

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS



**Obtención del colorante de la semilla de achiote (*Bixa orellana*)
utilizando microorganismos celulolíticos**

T E S I S

Por:

JUAN MANUEL TIRADO GALLEGOS

Presentada como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Agosto del 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

**Obtención del colorante de la semilla de achiote (*Bixa orellana*)
utilizando microorganismos celulolíticos**

TESIS

Presentada por:

JUAN MANUEL TIRADO GALLEGOS

**Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito
Parcial para Obtener el Título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

APROBADA

M.C. María Hernández González
Presidente

PhD. Anna Iliná
Vocal

Dr. Ramiro López Trujillo
Vocal

M.C. Oscar N. Reboloso P.
Vocal suplente

Dr. Ramón F. García Castillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. MÉXICO. AGOSTO DEL 2005

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, **mi Alma Mater**, por haberme dado la oportunidad de Estudiar una Licenciatura y darme el derecho de luchar por ser mejor en el mundo.

Al **Departamento de Nutrición y Alimentos**, así como a los profesores que lo integran, por el interés y las atenciones mostradas durante mi formación y el desarrollo de la presente investigación, mil gracias.

Al **Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECyT)**, por el apoyo económico otorgado a través del programa Becas Tesis de Licenciatura (etapa Noviembre - Agosto), y la confianza depositada en mi persona para la realización de esta investigación.

A la **M.C. María Hernández González**, por compartirme una parte del amplio conocimiento que tiene, muchas gracias por el tiempo que dedico a la presente investigación, así como por los consejos que me dio, pero sobre todo por la amistad brindada.

Al **M.C. Oscar Noe Reboloso Padilla**, por el esfuerzo que realizo para que mis compañeros y yo tuviéramos una formación como profesionistas, por el apoyo que me brindo y por aceptar ser parte de este trabajo, muchas gracias.

Al **Dr. Ramiro López Trujillo**, por compartir parte de sus conocimientos y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de la presente tesis.

A la **Dra. Ana Iliná**, por todo el apoyo a la presente investigación y aceptar ser parte del jurado examinador.

A la **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara**, por el gran apoyo y confianza depositada en un servidor para la realización de este proyecto, muchas gracias.

Al **M.C. Gerardo Sánchez**, por ser mi amigo y por compartir su conocimiento, muchas gracias por todos sus consejos.

A los **T.L.Q. Maria de Jesús Sánchez Velásquez (chacha) y Carlos Alberto Arévalos Sanmiguel**, por permitirme ser su amigo y estar siempre dispuestos a apoyarme con el equipo y reactivos requeridos en la realización de esta investigación, mil gracias.

A **mis compañeros y amigos de generación**: Daniel Ángel (Dedote), Mauro (la mujer), Heberto (Fox), Luis Arturo (Chitter), Mario Alberto (el abuelo), Andrés (Shocker), Juan Luis (la polla), Carlos Arturo (el carnal), Jorge (gargamel), Sulpicio (sulfiero), Luis Armando (el anciano), José Manuel (el rondallo), Carlos (la sombra), Cesar(el don), Vanessa, Gaby, Ana, Dunia, Dalía, Lupita, Laura, Chuy, Rosy, Mónica, Paty,

A todos ellos muchas gracias por que de alguna manera en una gran parte del tiempo me ayudaron a ignorar la soledad, mil gracias por los buenos y malos momentos que pasamos, fragmentos de existencia que ahora forman parte de mis mejores recuerdos.

A **mis amigos**: Francisco Centeno, Ulises, Javier Encina, Fajardo, Alma Alicia Ruiz, Margarito Cruz (mago), Miguel A. Lándin, José Francisco Espitía (mostrón), Emilio (el gordo), Romeo, Juan José (torre), Juan (pollo), Luis Alberto (güicho), Francisco (mija), Omar (wiris), Chuy, Greñas, Gamaliel (el alcohol), Hugo.

DEDICATORIA

A **Dios** por iluminarme con el milagro más grande de este mundo, la vida; por haberme permitido terminar de manera satisfactoria mi carrera y todas las metas que hasta ahora he alcanzado.

A mis padres:

Sra. Gloria Gallegos Cabello.

Sr. Leonardo Tirado Ugalde.

Por creer en mí, por sus consejos, por enseñarme que la humildad y la voluntad son parte de los laureles que coronan el éxito, por enseñarme que la mejor filosofía sobre la vida no necesariamente se aprende en las aulas; pero sobre todo, por el gran sacrificio y paciencia demostrados durante mi formación como profesionista. Mi más sincera admiración y respeto, los amo.

A mis hermanas **Silvia, Ana Gabriela y Verónica** por su amistad, apoyo incondicional, pero sobre todo, por lo buenos y malos momentos que hemos pasado juntos. Gracias por ser auténticas, las amo.

A mis tíos (**Guadalupe, Carmen, Hortensia, Rogelio, Juan, Esther, Gustavo, Hermenegildo, Francisco, Francisca, Dolores, Rubén y Gloria**) por que siempre creyeron en mi y por su invaluable apoyo durante mi estancia en esta casa de estudios, gracias por ser como son, mis palabras son pocas para agradecerles lo que han hecho por mi.

A mis abuelos:

Sr. Jesús Gallegos Uribe.

Sra. Eustacia Cabello López.

Sra. Rafaela Ugalde Olivares.

Por el gran amor que me han brindado durante toda mi vida, por los grandes y acertados consejos que me han guiado para tratar de ser un gran ser humano.

A todos **mis primos**, gracias por comprenderme en las buenas y en las malas, pero sobre todo gracias por esos locos momentos que son cimientos de mis grandes recuerdos.

A **María Dolores Sifuentes Hilario**, por todo lo bueno que fue con migo, por apoyarme, por sus regaños y preocupaciones. Gracias por haber sido como una madre en los momentos que la necesite.

A La **Familia Ruiz Ibarra** por haberme abierto las puertas de su hogar, el cariño brindado, así como la confianza y atenciones que han tenido durante todo el tiempo que he convivido con ellos.

A Claudia Zerelda Ruiz Ibarra

Llegaste a mi vida cuando menos lo esperaba y nunca te busque, Dios cruzo nuestros caminos y le estoy infinitamente agradecido por eso.

Tu llegada revoluciono mi vida y de alguna manera me has hecho crecer como persona, gracias por permitirme estar a tu lado, gracias por tratar de comprenderme en todas las faceta de mi ser.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Objetivos	5
1.1.1. Objetivo General.....	5
1.1.2. Objetivos específicos.....	5
1.2. Hipótesis.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. Los colorantes	6
2.1.1. Definición	6
2.1.2. Clasificación.....	7
2.1.2.1. Colorantes sintéticos.....	8
2.1.2.2. Colorantes naturales.....	9
2.1.3. Normatividad de colorantes	10
2.1.4. Disponibilidad y demanda de colorantes	12
2.2. Los carotenos	13
2.2.1. Clasificación.....	13
2.2.1.1. Carotenos-hidrocarburos carotenoides.....	14
2.2.1.2. Xantofilas	14
2.2.2. Distribución.....	14
2.2.3. Estabilidad	14
2.2.4. Propiedades físicas, extracción y análisis	15
2.2.5. Los carotenoides como colorantes alimentarios.....	16
2.3. El achiote	16
2.3.1. Generalidades del cultivo.....	18
2.3.2. Distribución	19
2.3.3. Características fisicoquímicas de la semilla de achiote.....	20
2.4. La bixina	22
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas.....	22
2.4.2. Usos.....	24
2.4.2.1. Los extractos solubles en agua	25
2.4.2.2. Los extractos solubles en el aceite.....	26
2.4.3. Estabilidad	26

