiote en el Perú son: Lima, Cuzco, Junín, Loreto, San Martín, Piura, Cajamarca, La Libertad, Huánuco, Ayacucho, Puno y Pasco (por orden de producción).

Se podría decir que, todo lo que se produce se exporta ya que el Perú, todavía no tiene una industria que se dedique a la industrialización del achiote (como producto de transformación).

La estadística reciente, demuestra que los principales países que nos compran el achiote son:

TABLA II.3.1

Paises	% de Exportación.
(1) EE.UU.	53 %
(2) Puerto Rico	16 %
(3) Gran Bretaña	15.6%
(4) Italia	8.5%
(5) Argentina	3.6%
(6) Alemania Occ.	2.2%
(7) Japón	1.1%

El costo del valor del achiote exportado asciende a la suma de 1,051\$ el Kilogramo de achiote (precio en fob), por lo tanto si la exportación fué de 773,885 kg. de semillas de achiote, - la suma en \$ del total vendido sería \$ 813,489. Teniendo como - principales exportadores con más del 60% de lo exportado, al De - partamento del Cuzco (provincia de La Convención), seguido de los Departamentos de Arequipa (20%), Lima (11%) y Trujillo (9%).

Si consideramos que el colorante producido en estos países nos es vendido a un precio superior #200 la libra, nos daríamos - cuenta que pagamos un precio muy elevado por el proceso de extrac - ción. (estadística hasta Diciembre del año 1977, Ministerio de Comercio, Of. de Informática y Estadística).

III, COMPOSICION QUIMICA DEL ACHIOTE.

La Bixina, como pigmento se conoce desde hace mucho tiempo, pero en una forma empírica. Los estudios químicos comienzan en el siglo XVIII, con el estudioso CHEVRGOL. En nuestros días, todavía no podemos decir con exactitud la cantidad de isómeros que tiene - la episperma de esta semilla, pero estudios recientes, aproximan - una cantidad de pigmentos que es muy satisfactorio, para nuestro - estudio.

Nos interesa conocer aún más sobre ésta semilla, en cuanto - a los análisis biométricos y fitoquímicos, un informe mensual (5) nos da cuenta de lo expuesto; entre estos podemos citar:

TABLA III.1

Composición de las semillas de Achiote.

Departamento	Perisperma	Episperma	Testa.
Junín	68	26	6
Cuzco	70	22	8

TABLA III.2

Composición química de las partes constitutivas del achiote peruano.

Perisperma.

Humedad	28-30%
Célulosa	45-50%

	Pigmentos	4-6 %
	Azúcares	3-5 %
	Aceites esenc.	0.3-0.8
Episperma.		
	Célulosa	1.20%
	taninos	1.60%
Ac.	Ac.esenc.	0.06%
Testa		
	Ac.esenc.	0.10-1.10%
	ceras.	0.20-0.30%
Tegmen		
	ac.esenc.	8.00-10.0%
	Cénizas	1.60-1.80%

TABLA III.3

Composición de las semillas frescas de Achiote (100 gr. por muestra).

Parámetros	Valores	Nºde Muestras.
Humedad.	84.4 %.	100
Proteínas.	0.0 gr.	100
grasa.	0.4 gr	100
Carbohidratos.	15.2 gr.	100
Fibra.	0.6 gr.	100
Cenizas.	1.2 gr.	100
Calcio.	8.0 mgr.	100
Fósforo	11.0 mgr.	100
Fierro.	0,9 mgr.	100
Vitamina "A"	48,0 mgr.	100
Tiamina.	0.0 mgr.	100
Rivoflavina	0.06mgr.	100
Niacina.	0.40mgr.	100
Ac.Ascórbico.	3.00mgr.	100

TABLA III.4

Composición de las semillas secas de Achiote.
(100 gr. de muestras)

Parámetro	Valores	Nº de Muestras
Humedad	6.0 %.	100
Proteínas,	7.0 gr.	100
Grasa.	5.0 gr.	100
Carbohidratos.	80.0 gr.	100
Fibra.	15.0 gr.	100
Cenizas.	6.0 gr.	100
Calcio.	112.0 mgr.	100
Fósforo.	110.0 mgr.	100
Fierro.	6.0 mgr.	100
Vitamina "A".	170.0 mgr.	100
Tiamina	0.0 mgr.	100
Rivoflavina	0.06mgr.	100
Niacina.	0.40mgr.	100
Ac.Ascórbico	3.00mgr.	100

III.1. Estructura Química.

La Estructura Química de la Bixina, conforme ha pasado el tiempo, ha ido cambiando, por el descubrimiento de muchos isómeros un ejemplo, en cuanto a su fórmula global puede ser citado:(6).



Actualmente no es de dudar la fórmula global dado por G.G.- Mc Keown y E. Mark (8) donde nos dice:

"El principal pigmento de las semillas de la Bixa Orellana-

homólogos, la fracción aceitosa disuelve y entonces el sólido puede ser filtrado o centrifugado. Este sólido constituye 30 a 35 % de todo, es una sustancia pura o cerca de ser pura, conocida como Bixina, de fórmula global: $C_{25}H_{30}O_4$ de Pf.217°C.

Su constitución ha sido establecida (Kuhn & Ehmann, Helv. Chim. Acta 11,427 (1928); 12,64,904 (1929); Ber.64,1732 (1931); 65,646,1873 (1932), como el ester monometil de 3,5,7,9,11,13,15, 17,19,21 de ácido tetracosadecaenedioico; este está relacionado con el caroteno.

III.2. La Bixina y sus componentes relacionados.

Un estudio completo es realizado por G.C.McKeown (10), donde nos indica, una serie de compuestos no Bixina que se presentan en el colorante del achiote y la importancia de la cromatografía de papel para separar estos componentes.

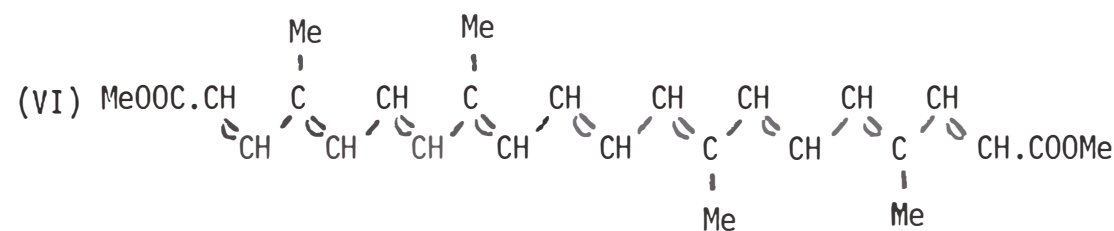
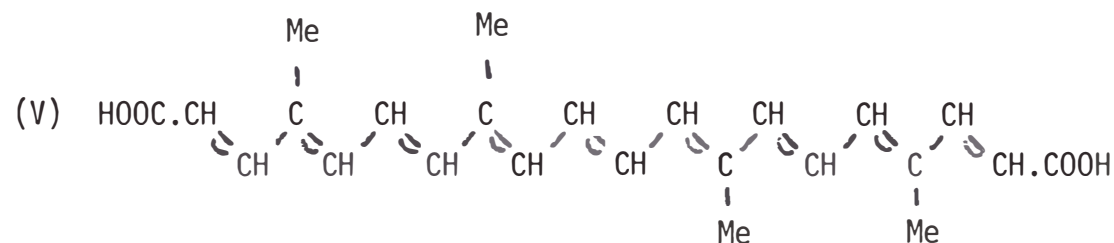
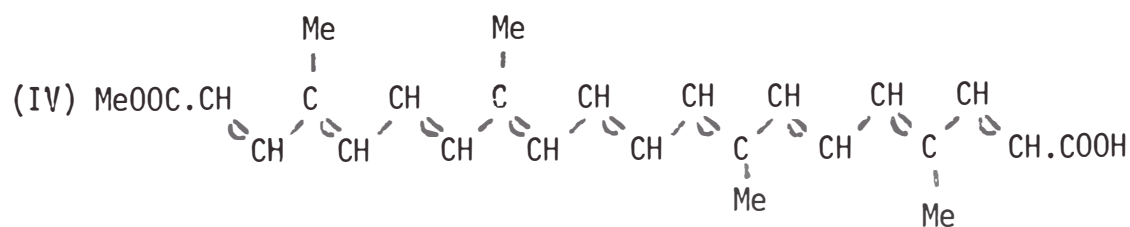
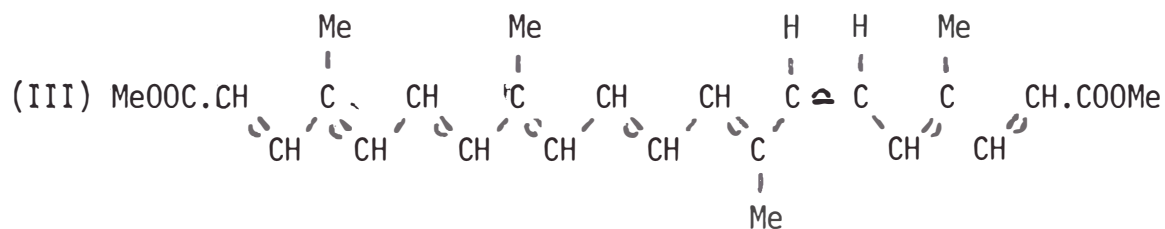
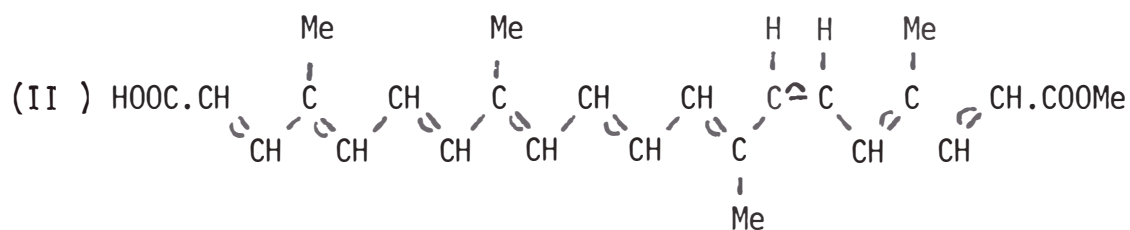
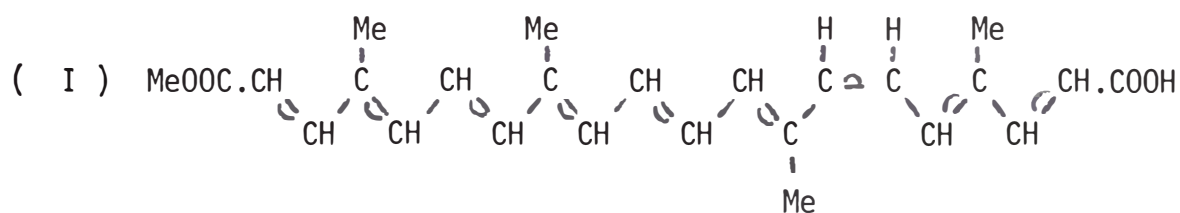
La pre-eminencia de la columna cromatográfica en el campo carotenoide parece tener primacía en un descuido comparativo de la posible aplicación de cromatografía de papel a los problemas de separación e identificación de componentes de este tipo. Las pocas referencias sobre la literatura de la cromatografía de papel de carotenoides dan principalmente con la separación bruta de estos componentes de los clorofilos. Tenemos los estudios de Ses Ták, el cuál ha analizado producciones en esta área. Dos papeles han aparecido sobre la aplicación de absorción de cromatografía

de papel a carotenoides. Jensen y Jensen, reportan la separación de 25 carotenoides diferentes (12) sobre 20% de Kieselguhr de papel, usando mezcla de éter de petróleo y acetona; y Yamamoto y Tomita, han separado el B-caroteno, licopene y luteína, sobre (13) papeles tratados con óxido de calcio u óxido de magnesio.

Los carotenoides neutrales pueden ser separados rápidamente por la absorción cromatográfica sobre las columnas o papeles pero tal no es el caso con la bixina y los carotenoides similares, que llevan uno o más grupos ácidos carboxílicos libres. Estos componentes tienden a reaccionar con los materiales de adsorción básica para formar sales insolubles que son incapaces de desarrollar y evadir cromatogramas normales. Así tenemos que la bixina reacciona con la alúmina siendo fijado en el tope de tales columnas y no es eludido con los solventes orgánicos polares usuales.

Según el análisis de cromatografía, que citaremos en posterior punto, se pueden encontrar los siguientes compuestos relacionados (op.cit.ref.10):

- (I) La Bixina Lábil (forma cis)
- (II) La nor-Bixina Lábil,
- (III) La metil-Bexina Lábil.
- (IV,V,VI) Formas estables (forma trans) de isómeros.



La absorción compleja espectra dada por las preparaciones de anato diferente, indican que las cantidades de pigmentos considerables no Bixina, son presentadas en estos productos. Estos pigmentos no son derivados de la semillas de Bixa Orellana, mas bien son encontradas en el proceso de extracción (op.cit.ref. 8) Iversen and Lam, han demostrado que la bixina, disuelto en aceite-vegetal y otros solventes, sobrellevan una serie de complejos de isomerización y de reacciones de degradación cuando es calentado-para extraerlo. Los productos de transformación no son identifi-cados, pero un pigmento amarillo (abs.max. 405- 406, 429-430, 505 mu en cloroformo)fué separado en preparaciones de anato comercial.

Afortunadamente, bajo un punto de vista espectrofotométrico, la bixina y sus productos de transformación pueden ser agrupados-en dos clases para determinaciones combinadas. La primera clase, incluye la bixina y sus isómeros (antes expuestos), los cuales exhiben un máximo de cerca de 404 y 428 mu en el mismo solvente . Así los pigmentos amarillos pueden ser determinados juntamente a una longitud de onda y la bixina y sus isómeros a otra. El máxi-mo de 500 mu. es el más usable para esta determinación, puesto que a esta absorvancia no se encuentran a los pigmentos amarillos. Los pigmentos amarillos pueden ser determinados a 404 mu, pero se puede aplicar una corrección para la absorvancia debido a la bixina en esa longitud. Asi las dos medidas de absorvancia tomadas - en una solución de una preparación de anato serían dadas a una meda exacta razonable del contenido total de pigmentos.

La bixina, sus isómeros (op.cit.ref.9) y sus productos de dimetilación tienen esencialmente absorción idéntica espectral en la región visible. Además puede indicar que el color del extracto crudo es debido casi enteramente a estas sustancias, ya que el espectro de absorción del crudo para luz visible es superimponible ya sea en la fracción bixina o isómero. El orellin, posiblemente sea un producto de oxidación de la bixina, productos de oxidación y pigmentos amarillos fueron estudiados por Iversen y Lam (14).

III.3. Análisis de Cromatografía.

El método que describiremos, para desarrollar un análisis de cromatografía, es el citado en McKeown: cromatografía del papel de la Bixina (op.cit.ref,10) y es el siguiente:

- Prepare una faja o tira de papel filtro de 6 1/2" x 22 1/2" del papel Whatman 3MM y marque una línea inicial de 2 1/2" desde un final. El final opuesto debe estar cerrado si se quiere un desarrollo continuo. Impregne, inclinando o sumergiendo en un 50% (v/v) de solución de N,N-dimetilformamida (DMF) en acetona y deje secar por 10 minutos con el papel suspendido en una posición vertical.

- Después de secado, rápidamente coloque sobre la línea inicial, 2 micro-litros de un 0.2% de solución de aceite amarillo AB en DMF por referencia, y, 2 microlts de las soluciones de Bixina que han sido analizadas. Si se requiere o se desea una

elución subsecuente y examinación espectrofotométrica (como es el caso de la investigación), trace de 50 a 100 mlts como una banda de unos 5" de largo a largo de la línea inicial.

- (a 0.1% de sol. en DMF es suficiente para la bixina y componentes relacionados).

- Para el desarrollo del cromatograma por flujo descendente se usa Ciclo-hexano, cloroformo, DMF, ac. acético en proporciones (85:10:3:2) por 3 hrs., o hasta que se haya obtenido una separación satisfactoria.

- Determine los R de los pigmentos no conocidos con respecto al AB y compare con los de la tabla.

Como podemos apreciar, el método aquí citado, es simple y será ejecutado en las pruebas de cromatografía, que más adelante expondremos su resultado (una variante de éste método, adaptado a nuestro sistema, también será desarrollado). Tenemos al igual que el estudio de McKeown, La separación cromatográfica de la semilla de Achiote, por R. Basto de Medeiros (Separación Cromatográfica de la semilla de Urucu) (15), donde también indica un método de separación de la bixina y sus componentes relacionados. El método que se emplea aquí, es separar los colorantes del achiote con acetona, el cuál es considerado solvente óptimo, al menos para este estudio. El extracto aceitoso obtenido con la acetona (antes purificada), es disuelto con eter de petróleo y se emplea una columna cromatográfica (glass column)-

conteniendo magnesia activa y celite 1:3. La columna fué separada y cada zona de color fué inicialmente elutada con eter de petróleo, despues fué guardado con 1,2-dicloro-etano y con metanol. Cada fracción obtenida fué desarrollada en cromatografía de capa fina. Los R_f fuerón calculados. Eter de Petróleo, 1,2-dicloro-etano y metanol fueron usados para obtener la máxima absorción (curva) por cada fracción. Según lo expuesto podemos mostrar las siguientes tablas:

Según: McKeown.

TABLA III.3.1.

Color zone	Description	R_f (approx.)	Spectra (μ max.)
1	Yellow	.01	420,395
2 (Labile Norbixin)	Orange	.02	ca 495,465
3	Yellow	.07	423,401.5
4 (Stable Bixin)	Red	.11	501,471
5 (Labile Bixin)	Orange	.17	494,5,464.5
6	Orange	.22	ca 488,459
7	Pale	.35	ca 420,400
8	Yellow Orange	.85	variable.

Composición de pigmento de colores de mantequilla de anato comercial como se determina por el análisis cromatográfico.

(tabla 2. ref, 10).

Según: Ruy Basto de Medeiros.

(Tabela I mostra of R_f das fracoes de 1 a 5 extraidos com éter-
de petróleo, dicloroetano e metanol, ver ref. 15).

TABLA III.3.2

Solvente: Eter de Petróleo-Dicloroetano-Metanol 4:3:3							
Zon	Descripción	Eter de Petróleo.		Dicloro-etano		Metanol	
		R_f	Max. Abs	R_f	Max. Abs	R_f	Max. Abs.
1	Amarillo-fuerte avermelhado	.97	390-,410	.97	420	.48-	340,430
2	Amarillo-Claro acinzentado	.97	390, 410	.74- .92	340	.43- .78- .87,94	380
3	Amarillo-rosa	.97	420, 445, 470	.96	360,430	.41- .97	
4.	Amarillo-averme lado,claro	.97	400, 420	.71- .92	340,410	.45- .92- .95	465 -495
5	Amarillo-claro	.94- .96	370,395, 420	.93- .96		.44- .96	

(ver también, curva de absorción, ref (15), pag. 702.)

Las tablas mostradas, las necesitaremos para hacer compara-
ciones con los desarrollos de cromatogramas, de muestras semillas
de achiotte.

III.4. Colorante del Achiotte: Annatto.

El annatto, es la porción coloreada extraida de la semilla

Bixa Orellana L.

Normalmente se usa para colorear la mantequilla, quesos, chocolates, etc. Como es conocido el annatto no es carcinógeno (16), por esta razón se usa en vez de colorantes sintéticos. En Suiza lo añaden a las comidas de las gallinas para que estas, pongan los huevos con yemas bien amarillas. El annatto puede ser encontrado como polvo o solución. El solvente debe ser un aceite - edible, alcali acuoso, o glycol y una serie de solventes orgánicos. La bixina predomina en este extracto (annatto). Encontramos los estudios de Morton (17), donde expone que el annatto ha sido usado por los indígenas populares (en algunos lugares) como tinta para decorar o proteger sus cuerpos o como medicina popular.