2.5.	Métodos de extracción del colorante	27
2.5.1.	Extracción rudimentaria	27
2.5.2.	Extracción Industrial.....	27
2.5.2.1.	Extracción con solución alcalina	28
2.5.2.2.	Extracción con aceites vegetales.....	29
2.5.3.	Aplicación de fluidos supercríticos.....	29
2.5.4.	Métodos biotecnológicos	29
2.6.	Biocatálisis	30
2.6.1.	Definición	31
2.6.2.	Microorganismos degradadores de celulosa	32
2.6.3.	Hongos	32
2.6.3.1.	Generalidades.....	32
2.6.4.	Aspergillus	33
2.6.4.1.	Morfología.....	34
2.6.4.2.	Cultivos	34
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1.	ETAPA 1. Obtención de la materia prima	35
3.1.1.	Características fisicoquímicas de la semilla de achiote.....	35
3.2.	ETAPA 2. Obtención, selección y caracterización de microorganismos fúngicos con probada actividad celulolítica.....	35
3.2.1.	Selección del microorganismo con mayor actividad celulolítica	36
3.2.2.	Caracterización de los microorganismos seleccionados	36
3.3.	ETAPA 3. Establecimiento de las condiciones de pH y temperatura para la degradación de la pared celular y liberación del colorante.....	36
3.4.	ETAPA 4. Recuperación y caracterización del colorante liberado	38
3.4.1.	Recuperación del colorante	38
3.4.2.	Caracterización del producto final.....	38
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1.	ETAPA 1. Obtención de la materia prima	39
4.1.1.	Características fisicoquímicas de la semilla de achiote.....	39
4.2.	ETAPA 2. Obtención, selección y caracterización de microorganismos fúngicos con probada actividad celulolítica.....	41
4.2.1.	Selección de microorganismos con mayor actividad celulítica	41
4.2.2.	Caracterización de los microorganismos seleccionados.	43
4.3.	ETAPA 3. Establecimiento de las condiciones de pH y temperatura para la degradación de la pared celular y liberación del colorante.....	44
4.3.1.	Monitoreo de azúcares totales.....	44
4.3.2.	Monitoreo de azúcares reductores	46

4.4.	ETAPA 4. Recuperación y caracterización del colorante liberado	48
4.4.1.	Recuperación del colorante.	48
4.4.1.1.	Efecto del pH, temperatura y cultivo fúngico sobre la liberación del colorante 52	
4.4.1.1.1.	Efecto del pH y temperatura sobre cultivo fúngico 7 en la liberación del colorante (interacción doble).	52
4.4.1.1.2.	Efecto del pH y temperatura sobre cultivo fúngico 5 en la liberación del colorante (interacción doble).	53
4.4.1.1.3.	Efecto del pH y temperatura sobre el testigo sin inculo en la liberación del colorante (interacción doble).....	54
4.4.1.2.	Rendimientos	57
4.4.2.	Caracterización del producto final.....	59
5.	CONCLUSIONES	60
6.	LITERATURA CITADA	62
7.	ANEXOS	69
7.1.	Técnica de rojo congo para evaluar actividad celulolítica	69
7.2.	Técnica para obtención y conteo de esporas.....	71
7.3.	Técnica para cuantificación de bixina	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Colorantes naturales usados en alimentos.....	10
2	Composición química de la semilla de achiote.....	20
3	Composición química degradada de la semilla da achiote.....	20
4	Medio para proceso de biocatálisis.....	36
5	Resultados de análisis químico de la semilla de achiote.....	38
6	Resultados de rojo congo analizados mediante t-Student ($P < 0.05$).....	41
7	Resultados de caracterización de microorganismos.....	42
8	Análisis de varianza para todos los datos.....	50
9	Análisis de varianza para cada factor.....	50
10	Análisis de medias del extracto liberado mediante t-Student ($P < 0.05$).....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de los colorantes.....	8
2	Planta de achiote con fruto y flor	17
3	Cápsulas maduras de achiote.....	18
4	Estructura química de la bixina.....	22
5	Estructura química de la norbixina.....	22
6	Ensayo de rojo congo con cultivo 7.....	40
7	Comportamiento de niveles de azúcares totales en reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3,5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 25 °C.....	43
8	Comportamiento de niveles de azúcares totales en reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3,5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 30 °C.....	44
9	Comportamiento de niveles de azúcares totales en reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3,5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 35 °C.....	44
10	Comportamiento de niveles de azúcares reductores en reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3,5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 25 °C.....	46
11	Comportamiento de niveles de azúcares reductores en reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3,5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 30 °C.....	46
12	Comportamiento de niveles de azúcares reductores en reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3,5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 35 °C.....	47
13	Semillas después del procedo de biocatalisis a 35 °C.....	48
14	Extracto de olorante recuperado después del proceso de biocatalisis.....	48
15	Extracto de colorante recuperado en diferentes tratamientos de biocatalisis.....	49
16	Efecto de pH 7 y temperatura en peso de extracto obtenido con cultivo fúngico 7... 51	51
17	Efecto de pH 7 y temperatura en peso de extracto obtenido con cultivo fúngico 5... 52	52
18	Efecto de pH 7 y temperatura en peso de extracto obtenido sin cultivo fúngico 7... 53	53
19	Peso de pasta colorante obtenida por cada tratamiento.....	56
20	Espectro IR para pasta recuperada y colorante comercial.....	58

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de estudiar un posible nuevo método de extracción del colorante presente en la semilla de achiote (*Bixa orellana*), pigmento que es obtenido tradicionalmente por lavado con agua y a nivel industrial con soluciones alcalinas y ácidas

Se obtuvieron diferentes preparados fúngicos que fueron evaluados de acuerdo a su actividad sobre la celulosa. Después del análisis aplicado se eligieron dos preparaciones fúngicas. Ambas fueron identificadas como genero *Aspergillus*,

Cada cultivo fúngico fue inoculado en un medio acuoso formulado con micronutrientes y semilla de achiote como única fuente de carbono. Los valores de pH bajo los que se trabajó fueron de 3, 5 y 7 con temperaturas de 25, 30 y 35 °C para cada uno. Al término de 144 hr. se procedió a la recuperación y deshidratación de la pasta de achiote liberada.

Se obtuvieron 27 tratamientos como resultado de las diferentes interacciones de los dos cultivos fúngicos y el control con los demás factores. Se establecieron tres repeticiones para cada tratamiento, por lo que se analizaron un total 81 muestras de pasta colorante recuperada.

Los resultados del análisis de varianza dieron a conocer que existe interacción entre los factores cepa fúngica, pH, y temperatura y que ésta se ve reflejada en la liberación y recuperación del colorante.

Las mejores condiciones de trabajo que se obtuvieron del análisis se presentan cuando se trabaja con el género *Aspergillus* (cultivo fúngico # 7), a un pH de 7 y una temperatura de 35 °C.

La extracción del colorante con hongos celulolíticos resultó ser mayor a la liberación ofrecida por el método acuoso. Con el método en estudio se obtuvieron rendimientos de hasta un 80.7%, valor superior al reportado para la extracción con agua, pero inferior al registrado para el método alcalino que puede ser de hasta un 90%.

1. INTRODUCCIÓN

El color de los alimentos es un atributo que tiene mucha influencia dentro del juicio del consumidor. Gracias a su fácil percepción por los sentidos del hombre es la primera propiedad que causa impresión. El color puede llegar a ser determinante para que un comestible sea aceptado o rechazado. La homogeneidad del color del producto durante todo el tiempo es fundamental. El público desea siempre encontrar el alimento con la misma tonalidad; de no ser así, desconfía de su calidad (Badui, 1993).

La industria alimentaria utiliza una serie de sustancias, mejor conocidas como colorantes; que tienen como función primordial impartir alguna coloración en particular o simplemente resaltar la que por la naturaleza de las materias primas y, en su caso, de los procesos tecnológicos se tiene en el producto final.

Los aditivos que son utilizados como sustancias colorantes pueden ser obtenidos por síntesis química en la industria (colorantes sintéticos) o provenir de fuentes naturales como los vegetales (colorantes o pigmentos naturales).

En los últimos tiempos los colorantes sintéticos han sido cuestionados debido a sus efectos toxicológicos, inclusive algunos han sido eliminados de algunas legislaciones, tal es el caso del rojo No. 3 o eritrosina el cual se demostró que puede llegar a causar un mal funcionamiento de la tiroides (Vázquez, 2001). Lo anterior aunado a la tendencia que tienen los consumidores, sobre todo en los países desarrollados, a consumir alimentos con un mínimo o nulo contenido de sustancias sintéticas; ello ha provocado que el uso de colorantes naturales haya ido en aumento y en sustitución de los sintéticos (Salas, 2003).

Para abastecer la creciente demanda de colorantes naturales sin problemas de legislación, se procede a la extracción de los pigmentos presentes en los tejidos

vegetales o animales por medio de diferentes métodos como son el uso de variados solventes, enzimas, soluciones alcalinas, etc. Cada método presenta sus limitantes y ventajas.

El colorante obtenido de las semillas de achiote (*Bixa orellana*), está compuesto en su mayoría por el carotenoide bixina, se utiliza en la industria láctica, cárnica, condimentaria, cosmética, farmacéutica, etc. Es un colorante natural exento de certificación que ofrece tonalidades del amarillo al rojo, siendo este último uno de los colores más deseados dentro de la industria de alimentos. La extracción más rudimentaria se basa en un lavado con agua en ebullición, a nivel industrial se ha implementado un proceso de extracción alcalino que es de fácil aplicación, pero que tiene el inconveniente de que el producto final contiene un máximo de 30 a 40% de pigmentos (Vázquez, 2001).

Actualmente, y gracias a la biotecnología, se pueden obtener pigmentos naturales aplicando enzimas a variados sustratos vegetales e inclusive se pueden obtener como resultado de metabolismo de microorganismos modificados genéticamente (García *et al.*, 1999).

Las posibilidades de incrementar el rendimiento y la pureza del colorante obtenido del achiote siguen siendo tema de estudio, se debe buscar un método de extracción de fácil aplicación, que eleve el grado de rendimiento, dando como resultado un extracto exento o con un mínimo de impurezas químicas, que disminuya los riesgos al consumidor que implica el uso de solventes.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Obtener el colorante presente en la semilla de achiote (*Bixa orellana*), mediante biocatálisis utilizando hongos con comprobada actividad celulolítica.

1.1.2. Objetivos específicos

- Obtener semillas de achiote.
- Obtener, caracterizar y seleccionar microorganismos fúngicos con probada actividad celulítica.
- Establecer las condiciones óptimas de pH, temperatura y tiempo a fin de tener la mayor degradación de pared celular de la semilla de achiote.
- Recuperar, cuantificar y caracterizar químicamente el colorante obtenido después del tratamiento microbiano.

1.2. Hipótesis

Es posible obtener el colorante presente en la semilla de achiote (*Bixa orellana*) utilizando microorganismos capaces de producir exoenzimas que degraden la pared celular donde se encuentra adherido, facilitando así su liberación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. Los colorantes

Los primeros atributos de calidad con los cuales tiene contacto el consumidor son sin lugar a duda la apariencia y el color, éstos son los primeros en ser evaluados por el consumidor al momento de elegir algún alimento. Lo anterior es debido a la capacidad y facilidad que se tiene de percibir dichas características (Fennema, 2000, Badui, 1993).

La naturaleza física del espectro electromagnético que contribuye al fenómeno del color y el desarrollo de los mecanismos bioquímicos para la percepción de este atributo son algunas de las facetas más fascinantes de la evolución de la vida. El color es la principal característica sensorial para los consumidores de alimentos. Su uso tiene una larga historia en la civilización humana. Además de la atracción psicológica que ejercen, los compuestos que imparten color a los alimentos influyen en la fisiología de los consumidores por lo que existe un vínculo muy estrecho (Reyes, 2003).

2.1.1. Definición

El color se refiere a la percepción humana de los materiales coloreados: rojo, verde, azul, etc.

Un colorante se puede definir como aquella sustancia química de origen natural o sintético que tiene la capacidad de impartir o prestar algún color a aquellos materiales en los que se aplica.

Los pigmentos son sustancias naturales de las células de tejidos vegetales y animales que confieren color (Fennema, 2000).

Con respecto a los colorantes, un aditivo colorido de acuerdo con la U. S. Food and Drugs Administration (FDA, 1986):

“Es cualquier colorante, pigmento u otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar o extraída, aislada o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente y que cuando es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos o cosméticos, al cuerpo humano o a cualquier parte, por sí misma es capaz (sola o a través de una reacción con otra sustancia) de impartir color” (García *et al.*, 1999).

En México, la definición es enfocada por la Secretaría de Salud hacia el origen de la sustancia, “caracterizándola como aquella obtenida de los vegetales, animales, minerales o por síntesis y que es empleada para impartir o acentuar el color, sin especificar su uso o aplicación” (García *et al.*, 1999).

La variada gama de sustancias colorantes hace necesaria la existencia de una clasificación, para esto se han tomado diversos criterios, tanto físicos como químicos.

2.1.2. Clasificación.

La clasificación de los colorantes se puede realizar de diversas formas, estas se pueden basar en su procedencia o fuente de origen, en su certificación o por el grupo cromóforo o el radical que provoca un determinado color en su apreciación óptica.

De acuerdo con su origen se pueden clasificar en colorantes naturales y sintéticos, los primeros se obtienen de microorganismos, vegetales, animales o minerales; los segundos por síntesis química, incluyendo aquellos que son idénticos a los provenientes de fuentes naturales (García *et al.*, 1999). En la Figura 1 se observa una clasificación de los colorantes alimentarios en base a su origen.