Encontramos un estudio completo de la extracción del annatto de las semillas de achiote, según Barnet and Espoy (1975)(18), donde, estima un método económico optimizado para extraer el colorante, a parte de otras pruebas (patente) de mejoría (recovering) de extracción. Marcel A. Perret (1958) en su patente: "Food Color and Method of Preparing the Same", intenta descubrir un nuevo método para la preparación de pigmentos usados en la alimentación diaria a partir del annatto (derivado de ellos), (19). Tenemos también el estudio de Harold. G. Hartgrerink (1959), en su patente: "Extract of Bixa Orellana Plant For Use as a Pharmaceutical", donde, intenta emplear toda la semilla con raíz y, la corteza de la raíz para su logro, y, de allí obtener productos medicinales -

(20). Así, podríamos citar una serie de patentes o libros, que dedican su mira al amplio campo de uso industrial del annatto; - tales como: Riel and Gibson (1958), en su tema, "Use of annatto- for coloring butter" (21), el de Benk y Bergmann, en "Extract -- from orange peel (annatto), (1970), (22) y por último, la de Koe- cher, en "Edible Annatto coloring compositions and method of pre- paring same" (1956), patente (23), donde explica un método nove- doso para la nueva preparación y mejoras en las composiciones de annatto comestible que se usan para colorear productos comesti-- bles generales, incluyendo los de consumo diario relacionados -- con comestibles como la leche, el queso, la mantequilla, la mar- garina, y los helados.

IV. EXTRACCION DE COLORANTES DEL ACHIOTE.

La extracción de un constituyente soluble de un sólido -- por intermedio de un solvente, es conocido como lixiviación, sin embargo, es costumbre referirse a extracción con un medio acuoso como lixiviación, y con un solvente como extracción solvente.

Hasta el momento, los terminos empleados anteriormente, - nos servirán para comenzar, las pruebas de extracción del colo - rante básico de la Bixa Orellana: El annatto, y, para esto debe mos de tener en consideración los siguientes factores; Factores- que influyen en la extracción (tamaño del grano, solvente adecua - do, etc), métodos de extracción, especificaciones del color, --

pruebas, resultados.

IV.1. Factores que influyen en la extracción.

Los factores que influyen en una buena extracción, puede ser resumido en los siguientes:

IV.1.1. Tamaño del grano.

Durante las experiencias, que he tenido para seleccionar las semillas para el proceso de extracción, y aún en el mismo proceso; he comprobado que son de un tamaño adecuado, y, por eso que reducir su tamaño, en busca de mejores resultados, daría al contrario sería dificultad en el tamizado, el área de transferencia, entre la semilla y el solvente es de lo más óptimo, triturarla traería consigo un mejor filtrado de la pasta (annatto).

IV.1.2. Solvente adecuado.

Lo más importante, en que se debe tener en cuenta para la elección del solvente, es que debe tener baja viscosidad, para que el colorante más el solvente circulen libremente por el sistema de extracción. Posiblemente la extracción con los solventes volátiles; tales como; el cloroformo, el alcohol etílico, tricloroetileno, metanol, cumplan con esa condición, pero debido a su costo en el mercado y su escaso uso como solvente industrial, nos orienta a utilizar un solvente más barato, que cumpla con

la anterior condición y más aun, que tenga un rendimiento mayor. Dentro de los métodos, se encuentra la utilización del propileno glicol y el aceite comestible como solventes de extracción, ambos son de viscosidad apreciable, pero el rendimiento es mayor que el de los anteriores solventes y de mejor calidad, condiciones como estas se deberá tener en cuenta.

IV.1.3. Temperatura óptima.

Uno de los principales factores en la extracción del anatto, es la temperatura de operación. Es sabido que a temperaturas altas (9), se producen productos de degradación, que no son necesariamente los que queremos obtener. Además sabemos que la bixina no es estable a temperaturas altas; por lo tanto, una temperatura moderada de operación, será necesaria.

IV.1.4. Proceso de agitación.

Para obtener un buen lavado de las semillas (denominó con el término lavado, al desprendimiento del colorante de la episperma del achiote) no sólo depende de un solvente adecuado, sino también del modo de agitarse, para la mejor transferencia del solvente con el colorante. A nivel de laboratorio, usé un agitador tipo hélice, con revoluciones controlables, calentando con vapor; a nivel industrial

se puede lograr el objetivo, almacenando gran cantidad de semillas con el solvente, agitados con vapor, ayudado con agitadores de paleta o de hélice. Utilizando propilenglicol como solvente, se obtiene un buen desprendimiento de colorante, un buen "lavado".

IV.2. Métodos de Extracción.

Estas se basan únicamente, en la extracción de un sólido con un solvente adecuado. El sólido es la materia colorante que se encuentra en la superficie de la semilla, el solvente será en algunos casos, solamente agua, en otros podrá ser cloroformo, propilenglicol, etc. Anteriormente dijimos que la extracción de un constituyente soluble de un sólido por intermedio de un solvente, es conocido como lixiviación, sin embargo, es costumbre referirse a extracción con un medio acuoso como Lixiviación, y con un solvente como extracción Solvente. Existen en nuestro medio, conocimientos de una serie de métodos de extracción, los que se resumirán en los métodos que citaremos.

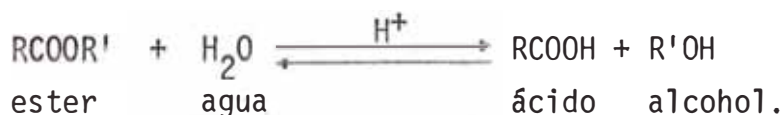
IV.2.1.Lixiviación con Agua.

La lixiviación con agua, consistirá en macerar las semillas de achiote con agua (como solvente), los cuales en algunos casos sera fria o caliente. La suspensión de color se formará al cabo de cierto tiempo, lo cuál indicará que se debe tamizar

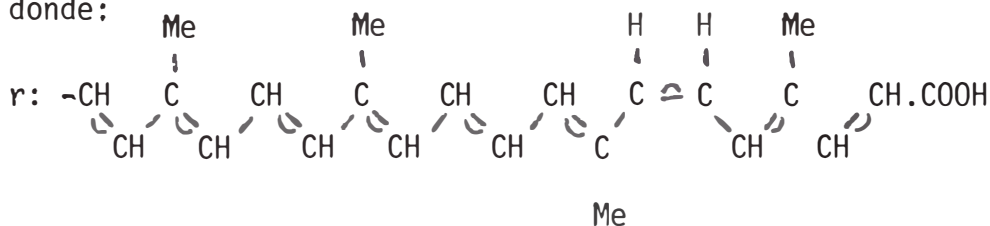
Las semillas de achiote. El líquido coloreado desprovisto de sólidos por el tamizado será dejado en reposo un tiempo a determinarse, para luego por decantación, separar los colorantes del agua. La masa residual dejará secar al medio ambiente o en su defecto, secarla en una estufa.

Reacción.

Estamos en la condición de proponer un posible mecanismo de reacción. Considerando lo establecido en el punto III.1. sobre la estructura química de la Bixina, establecida como un éster monometil, decimos que la hidrólisis de un éster es una reacción en equilibrio. En el equilibrio existe una mezcla de éster, agua, alcohol y ácido (24), para nuestro caso:



donde:

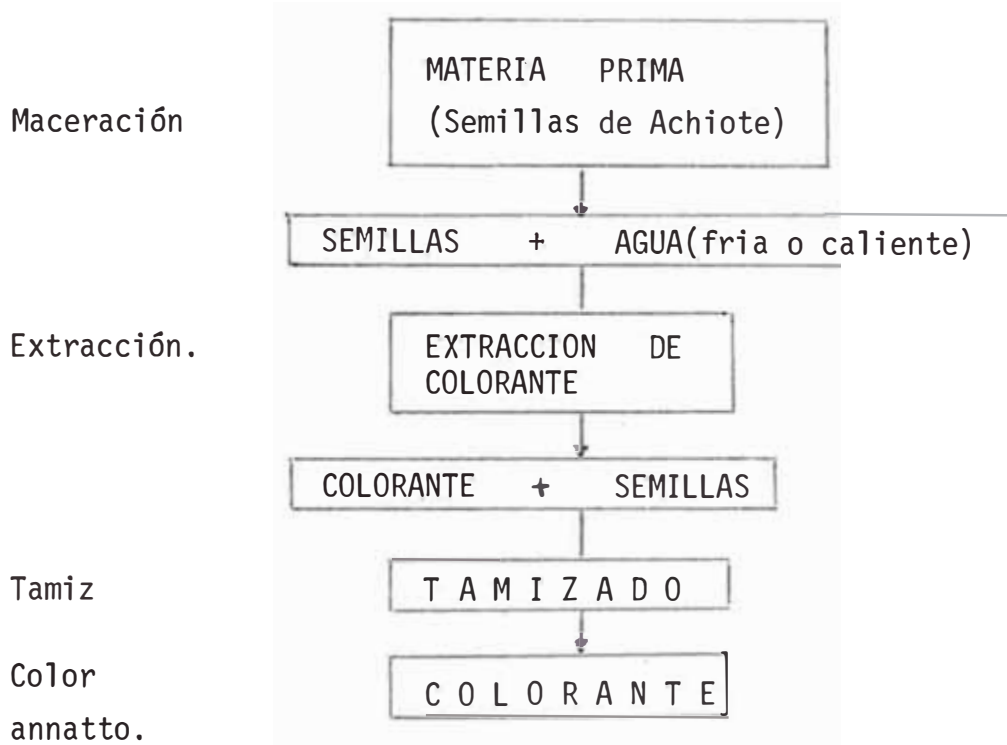


y R': -- es el radical metil CH₃ - ó Me.

El ácido formado sería,, la Nor-Bixina Lábil (ver pto. III.2. - compuesto II) y el alcohol, es el metanol, el cuál se evaporaría por ebullición. Esto si relacionamos estrictamente la reac

ción, pero intervendrán una serie de compuestos relacionados de la Bixina.

Diagrama de Proceso.



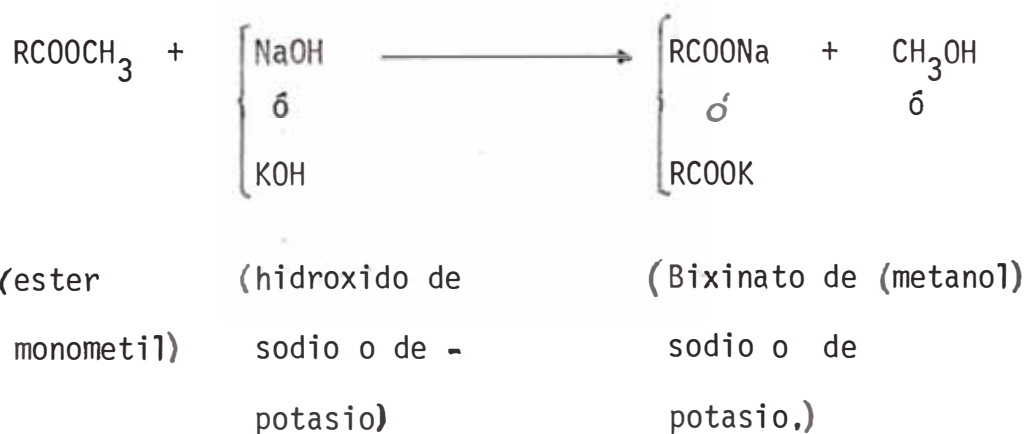
IV.2.2.Lixiviación con Hidróxido de Sodio.

La lixiviación con una sustancia alcalina (porque puede utilizarse en vez de hidróxido de sodio, también el hidróxido de potasio) consiste en someter a las semillas de achiote a la acción de una solución alcalina, en este caso a la solución con hidróxido de sodio, posteriormente, se procederá a un tamizado, para separar las semillas de la solución coloreada. El extracto resultante será neutralizado (con exceso de ácido) con una

solución ácida, precipitándose la masa colorante en forma de flóculos, él cuál será filtrada y secada.

Reacción:

Posiblemente tambien se trate de una hidrólisis de éste res, tomando como base lo expuesto en la reacción anterior. Según este concepto (24), para lograr una hidrólisis lo más completa posible de un éster (en nuestro caso, éster monometil de un ácido dicarboxílico) se acostumbre tratarlo con una solución acuosa de hidroxido de sodio o de potasio. En este proceso se obtiene el alcohol y la sal metálica del ácido que ya no puede reaccionar con el alcohol para regenerar el éster, según esto:

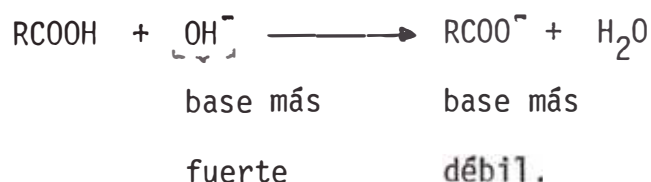


Según Rakoff-Rose (24), a este tipo de hidrólisis se le conoce como el proceso de Saponificación, ya que el proceso empleado en la fabricación de jabón a partir de grasas. Las grasas son ésteres de glicerol; $\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$; con ácidos de cadena larga (ácidos grasos).

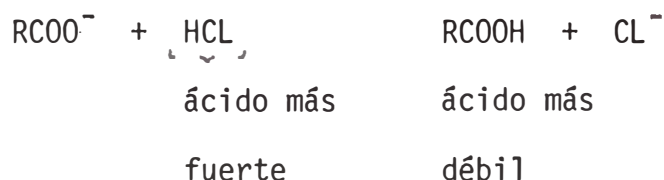
$$K_a = \frac{(\text{RCOO}^-)(\text{H}_3\text{O}^+)}{(\text{RCOOH})}$$

La concentración del agua que generalmente se encuentra en gran exceso, prácticamente permanece constante; por este motivo, esta concentración se incluye en K_a , de la expresión anterior. Como la constante de ionización es la relación de las concentraciones del material ionizado con respecto al no ionizado, mientras mayor sea su valor, mayor será la ionización y por lo tanto, mayor será la fuerza del ácido. Los ácidos carboxílicos tienen cte. de ionización de aprox. 10^{-16} ; la de los ácidos minerales fuertes es mucho mayor, para el ácido clorhídrico HCL, K_a es igual a 10^8 , para el H_2SO_4 , el K_a es 10^2 . Por lo tanto, los ácidos carboxílicos son generalmente, mucho más débiles que los ácidos minerales fuertes, como es nuestro caso.

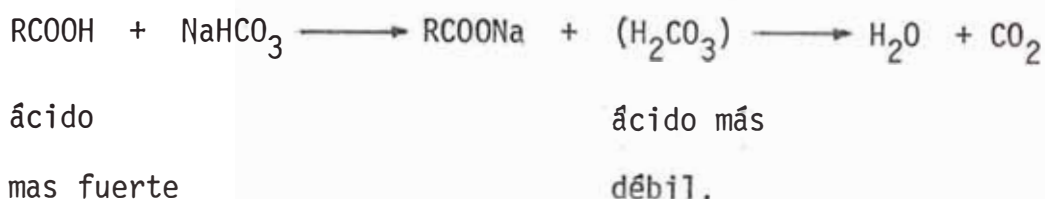
- Los ácidos carboxílicos reaccionan instantáneamente con el ión hidróxido produciendo un ión carboxilato y agua, propiedad que servirán en la reacción de los tipos de lixiviación.



- Los ácidos minerales fuertes pueden descomponer las sales de los ácidos carboxílicos más débiles.



- Los ácidos carboxílicos también reaccionan con bicarbonato de sodio desprendiendo dióxido de carbono y produciendo agua, ya que son más ácidos que el ácido carbónico, K_a - ca. 10^{-7} .



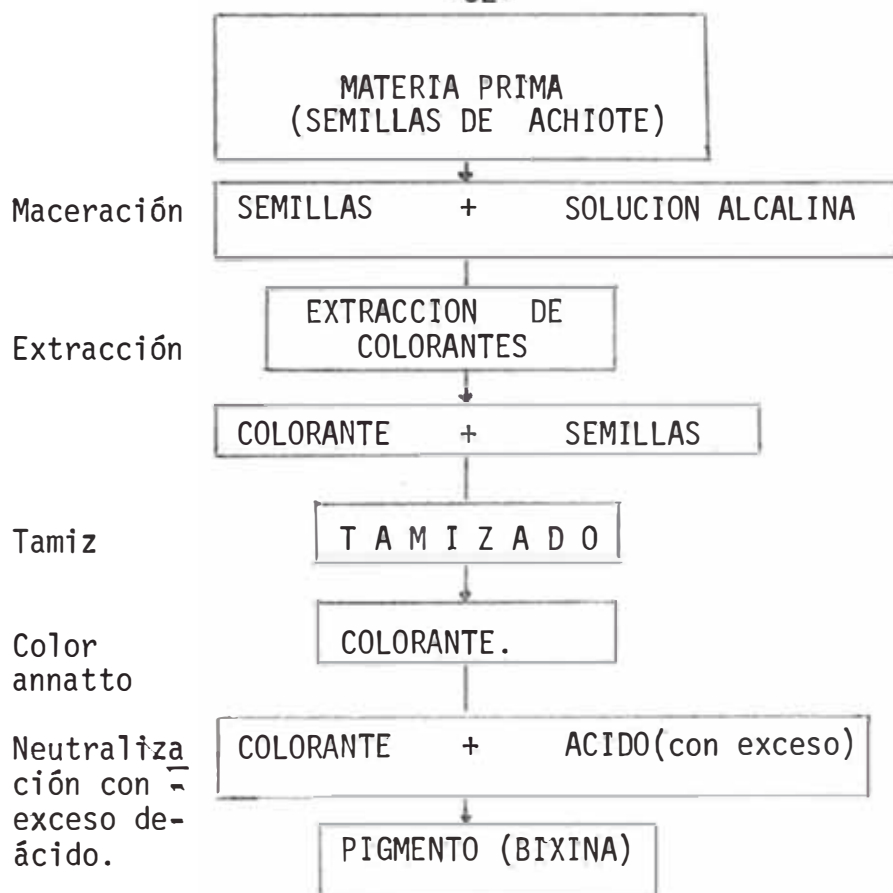
El desprendimiento de CO_2 de una solución de bicarbonato de sodio en agua es útil para distinguir los ácidos carboxílicos de otras sustancias débilmente ácidas, tales como los fenoles, que se disuelven en hidróxido de sodio pero no desprenden CO_2 del bicarbonato de sodio.

- Formación de ésteres. Un ácido reacciona con un alcohol produciendo un éster. Esta reacción puede alcanzar el equilibrio, según:



para poder aumentar el rendimiento del éster se puede aplicar el principio de Le Chatelier y desplazar el equilibrio en dirección del éster, utilizando un exceso del ácido o de alcohol o bien eliminando uno de los productos, ya sea el éster o el agua tan pronto como se formen. Los conceptos (propiedades) dados, podrán ser aplicados en las reacciones de lixiviación y también ser considerados en la extracción con solventes.

Diagrama del Proceso.



IV.2.3.Extracción por medio del aceite comestible.

Lo interesante de este método, es que sólo se utiliza el aceite vegetal comestible como solvente para la extracción.

Consiste, primeramente en preparar las semillas de achiote, con vapor de agua, para hincharlas y darles mayor facilidad de desprendimiento a los pigmentos que se encuentran en la superficie de la semilla (episperma). Luego las semillas ya hinchadas son extractadas por aceite vegetal frio ó caliente, y esta solución coloreada puede ser utilizada para teñir productos lacteos, tales como la mantequilla y la margarina directamente.

Haremos referencia de un estudio realizado por Harold Barnett en su tema "Process For extracting the Coloring Matter From Annatto Seeds" (Proceso para extraer la materia colorante de las semillas de achiote), (18), donde detalla algunos aspectos de este método.

La materia colorante después de ser extraída de la episperma de la semilla, consiste de dos pigmentos. La Bixina y en menor proporción el Orellin. Para extraer estos pigmentos, varios métodos han sido tanteados por los nativos y estos han sido descritos en Journal of Science.

Se ha descubierto, que el colorante puede ser extraído en forma eficiente por agitación de las semillas en presencia de aceites grasos, alcoholes grasos, y ácidos grasos ya sea en sistemas continuos o discontinuos.

También se ha encontrado, que las semillas primeramente tratadas con vapor de agua y luego sujetas a la acción de aceites para extraerlas, contienen un porcentaje de 90% de colorante natural y puede ser obtenido aún más. Las semillas de annatto áridas contienen colorante, los cuales pueden ser extraídas con aceite vegetal caliente pasando a través de un vaso grande y alto el cuál contiene a las semillas; el vaso puede estar cerca de 100°C, y el aceite vegetal puede estar a la misma temperatura, pero estos antes de vaciarlo en el tope del vaso, para recobrar colores disuelto en el aceite. El extracto sale por debajo de

la pera de decantación (vaso grande) y cerca de 30% del material coloreado fué removido por un simple paso a través de las semillas, y el aceite puede contener sustancias saturadas con los colorantes.

Los colorantes pueden ser extraídos eficientemente en un extractor tubular inclinado (el cuál tiene un screw rotatorio) . Las semillas son transportadas a lo alto del tubo, donde caen por gravedad, esto resulta una extracción bien eficaz si además de lo explicado, existe un contador de aceite saturado dentro del tubo. En este método cuando la cantidad de aceite es menor que el disolvente del colorante provechoso, la combinación caída y extracción, físicamente remueve finas partículas del colorante natural y lo cristalino de este extracto puede ser obtenido por filtración.

La materia colorante extractable por aceite, es una mezcla de pigmentos rojos y amarillos. La proporción de pigmentos rojos decrece progresivamente cuando este material es expuesto a un tiempo prudencial de tiempo. Para colorear la mantequilla y la margarina, los pigmentos amarillos y naranjas son generalmente los preferidos. Se ha realizado controles de calentamiento del aceite, en el cuál los pigmentos son disueltos , estos se hicieron a diferentes temperaturas para diferentes tiempos, esto nos induce a pensar que se puede controlar el color, controlando los parámetros, tiempo-temperatura. Para un color satisfactorio de la margarina y la mantequilla, lo sgte. tiempos y temperatura

fuerón encontrados para un mismo matiz;

100 °C, para 5 a 7 hrs.

120°C , para 2 a 2.5 hrs.

130°C , para 45 a 55 min.

140°C , para 23 a 25 min.

150°C , para 10 a 12 min.

165°C,, para 3 min.

177°C , para 0.75 a 1 min.

Optimizariamos, nuestro método, si el extracto resultante, calentado suficientemente, para dar un color deseado se le hiciera un análisis de espectrofotometría. A través del uso de este instrumento, la cantidad de absorvancia que dá la solución puede ser determinada por diferentes medidas. En este caso, el extracto annatto calentado cerca de 90°C (sin llegar a él), la absorción del extracto en cloroformo es 435 mu y sólo cerca del 70% de la abs. a 470 mu. En calentamiento cerca de los 100°C, la medida corresponde entre 435-470 mu. Una comparación de extracción de colorantes por varios aceites calientes grasos es dado en la siguiente tabla:

TABLA IV.2.3.1

Solvente	Aceite de semilla de algodón	Acido oléico	Oleyl Alcohol.
Temperatura de operación.	130,0	120-125	120-130
Partes por peso del extrac.	94.8	96.0	94.2

Coefficiente de extinción ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$), 470 mμ (cloroformo).	3.95	96.0	3.19
Porcentaje de remanete que sale del extractado.	58.0	14.3	17.4

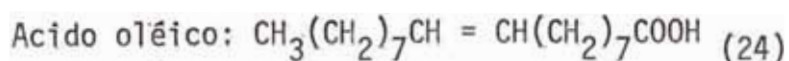
ver tabla 1, ref (18)

Esta tabla se confeccionó, con la extracción discontinua de agitación mecánica de 25 partes por peso de semillas con 100 partes de cada uno de los solventes mencionados (peso) por una hora a la temperatura indicada, la decantación y la filtración del solvente extractado y analizando el extracto y las semillas residuales. Una corrida similar fué realizada, pero utilizando 25 partes por peso de las semillas remojado en 20 partes por peso de agua para 12 hrs., los resultados son mostrados en la tabla II, ref 18.

TABLA IV.2.3.2

Solvente	Aceite de semillas de algodón.	Acido Oléico
Temperatura de Op. °C..	130.00	125.00
Partes por peso del extracto	93.30	92.70
Coefficiente de extinción	4.75	4.64
Porcentaje del remanete del extractado.	17.50	10.40

Reacciones.



Alcohol Olefco: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{OH}$ (24)

Aceites: Los aceites y las grasas de plantas y animales son mezclas que, en forma predominante, contienen ésteres de ácidos grasos y glicerol).

Vemos que la estructura del ácido oléico y el alcohol oléico son similares, y que solo varían en el grupo característico de ácido y alcohol, también sabemos que se puede encontrar, mejor dicho se puede formar esterres, de alcohol y ácidos, aplicando la reacción en equilibrio.



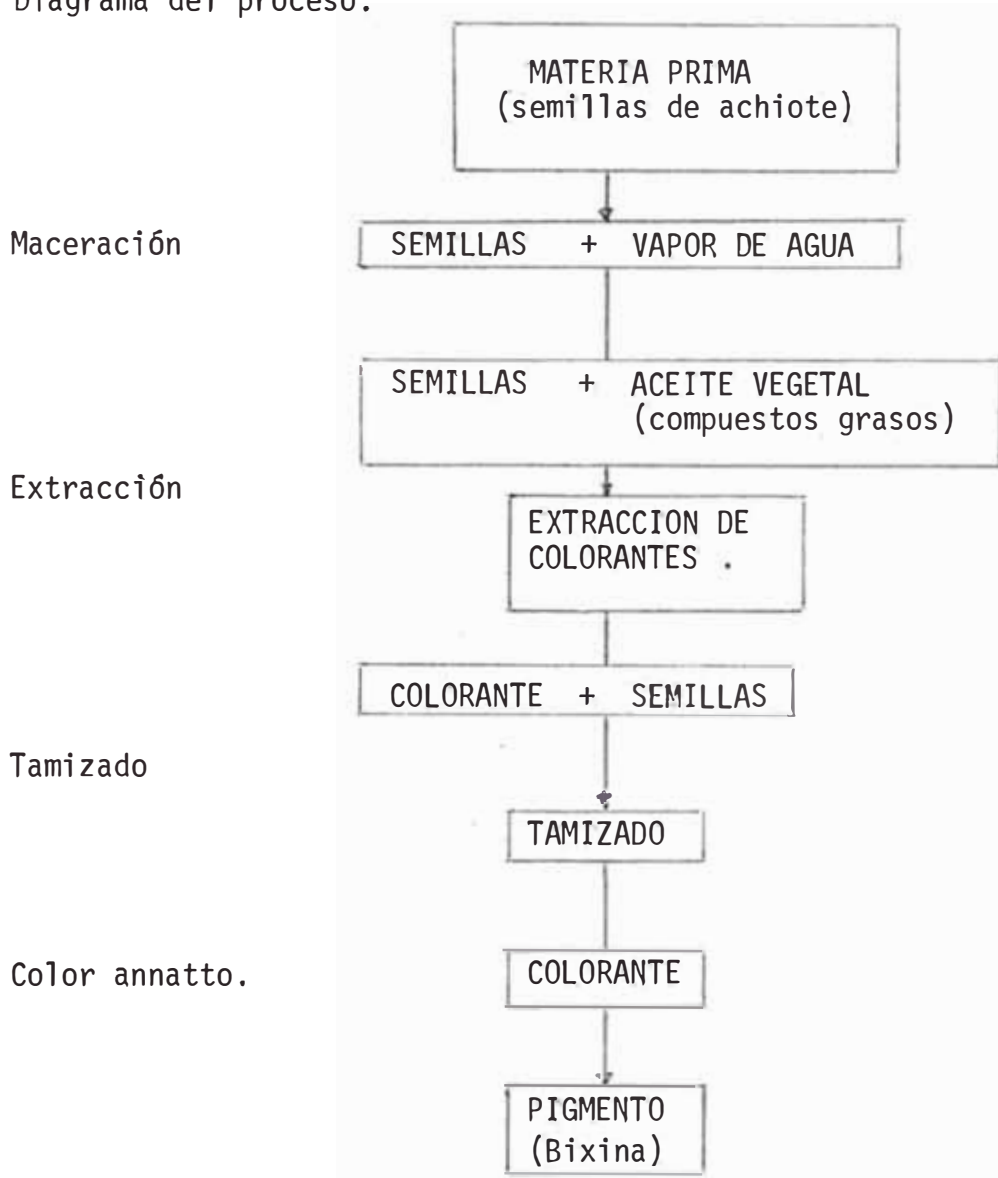
si además de lo expuesto, sabemos que la mayor parte de las grasas y aceites que se obtienen a partir de las plantas y animales se destinan a la alimentación del hombre y los animales, resulta provechoso, extraerlos con estos componentes. Dentro de los componentes relacionados de la bixina, y aún la bixina (definido como un compuesto, éster monometil de un ácido dicarboxílico), existen compuestos con grupos ésteres, aplicando el concepto: "Lo semejante disuelve lo semejante" y definiendo a los ésteres como buenos disolventes de muchos compuestos orgánicos y dentro de él a los mismos ésteres, es pues lógico extraer los colorantes de las semillas de achiote, con los compuestos citados anteriormente (aceite vegetal, alcohol grasos, ácidos grasos).

Concluimos: (según lo expuesto).

El proceso para extraer los pigmentos, de la superficie-

de la semilla, utilizando como solvente, al aceite vegetal y otros compuestos grasos, es satisfactorio.

Diagrama del proceso.



IV.2.4 Extracción por medio del Glicol propileno (alcalino)

Este método, es uno de los más interesantes en la extracción del annatto. Consiste básicamente en extraer los colorantes de las semillas con una solución glicol propileno alcalino-

(las semillas antes han sido tratadas con vapor de agua), los cuales son filtradas y neutralizadas con un ácido mineral.

Al respecto tenemos un estudio muy amplio que es necesario citar, es el de Richard Bruce Kocher, en su tema: "Composiciones de colores del annatto comestible y el método de preparación del mismo" (23), donde se refiere mucho al método.

Los colorantes de las semillas de achiote, pueden ser extraído con el glicol propileno (a saber 1,2-propano diol, que tiene la fórmula química: $\text{CH}_3\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$) en presencia de una material alcalino, que sea al menos soluble en el glicol propileno (cumplen con esta condición, soluciones de hidróxido de sodio o de potasio, prefiriéndose el de sodio). El uso de glicol-propileno alcalino para la extracción de colorantes de las semillas de achiote resulta una extracción efectiva del pigmento de annatto deseado y anula la extracción de otros elementos de la semilla de annatto que aparentemente, hasta ahora, han sido responsable de factores adversos de extracción. No solamente hace que los resultados de las composiciones de annatto posean un color puro destacado, sino que ha demostrado que dichas composiciones, no se afectan en tiempo prudencial de almacenaje,

Para llevar a cabo la extracción, las mezclas de las semillas de achiote y el glicol propileno son calentadas para aumentar la aceleración de extracción. Se prefiere utilizar temperaturas elevadas generalmente del orden de 190 a 230°F., con una

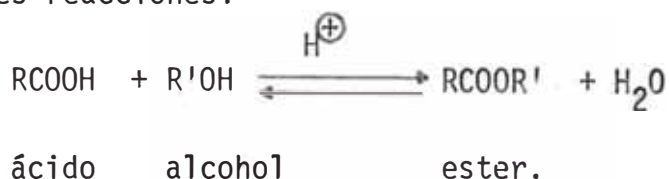
temperatura cerca de 215 a 225°F. El tiempo tomado de la extracción es variable, dependiendo, entre otras cosas, del bulto de la semilla de anato que ha sido extraída. No hay nada crítico en el tiempo o en la temperatura. Después de que la operación de extracción ha sido completa, las semillas son tamizadas y el extracto líquido resultante entonces es filtrado. Antes de la filtración es preferible enfriar el extracto líquido bajo los 140 a 170°F, y entonces filtrar. Para obtener una buena claridad en el producto acabado, se prefiere, hacer una filtración del extracto líquido antes de la verdadera filtración, esto es como una ayuda y mayor facilidad pueden emplearse varios tipos de filtros, por ejemplo; tierras de diatomea, tierras de infusorios, terreno de asbestos, pulpa de papel y otros semejantes.

Las composiciones de annatto, extractadas con este método demuestran importantes ventajas sobre las composiciones de otras preparaciones. Sobre la estabilidad de la sedimentación, para coloración efectiva de productos alimenticios (ya sea de alto o bajo contenido graso), como es la mantequilla, el queso, etc., el annatto producido por este método es satisfactorio. Una importante propiedad de estos extractos es que son solubles en el agua.

Reacción:

Como se trata de un glicol, podemos decir que estos, son altamente solubles en el agua, el cuál está relacionada con su

capacidad de formar un gran número de puentes de hidrógeno por-molécula (1,2 propanodiol; P.F:-59, P.E:188, solubilidad en gr/100 gr. de agua es infinita). Los glicoles pueden participar - en reacciones similares a los de alcoholes monohidrilados (for-mación de ésteres, etc.). Podemos entonces establecer las si-guientes reacciones:

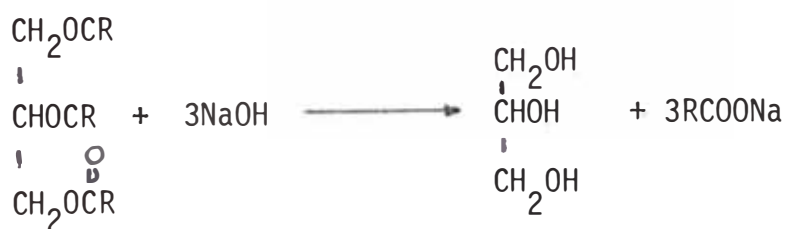


Esto considerando al alcohol monohidrilado como (1.2-propano-dio).



El cuál es la hidrólisis básica del éster.

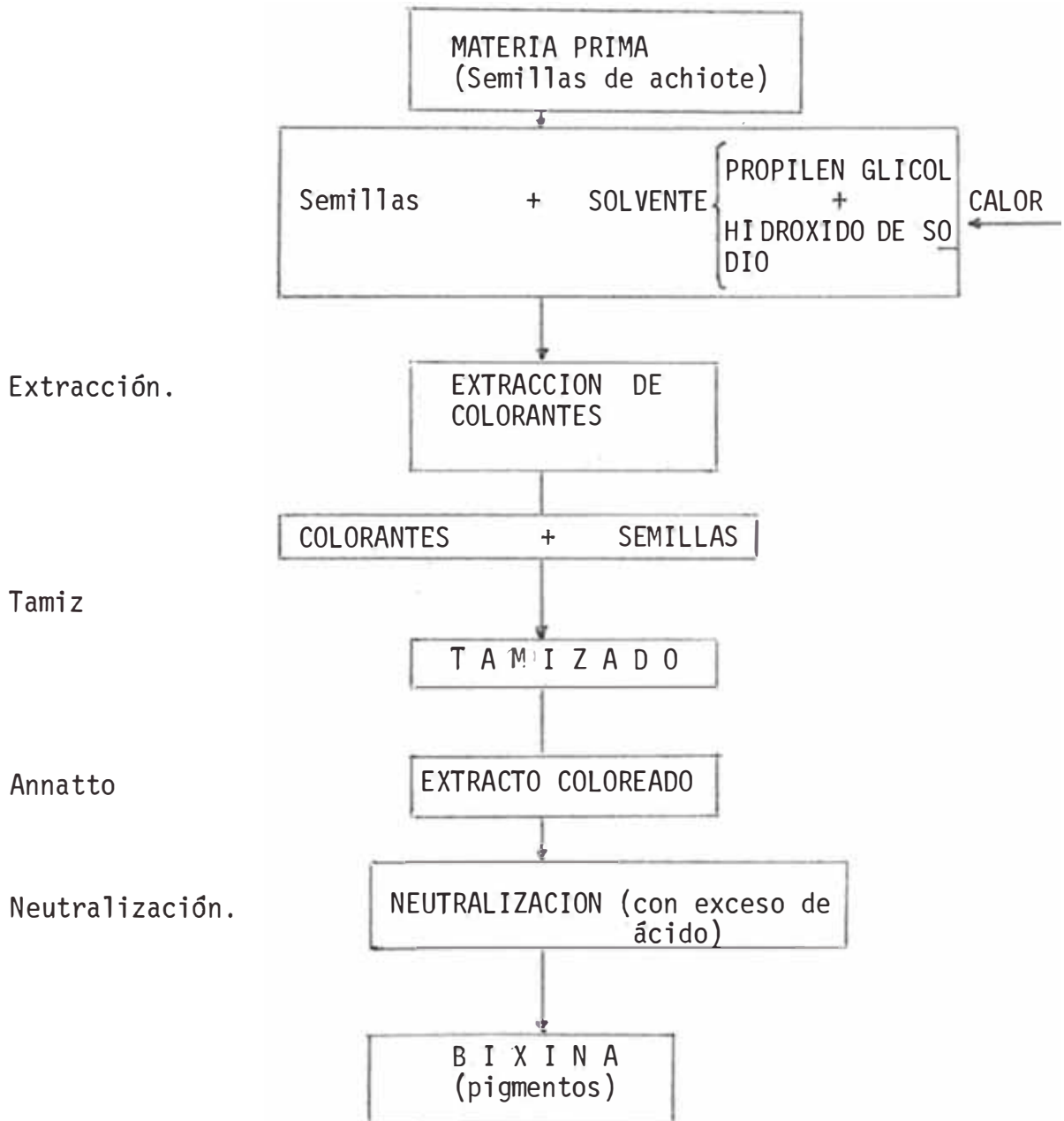
- Debemos considerar, que las grasas son ésteres del glicerol - con ácidos de cadena larga. Los enlaces de éster, en las grasas se pueden romper por la acción del hidróxido de sodio, produciendo glicerol y jabones. Las semillas de achiote tienen en su com-posición grasas vegetales y posiblemente actuan de la manera pro-puesta



Se podría también utilizar el glicerol (1,2,3,-propano-triol, P.F: 18, P.E:290°, solubilidad en gr/100 gr. de agua, es

infinita) dado que no tiene características tóxicas, además tiene sabor dulce y es fácilmente digerible, aparte que todavía es mucho más soluble en el agua (por tener tres OH^-) que el propilenglicol.

Diagrama del proceso.



Los métodos que se citarán a continuación, son con solven

tes volátiles, y sus procesos no están aun bien definidos.

IV.2.5.Extracción por medio del Alcohol etílico y el tricloro-etileno.