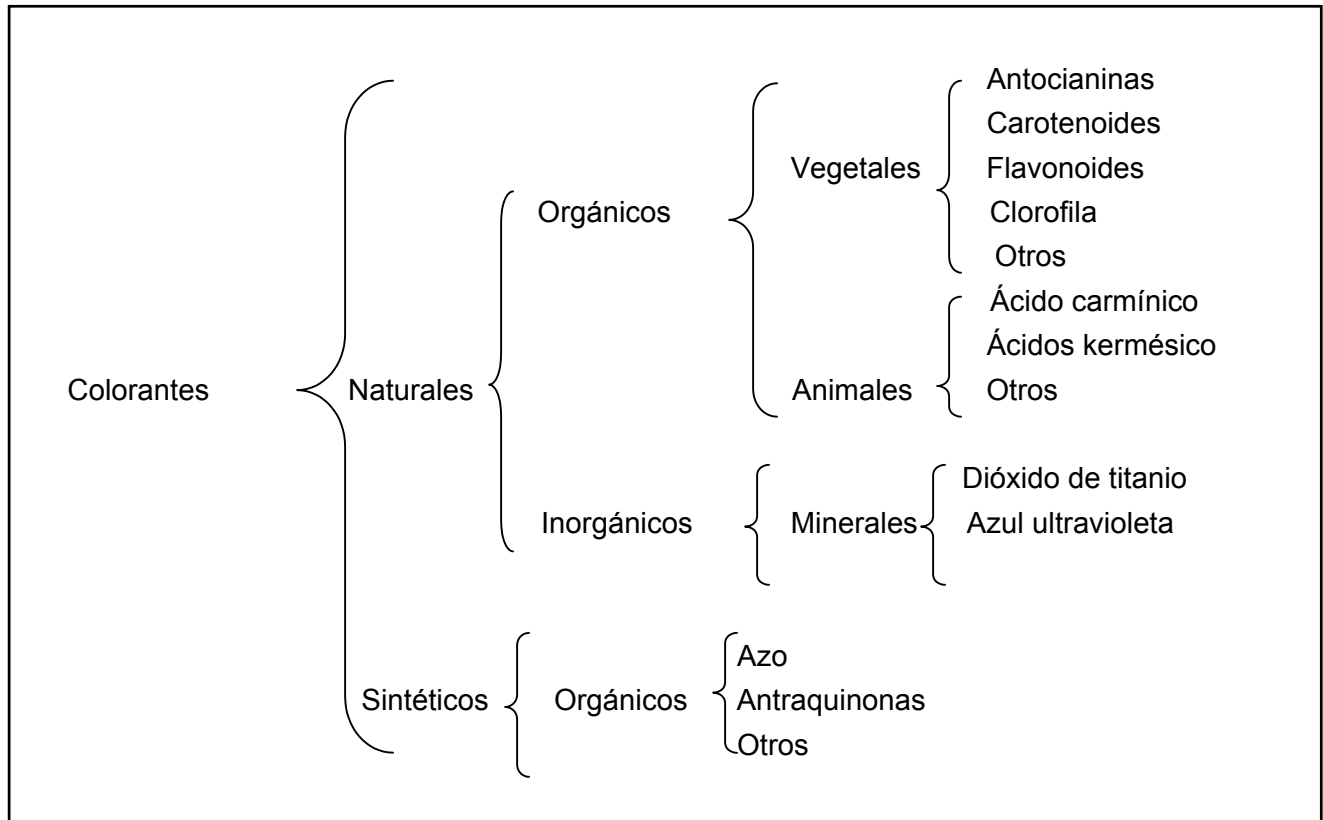


Figura 1. Clasificación de los colorantes. Fuente: García *et al.*, (1999).

2.1.2.1. Colorantes sintéticos

La utilización de colorantes sintéticos es una práctica que data desde hace muchos años, y las razones de su uso como aditivos alimentarios se deben más que nada a las ventajas que ofrecen sobre los colorantes naturales. En los últimos años se ha descubierto que muchos causan problemas a la salud del consumidor (García *et al.*, 1993, Shibamoto y Bjeldanos, 1996, Furia, 1972).

Actualmente los colorantes sintéticos han perdido popularidad y la situación por la que atraviesan se puede ver en el área de bebidas, considerada hasta hace poco una de las que más emplea colorantes artificiales en la industria alimenticia. En este sector de la industria, muchos colorantes sintéticos han sido prohibidos; por ejemplo, el rojo

2 en Estados Unidos, reemplazado por el rojo # 40 que no ha sido aprobado por la mayoría de los países.

Los colorantes artificiales han perdido popularidad porque se requiere de productos con mejor calidad nutricional, ya que la mayoría de los consumidores buscan bebidas saludables; por ejemplo, enriquecidas con vitaminas y provitaminas. No obstante, muchos colorantes artificiales conducen a problemas técnicos cuando se tratan de mezclar con estas sustancias (García *et al.*, 1999).

2.1.2.2. Colorantes naturales

Actualmente existe un considerable interés por ampliar el uso de colorantes naturales debido a que se presenta la necesidad de expandir la variedad de los mismos y , por otro lado, divulgar que son naturales y por ello son seguros para quien los consume (García *et al.*, 1999, Salas, 2003).

Pueden ser compuestos puros o productos de extracción. Los compuestos puros como la riboflavina y el β -caroteno están bien definidos químicamente y pueden ser de origen natural o haber sido obtenidos por síntesis; son siempre de calidad igual y responden a unas especificaciones precisas. Los productos de extracción proceden de materias primas alimentarias y pueden estar asociados a numerosas impurezas; los compuestos obtenidos no tienen composición y propiedades colorantes constantes; lo que hace que la obtención de estas sustancias sea más fácil por síntesis que por procedimientos de extracción (Multon, 2000).

La mayoría de los colorantes naturales se encuentran en los tejidos vegetales, a excepción del rojo cochinilla (rojo carmín), que se puede obtener de insectos (Multon, 2000). En el Cuadro 1 se hace mención de algunas fuentes de colorantes o pigmentos naturales.

Cuadro 1. Colorantes naturales usados en alimentos

FUENTE	AGENTE ACTIVO
Achiote, annato (<i>Bixa orellana</i>)	Bixina (carotenoide)
Azafrán (<i>Crocus sativos</i>)	Crocetina (carotenoide).
Cúrcuma (<i>Cúrcuma longa</i>)	Cucurmina
Cochinilla (<i>Dactylopius coccus</i>)	Ácido carmínico
Pimiento rojo (<i>Capsicum annum</i>)	Capsantina (carotenoide)
Enocianina	Polímeros de antocianina
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	β - caroteno (carotenoide)
Cempoaltxochitl (<i>Tagetes erecta</i>)	Luteína (carotenoide)
Plantas verdes	Clorofila
Betabel (<i>Beta vulgaris</i>)	Betalaínas

Fuente: Badui (1993).

La gran mayoría de los colorantes naturales presentes en las frutas se encuentran dentro de organelos especializados llamados plástidos, éstos están localizados dentro del protoplasma de la célula vegetal y se pueden observar al microscopio. Cuando son solubles en agua se encuentran disueltos en las vacuolas de las células (Badui, 1993).

Los colorantes naturales se pueden clasificar en: flavonoides, carotenoides, melanoidinas, porfirinas, betalinas, quinoides y otros varios (curcumina, carbón vegetal, Índigo) (Rodríguez, 2002, Badui, 1993).

La aplicación de colorantes naturales, así como las especificaciones de sus usos depende de la legislación de cada país, bloque económico, tratado, etc.

2.1.3. Normatividad de colorantes

Cada país se puede regir por su propia normatividad, de acuerdo a su legislación, lo que conlleva a que algunos aditivos estén permitidos en ciertos países y en otros no.

Con el objetivo de reglamentar las características de seguridad de los alimentos en el comercio internacional, la Comisión del Codex Alimentarius ha creado un cuerpo de normas que son aceptadas internacionalmente. La colección de normas se encuentra publicada en un documento titulado Codex Alimentarius, en este se incluyen las disposiciones sobre los aditivos en la industria alimentaria (FAO/OMS, 1995).

Otro organismo regulador y que tiene un gran peso a nivel internacional, dado el gran mercado que representa, es la Food and Drugs Administration (FDA) de los Estados Unidos.