Una vez obtenidos los extractos coloreados, por cualquiera de los anteriores métodos, preferentemente si estos son extraídos con el propilen glicol alcalino, son tratados con el alcohol etílico (P.E:78°C) y el tricloro etileno (P.E:87°C), o también se puede tratar directamente las semillas con esta solución (alcohol etílico y tricloroetileno), después de colados, los solventes volátiles son recuperados por destilación, quedando una masa pastosa coloreada.

La ventaja que se podría encontrar en este método, es la mayor concentración de la materia colorante. Un estudio al respecto es el de Moriez-Smith (25), donde emplea casi exactamente lo expuesto anteriormente.

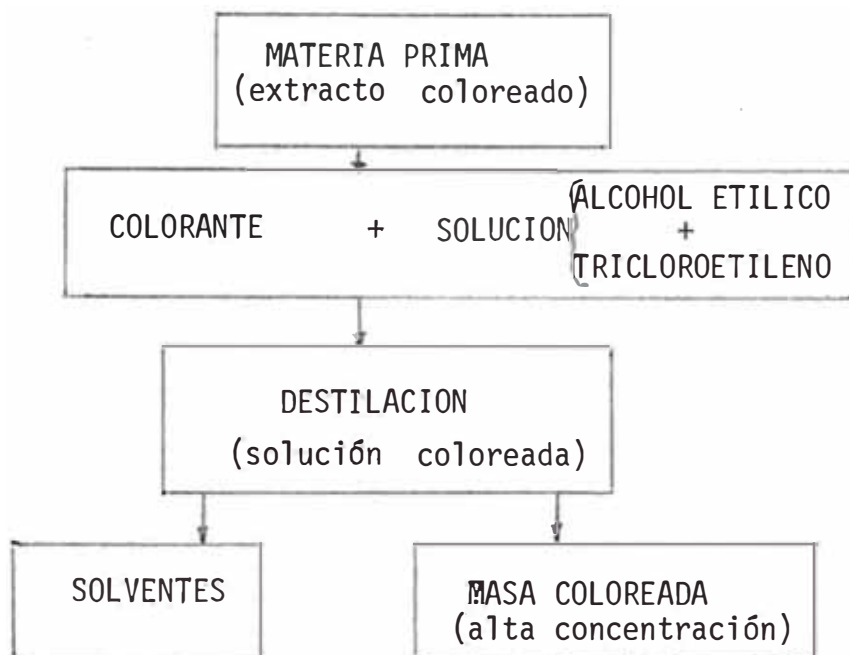
Reacción:

Alcohol etílico: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$

Tricloro-etileno: $\text{CCL}_2 = \text{CHCL}$

- ambos se comportan como buenos disolventes orgánicos, arrastrando la materia colorante con el paso de ellas.

Diagrama de proceso.



IV.2.6.Extracción por medio del cloroformo.

Se puede partir la extracción del extracto coloreado de los anteriores métodos o utilizando las semillas de achiote.

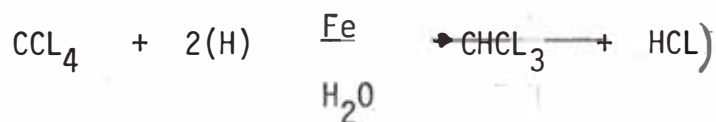
Las semillas de achiote son tratadas con cloroformo, los cuales en conjunto son agitados con calentamiento. El agitado desaloja muchas de las capas de pigmentos de la semilla. La mezcla coloreada es filtrada y la extracción se repite sobre el material insoluble con una segunda dosis de cloroformo. Se puede hacer sucesivas extracciones hasta que todo el colorante de la semilla o la mayor parte se halla desprendido (el cuál se nota a simple vista). Se puede concentrar la materia colorante , en un tipo de rotavapor (evaporador rotatorio), dando como resul

tado una masa pastosa coloreada de gran poder de tintura. En algunos casos también se agrega el tricolor etileno y el alcohol etílico, para dar mayor fuerza de extracción. Cristales violetas oscuros se podrán formar, con una debida concentración y una buena filtración. seguido de un sacado al vacío (8).

Reacción.

	PE	PF	a 20°C Densidad
Cloroformo (Tricloro-metano)	62 C	-63°C	(gr/l) 1,489

El cloroformo es un compuesto polihalogenado (el cuál se puede obtener por la reacción del haloformo, o, por la halogenación del metano y por reducción del tetracloruro de carbono;

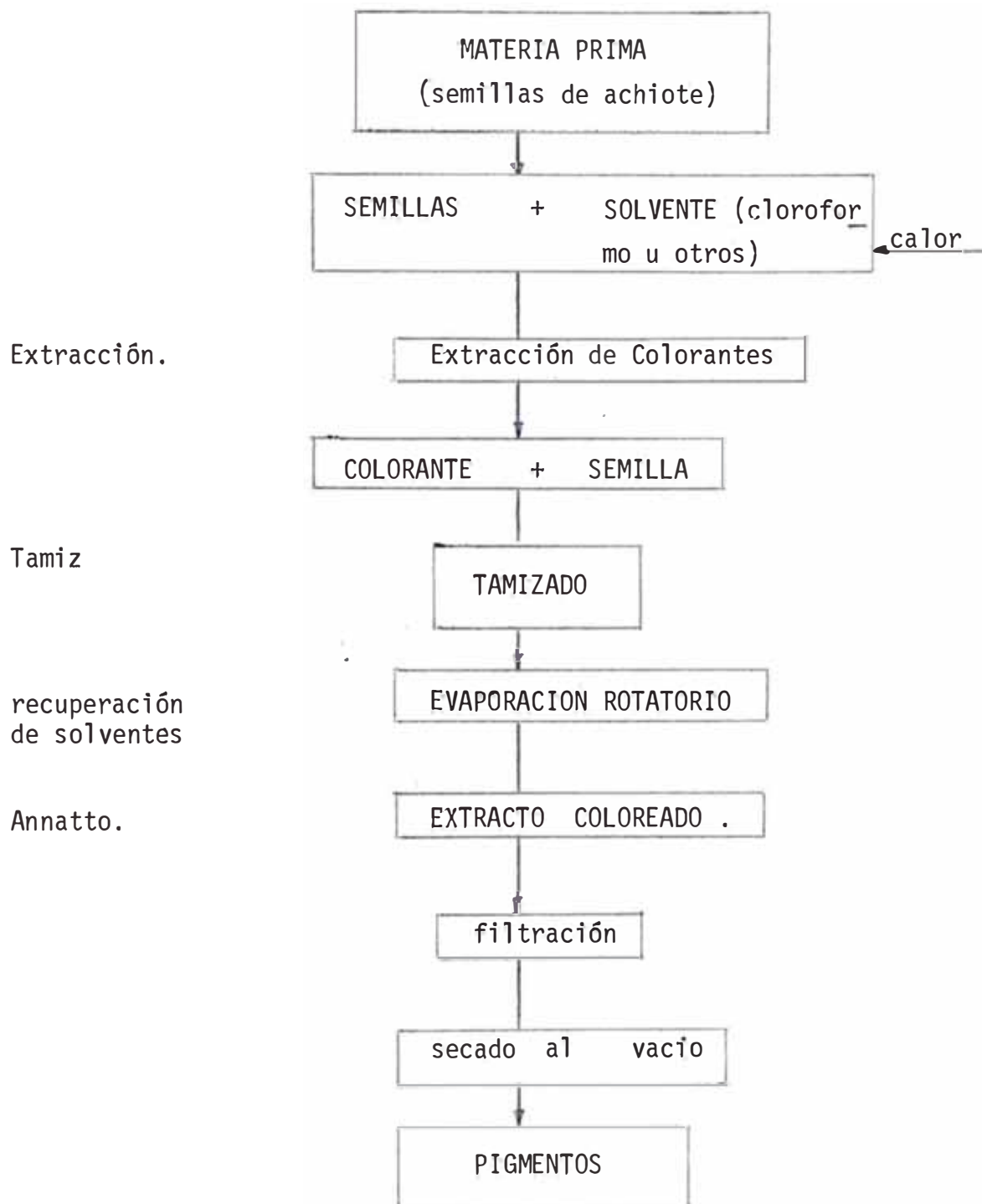


una particularidad de los compuestos polihalogenados, como es el cloroformo, es que son buenos disolventes de aceites y grasas, es por ese motivo que al cloroformo (y al tetracloruro de carbono) se le emplea para extraer aceite de las semillas (24). Existe peligros en el uso del cloroformo, y es la posibilidad de formación de fósgeno, COCl_2 , el cuál es un gas sumamente venenoso = producido por calentamiento en presencia de aire.



el tetracloruro de carbono también puede producir el fósgeno, al ser calentado a temperaturas elevadas en presencia de aire.

Diagrama del proceso.



IV.2,7.Extracciones Diveras.

Las semillas de achiote pueden ser tratados de diferentes maneras, para obtener diferentes preparaciones de annatto .

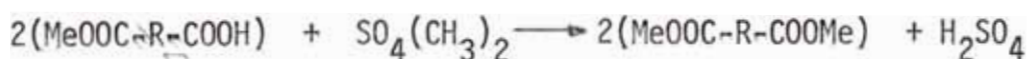
Esteres de la Bixina.

Se ha dicho que la bixina es un ester monometil de un ácido dicarboxílico, pues bien (ver pto. III.1.) también se conoce - la bixina completamente esterificada (ver III.2), el cuál es usada también como pigmento, como quiera que sea, ya no sería un ácido.

Los ésteres metil y etilo de bixina son sustancias conocidas, el cuál pueden ser obtenidas por la reacción de las bixinas con el sulfato de dimetilo ó con el sulfato dietilo o con el diazometano:

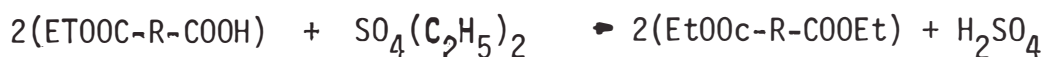
Si representamos a la bixina como; MeOOC-R-COOH, donde R - es una agrupacion altamente conjugada, se puede establecer,

Me: -CH₃



dimetil éster
metil Bixina

Et: - C₂H₅

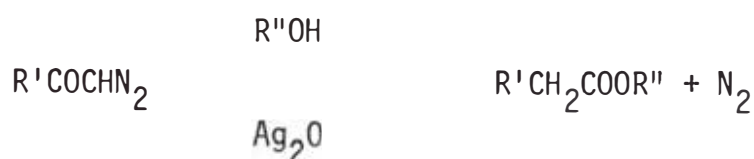


etil bixina

con el diazometano sucede algo diferente (2CH₂N₂) (24); se establece la síntesis de ácidos de Arndt-Eistert, donde los cloruros de ácido (veremos más adelante) reaccionan con el diazometano, produciendo diazometilcetonas;



Estas diazometilcetonas (R':MeOOC-R-), al ser calentadas con el agua en presencia de óxido de plata, pierden nitrógeno y sufren una transposición en la que interviene el disolvente, produciéndose un ácido cuya cadena de carbonos ha aumentado en un átomo de carbono con respecto al cloruro de ácido original.

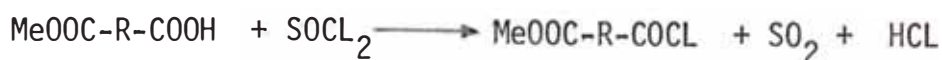


Al respecto de los ésteres de la Bixina, tenemos el estudio de Marbet and Winterstein (26), donde detalla la formación de ésteres con altos compuestos de alcoholes (alcoholes que contengan por lo menos 5 átomos de carbono en la molécula). Se basa en que el mismo ácido; la bixina es ligeramente soluble en grasas y aceites y en los solventes modernos tales como el éter de petróleo. La solubilidad de los ésteres Propil y Butil de la Bixina, que son componentes no novedosos, no son tan mejores que estos ésteres citados.

Explica, que los ésteres de bixina con alcoholes más altos poseen una solubilidad inesperada en grasas, aceites y solventes grasos. Por ejemplo, el amyl-Bixina (formado con el alcohol amílico) es 10 veces más soluble en los solventes grasos que el Butil-bixin, el octyl-bixin es aún 20 veces más.

La base de la formación de ésteres radica primero en la formación de los halogenuros de la bixina. Estos se obtienen mediante la reacción de un ácido (la bixina) con un agente haloge-

nante de tipo ácido:



Bixina cloruro cloruro de la
 de tionilo Bixina.

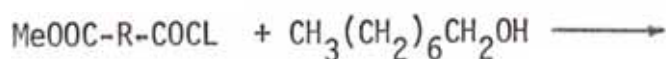
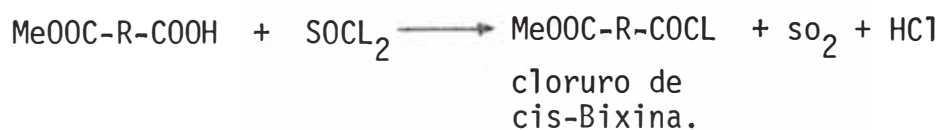
Los productos inorgánicos de esta reacción son gases y se eliminan fácilmente de la mezcla de la reacción. Como el cloruro de la Bixina carece de un hidrógeno ácido para poder participar en la formación de puentes de hidrógeno inter-moleculares (como es el caso del ácido), no se encuentra asociado, y por lo tanto tiene un punto de ebullición menor que la bixina. En vez de Cloruro de tionilo se puede utilizar, PCl_3 , PCl_5 , ó PBr_3 .

Una vez formado el cloruro del ácido, se forma el éster, - por la reacción del halogenuro del ácido con un alcohol (en este caso, de no menos 5 átomos de carbono), según: alcoholisis;



Este método es excelente para la preparación de ésteres. Frecuentemente se emplea una base, como la piridina, para eliminar el HCl. En contraste con muchos otros de los métodos empleados para la preparación de los ésteres, esta reacción no está regida por un equilibrio y se pueden obtener ésteres con muy buenos rendimientos.

Ej.



alcohol n-octílico



cis-bixin octil ester.

Nota:

Para todos los casos, el grupo metoxycarbonil, presenta una estabilidad mayor que el grupo carboxílico.

Producto de Degradación.

La Bixina puede ser hallado, o mejor dicho puede ser con -
vertido en un pigmento amarillo soluble en aceite, calentando el -
anhidrido acético. Este producto puede ser usado para teñir la -
margarina.

Para este propósito el annatto es calentado en un ácido mo-
nocarboxílico alifático más bajo (por ejemplo el ácido acético,
 CH_3COOH) en presencia de un anhidrido del ácido (anhidrido acéti-
co, $\text{CH}_3\text{COOCCCH}_3$). Es importante que el aire sea excluido (9) du-
rante todo el proceso, puesto que el oxígeno cataliza una polimeri-
zación a pigmentos insolubles y así puede ocasionar una muy seria-
pérdida de material. Esta catalización es disminuida aunque no en-
teramente prevenida, manteniendo una manta o cubierta de gas iner-
te (CO_2, N_2 , etc) sobre la mezcla desde el momento del preparado.
El anhidrido acético (de punto de ebullición más alto que el ácido
acético, tal como 140°C y del ácido, 118°C) funciona como un cata-
lizador para la conversión, mientras que el ácido actúa como sol-
vente'. Es posible, aunque menos conveniente usar otros solventes-
orgánicos; alcoholes alifáticos más bajos, pero el anh. acético es
indispensable. El resultado obtenido, es un material pigmentario-
amarillo que presenta una gran y vasta solubilidad en solvente tipo
aceite y su mejoramiento es reconocido con respecto al uso conve -

niente.

Modificaciones Físicas.

Se puede obtener un polvo convenientemente dispersible, disolviendo el annatto en un aceite vegetal o un extracto de aceite vegetal (ver IV.2.3.), mezclando esta solución con una solución acuosa de un agente dispersador y un spray seco en dispersión.

La siguiente afirmación es expuesta por Jacob Christopher (27), el cuál se basa, en que los carotenoides no han alcanzado su potencia completa, porque no se disuelven ni se dispersan rápidamente o fácilmente. Continúa, en materiales sólidos las sustancias cristalinas (cristales de bixina) tienen tendencia a mancharse, en preparaciones líquidas tienden rápidamente a depositarse. La solubilidad limitada de los carotenoides en más solventes comestibles y la inhabilidad para dispersar estas sustancias en el medio acuoso, el uso de soluciones hasta ahora no ha resuelto el problema.

Aunque los carotenoides están generalmente caracterizados como soluble en aceite, su solubilidad es de tal manera en orden bajo a temperaturas ordinarias tanto que no alcanza un nivel práctico. Ej. la sustancia usada comunmente, el B-caroteno, tiene una solubilidad de cerca de 0.08% por peso en aceites vegetales a temperatura ambiente, las soluciones supersaturadas de los carotenoides en aceites comestibles, tales como el aceite vegetal que son licuados a temperatura ambiente, puede ser preparados calen -

tando el aceite a temperaturas elevadas, sin embargo estas solu-
ciones son inestables y normalmente el carotenoide se cristaliza
prematuramente, particularmente al enfriarse.

Entonces, preparar agentes colorantes en forma seca y que
impartan un color uniforme al secarse, sería lo más aconsejable.
Específicamente, se puede lograr composiciones de carotenoide usa
das como colorantes que sean dispersibles en agua.

En la extracción de colorantes del achiote con aceite vege
tal, se explico los pasos a seguir en dicho método, pues bien, se
ha descubierto (27) que estas soluciones extraídas con aceite,
(aceite de coco, aceite de soya, etc.), a temperaturas elevadas,-
disueltas en un material gelatinoso (el cuál se utiliza como esta
bilizante, por ej-gomas solubles en agua,coloides gelatinosos-ge
latina pectin, goma arábica, pirrolidone polivinil, etc.) pueden
ser pasadas en spray seco (atomizador) para formar un compuesto -
polvo que es soluble en agua, adicionalmente se puede agregar pre
servativos y antioxidantes tales como el hidroxitolueno butilado
hidroxianisol butilado, galato propil, tocoferoles, palmitato as
corbil, etc. el cuál aumenta la estabilidad contra la deteriora
ción al calentar al aire y al mezclar. Preferentemente estos ma
teriales son introducidos en la fase aceite.

Una descripción detallada se da a continuación; Una solu-
ción acuosa de gelatinosa es calentada a una temperatura cerca
de 60 a 100°C, separadamente, una solución supersaturada de caro
teno (como lo es el extracto de annatto en aceite) se agrega al a

ceite caliente, preferentemente de 135 a 145°C, el cuál es preferido que se realice en atmósfera inerte (CO₂, N₂, etc.) La solución caliente de caroteno-aceite, entonces es rápidamente emulsificado con la solución gelatinosa acuosa caliente y pasa a través de un pulverizador rotante, el cuál dará como resultado gotitas muy fina o lloviznas. La temperatura del pulverizador puede ser cerca de 60 a 90°C.

Los colorantes así preparados (en polvo) pueden ser usados en comestibles de preparaciones secas que están siendo reconstituidas o procesadas con agua antes de ser usadas en las mezclas de cake seco, en las bases de bebidas secas, en los postres de gelatinas etc. Similarmente los productos coloreados obtenidos por el método citado, hacen posible que los colorantes de productos comestibles de base acuosa, tales como jugos, bebidas, helados, etc. dispersen la preparación seca en el líquido acuoso sin cristalización o sedimentación del pigmento.

Se puede también obtener el annatto en forma granulada, el cual se obtiene disolviendo un éster de la bixina en un aceite vegetal hidrogenado (normalmente sólido) el cuál será puesto en enfriamiento. La temperatura de operación podrá estar entre los 95 a 125°C y el éster formado será sustancialmente proveniente de un ácido alto graso. El tiempo límite de proceso no deberá pasar de la hora. Un estudio al respecto lo realiza Perret (19).

IV.3. Especificaciones de Color.