Las regulaciones de la FDA distinguen dos tipos de aditivos colorantes (Wong, 1989, Fennema, 2000):

1. Colorantes *no certificados*, que son aquellos obtenidos a partir de fuentes naturales o bien, son duplicados sintéticos de los colorantes naturales.
2. Los colorantes *certificados* no se encuentran en la naturaleza como tal, por lo que se obtienen por síntesis química, entre éstos se pueden mencionar los tintes y las lacas, de amplia aplicación en la industria alimentaria. Comparados con los colorantes naturales, los colorantes artificiales tienen una mayor capacidad colorante, una mayor estabilidad y es más fácil normalizar el matiz de color y la intensidad.

Las lacas son sales de aluminio de los colorantes artificiales y son una forma no soluble del colorante, por lo que no se utilizan en sistemas acuosos (Wong, 1989).

En México, la utilización de colorantes dentro de la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética es regulada por las siguientes normas (García *et al.*, 1999):

- NOM-038-SSA1-1993
- NOM-118-SSA1-1994
- NOM-119-SSA1-1994

El 22 de octubre del 2004, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios determinó que las normas oficiales mexicanas anteriormente citadas son obsoletas.

Estas normas han sido superadas por la normatividad internacional, así como por diversos ordenamientos legales vigentes en México, lo anterior no permite la creación de nuevos productos con una base sanitaria específica que contribuya a reducir riesgos en su caso (DOF, 2004).

2.1.4. Disponibilidad y demanda de colorantes

Se estima que el mercado de colorantes crece a razón de un 10% por año. La proporción de pigmentos naturales es creciente, esto es debido a la toxicidad de algunos de los compuestos sintéticos. Sin embargo, cerca del 80 % de las ventas totales para esta área en Estados Unidos (uno de los principales mercados) es cubierto por tres químicos monoazoicos, como la tartrazina (amarillo), dos azonaftoles y el rojo 40.

En México, se estima que la demanda es cubierta (excluyendo el color caramelo) en su mayor parte por los amarillo-naranja (55%) y los rojos (25%). México es un productor-exportador de colorantes.

La situación y perspectiva actuales para los colorantes, sobre todo los naturales, se pueden observar en el caso de los carotenoides. Estos pigmentos ofrecen las tonalidades que se desean en el mercado. Se estima que estas sustancias tienen

ventas de 19 millones de dólares en el área de alimentos, medicamentos y cosméticos. Es importante señalar que sobresale el β -caroteno (García *et al.*, 1999).

2.2. Los carotenos

Son un grupo de pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas superiores. Se caracterizan por tener como estructura principal un esqueleto conformado por átomos de carbono que a su vez consisten en unidades repetidas de isopreno (Wong, 1989, Fennema, 2000).

El nombre genérico deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue en esta hortaliza de donde se aislaron por primera vez (Badui, 1993).

Los carotenos se clasifican de acuerdo a la estructura de su cadena.

2.2.1. Clasificación

En la naturaleza se ha identificado un número mayor a 420 carotenos, una gran cantidad de éstos se encuentra en las hojas verdes, aunque su coloración vaya del amarillo al anaranjado, y se manifiesta en el invierno, ya que la clorofila; que es el pigmento de mayor presencia, desaparece (Badui, 1993).

De acuerdo a Wong (1989), los carotenos se pueden clasificar en dos grupos:

1. Carotenos-hidrocarburos carotenoides.
2. Xantofilas (u oxicarotenoides)- derivados que contienen oxígeno.

2.2.1.1. Carotenos-hidrocarburos carotenoides

Este grupo es conocido simplemente como carotenoides, presentan características de hidrocarburos, son compuestos solubles en petróleo y poco en etanol. Los carotenoides hidrocarburos que más destacan dentro de este grupo son los α , β y γ -carotenos y el licopteno (Badui, 1993).

2.2.1.2. Xantofilas

Se caracterizan por presentar oxígeno en su cadena, se presentan como ácidos, aldehídos, alcoholes y son solubles en alcohol, metanol y éter de petróleo. Algunos ejemplos de estos compuestos son la luteína y la fucoxantina (Badui, 1993).

Además, también están muy extendidos en la naturaleza los ésteres de carotenoides hidroxilados con ácidos grasos (Fennema, 2000).

2.2.2. Distribución.

Los carotenos se encuentran dispersos en la naturaleza, se pueden encontrar en los cítricos, zanahorias, tomates rojos, pimiento, mantequilla, aceite de palma, azafrán, yema de huevo, trucha, salmón y algas. Por razones comerciales, las principales fuentes de obtención son los residuos de pulpa y melazas procedentes de las fábricas de cítricos (Rodríguez, 2002, Multon, 2000).

2.2.3. Estabilidad

Como consecuencia de los dobles enlaces (insaturaciones) presentes en la cadena principal, estas sustancias están sujetas a manifestar variados cambios químicos que son el resultado de las diferentes condiciones de procesamiento (principalmente

elevadas temperaturas, radiaciones electromagnéticas y el oxígeno) a que son sometidos en la industria (Badui 1993, Fennema, 2000). Cuando se calientan en ausencia de aire existe una tendencia de algunos dobles enlaces *trans* de los carotenos a isomerizarse a *cis*, conforme aumenta el número de dobles enlaces *cis* disminuye la intensidad del color (Coultate, 1984).

Dentro de su ambiente natural, los carotenoides son generalmente estables, el problema en su inestabilidad se ve reflejado cuando los alimentos en que están presentes son calentados, o cuando se extraen con aceites o disolventes orgánicos, se vuelven mucho más lábiles (Coultate, 1984).

2.2.4. Propiedades físicas, extracción y análisis

El color de los carotenos varía del amarillo al rojo, se detectan a una longitud de onda que va de 430 a 480 nm. Las longitudes de onda mayores suelen utilizarse para algunas xantofilas a fin de prevenir la interferencia de las clorofilas.

Los carotenos son un grupo de compleja naturaleza y gran diversidad, por lo que su separación a partir de los tejidos vegetales exige cromatografía. La extracción de carotenos para un análisis cuantitativo implica el uso de solventes orgánicos. Comúnmente se utilizan mezclas hexano-acetona para este fin, pero a veces es necesario utilizar disolventes y tratamientos especiales para alcanzar una separación satisfactoria.

Se han desarrollado muchos procedimientos cromatográficos, incluso HPLC, para la separación de estos (Badui, 1993, Coultate, 1984, Fennema, 2000).

2.2.5. Los carotenoides como colorantes alimentarios

Los carotenoides no son un grupo de pigmentos que se haya caracterizado por su amplia aplicación en la industria de alimentos, esto se debe a que no son muy estables y a que son sustancias insolubles en agua.

Dos excepciones a esto son la creocetina, pigmento mayoritario del azafrán, y la bixina.

La bixina es el constituyente principal de la sustancia colorante annato, que se obtiene de extractos de las semillas de la planta conocida como achote, annato, cocote, bija, bixa, urucu (Devia y Saldarriaga, 2003, Pérez, 2003, Rosales, 1991), roccou o achiote (*Bixa Orellana*) (Rodríguez, 2002, Coultate, 1984, Vázquez, 2001).

2.3. El achiote

El achiote, vocablo derivado del Nahuatl “achiotl”, es una planta útil que ha sido usada desde tiempos remotos por los indígenas quienes le daban múltiples usos tales como: cosmético, adornos para la ropa y otros objetos, así como para tinción del cuerpo. Fueron los españoles quienes al considerarlo de propiedades semejantes al azafrán le dieron uso culinario (Arce, 1983).

El achiote es una planta originaria de América Tropical, se cultiva desde México hasta Brasil, muy posiblemente su área de origen es la oya amazónica. Fue descubierto por los europeos a su llegada al nuevo mundo (Devia y Saldarriaga, 2003, Pérez, 2003, Rosales, 1991).

El nombre científico *Bixa orellana L.* es en honor al conquistador Francisco de Orellana, quien exploró el río del Amazonas alrededor de 1541. Su clasificación taxonómica es la siguiente (Vázquez, 2001):

Reino: vegetal.

Sub-división: Angiosperma.

Clase: Dicotiledóneas.

Orden: Parietales.

Genero: Bixaceae.

Genero: Bixa.

Especies: *B. orellana* L., *B. excelsa* G., *B. platycarpa* R., *B. arborea* H. y otros.

El achiote, cuya imagen se presenta en la Figura 2, es una planta arbustiva que crece rápidamente hasta alcanzar una altura de 4 a 6 metros, es de aspecto robusto con flores blancas o rosas, dependiendo de la variedad.

El fruto es una cápsula de coloración roja y en su interior contiene entre 30 y 40 semillas. Las semillas están cubiertas en su periferia por un arilo de color rojo o anaranjado, esto debido a su contenido de bixina, sustancia que constituye el pigmento propiamente dicho (Devia y Saldarriaga, 2003, Roosevelt, 2005, Rosales, 1991).



Figura 2. Planta de achiote con fruto y flor. Fuente:
http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_biosfera/flora/achiote/achiote.htm

2.3.1. Generalidades del cultivo

Es una planta que se encuentra en armonía en zonas tropicales, aunque también se puede adaptar a diferentes climas. Se desarrolla bien a temperaturas que van de los 24 a los 35 °C, siempre y cuando no se presenten heladas y las precipitaciones pluviales anuales sean de 1000 a 1200 mm (Pérez, 2003, Roosevelt, 2005).

El suelo que mejor se presta para su cultivo es aquel que es rico en materia orgánica, buen contenido de humedad, plano y de preferencia con aluviones en los márgenes de los ríos (Vázquez, 2001).

Los arbustos de achiote comienzan su producción comercial entre los 3 y 4 años de edad. En promedio, una plantación resulta redituable por un periodo de 12 años. El momento de la cosecha se identifica por la firmeza de la cápsula, siendo duras al tacto. En la Figura 3 se puede observar el fruto maduro del achiote.



Castedo, J.P. www.ccbol.com/achiote.html

Figura 3. Cápsulas maduras de achiote. Fuente: http://www.portalagrario.gob.pe/rrnn_achiote.shtml

El rendimiento de una plantación depende de ciertas variables, pero en promedio se obtienen de 500 a 600 kg de semilla por hectárea (Pérez, 2003).

2.3.2. Distribución

La familia Bixaceae se distribuye desde México hasta Brasil y Argentina, se cultiva en otras regiones tropicales y subtropicales, los principales países productores son: Bolivia, Brasil, Ceilán, Colombia, República Dominicana, Ecuador, Guayana, India, Jamaica, Perú, Srilanka y México (con una distribución de 50 hasta 1000 metros sobre el nivel del mar). En México la planta se encuentra en los estados de Puebla, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Campeche y Yucatán (Vázquez, 2001).

De acuerdo con el censo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) del 2000, se produjeron en Quintana Roo 721 toneladas, en Campeche 515, en Yucatán 147 y en Tabasco 35, para consumo nacional (Pérez, 2003).

2.3.3. Características fisicoquímicas de la semilla de achiote

Los principales componentes de la semilla del achiote son los carbohidratos, ya que según Devia y Saldarriaga. (2003), estos componentes representan hasta un 48% de la totalidad de las semillas.

La composición química de la semilla de achiote es muy variada, y diferente de un autor a otro. En el Cuadro 2 se puede observar la composición general de la semilla de achiote de acuerdo a Devia y Saldarriaga (2003), en tanto que en el Cuadro 3 se muestra una composición química más detallada de acuerdo a Vázquez (2001).

Cuadro 2. Composición química de la semilla de achiote.

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

Fuente: Devia y Saldarriaga (2003).

Cuadro 3. Composición química desglosada de la semilla de achiote.

ESTRUCTURA DE LA SEMILLA	COMPUESTO	PORCENTAJE
CUBIERTA EXTERIOR (68%)	Celulosa	40.00 a 45.00
	Humedad	20.00 a 28.00
	Azúcares	3.50 a 5.20
	Aceites esenciales	0.25 a 0.85
	Pigmentos	3.25 a 5.50
CUTÍCULA (22%)	Celulosa y tanino	20.00 a 21.00
	Resina	1.0 a 1.65
	Aceites esenciales	0.05 a 1.10
ALMENDRAS (10%)	Sustancias cerosas	0.3
	Aceites esenciales	8.00 a 11.00
	Cenizas minerales	1.50 a 1.80
	Alcaloides	Trazas

Fuente: Vázquez (2001).

El principal componente del pigmento presente en el exterior de las semillas de achiote es el carotenoide bixina, sustancia que llega a representar más del 80% del total de los pigmentos presentes (Devia y Saldarriaga, 2003, FAO, 1995).

El contenido total de pigmento presente en las semillas suele ser expresado como bixina. Las mejores semillas, en cuanto a contenido de bixina, presentes en el mercado pueden contener de un 2 a un 3%, siendo generalmente las primeras las de mayor utilización. Este valor puede variar de acuerdo a las áreas de producción, e inclusive varía dentro de las mismas áreas (FAO, 1995).

Las semillas con más alto contenido de colorante, y por ende de mayor calidad, cuyo contenido de bixina representa un 3% de su peso, son producidas y exportadas por

Jamaica y otras Islas del Caribe. Las semillas con un contenido del 2 % son producidas en Centro y Sudamérica. En la India, las semillas de achiote producen un pigmento amarillo conteniendo 1.3% a 1.5% y 0.4% a 0.5 % de pigmento rojo (Vázquez, 2001).

El colorante o extracto, se encuentra constituido principalmente, además de bixina, por grasa, resina e isoprenoide. Estos últimos han sido reportados como fuentes de vitamina A, B y D (Vázquez, 2001).

2.4. La bixina

El principal pigmento del achiote es la bixina, esta sustancia confiere el color rojo-naranja característico presente en el exterior de las semillas, existe otro pigmento que confiere un color amarillo que se conoce como orellina. La bixina representa alrededor del 80 % de los pigmentos presentes en e la semilla (Devia y Saldarriaga., 2003, FAO, 1995, Rodríguez, 2004)

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas.

Como se puede apreciar en la Figura 4, es un carotenoide en forma *cis* formado por una cadena de carbonos que presentan dobles enlaces con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metil éster en el otro, lo anterior determina la insolubilidad del pigmento en el agua (Vázquez, 2001, Badui, 1993, FAO, 1995, Rodríguez, 2004).