Hasta el momento no existe en nuestro país normas de adecuación de este tipo de colorantes, por lo que todo el colorante de achiote es importado, adecuándose a sus normas y pruebas.

Las siguientes pruebas se establecen para estos tipos de colorantes y pueden ser adaptados a la Bixina.

Prueba para materia insoluble en solución de amoníaco.

Reactivos. Los reactivos pueden ser reconocidos en calidad analítica. Debe ser usada agua destilada o agua que iguale su pureza.

- a) Solución amoníaco, conteniendo 10% w/w de NH_3
- b) Solución amoníaco, conteniendo 0.1% w/w de NH_3

Aparatos.

- a- Filtro de vidrio incrustado,
- b- Horno secador, controlado a 105°C

Proceso.

- a) Peso, al miligramo más cercano, alrededor de 0.25 gr. de la materia colorante y disuelta en 2.5 ml. de 10% de solución de amoníaco. Diluir con agua, transferido a un frasco volumétrico de 100 ml. y diluir hasta la marca con agua. Observe si la solución resulta clara o nublada.
- b) Filtre la solución a través de un filtro de vidrio incrustado que haya sido previamente secado, enfriado y pesado. Lave el filtro con el 0.1% de solución de amoníaco, entonces sequé el filtro a 105°C , enfriélo y nuevamente peselo.

Método para la determinación de la ceniza.

Aparatos.

a- crucero de platino o sílice.

b- horno de arcilla, controlado a 500°C aprox.

Proceso.

Pese, alrededor de 1 gr. de la materia colorante polvoreada en el crucero, el mismo que ha sido previamente encendido, enfriélo y peselo. Caliente el crucero y su contenido hasta que la materia-carbonoza haya desaparecido. Enfriélo nuevamente y peselo.

Expresión de resultado.

Expresa el peso de ceniza restante como un porcentaje del peso de materia no volátil a 105°C.

Método para la determinación de la Intensidad de Color.

Reactivos.

Los reactivos pueden ser de calidad reconocida analíticamente. Agua destilada o agua con igualdad de purezas puede ser usada.

a) sol.amoniaco, 10% w/w NH_3

b) sol.amoniaco, 0.25% de w/w de NH_3 .

Aparatos.

Espectrofotometro.

Proceso.

a) Disuelva una cantidad de materia colorante equivalente a 0.20-gr. de materia no volátil a 105°C, en 5 ml. de 10% de solución de amoniaco. Diluya en agua, transfírala a un frasco volumé-

trico de 200 ml. y diluya hasta la marca a 20°C con agua.

- b) Por medio del Espectrofotometro, determine la longitud en onda de absorción máxima y mida la absorción a esta longitud. Si se requiere más solución diluída para la medida, use 0.25% de sol. de amoniaco como diluyente.

Expresión de resultados.

Calcule el coeficiente de extinción $K^{1\%}_{1\text{cm}}$, a la longitud de onda de absorción máxima y reporta ambos a la longitud correspondiente.

Hasta el momento, las normas indias sobre especificaciones de color para annatto son las más destacables. Un estudio de Dendy, Annatto, The Pigment of Bixa orellana (28) da pautas para estas especificaciones.

IV.4. Pruebas Experimentales.

Los conceptos teóricos sobre la cuál se basan los diferentes métodos de extracción, ya fuerón estudiadas. En este punto lo que se trata, es de obtener métodos optimizados de extracción que se adecuen a nuestro sistema (materia prima) con parámetros propios de investigación, al fin de hallar el mejor método para la extracción del colorante básico del achiote: la Bixina, el cuál es un pigmento orgánico. Hago constar que las pruebas realizadas fuerón a nivel de laboratorio, los cuales podrán proyectarse a nivel piloto.

Lexiviación con Agua.

- a) Fria: 100 grs. de semilla de achiote son puestas en 200 grs.-

de agua fría, los cuales en conjunto son agitados por el lapso de 2 a 2 1/2 hr. con escala 5.5 en el agitador fisher Dyna-Mix, pasado este tiempo de agitación constante, se tamiza la solución coloreada con el fin de separar las semillas decoloradas. El extracto coloreado es puesto en una pera de decantación donde se separa la fase acuosa quedando una pasta coloreada, el cual será puesto en estufa (no superar los 40°C) por espacio de 15 min. El resultado es una masa coloreada de color rojo tenue mente anaranjado.

Observaciones.

La única ventaja que posee este método, es el uso del agua como un solvente. Entendemos que el agua actúa como un alcali, pero como es débil, este no actúa satisfactoriamente.

Existe el problema también de las impurezas que se presenta por este método, el agitación constante desprende cascara de las semillas y estas dificultan el filtrado. El rendimiento que se puede alcanzar por este método (gr. de masa pastosa/ 100 gr. de semilla) es del 12.5% en promedio.

b) Caliente: El agua que se utiliza, deberá estar a la temperatura de ebullición y el tiempo de agitación es aprox. de 3/4 a 1 hr., mejoraría el método en la repartición de las semillas en varios matraces.

Observaciones.

La manera de proceder es similar al del agua fría, pero con un

mejor resultado en el rendimiento, el cuál es en promedio del 15%. En ambos casos el tiempo de decantación es demasiado, perjudicando la continuidad de pruebas.

El Ph promedio de la masa coloreada es 4.8, variando de 4.5 a 5.

Lexiviación con Hidroxido de Sodio.

100 grs. de semilla de achiote son tratadas con una solución alcalina (de hidróxido de sodio) que esté a un Ph de 11.78, o que oscile entre 11-12. Esta solución alcalina representa 0.04% de NaOH (0.2 gr. de soda diluido en 500cc. de agua destilada) en agua destilada, el cuál será de aprox. 500cc. El conjunto en sí, es agitado por un lapso no menor de 2 hrs., en forma constante (escala 6.5 en la fisher Dyna-Mix). Para separar la solución coloreada de la semilla una malla 200, será utilizada, quedando una solución aprox. de 480 cc., con un Ph de 7.45.

El resultado de este procedimiento, representa una solución coloreada de una densidad mayor que la del agua, el cuál podría ser pasado al spray, con tratamiento adecuado.

A la solución coloreada, se le pasa por filtro, para eliminar impurezas y se procede a la neutralización con exceso de ácido. La solución ácida utilizada en la neutralización es el ácido clorhídrico de composición 2N, el cuál será agregada por un bureta graduada con agitamiento constante. Al respecto cita



a. pasta coloreada



c. extracto neutralizado.



b. extracto coloreado (sin neutralizar)

Fig. IV.4.1. Extracción de Colorantes por medio de sol. alcalina (NaOH).

mos el Ph que toma la solución coloreada con la adición del ácido;

Acido Clor- hidri- co-2N	0.0	0.5	0.7	1.0	1.6	2.5	2.75	4.0	2.0	5.35
Ph	7.45	6.3	5.9	5.4	4.7	4.0	3.7	2.9	2.5	2.3

A un Ph de 4.0 a 3.7 aparece flóculos de colorante, los cuales se precipitan hacia el fondo del vaso. Se decanta y filtra, quedando una masa coloreada de color rojo indio, el cuál será secado en estufa, de no más de 40°C.

Observaciones.

El tratamiento con la solución alcalina, puede estar a una temperatura de 40°C, el cuál ayudará al mejor desprendimiento del colorante de las semillas. Es necesario que la solución tamizada se neutralice con la cantidad necesaria del ácido.

Con este método de extracción, no será necesario dejar macerar las semillas en la sol. alcalina, bastará para esto una agitación constante. El colorante obtenido es soluble en alcohol etílico-absoluto y demás solventes orgánicos (acetona, éter etílico, etc) con los cuales se podrá matizar una serie de colores. El rendimiento podrá llegar hasta un 35%, pudiendo ser superado con mejores métodos de filtrado. La solución ácida podrá ser de diferente normalidad, pero se encontró óptima la de 2N, el cuál da un rango aceptable del Ph en la neutralización.

Extracción por medio del aceite comestible.

25 grs. de achiote son colocados en un vaso, que contiene 245 cc. de aceite vegetal caliente de aprox. 60°C (podrá ser mayor aún) Dejar actuar no más de 1/2 hr. y tamizar las semillas de achiote.

Se podrá obtener 235 cc. de solución aceitosa coloreada . Para tratar de separar el colorante de la solución, se tratará a este con los siguientes solventes;

- alcohol isopropílico.

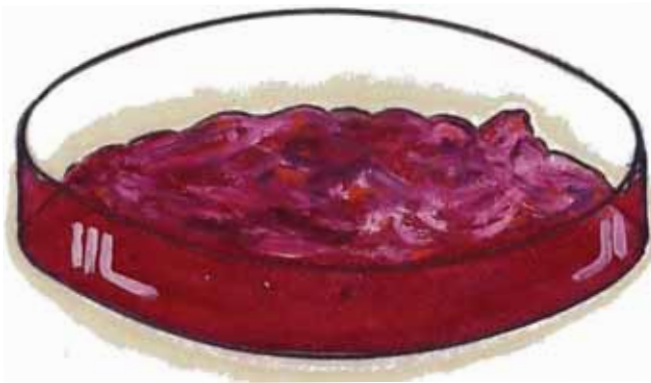
- Acetona.

- Metanol, etanol o cualquier alcohol primario, en cantidad igual a la solución aceitosa. La solución alcohólica coloreada resultante será aproximadamente del 40% del volumen total (solución aceitosa más solvente), el cuál será pasada en un evaporador rotatorio (Rotavapor-Buchi) para concentrar la masa colorante Se puede encontrar una serie de matices, si las semillas son tratadas con el aceite a diferentes temperaturas.

Observaciones.

Es ideal el colorante encontrado, para obtener la bixina por el método de Etti.

El colorante encontrado, a diferencia de los anteriores métodos es de gran poder de tintura y excelente para el teñido de telas. Dentro de los solventes utilizados, se encontró un mejor rendimiento con los alcoholes primarios (principalmente con el alcohol etílico.)



a. pasta coloreada



c. extracto neutralizado



b. extracto coloreado (sin neutralizar)

Fig. IV.4.2. Extracción de Colorantes por medio del Glicolpropileno.

Extracción por medio del Glicolpropileno Alcalino.

100 grs. de semilla de achiote son puestas en un vaso de precipitación. Preparar una solución que contenga 250 cc. de hidroxido de potasio al 2.8% con 250.cc. de propilen-glicol (o en proporción semejante; cc. de glicol-propil/cc. de 2.8% de KOH igual 1)

Obtenida esta solución, agregarla a los 100 grs. de semilla de achiote y mantener una agitación constante por tiempo no menor de 2 hrs. (6 1/2 esc.fisher Dyna-Mix), con el fin de obtener el mejor desprendimiento de la episperma de la semilla. Se procederá luego a tamizar, para separar a la solución coloreada de las semillas de achiote (para obtener mejor rendimiento, después del tamizado, se podrá lavar las semillas de achiote con un poco de la solución alcalina, aprox. 100 cc.) La solución coloreada así tratada (después de ser filtrada), con diferentes tratamientos a fines puede ser empleada para colorear diversos alimentos. El extracto así filtrado, es neutralizado con exceso de ácido para la precipitación de la Bixina, siguiendo los siguientes perfiles;

Acido Clorhídrico solución 2N	0	25	70	75	85	90
Ph	12.25	11.8	6.8	5.8	4.0	2.8

A un Ph de 2.8, prácticamente casi toda la solución coloreada -
tiende a precipitarse, cambiando de color rojo indio a un color-
rojo naranja. Por la densidad del colorante, este se precipita-

en el fondo del vaso, el cuál despues de cierto tiempo puede ser decanto y filtrado, La masa pastosa coloreada así deberá secarse en estufa que no supere una temperatura de 40°C.

Observaciones.

El método de Hidroxido potasico propilen glicol, es el que mejor realizar el proceso de lavado de las semillas, que los anteriores métodos citados, entendiéndose por lavado, a la separación del colorante de la semilla.

La neutralización con exceso de ácido, a la solución coloreada, deberá hacerse en constante agitación, para la neutralización uniforme, teniéndose en cuenta el pH a todo momento.

El proceso de filtrado es el más óptimo, obteniéndose el colorante en forma de torta, en el sistema Buchner-Kitasatto.

Si quisieramos establecer una relación de la cantidad de solución ácida que se necesitaría para la precipitación del colorante, este estaría dado por:

$$\frac{\text{a } 100 \text{ gr. de achiote tratado}}{\text{sol. ácida 2 N.}} = \frac{10}{9}$$

el rendimiento promedio hallado, fué aproximadamente del 60% con respecto a la cantidad de semilla utilizada. Creo firmemente, que este promedio podrá ser superado en mejores condiciones de trabajo.

Los tonos de color encontrados, varían de acuerdo a las concentraciones en los solventes orgánicos conocidos, desde amarillo tenue hasta rojo indio.

Extracción por medio del Alcohol Etilico y el Tricloro-Etileno.

Este método se aplica luego, que se obtengan los colorantes, por los anteriores métodos, específicamente, radica en la concentración del extracto de coloreado. Preferentemente, si los métodos anteriores son la de NaOH o la del glicol-prolieno.

Luego del tamizado, para separar las semillas del extracto soluble con los colorantes, se trata a este extracto con el alcohol etílico (PB:78°C) y el tricloro etileno (PB:87°C) en proporción de 1:1.

Extracto y solvente son removidos por destilación durante 3/4 a 1 hr. recuperando los solventes (al parecer mezcla azeotrópica) a los 75°C. La masa coloreada resultante es aproximadamente los 3/4 de la solución coloreada, el cuál se colocará en estufa a una temperatura que no supere los 35°C.

Observación.

La masa coloreada es de gran calidad, pero por el costo de los solventes no sería recomendado este método.

La variedad de color son de las más diversas, variando desde amarillo pálido hasta un rojo carmín. La masa pastosa coloreada -- puede ser tratada para la obtención de la bixina pura por las propiedades físicas que presenta (por el método de Etti.). El rendimiento no superará al 16%.

Extracción de colorantes por medio del cloroformo.

El siguiente método, fué realizado siguiendo las pautas de los conceptos teóricos antes citados (ver IV.2.6.).

Tomar 100 gr. de achiote y ponerlas en un frasco de salida lateral, en el cuál existe Cloroformo (PB:62) de proporción igual en cc, al peso de semilla o sea 100 cc. La extracción con este solvente estará ayudado con los solventes: alcohol etílico y tricloro etileno (100 cc. de c/u.). La mezcla en si se mantendrá en agitación (125 RPM) por un lapso no menor de 30 min. El baño maría será necesario a una temperatura de 42°C, y también un vacío de 0.4 atm. La masa pastosa resultante después del tamizado es filtrado, resultando un producto fácil de secar al medio ambiente.

Observaciones.

El conjunto de estos tres solventes accionan sobre las semillas- realizando un buen lavado en un poco tiempo de agitación. La recuperación de solventes en este método es de mayor consideración, pues hasta ahora no existe una recuperación satisfactoria, de ahí que el costo de éste método es algo costoso. Un rendimiento del 13%, será el máximo deseado.

IV.4.1. Composición de las diferentes preparaciones de Annatto obtenidas por los diferentes métodos en el Laboratorio.

Los resultados que se van a mostrar, tienen como base 100

grs. de semillas de achiote. La variedad de achiote que presenta nuestro país es diversa, por eso creemos que las más representativas son las de Junín, Cuzco, y Huánuco, por la cantidad que se produce en estos departamentos. Para todos los casos de aquí en adelante la siguiente nominación serán las representativas:

- (A) Lexiviación con Agua.
- (B) Lexiviación con Hidróxido de Sodio (alcali)
- (C) Extracción por medio del Glicol-propileno.
- (D) Extracción por medio del Alcohol etílico y Tricloro Etileno.
- (E) Extracción por medio del Cloroformo.

Es importante citar que los resultados aquí expresados - pueden ser aún optimizados, de acuerdo a la buena disposición -- del material de trabajo y al reemplazo de equipos e instrumentos que faciliten y mejores los métodos.

TABLA IV.4.1.1.

Composiciones de annatto en los diferentes métodos.

Departamento	Método (annatto en grs./100 grs.de semilla)				
	A	B	C	D	E
Junín	15	35	60	16	12
Cuzco	16	38	50	13	12
Huánuco	12	32	55	16	12.2
Promedio:	14.33	35	55	15	12.06

Nota: Un cuadro más general, será presentado en el punto V.3.1., donde se incluirá el % de pigmentos y de Bixina.

IV.4.2. Resultados.

Como se ha podido notar cada método presentado (parte teórica y parte experimental) presentan condiciones tanto favorables como desfavorables. Si nos guiamos por los resultados, los más favorables para la extracción (ver Tabla IV.4.1.1.) son los métodos del propileno glicol alcalino y la de Hidróxido de Sodio, por la cantidad de annatto que se puede producir. Veamos lo que dice la experiencia del uso de colorantes en los comestibles.

Las formas bien conocidas de extracción de colorantes son las que se obtienen por el método de aceite comestible y la extracción con soluciones alcalinas; pues bien, estos métodos citados tienen serias desventajas. Por ejemplo, la solución de aceite vegetal de annatto, mientras es usada para la coloración de comestibles, los cuales tienen un alto contenido graso, como las margarinas y las mantequillas, son prácticamente útiles, pero si esta misma solución coloreada se le agrega a la leche por ejemplo, resultaría que tal solución flucularia sobre la leche (23), siendo prácticamente imposible o extremadamente dificultoso efectuar una distribución uniforme de dicha solución en toda la leche. Por otro lado, los extractos coloreados obtenidos con solución acuosa alcalina, puede ser usada desde un punto de vista,

práctico, solo en la coloración de comestibles o soluciones que seán esencialmente acuosas en propiedad, o que el contenido acuoso sea considerablemente mayor que el contenido graso. Tales extractos acuosos no son totalmente satisfactorios al usarse para la coloración de productos comestibles de un alto contenido graso tales como la mantequilla, la margarina o el queso procesado.

Tratando de superar estos inconvenientes, se han estado presentando en la preparación de composiciones de annatto, materiales oleoginosos, tales como, un aceite vegetal, al cuál hay que añadirle un agente emulsionante en la forma de un éster parcial de un ácido graso con un alcohol polihidrico. Este acercamiento ofrece ciertas ventajas sobre las prácticas previas ya conocidas, no obstante tiene un número de dificultades asociadas, con él, el cuál se ha limitado contra su adopción por el arte, al menos a cualquier alcance de material.

En el caso de extractos alcalinos de annatto, el cuál generalmente se usa en la tintura del queso, estos tienen una seria desventaja, el cuál es relativamente inestable. Como ejemplo podemos citar, que después de un corto período de tiempo de almacenaje; aparece una cantidad apreciable de depósitos sedimentosos; dichos pigmentos sedimentados aparentemente contienen pigmentos de annatto que han sufrido cambios químicos (por ejemplo la oxidación que produce el orellin). El efecto que produce tal sedimentación es brindar a la solución de annatto una débil potencia de coloración. Si lo exponemos a temperaturas bajas, --

como algunas veces ocurre en el almacenaje, se acelerará la ac-ción de sedimentación. Esta situación necesariamente se presen-ta, por eso hay que tomar medidas de precaución para resguardar-las adecuadamente contra las soluciones de annatto refrigerante durante el almacenaje o en tiempos de invierno. La sedimentación parece ser causada o acelerada, por razones de la presencia en los extractos acuosos de las semillas de annatto, de ciertos elementos extraños al pigmento mismo de annatto, los cuales son extraídos de las semillas de la bija (como también se le conoce), junto con el annatto en proceso de extracción alcalino acuoso - descrito anteriormente.

El uso de glicol propileno alcalino para la extracción de semillas de annatto, resulta una extracción efectiva del pigmen-to de annatto deseado y anula la extracción de otros elementos de la semilla, que aparentemente, hasta ahora, han sido responsa-bles de la sedimentación mencionada o de la aceleración de este. No solamente hace que los resultados de las composiciones de -- annatto posean un color destacable. sino que también dichas composiciones de annatto, aún después de meses de almacenaje a bajas temperaturas, como el orden de 0°C. y aún más bajo, no exhibe ninguna sedimentación.

Las composiciones de annatto, o sea soluciones de annatto glico propileno alcalino, han demostrado que poseen ciertas ven-tajas importantes sobre las composiciones de color de annatto obtenidas por métodos descritos. Como ya se ha indicado tienen -

una marca superior para los extractos acuosos conocidos previamente de las semillas de annatto, con el objeto de mantener la estabilidad contra la sedimentación. En otro lugar, pueden ser usados altamente para una coloración efectiva en productos alimenticios ya sea de alto o bajo contenido graso o contenido acuoso, así, se puede colorear satisfactoriamente, la mantequilla, el queso natural, el queso procesado, margarina y helados (23). Otra importante propiedad de estas soluciones es que son solubles en el agua o sea son hidrosolubles, entonces pueden ser añadidos a la leche líquida y ser mezcladas uniformemente hasta efectuar la coloración de la leche.

Si partimos de la concepción de que los carotenoides (la-bixina es un carotenoide) no han alcanzado su potencia completa , no se disuelven ni se dispersan rápidamente (Ver IV.2.7, modificaciones físicas), ninguno de los métodos expuestos en la investigación son óptimas; he tratado de citar solo las ventajas que tiene un método sobre los demás en cuanto a su comportamiento físico.

El problema de la solubilidad del annatto, radica también en la forma como se encuentra, consideramos en modificaciones físicas, las conveniencias de utilizar el annatto como un polvo colorante, o también en forma de ésteres, etc. En forma muy particular pienso que el método que presenta mayores ventajas y da una tonalidad de colorante efectivo al annatto, es el de la extracción con propileno glicol alcalino. Los resultados obtenidos al respecto acrecientan aún más lo dicho. En cuanto a los métodos

de extracción con solventes, estos producen colorantes de gran calidad, pero por el costo del solvente y su parcial recuperación, se limitan mucho a la extracción (solventes como acetona, alcohol etílico, tricloro etileno, etc.).

V.- OBTENCIÓN DE LA BIXINA.

El pigmento básico del annatto es la Bixina (ver III.1), el cuál representa aproximadamente el 70% del total de pigmentos. La masa coloreada pastosa encontrada por los métodos de extracción citados, fuerón nuestros primeros pasos, lo que se trata en este punto es de obtener la bixina, ya sea por los métodos convencionales o por los encontrados más satisfactorios en la investigación. En todos los casos que trataremos, parten del colorante ya obtenido, el cuál por medio de procesos de purificación se obtendrá la Bixina.

V.1. Pruebas de Laboratorio. Métodos.

Los métodos hasta ahora conocidos son contados, tales como el de Etti, Dumontal, Zwick y Panizer, los cuales tratan con el colorante ya obtenido, otros como Mc Keown establecen métodos propios de obtención (8 y 10). Sin embargo podemos establecer con continuidad de investigación, métodos novedosos de obtención dado que el componente en si; la Bixina, tiene comportamientos definidos en la química orgánica. Al respecto cito un posible método establecido como consecuencia de los anteriores.

V.1.1. Método de ETTI.

Los colorantes obtenidos por los diferentes métodos de extracción ensayados, son tratados con el alcohol etílico, -formandose así un líquido alcohólico, que será filtrado para eliminar las impurezas del medio. A la solución alcohólica coloreada se trata con carbonato de sodio para formar la sal del ácido correspondiente (Bixinato de sodio) el -cual seguidamente será neutralizado con una solución de ácido clorhídrico, para de allí obtener la bixina pura. Preferentemente se encontró, que un 20% de carbonato de cal -cio y solución 2N de ácido clorhídrico es de lo más óptimo pudiéndose establecer nuevos parámetros.

V.1.2. Método de DUMONTAL.

Este método es más que novedoso, es de purificación. Consiste en tratar los colorantes a la acción de una solución alcalina, tales como el Hidróxido de Sodio o el Hidroxido de Potasio. La solución coloreada resultante es filtrada y neutralizada con una solución ácida (preferentemente, el ácido clorhídrico). El colorante así obtenido es secado , quedando así la Bixina, para establecer mejor el rendimiento, se podrá agregar cloruro de sodio, para una mejor precipitación de la Bixina. Si el colorante utilizado en este método es el extraído por el de la sol. alcalina, los -rendimientos serán de los más óptimos.

V.1.3. Método de SWICK.

Consiste en someter a los colorantes antes extraídos a la acción del cloroformo al que luego se le dejara evaporar - (recuperando el solvente). El residuo se lavará repetidas veces con ligroina hasta obtenerse la bixina en forma de - cristales, los cuales serán secados en estufa.

V.1.4. Método de HEIDUSCHA y PANZER.

Básicamente consiste el tratamiento del colorante con solventes. El extracto coloreados es tratado con cloroformo, donde despues de ser secado y pulverizado es tratado con a cetona, alcohol etílico, o metílico. El producto coloreado se lavara con éter, al cual al evaporarse dejará libre a la bixina.

En la extracción de la bixina, existen numerosos métodos , pero todos relacionados entre si. En el estudio de análisis cromatográfico de la Bixina por Mc.Keown (10), encontramos que este describe su propio método de preparación de la Bixina para sus a nálisis, al cual podemos citar.

Las semillas frescas de la Bixa Orellana, fuerón extraídas con ácido acético glacial, hirviendo. El extracto fué filtrado y luego concentrado por evaporación bajo presión reducida a 70°C.

Por enfriamiento, un depósito de Bixina cristalizada fué obtenido, con un punto de derretimiento constante (punto de fusión de 196 a 198°C), el cuál está de acuerdo con los datos físicos de la bixina. Este mismo autor describe otro método de extracción pero empleando, en vez de ácido acético glacial, cloroformo (8).

Los métodos citados en este punto, son más generales y por los tiempos en los que fuerón conceptuados, pueden ser complementados y distribuidos en base a ellos, un óptimo método de extracción.

V.1.5. Método complementado para la Obtención de la Bixina, establecido en la Investigación.

Para la obtención propia de nuestra muestra en la investigación se llegó al establecimiento del siguiente método:

250 gramos de semilla de Bixa Orellana, es cubierto con 250 cc. de cloroformo y 50 cc. de alcohol etílico absoluto. El conjunto en si, es calentado a una temperatura aproximada de 40° cent. con agitamiento constante durante 2 a 3 hrs. El alcohol-etílico ayuda en forma óptima a la extracción, reteniendo hasta cierto grado la evaporación de los solventes. A la solución coloreada resultante, se le tamiza y se filtra respectivamente. (comprobar de manera visual que todo el episperma de la semilla halla sido extraída, caso contrario, hacer una segunda extracción con un mínimo de solvente).

La solución coloreada extraída, es evaporada en un Rotavapor-R (Buchi)- evaporador rotatorio-. con revoluciones controladas. La temperatura de operación no excederá a 38.5°C y 10 en escala de revolución. El resultado de la operación es una masa pastosa de un tono de color muy profundo, el cual es muy inestable al calor (se adhiere al recipiente que lo contiene). Es criterio de operación, el de secado al medio ambiente o al vacío. Para conveniencia de la investigación, el secado fue al medio ambiente (de un día para otro); encontrándose cristales aglomerados de aspecto anacarado. Un método convencional se utilizó en la cristalización, una dilución y enfriamiento (al medio ambiente), el cual arrojó cristales violeta oscuro, de aspecto prismático (en la mayoría que se encontró, los cristales son de estructuras frágiles). Los cristales hallados presentan una absorción máxima en los 490 a 510 mμ, con un punto de fusión de 196 a 210°C.

El método expuesto radica en el gran poder solvente que tiene el cloroformo en este tipo de procesos (buenos disolventes de aceites y grasas), ayudados por la acción del calor y la presencia de otro solvente, alcohol etílico. La concentración de la masa coloreada en el rotavapor, es una parte importante del método.

V.2. Determinación de Calidad.

Hasta el momento, se ha tratado de obtener tanto el anatto (que es la pasta coloreada), por métodos descritos anteriormente, dando rendimientos en base a la masa coloreada encontrada: Pues bien, en el presente punto, trataremos de encontrar el pro

centaje total de pigmentos que existe en estos preparados de annatto y también el porcentaje de Bixina que hay en el total de pigmentos.

Se citarán métodos para encontrar el total de pigmentos y bixina que hay en los extractos coloreados de la semilla de achio te, que se adecuen a nuestro sistema.

Es interesante anotar las contribuciones dadas por G.C. Mc Keown, al respecto. Tenemos su estudio muy completo de las calidades de annatto, en "The Composition of Oil-Soluble Annatto Food Colors", donde existe métodos de determinación de calidad muy bien sustentados (8). Nos referiremos a uno de sus análisis donde cita las composiciones de annatto comercial.

TABLA V.2.1.

Pigmento total y contenido de Bixina en diversas preparaciones de annatto comercial (pag.766-ref 8) Tabla 3.

Color	Run	Total pigments, g / 100g.	Bixin g /100g	Bixin,% of total pigments.
A	1	0.608	0.255	44.7
	2	0.608	0.277	
B	1	0.332	0.103	31.0
	2	0.332	0.103	
C	1	0.570	0.337	59.1
		0.575	0.337	
D	1	1.45	0.468	32.1
	2	1.45	0.462	
E	1	0.248	0.129	51.6
	2	0.252	0.128	
	1	0.685	0.297	42.5
	2	0.689	0.288	

(tabla 3, ref. 8-Journal of the A.O.A.C.-vol.45, N°3, 1962 , Pag 766).

En la parte introductorio, se hizo incapie de las condiciones satisfactorias que presentaba el colorante de la Bixa, originando su análisis en un espectrofotometro simple, por la absorción del colorante en la región de la Luz visible, deciamos tambien que la bixina y sus productos de transformación pueden ser agrupados en dos clases, para sus determinaciones de calidad, la primera que absorve cerca de los 500 a 470 μ en cloroformo (la bixina y sus isómeros); la segunda clase son los pigmentos amarillos que indican un máximo cerca de 404 y 428 μ , en el mismo solvente. Asi los pigmentos amarillos pueden ser determinados a una cierta longitud de onda y la bixina (e isómeros) a otra.

El criterio asi expuesto, será la base en las fórmulas de determinación de la calidad.

V.2.1. Porcentaje de Pigmentos:

Una solución que contenga una cantidad pesada de preparación de annatto por diferentes métodos (puede ser 100 mg. diluido a 100 cc. con cloroformo) es diluida en cloroformo. A la solución coloreada asi preparada, se le determina su espectro de absorción (pudiendo ser el espectro-ny 20). la dilución puede ser necesaria, sobre el recorrido de 600-

400 mu, usando unos 10mm. de célula. Debera medirse la absorvancia a 404 mu. y en el máximo de 500 mu. asi el radio A_{404}/A_{501} , para la bixina es de 0.256; la corrección es de $0.256 \times A_{500 \text{ max}}$. Por eso la absorvancia total de pigmentos es:

$$A_{tp} = A_{500 \text{ max.}} + A_{404} - (0.256) \times A_{500} \quad (1)$$

y el total de pigmentos calculados en gramos por 100 gramos es:

$$\text{Total pigmentos} = (A_{tp}/A_{501 \text{ bixin}}) \times (\text{volumen}/100) \times (100/w)$$

donde:

A_{tp} es el descrito en la ec. (1)

$a_{501 \text{ bixin}}$ es la absorvidez (coeficiente de absorción) a 501 mu, el cuál es: 282.6

volumen, es el volumen de la solución muestra.

w, es el peso de la muestra en gramos.

Si expresamos la fórmula en las medidas expuestas, se podría reducir a:

$$\text{Pig. total} = (A_{tp}) / (28.26 \times w) \quad (2)$$

V.2.2. Porcentaje de Bixina:

Para saber el contenido de Bixina que posee un preparado de annatto, se requiere una separación cromatográfica, para determinar a la bixina en presencia de sus isómeros y sus productos de degradación. En el punto siguiente

(V.2.3.) se describirá el método de análisis cromatográfico, ahora partiremos de la zona de la bixina hallada por cromatografía de papel. La zona de Bixina hallada es eluata con 50 ml de cloroformo y examinado en un espectrofotómetro (en nuestro caso, el Spectrony 20), usando unos - 10 mm. de célula. Se medira la absorvancia del máximo en la región de 500 mu (la bixcina en cloroformo indica un máximo de 501 mu.pero en presencia de la DMF- que se usa en el análisis cromatográfico es cambiado ligeramente para acortar longitudes). Se calcula el contenido de bixina del color de annatto en términos de gr/100 gr;

$$(3) \text{ Total Bixina} = (A_{500 \text{ max.}} / 282.6) \times (5.0 / 0.1) \times (50 / 100) \times (100 / w).$$

donde; 5.0, 0.1 y 50, son los volúmenes de la solución de la muestra, la solución alícuota, y la solución final respectivamente (ver V.2.3.1.).

282.6 es el coeficiente de absorción de la Bixina a 501mu
w, es el peso de la muestra en gramos.

de donde la ec. (3) queda reducida a:

$$\text{Bixina total} = (A_{500 \text{ max.}}) / 0.885 w \quad (4)$$

V.2.3. Análisis de Cromatografía.

Tratamos en el punto III.3., los aspectos sobre análisis de cromatografía desde un punto de vista teórico y práctico a la vez, porque se citó un método de análisis.

En la actualidad, la cromatografía del papel aplicado al análisis de los componentes de la bixina, representa un método - satisfactorio, Hay quienes piensan que el método de separación - por cromatografía en capa fina, o de columna pueden lograr esta - separación; hasta cierto punto se expresan razones, siempre y - cuando los carotenoides sean neutrales, pero tal caso no es de - la bixina y carotenoides similares (ver III.3) que llevan grupos ácidos, los cuales reaccionan con los materiales de absorción - formando sales insolubles que deterioran cromatogramas normales.

V.2.3.1.Método de Análisis,

El método aquí descrito, es una variación adaptada a los materiales de investigación disponibles, del punto III.3. (método dispuesto por Mc.Keown-ref. 8-) al que se puede exponer del siguiente modo:

- Preparar una banda de 5 por 55. de tira de papel Whatman 3MM ó un similar en características. Se procede a marcar una línea inicial de 2 cm. a partir de la línea final del papel para referencia. El papel tiene que ser tratado con una solución de Dimetil formamida (DMF) y acetona (proporción vol, 1:1) y dejarlo secar por un tiempo no menor de 25 min.
- La muestra que se desea analizar debe ser pesado en cantidad - de 1 gr. (color de annatto) y diluido hasta la marca de 5 ml. - con cloroformo (un vaso de 10 ml., es suficiente).
- Aplicar 0.1 ml. de muestra elaborada recientemente en el papel Whatman.

- El desarrollo de este cromatograma es de flujo descendente y se usa como fase móvil, Ciclo Hexano-cloroformo-DMF-Ac. Acético, en proporción en volúmen de 43:5:2:1.
- Tres horas de separación cromatografía es suficiente para este carotenoide, después de la cuál se eluta cada zona (antes, cada zona coloreada fué cortada).
- Se determina los valores de R_f y se tabula y se aplica las e-cuaciones (1,2,3,4), del pto.V.2. para hallar los % de pigmento y bixina total.

Se ha explicado el uso del papel Whatman. los solventes de la fase móvil podrían justificarse del siguiente modo; El ciclohexano da excelentes separaciones de los pigmentos, pero hay que añadir cloroformo para llevar a cabo un desenvolvimiento razonable, del lento movimiento de la bixina y el norbixin. El N, N-Dimetilformamida previene el agotamiento de los solventes durante el desarrollo prolongado. El ácido acético se utiliza para la formación de sal posterior de los pigmentos, bixina y norbixinas con indicios de sodio y iones amonio que se presentan en los papeles tratados.

Según el procedimiento, seguido en el punto V.1.5., método donde elaboramos nuestra muestras de Bixina, podemos elaborar una tabla, donde muestre el % de Bixina que tienen los diferentes granos (semillas de achiote) de las regiones Junín, Cuzco, Huánuco. Los resultados son expresados en base a 250 grs.- de semilla (6 pruebas experimentales de c/u.).

TABLA V.2.3.1.1.

Región	Granos de Bixina	% bixina (sobre 250 grs).
Junín	6.50	2.60
Cuzco	5.80	2.32
Huánuco	5.60	2.24

Nos hemos referido también a las zonas coloreadas que aparecen en los cromatogramas. Al respecto también se realizaron pruebas, encontrándose bandas de color, con descripción semejante a las expuestas en la tabla III.3.1. (véase las semejanzas de los R_f en ambas tablas) ver tabla V.2.3.1.2.

La zona 1, posiblemente sea el orellin, el cuál es un producto de oxidación de la bixina. La identificación de cada zona, fué encontrada por la relación con las expresadas por Mc.Keown, tabla 2, ref. 8, en composición de pigmentos de colores de mantequilla de annatto comercial, el cuál se determina por análisis-cromatografico.

La banda N°4, es la de mayor área en el cromatograma, de allí que su identificación sea sencilla, dado el caso que es color rojo y cumple con las especificaciones de Absorción.

Por la experiencia mostrada en el desarrollo de cromatogramas de papel, a simple vista solo se verá una banda de color naranja con ciertos rasgos de otro color, pero no tan claro y preciso, es por eso que visualizarlos con rayos ultravioletas,

en short long, sería lo más recomendado.

TABLA V.2.3.1.2.

Zona coloreada	Descripción	Abs.Max. (milcr).	Desplazamiento Cromatograma			R _f (cm)	
			# 1	# 2	# 3		
1		Amarillo Fluorescente.	380 y 400	0.02	0.03	0.02	0.0005
2	Labil norbixi.	anaranjado	480 y 435	0.7	1.5	1.0	0.0215
3		amarillo fluorescente.	400	1.5	1.5	1.7	0.0312
4	Bixina estable	Rojo	501 y 460	17.	12.5	20.0	0.3271
5	Bixina inestab.	anaranjado oscuro	460	17.5	13.0	20.5	0.3380
6		anaranjado claro.	440	22.0	21.0	21	0.4240
		frontera		53.0	48.0	50.0	

V.3. Pruebas en el Laboratorio.

La tabla V.2.3.1.2., solo muestra la distribución de las absorciones máximas, en cada zona de color. La tabla V.3.1. mostrará los perfiles de absorvancia a lo largo de 380 a 600 milicrons.