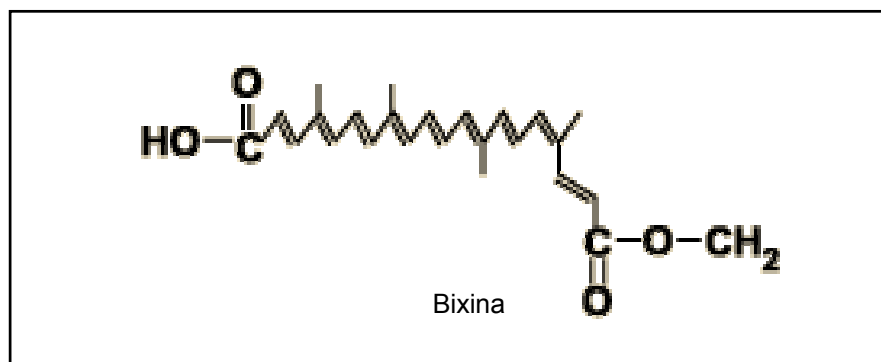


Figura 4. Estructura química de la bixina. Fuente: Kalsec (2005).

La bixina es insoluble en agua, pero cuando se pone en contacto con álcalis y se le aplica calor, se obtiene una sal soluble en esta. El producto es llamado norbixina, tanto *cis* como *trans*. La estructura de la norbixina se presenta en la Figura 5, donde se aprecia claramente la ausencia del grupo metil ester.

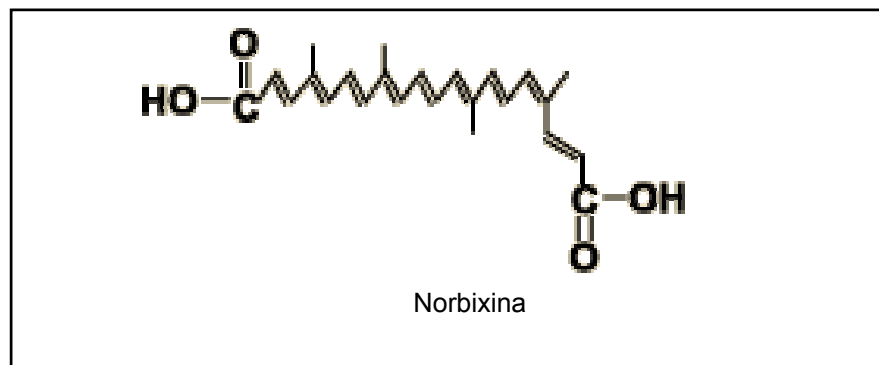


Figura 5. Estructura química de la norbixina. Fuente: Kalsec (2005).

La *cis*-bixina es insoluble en aceite. Con el tratamiento térmico usado en la extracción la *cis*-bixina se convierte en *trans*-bixina, de color rojo y soluble en aceite.

Devia y Saldarriaga (2003), reportan una máxima absorbancia en 480 nm para el colorante del achiote. Toledo y Rocha (2004), reportan una absorción máxima de 470 y 501 nm para la bixina liposoluble diluida en cloroformo, en tanto que para la forma hidrosoluble disuelta en agua, reportan una absorción máxima de 453 y 483 nm. Estos extractos producen con ácido sulfúrico concentrado un color azulado debido a la bixina o azul verdoso debido a la norbixina.

2.4.2. Usos

Las coloraciones que van desde el amarillo natural del huevo, hasta el rojo ladrillo son las de mayor ocurrencia al momento de utilizar colorantes en la industria alimenticia, estas coloraciones son aportadas a los alimentos por el pigmento del achiote en todas sus presentaciones comerciales, cuya calidad ya sea en extractos líquidos o sólidos (polvos) son proporcionados por la industria que los extrae.

Las características de los extractos de achiote importantes para la industria alimenticia son (Kalsec, 2005):

- Matices que van de amarillo natural a anaranjado;
- Larga vida de anaquel;
- Consistente color estandarizado;
- Compatibilidad con otros extractos colorantes;
- Calidad microbiológica superior (resistencia al ataque microbiano);

La característica más importante y que convierte al achiote en un material interesante para extraer pigmentos es la posibilidad de obtener colorantes tanto solubles en agua como en aceite, esto con sólo variar las condiciones en el proceso de extracción (Toledo y Rocha, 2004).

Existen extractos del achiote que pueden ser solubles tanto en sistemas acuosos como grasos, comúnmente los extractos comerciales contienen bixina y norbixina, además de emulsificantes de grado alimenticio que permiten aumentar su solubilidad en agua o aceite, esto también permite su aplicación en sistemas con un pH bajo (Sensient, 2005, Toledo y Rocha, 2004).

2.4.2.1. Los extractos solubles en agua

Los extractos o formas solubles del colorante del achiote se utilizan en aquellos alimentos que se caracterizan por su alto contenido de agua (sistemas acuosos) tales como los quesos, las pastas, productos de panadería, salsas, confitería. Los extractos comerciales, generalmente, contienen una mezcla de sales de sodio y potasio de los isómeros de *cis* de la norbixina, estas sales son el producto final de la transformación de la bixina durante el proceso de extracción (FAO, 1995, Vázquez, 2001, Kalsec, 2005, SIRE, 2005).

El colorante soluble del achiote puede ser utilizado en los cereales, ya que dependiendo de los métodos de procesamiento, los matices de amarillo-naranja a dorado-café pueden ser obtenidos (Kalsec, 2005).

El uso de la norbixina debe considerar aspectos tecnológicos como la solubilidad, el pH, la estabilidad y la capacidad del pigmento para interactuar con las proteínas del medio. La solubilidad de la norbixina en agua está directamente relacionada con el pH, por lo que su uso se restringe a ciertos límites. Una característica interesante de este pigmento es que puede adherirse a proteínas, esto representa un gran interés para su aplicación en ciertos productos (Toledo y Rocha, 2004).

De acuerdo con Wong (1989), la mayoría de los alimentos tienen un pH ácido, por lo que cuando se les añade una solución de norbixina, el pigmento se insolubiliza debido al descenso del pH y queda en suspensión. Por esta razón la norbixina es particularmente útil en la elaboración de cereales para desayuno cuando no se desea que el color pase a la leche.

2.4.2.2. Los extractos solubles en el aceite

Estos productos pueden contener bixina o norbixina o una combinación de ambos, se usa en aquellos alimentos que se caracterizan por su alto contenido de grasa. Se venden como polvo o en forma de soluciones o suspensiones listas para usar en aceites vegetales comestibles.

Los productos sólidos pueden contener hasta un 99% de bixina, mientras que las soluciones en aceite vegetal pueden presentar concentraciones tan bajas como 0.1%. Los niveles de la dosificación de bixina/nor-bixina en productos alimenticios se extienden generalmente entre 0.01 y 0.5%. El competidor principal para los extractos del annatto es el betacaroteno sintético (Toledo y Rocha, 2004).

El pigmento del annatto es usado también como un repelente para insectos el cuál es aplicado directamente a la piel (SDIC, 2005).

2.4.3. Estabilidad

La estabilidad de la bixina o annatto varía, dependiendo de los medios, y se debe probar para cada uso. Algunos factores a considerar incluyen (Sensient, 2005):

- Luz – el annatto se degrada con la exposición prolongada a la luz fuerte, directa.
- Medios ácido-básicos – en medios ácidos las soluciones alcalinas acuosas de norbixina se precipitan, en medios alcalinos dichos extractos son estables.
- Oxidación – los colorantes del achiote son susceptibles a la degradación a causa de la oxidación.
- Ataque microbiano – los colores del achiote son resistentes al ataque microbiano.

Existen diversas formas para extraer el colorante de las semillas de achiote, algunas son muy rudimentarias, los métodos más actuales son utilizados a nivel industrial.