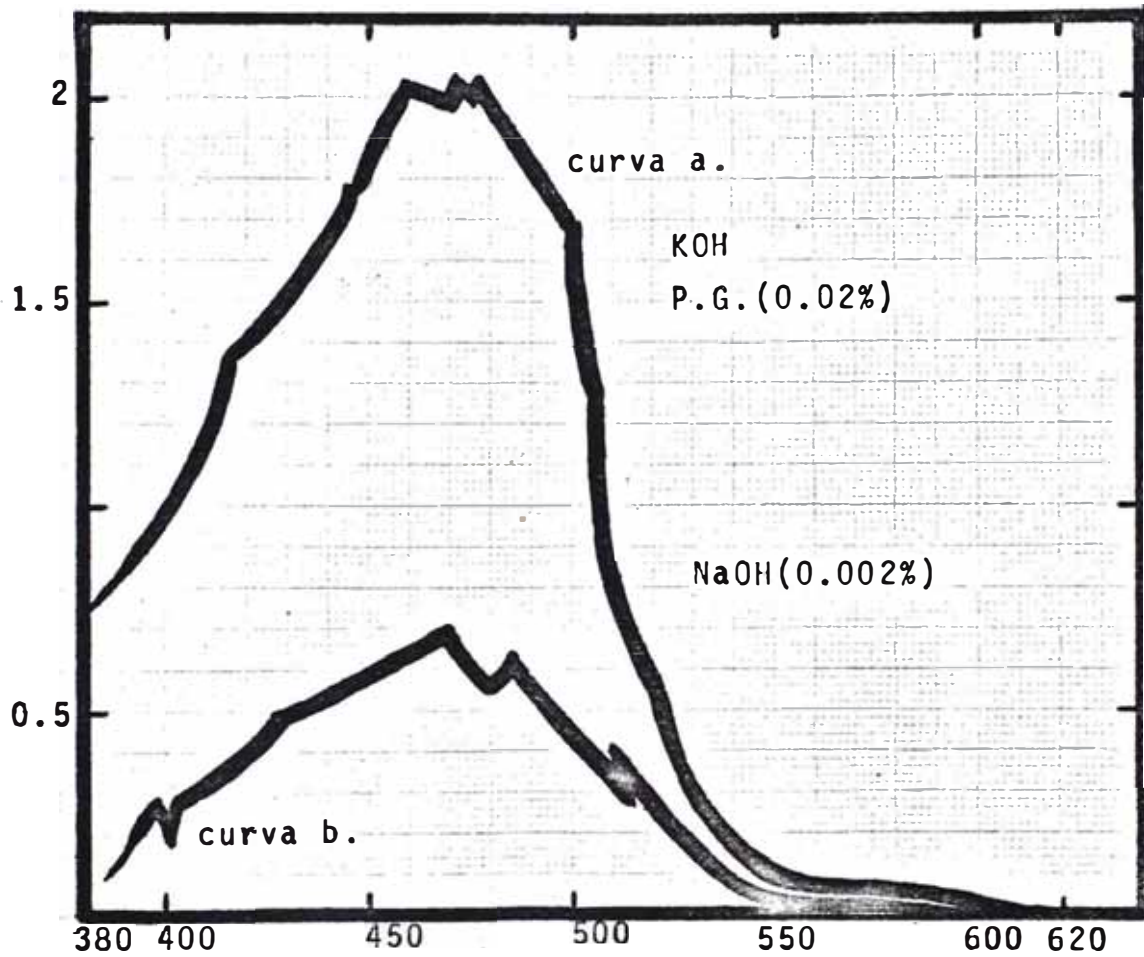


Fig. V.3.1. Espectro de Absorción.

curva a. Sol.coloreada, método Glicol.
 b. Sol.coloreada alcali.

Zonas de Color en un desarrollo Cromatográfico.

TABLA V.3.1.

Absorvancia (milicrons)	Z O N A S					
	1	2	3	4	5	6
380	-0.240	0.250	0.210	-----	-----	-----
395	0.220	0.231	0.215	0.760	0.660	1.000
401	-0.250	0.230	-0.218	0.860	0.750	1.200
410	0.220	0.231	0.205	0.960	0.840	1.250
420	0.210	0.235	0.190	1.250	0.900	1.300
440	0.160	-0.232	0.185	1.600	1.050	1.310
460	0.130	0.131	0.160	1.800	1.230	1.200
500	0,090	0.060	0.100	1.700	0.670	0.550
501	0.080	0.070	0.120	1.810	0.620	0.520
520	0.050	0.040	0.045	0.350	0.200	0.195
540	0.030	0.025	0,030	0.080	0.050	0.330
560	0.006	0,005	0.000	0.055	0.018	0.015
580	0.003	0.002	-----	0.025	0.014	0.014
600	0.000	0,000	-----	0.010	0.010	0.013

Las rayas horizontales en las zonas indican los máximos.

°°La bixina fue preparado con el método de la investigación.

Si graficáramos esta tabla con todos sus valores, por cada zona, veríamos que existen varios picos, para diferentes longitudes de onda. Al respecto podemos ilustrar, el espectro de

absorción, de las preparaciones de annatto por medio del glicol-propileno (curva A) el de hidróxido de sodio (curva B), tomando en el spectrony 20. (ver fig).

Una característica básica de la bixina (o componentes) -- que se ha comprobado, es la reacción con el ácido sulfurico; Si el ácido sulfurico es concentrado, la reacción resultante toma un color azul oscuro, pero si a este producto se le añade agua , la coloración es roja. Esta reacción es muy importante para el reconocimiento rápido de la bixina.

La prueba de obtención tanto de annatto y Bixina han tenido como base en cuanto a resultados, las pruebas hechas en el laboratorio, al cuál aplicando los métodos de determinación de calidad, se encontró los porcentajes de pigmentos y Bixina.

V.3.1. Resultados.

Ahora que conocemos métodos de determinación de calidad, es decir métodos para encontrar la cantidad de pigmentos que tiene un preparado de annatto y de allí la cantidad de Bixina, estamos en la condición de expresar dichos conocimientos en resultados numéricos. Anteriormente se dió el rendimiento de cada método en base al annatto extraído (ver Tabla IV.4.1.) en los cuadros siguientes irán acompañados por el % de Bixina y pigmentos. Para la obtención de annatto, se empleó los siguientes métodos:

- (A) Lexiviación con Agua.
- (B) Lexiviación con Hidróxido de Sodio.
- (C) Extracción con Glicol propileno alcalino.
- (D) Extracción con Alc.etílico y Tricloro etileno.
- (E) Extracción con Cloroformo (métodos de investigación).

Para el análisis de cromatografía, se desarrolló el método descrito en el pto. V.2.3.1. (es el método descrito en el punto III.3, modificado). Los resultados expresados en % fueron obtenidos empleando las fórmulas, 2,3,4 del pto. V.2.

TABLA V.3.1.1.

METODO "A"

Región	Pigmento Total	Bixina Total	Annatto.
Junín	1.2 gr.	0.43 gr.	15.00 gr.
Cuzco	1.6 gr.	0.52 gr.	16.00 gr.
Huánuco	1.3 gr.	0.48 gr.	12.00 gr.
Prom.	1.36 gr.	0.47 gr.	14.33 gr.

METODO "B"

Junín	4.2 gr.	1.51 gr.	35.00 gr.
Cuzco	3.5 gr.	0.98 gr.	38.00 gr.
Huánuco	3.15 gr.	1.32 gr.	32.00 gr.
Prom.	3.61 gr.	1.27 gr.	35.00 gr.

METODO "C"

Región	Pig.total(gr)	Bixin Total (gr)	Annatto (gr).
Junín	6.3	2.64	60
Cuzco	5.2	1.97	50
Huánuco	5.1	1.78	55
Prom.	5.53	2.13	55

METODO "D"

Junín	2.4	1.08	16
Cuzco	1.8	0.88	13
Huánuco	1.9	0.80	16
Prom.	2.03	0.92	15

METODO "E"

Junín	2.64	1.58	12
Cuzco	2.32	1.37	12
Huánuco	2.28	1.52	12.2
Prom.	2.41	1.49	12.06

Agrupando solo los promedios obtenidos y expresándolo en porcentajes, podemos expresar;

Met. de Extrac.	Pigmento Total r 100 r.	Bixina total r 100 r	% Bix.sobre pig.
A	9.49	3.28	34.56
B	10.31	3.63	35.19
C	10.05	3.87	38.53
D	13.53	6.13	45.33
E	19.98	11.98	61.83

La base de semilla en todos los métodos es 100 grs. pues bien, si expresamos las cantidades en base a la cantidad de semilla utilizada, se puede citar:

TABLA V.3.1.3.

Método de Extracción	Total Semilla gr/100gr.at	Bixina en gr/100gr ant.	% de Bixina. sobre semilla Total.
A	697.83	3.28	0.47
B	285.71	3.63	1.27
C	181.82	3.87	2.13
D	666.66	3.13	0.92
E	829.18	11.35	1.49

Nota; para obtener estos resultados, se realizaron 9 pruebas por cada extracción, para determinar el promedio.

V.4. Consideraciones.

Los métodos considerados anteriormente (A,B,C,D y E) solo dan como producto, el annatto en forma de pasta coloreada, - los resultados de pigmento total y Bixina total, fueron hallados de manera teórica, establecidos con la determinación de cantidad citados en el pto.V.2. Hemos considerado que estas determinaciones son las más satisfactorias por los conceptos de Absorbancia Espectral de la Bixina y sus isómeros citados por G.C. Mc Keown y por la relación que existen con los análisis de Cromatografía (8).

La única manera en que se encontró la Bixina, para los respectivos análisis, fué en el método complementado (ver V.1.5) establecido en la investigación. Este resultó satisfactorio por las características semejantes a la que existe en la literatura de la Bixina.

No se hizo pruebas por los métodos de Etti, Dumontal y los otros expuestos en V.1. porque se consideró que las bases de aquellos fuerón ejecutadas en los métodos de extracción del annatto y solamente serán procesos de purificación.

En las conclusiones finales de la investigación se dará a conocer el mejor método que se puede establecer para la obtención de la bixina y los demás colorantes del achiote.

VI. METODO SEMI-INDUSTRIAL DE PRODUCCION DE ANNATTO.

En este momento, extraer el annatto concentrado, implica establecer un equipo que no sea demasiado costoso, ya que el mercado, en lo que respecta a lo nacional, es todavía muy limitado. El criterio así expuesto, elimina en ciertos aspectos al uso de solventes orgánicos para la extracción del annatto. Existe en estos momentos un método que satisface estos principios establecidos por el centro de investigación en el Este de Africa (Evolution of a Method Suitable for East Africa, pag.129, ref. 28).

El tal método se establece, en la extracción del colorante del achiote, con soluciones alcalinas (hidróxido de Sodio) y neutralización ácida. Los factores en la tasa de extracción, fueron ya citados (Ver IV.1.).

Tres procedimientos comprende la lixiviación de las se-millas de la bija. Primeramente, el solvente disuelve el pig-mento de la superficie de la semilla, entonces la solución es separada de las semillas extractadas; y finalmente, las semi-llas son lavadas hasta estar libres de adición de la solución. Un proceso más simple sería que de una de las múltiples etapas (contactos) simples en la cuál la cantidad total de solvente - (a decir, soda cáustica acuosa), es dividida en varias porciones y la cantidad total de semillas entonces es tratada con cada porción y la cantidad total de semillas entonces es tratada con cada porción de solvente fresco en una serie de etapas su-cesivas. Esto es, que, las semillas de la primera etapa son extractadas con solvente fresco, y seguidamente hasta añadir una cantidad insignificante de tintura a las semillas. La desventaja de dicho sistema es que muchas de las grandes cantida-des de alcalí acuoso tienen que ser usadas aún si el alcalí es reemplazado por agua en las últimas etapas, y el volumen de ex-tracto obtenido inconvenientemente grande.

El método preferido, es el de contacto de múltiples eta-pas en contracorriente (28). El solvente fresco y las semi-llas son enviadas a los finales opuestos de las series de etapas de extracción. Las semillas y el solvente son pasados con-

tínuamente de una etapa a otra a través del sistema, el solvente libre de la etapa Nth viene a ser la solución extracto de la etapa (N-1) th y las semillas de la etapa Nth proceden a la etapa (N-1). Las semillas agotadas y la solución de tintura son retiradas de los finales opuestos del sistema. El método es eficiente y se emplea un mínimo de solvente. En el método desarrollado por la Organización de Investigación Industrial del Este de África, se emplea seis etapas, y las semillas se mueven a través del sistema en cinco tiempo que es la tasa del solvente (alcalí acuosa). Por eso, las semillas agotadas contienen una pizca de soda cáustica, siendo de 3 a 6 las etapas de lavado. Esto asegura que no se malgaste lo cáustico. Las semillas agotadas no pueden ser usadas ni como estiercol ni como aditivo a las comidas de Pollos a pesar de que se mantienen fértiles y también contienen , en el embrión, alcaloide venenoso.°°

Método.

Las semillas son pesadas en unas canastas o mallas de redes muy finas de acero inoxidable. La canasta de semillas es suspendida en agua suficientemente para que cubra las semillas. Después de este pre-remojo la cesta es conducida a una vasija que contiene 1% de solución de soda cáustica. La vasija es de tal dimensión para un volumen de 2.5 lts. por kilogramo de semillas. Las semillas son lavadas en esta solución levantando y bajando la cesta por un período corto de tiempo, luego se le permi

te ser escurrida. Entonces es bajada a un volumen similar de 1/2 % de solución de soda cáustica y el proceso de extracción se repite. Mientras tanto, la porción fresca de semilla es extraída en 1% de alcalí. Del 1/2 % de soda cáustica de semilla, después de ser escurrida y pasadas por cuatro lavadas de agua, se remueve el extracto alcalino adherido. Cuando cinco tandas de semillas son extraídas, esto es, que ya hayan pasado a través del 1% de alcalí, el extracto es transferido a una vasija fija. Las soluciones y lavados están comprendidos en una etapa, y el agua fresca debe ser introducido en la etapa 6. - Al llegar al lavado de agua de la etapa 2, se añade suficiente soda cáustica para hacer 1/2 % de solución. Al 1/2% cáustico que ha sido movido de la etapa 2 a la etapa 1, se le añade al alcalí extra para hacer 1% de solución. Entonces, se continúa la extracción como antes. La vasija de pre-remojo es vaciada diariamente a una vasija fija. Ya que las semillas absorben algún 20% w/w de agua durante el remojo, por lo que es necesario mantenerla en alto.

Cuando se haya colectado suficiente licor (sustancia) en una vasija fija-para muestra, de un día de extracción es agitado y diluido lo suficientemente (20% v/v) se añade ácido sulfúrico hasta que haya un 50% de exceso, basándose en el alcalí que contiene el licor. El exceso de ácido asegura la pronta formación granular del annatto, el mismo que puede ser fácilmente filtrado.

El equipo usado para extracción a sobre 50 kg. por escala diaria fue simple. Las cestas eran de 5 pulg. x 5 pulg. diámetros del cilindro, de 30 mallas de gasa de acero inoxidable suspendidos por una línea de nylon desde un armazón o ángulo de extracción. Las vasijas fuerón de 5 lts. y vidrio incrustado, la vasija fija (de control) de tambor de polietileno lineado. Un kilogramo de semilla fué procesado por tanda.

La escala ascendente se procesa en forma similar a la construcción del equipo, las cestas son suspendidas en un fuerte armazón, las vasijas, serían de acero inoxidable o plástico. Más de 50 escalas se pueden procesar por día, a menos que la escala no es eficientemente manipulada. Así podrían ser procesados 16 kg., por etapa, a 200 ton. por año.

El proceso de extracción puede ser parcialmente mecanizado ya que hay que ayudar en la suspensión y emersión de las cestas. Casi, podría efectuarse una completa mecanización suspendiendo las cestas de un cigüeñal y una rotación motorizada, permitirá que las canastas giren sumergiéndose y emergiendo.

Filtración y lavado.

De 100 kg. de semillas unos 50 lts. de suspensión acidificada de annatto es producida, conteniendo unos 5 kg. de sólidos filtrables, los mismos que en filtración producen 16 kg. de pasta (molde) de una gravedad específica 1.1-1.2. En pequeña escala se puede usar un filtro Buchmer, sobre una escala de planta industrial (semi) un filtro prensa será necesario. Se puede sugerir-

que el annatto puede ser separado cuando este se halla sedimentado, decantando el líquido claro y lavando el depósito similar, Sin embargo durante el lavado los granulos de annatto se rompen dando una fina suspensión, la misma que ha tomado una semana en depositarse suficientemente para que el licor sea cifoneado (sifón).

Es muy importante lavar el annatto hasta estar libre de ácidos y la degradación de la bixina durante el secado a temperaturas elevadas.

Secado.

La bixina es degradada en la presencia de la luz ultravioleta y no se aconseja secar el filtro molde en el sol. Un rápido secado a 60°C, en difusión de calor por circulación, ó en horno de convección forzada, dá un producto satisfactorio.

Pulverización.

El annatto puede ser utilizado en polvo. Pero, este polvo adquiere una carga de electricidad muy facilmente, los cuales implican cierta medida de precaución, para evitar accidentes (explosiones), No es aconsejable añadir un agente anti-estático al tinte polvoreado, ya que estos pueden convertirlo en inapropiado para el uso doméstico.

El método aquí citado, establece pautas, normas que pueden ser facilmente adaptado a nuestro sistema y con nuestra materia -

prima. No existe ningún tipo de inconvenientes por las cuales se pueda justificar algún imprevisto o equipo no disponible, muy al contrario contamos con todos los materiales aquí citados y con la tecnología adecuada para el proceso. También puede ser adaptado para el método de extracción con el glicol propileno alcalino.

Método Propuesto.

Según lo expuesto y adaptando criterios al respecto, se puede establecer el siguiente método de extracción.

- Una cantidad pesada de semilla de achiote, es puesta a remojar en un tanque de pre-remojo, el cuál puede ser con agitación.
- Se puede adecuar, una serie de tanques de extracción (reactores de lote), donde el solvente (ya sea el alcalí acuoso o el propileno glicol alcalino) más las semillas son agitados constantemente para la separación del episperma de la semilla. La agitación tiene que ser con revoluciones controladas si fuera posible.
- Cada reactor de lote, están dispuestos de conexiones de vapor (alimentados por un caldero) a una presión y temperatura adecuada al sistema (no es necesario que sea sobresaturada).
- Estos reactores, estarán dispuestos en posición paralela, resultando de él, el líquido coloreado. La alimentación del solvente a los reactores, estarán a temperatura ambiente.
- La solución coloreada, pasará a tanques de neutralización, antes, se enfriará a la temperatura ambiente. Lo mismo que los tanques de extracción esta puede ser más de uno, según se disponga en requerimiento.

- ~ Las semillas decoloradas, pueden ser tratadas, de tal manera que sirvan como absorbente vegetal, el cuál serviría para el filtro -- prensa, posteriormente requerido. Este procedimiento todavía no - esta bien estudiado, pero si es muy factible su utilización. Es ta es la única objección que se presenta en el anterior método.
- ~ Con adición uniforme, se añadirá en los tanques de neutralización la solución ácida respectiva, para la precipitación del annatto. El ácido usado, podrá ser el ácido sulfúrico o clorhídrico, el - cuál en el laboratorio dió excelentes resultados (2N)
- ~ La solución clara que se presenta en las dos fases del precipitado (el pigmento se precipita en forma de flóculos la adición del cloruro de sodio en los productos ayudará a la floculación los cuál es se depositan en el fondo del tanque; fondo cónico). puede ser- utilizado para el tanque de pre-remojo, como solvente en vez del agua.
- ~ El precipitado, es pasado por un filtro de prensa. El producto- en forma de moldes, es secado, pulverizado y de allí al mercado.
- ~ El precipitado, puede ser tratado, para productos derivados, ta les como, ésteres, sales, etc.

El proceso así citado puede ser adaptado a nivel de planta- píloto, para encontrar las dimensiones de los tanques propuestos , la cantidad de semilla necesaria, la temperatura del vapor, la cantidad de volumen que resulta de solución coloreada, etc. para dis poner un diseño de planta del resultado de las pruebas.

Los métodos así citados, solo podrán adaptarse para los métodos de extracción: -Método de extracción por el propilen glicol alcalino y.
-Lexiviación con alcalí (soda caústica) - para los demás métodos que utilizan solventes en la extracción - tendrán que adaptarse nuevos diseños que se adecuen a él.

VII. INTRODUCCION AL ANALISIS DE COSTOS.

En el punto VI., mostramos un posible mecanismo de producción del annatto a nivel de planta piloto. Este punto tratará - el estudio de dos importantes factores en la decisión de la aprobación de un proyecto. La inversión total que se requiera y el costo de producción del producto terminado, si bien es cierto - que estos se traducirán en cifras, también es que sólo representan valores que están dentro de los límites de confiabilidad.

Es importante conocer que la obtención de la materia prima; el achiote, en el Perú, está regido por un amplio mercado - que garantiza la producción normal de cualquier producto de -- transformación que se desea obtener de él. Además de esta producción (ver II.3), existe en nuestro país más de diez compañías exportadoras, que abastecen al mercado mundial, tales compañías pertenecen principalmente a los departamentos del Cuzco, Arequipa, Trujillo, Lima, etc.

Consideraciones.

Habíamos citado, que el análisis de costos, tratará sobre -- la puesta en marcha de una planta piloto, para que de esta experiencia surgiera posteriormente datos para escalación a nivel de planta industrial. Además que lo considerado debemos establecer que estan basados sobre lo que se denomina Batery Limit, él cuál significa -- que los servicios industriales, estan ya en planta (agua, energía , eléctrica, etc). Se considera tambien que solo se elaborará a un solo turno de 8 hrs. el día (de trabajo). Las horas de producción- anual serán de 8000 (repartidos en 12, si se desea al mes).

La planta está estimada para producir 2.4 TM. de annatto -- anualmente, a partir de 9.6 TM de semilla de achiote (o sea de 40%- de rendimiento). El método que se deberá utilizar es: Extracción - de Colorantes con sol. Alcalina (Propiamente, Lixiviación con un Al calí-soda caústica). pudiéndose adaptar a la extracción con el Propilen Glicol alcalino.

VII.1. Inversiones.

La inversión total, está constituido por:

- Inversión fija.
- Gastos pre-operativos.
- Intereses durante la construcción.
- Capital de trabajo.

Esta inversión, corresponde a todo el transcurso en la im - plementación de la planta piloto y básicamente se puede estimar dano

Obras civiles y edificios.

Corresponde a la construcción de algunas estructuras necesarias para el montaje de la planta en cuanto a la disposición de equipos. El monto aproximado será de \$ 145,000.00 soles, repartido en dos períodos, inicial de \$ 55,000 y durante la implementación - (o expansión) de \$ 90,000.00

Montaje y Erección.

Su costo aproximado, será de \$ 100,000.00, repartidos en : \$ 40,000.00 al inicio y \$ 60,000.00 en la expansión.

Repuestos.

Corresponderá aproximadamente al 1% del costo total de las-
maquinarias y equipos, o sea \$ 7,000.00

Otros.

Como en toda implementación existen imprevistos (ej. dete-
rioro de maquinarias, deficiente montaje de algún equipo, etc.), -
estas serán amortiguados con el 5% del costo total anterior (\$951,
000) o sea \$ 48,000.00 (el porcentaje es constante en la expansión
o en el inicio.).

Gastos Pre-operativos.

Entra en todo proyecto de inversión, el cuál está constitui
do por la búsqueda de la tecnología adecuada, supervisada por una

ingeniería adecuada al proceso.

Su monto será aproximadamente de \$ 141,000.00 soles, establecido por:

Ingeniería.

Corresponde a las pautas y normas más adecuada, relacionados con la ingeniería, necesarios durante el proyecto. Sin recurrir en mayores errores, su monto es aprox. el 10% del total invertido en equipos y maquinarias, o sea \$ 70,000.00

Licencia y Tecnología.

Establece las prioridades en cuanto a la mejor tecnología a aplicar. Estarán relacionadas a patentes afines a la extracción. Su cantidad como gasto pre-operativo será de \$ 26,000.00.

Supervisión.

Esta dedicada a la buena marcha de las inversiones, sincronizada con cada uno de los gastos requeridos. Su monto es aproximadamente \$ 38,000.00 repartidos en \$ 18,000.00 al inicio y \$ 20,000.00 durante la implementación.

Otros.

Cualquier gasto no incluido anteriormente, estará comprendido en este punto (gasto pre-operativo, no establecido). Un estimado acertado será del 5%, del total de los tres anteriores gastos -- (\$ 134,000.00) o sea \$ 7,000.00 (el % será constante en cualquier fase de la inversión.).

Intereses durante la Construcción.

Está estimado en \$ 40,000.00 por trabajar con el aporte constante de un capital de 51% (o sea 49% de deuda).

Capital de Trabajo inicial.

Es la diferencia entre el activo corriente y el pasivo corriente. En el activo corriente está constituido por:

- Caja, mano de obra, indirectos, mantenimiento, costos adm.
- Cuentas por cobrar.
- Inventarios (materia prima, prod. terminado).

El pasivo corriente, es la cantidad de cuentas por pagar. Hemos considerado un capital de trabajo inicial para la producción de 15 días en planta, el cuál está estimado en \$ 460,000.00. Por lo tanto el monto aproximado de la inversión total es de \$ 1'641,000.00.

VII.2. Costos Variables.

Están basados en la cantidad de annatto a producir (2.4 TM.- anulaes) con el método propuesto de extracción (lexiviación con sol. alcalina). Los costos variables están constituidos principalmente por:

- A.- Materias Primas.
- B.- Servicios Industriales.
- C.- Total Costos variables.
 - Vapor,
 - Energía Eléctrica.
 - Aire,

- Agua,
- otros suministros, etc.

Para efectos de cálculos de costos, se tomarán en cuenta los parámetros encontrados en el punto IV.4. (pruebas experimentales de lexicación con Hidróxido de sodio.).

A.- Materias Primas.

Según el método que vamos a utilizar, las siguientes son las materias primas necesarias:

Achiote.

El precio promedio en el mercado nacional es de \$ 130.00 el Kilogramo. - Necesitaremos 9,600Kg. de semillas de achiote al año.

Hidróxido de Sodio,

Existe en el mercado en forma de lentejas blancas. Su costo es de 3,392 soles el kilogramo (con una oscilación del 5% en el precio). Se necesitará anualmente 19.2 kgr. (se utiliza solo 19.2 grs. al día).

Acido Clorhídrico.

Necesitaremos el concentrado, que tiene un costo de \$3,200. soles, 5 ptas. (aprox. 2.5 lts). anualmente se necesitará 52.81lts. Por lo tanto el costo total de materia prima anualmente será de -- \$ 1'381,000.00.

B.- Servicios Industriales.

No están comprendidos dentro del límite de Bateria. Basicamente -

CUADRO VII.1.1.

INVERSIONES \$Nacional.

1. INVERSION FIJA	inicial	expans.	final
	418	582	1000
1.1. Equipos y Maquinarias.	300	400	700
1.2. Obras Civiles y Edificios	55	90	145
1.3. Montaje y Erección.	40	60	100
1.4. Repuestos (1% de 1.1.)	3	4	7
1.5. Otros (5% de 1.1. al 1.4.)	20	28	48
2. GASTOS PRE-OPERATIVOS.	63	78	141
2.1. Ingenieria (10% de 1.1.)	30	40	70
2.2. Tecnología (u licencia)	12	14	26
2.3. Supervisión	18	20	38
2.4. Otros (5% de 2.1 a 2.3.)	3	4	7
3. INTERESES DURANTE CONSTRUCCION	16	24	40
4. CAPITAL DE TRABAJO INICIAL	160	300	460
INVERSION TOTAL	657	984	1641

INVERSION TOTAL = \$ 1'641,000.00
 =====

corresponde a los siguientes servicios:

- Vapor.
- Energía eléctrica.
- aire,
- agua de enfriamiento,
- agua de proceso,
- refrigeración.
- Otros suministros de Operación.

necesitaremos solo, vapor, energía eléctrica y agua de proceso.- Los demás servicios industriales no figurados, estarán comprendidos en Otros suministros (el cuál representará el 20% del costo total anterior).

Vapor.

Una estimación aproximada anual, será de \$ 120,00. Se necesitará 0.6 TM de vapor anualmente. Su costo por unidad (TM) es de \$ 200.00

Energía Eléctrica.

Su costo por unidad (kw-hr) es de \$ 2.00. Se necesitará (para la bomba, agitadores y alumbrado de la planta) 3760 kw-hr en año, el cuál significa \$ 7,520.

Agua de Proceso.

Para los diversos tanques de operación y limpieza. Su costo por M³ es de \$ 4.00. Se necesitará 48 M³ al año, el cuál se estima en \$ 200.00.

Otros suministros de Operación.

Estarán a otros servicios no figurados hasta el momento y representarán un 20% del total anterior (\$7,840 anual) o sea -- \$ 1,570.00.

Por lo tanto, el costo total VARIABLE, será aproximadamente de \$ 1'391,000.00 anuales (578,560.00 soles por TM de annatto) El cuadro VII.2.1. resume las cifras expuestas.

VII.3. Costos Fijos.

Comprende los siguientes aspectos:

- D. Mano de Obra,
- E. Mantenimiento.
- F. Laboratorio.
- G. Depreciación.
- H. Seguros, y
- I. Total costos fijos.

D. Mano de Obra.

Dado el caso de que sólo se trabajará un solo turno por día (8 hrs), la planta piloto requiere los servicios de un supervisor (que haga las labores también de capataz) y un operador. Los cuales pueden ser integrados por estudiantes de Ingeniería Química o afines. El supervisor tendrá un ingreso de \$ 400.00 , por día y el operador de \$ 272.00. Así visto, damos un estimado en mano de obra de \$ 672.00 soles por día (lo cuál representa -

CUADRO VII.2.1.1.
Costos Variables.

\$ Nacional.

A.- MATERIAS PRIMAS	UNIDAD	COSTO \$UNIDAD	UNIDAD/TM	SOLES/TM	MILES \$.AÑO	SOLES/DIA	UNIDADES/AÑO.
1 ACHIOTE	KG	130	4000	520,000	1248	1248	9,600.00
2 HIDROXIDO DE SODIO	KG	3392	8	27,136	65	65	19.20
3 AC.CLORHIDRICO	LT	1280	22	28,160	68	68	52.80
4							
5							
TOTAL				575,296	1381	1381	

B.- SERVICIO INDUSTRIAL

1 VAPOR	TM	200	0.25	50	0.12	0.12	0.6
2 ENERGIA ELECTRICA	KW-HR	2	1567	3,134	7.52	7.52	3,760.00
3 AIRE							
4 AGUA ENFRIAMIENTO							
5 AGUA PROCESO	M ³	4	20	80	0.20	0.20	48
6 REFRIGERACION							
7 OTROS SUMINISTROS OPERACION (20% de 1-6)					1.57	1.57	
8 TOTAL				3,264	9.41	9.41	
C.- TOTAL COSTOS VARIABLES				578,560	1391.	1391.	

280.00 soles por TM de annatto producido).

E. Mantenimiento.

Representa aproximadamente un 5% de la Inversión fija, o sea 50,000.00 soles anuales. Estará dedicado exclusivamente al equipo y maquinaria de la planta.

F. Laboratorio.

Creemos conveniente, que el gasto se realice en el alquiler de un laboratorio completo, para los análisis respectivos de determinación de calidad y otros. Un costo aproximado anual será de 240,00 soles.

G. Depreciación.

Este corresponde aproximadamente al 10% anual de la inversión fija (casi standart en este tipo de procesos). El costo será por lo tanto de 100,000 soles anuales. La depreciación corresponde a la maquinaria y equipos.

H. Seguros.

Es de esperarse que la planta esté asegurada contra todo tipo de inconvenientes. Representa el 1% de la inversión fija en nuestro caso (establecido por similitud en procesos de este tipo).

I. Total costos fijos.

Por lo tanto, el costo total fijo está estimado en \$1'072,

CUADRO VII.3.1.

COSTOS FIJOS

\$ NACIONAL.

D.- MANO DE OBRA	CONCEPTO	MILES \$ AÑO	SOLES/ DIA	SOLES / TM.
1 SUPERVISION DIA	1 sup x turno (planta)	400	400	166,667
2 CAPATACES				
3 OPERADORES	1 ope.x turno (planta)	272	272	113,334
TOTAL M.O.		672	672	280,001
E.- MANTENIMIENTO	en planta	50	50	20,834
INVERSION FIJA 5%				
F.- LABORAT. Y/U.OTROS	determinac.de cal. y otro.	240	240	100,000
H-año + SOLES/AÑO				
G.- DEPRECIACION	de maq.y equipo	100	100	41,667
10% ANUAL (INV.FIJA)				
H.- SEGUROS	en planta	10	10	4,167
INVERSION FIJA (1%)				
I.- TOTAL COSTOS FIJOS		1,072	1,072	446,669
J.- TOTAL COSTO DE PROD. (C + I)		2,463	2,463	1'025,229

000.00 anuales (\$ 1'025,229 por ton. de annatto producido). El cuadro VII.3.1. resume las cantidades del costo fijo.

Resumen.

(1) COSTO DE OPERACION = COSTO FIJO + COSTO VARIABLE.

COSTO FIJO : \$ 1'072,000.00

COSTO VARIABLE: \$ 1'391,000.00

(C + I) Costo de Operación anual ..\$ 2'463,000.00/2.4
TM. de annatto.

....\$ 1,026.25/kgr. de an-
natto.

Teoricamente, si consideramos un 4% de rendimiento de Bixina a partir de annatto, obtenemos:

....\$ 25.67 /el gr. de Bixina.

o...\$ 11,637.68/lb. de Bixina.

si; (base 1978)

1 ~~l~~o cotizamos a \$ 200.00...\$.58.20/lb. de bixina.

(2) INVERSION TOTAL..... \$ 1'641,000.00

..... ~~l~~ 8,205.
=====

VIII. OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES.

Teniendo en consideración, lo expuesto en el transcurso de la investigación, tanto en la parte teórica como práctica, puedo establecer a dos métodos convenientes de extracción:

- Lexiviación con Sol. Alcalina y
- Extracción con el Propilen Glicol alcalino.

Si sólo consideramos la parte de investigación, se podría decir que el segundo de ellos es el más satisfactorio, por las considerables ventajas mostradas en la calidad del producto terminado, resumidos en los cuadros respectivos (ver V.3.1.); pero esto es punto de vista solamente basados en la investigación, nosotros los que introducimos ingeniería, tenemos que a la par de estos resultados, establecer un factor muy importante en la implementación de una planta industrial, el cuál es; análisis de costos.

Un análisis de costo, fué discutido para ambos métodos, dando como resultado, que el método de extracción con propilen glicol alcalino resulta anti-económico, no solamente por el costo de solvente (aprox. \$ 80,000.00 diarios) sino también por la dificultad en conseguir dicho producto, lo que hace nula su utilización como solvente en elaboraciones similares a la del achiote (donde se le usa en cantidades mayores a los 35 lts. diarios) y mucho más aún si se le considera en una planta piloto, para extraer colorantes del achiote.

Por lo tanto, consideró, teniendo en cuenta a los factores expuestos, al método de extracción: "Lexiviación con solución alcalina (Hidróxido de sodio)", como la más óptima a saber.

Considero satisfactorio a la investigación: "Obtención de la Bixina", no sólo por los resultados obtenidos, sino también -- por los criterios adoptados, por la satisfacción personal y ante todo, por lo que pueda dejar dicho, en bien de una futura industrialización.

La Bixina, como se ha observado durante la investigación, puede ser establecido como un factor de calidad, esto por la can-tidad de isómeros que presenta el pigmento, el cuál trasciende en un método muy sofisticado de separación.

IX.- BIBLIOGRAFIA.

- (1) Cabezudo Sulca, G. Colorantes para Alimentos. Tesis de Grado. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA (1973).
- (2) Diaz Chavez, F. "Extracción y Estudio Químico de Materias colorantes del Achiote". Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia.
- (3) León, J.E. "Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales" IICA. pag. 449-450, San José, COSTA RICA (1968).
- (4) Sanchez, M. Agricultura Tropical; "El Achiote", vol. 21, N°4 Abril. Ed. ABC. Bogota (1965).
- (5) García, M. Estación Experimental Agrícola de la Molina. Informe Mensual: Estudio Químico del Achiote, N°342, pag. 34-39. Enero (1956).
- (6) Thorpe, Edward. "Enciclopedia Químico Industrial" t. 1. pag 86. (1916).
- (7) Kuhn, R. and Winterstein, A., Ber. 65B.646 (1932).
- (8) G.G. McKeown and E. Marck. "The Composition of Oil-Soluble Annatto Food Colors". J.Assoc. Off. Agric. Chem. 45, 761.
- (9) August J. Buzas. "Proceso para convertir la Bixina en un Colorante Comestible y el producto resultante" ("Process to Convert Bixin to A Food Color and the resulting product). U.S. pat. 2793124 (Chem.Abs. 51,14025)-.

- (10) Mc. Keown-Laboratorio de Alimentos y Drogas, Departamento de Salud y Bienestar, Ottawa, Ontario, Canada - J.Assoc. Off. Agric. Chem,44,347 (1961).
- (11) Sestak, Z.,J. Chromatog., 1,293 (1958).
- (12) Jense, A. and Jensen, S.L., Acta Chem. Scand.,13,1863 (1959).
- (13) Yanamoto, Y. and Tomita, y Men, Fac. Agr. Kagoshima - Univ. 3, 16(1957).
- (14) Iversen, S. y Lam, J.,Z.Lebensm Untersuch.u.Forsch. - 97,1 (1953).
- (15) Basto de Madeiros R. Separacao Cromatografica da semente de Urucu (Achiote). Rev. Bras.Med., Noviembre - 1973-vol, 30, N°11.
- (16) Engelbreth-Holm, J., and Iversen, S. Is Vegetable Annatto Butter Color Cancogenic. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 37: 483 (1955).
- (17) Morton, J.F.- Can Annatto (Bixa Orellana L.) an Old source of food color, meet new needs for safedyes. Florida State Horticultural Soc., 73:301-309 (1950).
- (18) Harold, M.Barnett and Henry M.Espoy. Process For Extracting The Coloring Matter From annatto Seeds(19 U.S. Pat. 2815287 (Chem. Abs.52,42176).
- (19) Marcel A. Perret, Food color and Methd of prepari the same (1958) US/pat. 2830908 (chem. Abs.52,1
- (20) Harold G.HArtgerink, Extract of Bixa Orellana for use as a Pharmaceutical. (1952).US p (chem.Abs. 58,4384d),

- (21) Riel and Gibson, J. Dairy Sci.41.624. Use of annatto for coloring butter.
- (22) Benk, E.; Bergmann, R. Extract from orange peel (annatto). (chem Landesuntersuchungsanst., Sigmaringen, Ger).Suesswaren (1970), 14(22), 1102-1104 (ger).
- (23) Richard Bruce Koecher, Edible Annatto Coloring Compositions and method of Preparing Same. (1956). US. pat. 2831775 (chem, abs. 52,664).
- (24) Henry Rakoff and Norman C. Rose. "Química Orgánica - Fundamental". segunda reimpresión: 1974,Ed. Limusa , Mexico.
- (25) Moriez and Smith (1957). B. Pat. 781809 (chem. Abs. 52,664).
- (26) R, Marbet and A. Winterstein, "Esteres modernos de la Bixina, producidos con alcoholes altos, manufacturación de los mismos" (novel este of Bixins with higher alcohols and process for the manufacture thereof) , - (1956).US/pat.2768198 (chem.Abs.51.8798).
- (27) J. Christopher B. and Raymond Howard, "Water Dispersible Garotenoid Compositions and Process of Making the same". US.pat.2861891, patented Nov. 25,1958.
- (28) D.A. V. Dendy, Annatto, the Pigment of Bixa Orellana, East African Agricultural and Forestry Journal, october 1966 (Received for publication on 17th november - 1965).