2.5. Métodos de extracción del colorante

La composición de los extractos obtenidos varía según el método utilizado, debido a que la bixina se isomeriza con el calor aumentando el contenido de isobixina y se hidroliza en medio alcalino dando lugar a la norbixina. Por lo tanto, el método que se utilice para extraer el colorante de las semillas influirá en la calidad del producto final (Pérez, 2003).

2.5.1. Extracción rudimentaria

La extracción tradicional del colorante del achiote consiste en sumergir las semillas en agua a temperatura ambiente o en ebullición con constante agitación. Si las semillas se lavaron en agua a temperatura ambiente. El líquido coloreado se libera y es sometido a ebullición hasta obtener una pasta como producto final. Las semillas que son sometidas directamente en agua, se hierven hasta obtener la pasta. Esta técnica presenta bajos rendimientos, con pérdidas elevadas en el contenido de bixina, debido al prolongado tiempo de cocción (Pérez, 2003, Devia y Rocha 2003, Roosevelt, 2005).

2.5.2. Extracción Industrial

A escala industrial la extracción se realiza utilizando solventes como soluciones de álcali diluido, aceites comestibles, entre otros. Se evita el uso de altas temperaturas. Con este método se obtienen altos rendimientos, ya que la molécula de bixina es afín a estas sustancias y permite obtener extractos puros del pigmento. Sin embargo, el método resulta muy caro debido a la cantidad de solvente y equipo necesarios (Pérez, 2003, Devia y Saldarriaga, 2003).

Los principales mercados de exportación (Estados Unidos, Europa y Japón) desean que se eliminen los métodos de extracción que utilizan productos químicos (Liceras, 1988).

2.5.2.1. Extracción con solución alcalina

Al presentar un grupo carboxilo dentro de su molécula, la bixina puede reaccionar con una base para formar sales que son solubles en agua (Devia y Rocha, 2003, FAO, 1995).

Tiene altos rendimientos de extracción, hasta mayores a 70%, y es económicamente accesible (Pérez, 2003, Vázquez, 2001).

El proceso más común para obtener productos solubles en agua a partir de la semilla implica la extracción directa con álcali acuoso (generalmente hidróxido de sodio o de potasio) como primer paso. Típicamente, la semilla se empapa o se revuelve en álcali acuoso diluido en un recipiente de acero inoxidable por cerca de 10 minutos a una temperatura no mayor que 70 °C. Esta operación transforma la bixina natural de la capa de la semilla a un derivado soluble en agua simple, la sal norbixina. El extracto se escurre del recipiente y el proceso de extracción se puede repetir en las semillas para asegurar la recuperación máxima del pigmento. El extracto alcalino se filtra y después se acidifica con ácido mineral diluido (generalmente sulfúrico o clorhídrico) para precipitar la norbixina libre. El precipitado se deseca parcialmente en una prensa-filtro para obtener una goma débil. Esto se puede concentrar por la evaporación del agua para la venta como goma o someterla a la deshidratación completa, seguida por proceso de molido para obtener un producto secado, pulverizado (FAO, 1995).

2.5.2.2. Extracción con aceites vegetales

Los extractos liposolubles de achiote se obtienen mediante la extracción de la cubierta exterior de los granos por medio de: 1- la extracción directa de aceites y/o grasas comestibles; 2- la incorporación en los aceites y/o grasas comestibles del extracto obtenido a disolventes orgánicos (acetona, diclorometano, etanol, hexano, metanol, isopropanol, tricloroetileno), seguida de la eliminación del disolvente (Toledo y Rocha, 2004).

Recientemente se han desarrollado técnicas que emplean fluidos supercríticos, también se ha dado paso a la biotecnología.

2.5.3. Aplicación de fluidos supercríticos

Los fluidos supercríticos se han utilizado para extraer una amplia gama de sustancias a partir de muestras botánicas. Estos analitos extraídos pueden ser aceites esenciales.

Los extractos pueden ser utilizados para propósitos de análisis, para obtener sabores o fragancias.

La bixina fue obtenida usando dióxido de carbono supercrítico, después de analizar los resultados del proceso de extracción y aplicar HPLC al producto final, las condiciones óptimas para la extracción de bixina fueron 60.62 Mpa y 40 °C con 4% de acetonitrilo y conteniendo 0.05% de ácido trifluoroacético como solvente (Rozzi y Sing, 2002).

2.5.4. Métodos biotecnológicos

El uso de enzimas (pectinasas, celulasas, hemicelulasas) que degradan la pared celular, facilitaría la extracción acuosa del colorante. Estas enzimas que actúan sobre componentes insolubles tales como celulosa, hemicelulosa y pectina permitirían obtener

un colorante de mayor pureza y calidad. Asimismo, permitiría dejar de lado las sustancias químicas utilizadas actualmente en los métodos de extracción industriales (Campos y Salvá., 1997).

Según Campos y Salvá (1997), con la extracción enzimática se incrementa el rendimiento de extracción en 24 % (13 % en bixina y 11 % en norbixina) con respecto a la extracción acuosa. Respecto a la extracción alcalina no se reportan diferencias significativas en el rendimiento de extracción. Sin embargo, se obtiene un incremento de 15 % (10 % y 5 % en bixina y norbixina, respectivamente) en la pureza del colorante obtenido.

Bouvier *et al.* (2003), localizaron en el achiote los tres genes que producen la bixina demostrando que el precursor de la sustancia es el licopeno, el mismo pigmento que hace que los tomates sean rojos y que también está presente en las sandías y en las uvas tintas. En segundo lugar insertaron los genes en *E. coli* transgénicas que ya estaban transformadas para producir licopeno, de esta manera se indujo la transformación del licopteno en bixina que resultó ser idéntica a la presente en las semillas de *Bixa orellana*.

Otro método que puede ser utilizado en la extracción del colorante, también biotecnológico, es la biocatálisis microbiana.

2.6. Biocatálisis

Las enzimas se han distinguido por su habilidad para biocatalizar en forma altamente específica la velocidad y eficiencia de diversas reacciones químicas. Dichos atributos son ya una marca de clase, que les ha valido para ser utilizadas ampliamente en infinidad de procesos analíticos e industriales. Múltiples procesos de fermentación y

bioconversiones de importancia tecnológica, industrial y económica son procesos multienzimáticos.

El manejo de conceptos, modelos y casos de estudio serán clave del avance y análisis de esta área de gran relevancia para el sector industrial. La tecnología enzimática y bioconversiones son procesos claves para los sectores farmacéutico, alimentos, energía, salud y medio ambiental, apoyados en áreas como la microbiología industrial, ingeniería enzimática, ingeniería de solventes, ingeniería de proteínas y diseño de reactores, serán relevantes para emplear la biocatálisis como base en los procesos de innovación tecnológica y desarrollo económico de la bioindustria (Baez, 2005).

2.6.1. Definición

La biocatálisis es el fenómeno por medio del cual se llevan a cabo las reacciones químicas en los seres vivos. Se le llama así porque son reacciones llevadas a cabo por catalizadores especiales, de origen orgánico, es decir enzimas (Chamizo *et al.*, 2004). Con la producción de enzimas endógenas como exógenas, los microorganismos pueden transformar los sustratos con los que hacen contacto.

Cabe señalar que algunos microorganismos desarrollan esta capacidad de forma natural y otros cuando son forzados por las condiciones del medio donde están presentes (Bárzana, 2002).

Para los procesos de biocatálisis son ampliamente utilizados las bacterias, levadura y hongos principalmente (Bárzana, 2002).

Los hongos se caracterizan por asimilar sustancias simples presentes en el medio circundante. Si las moléculas son muy complejas, éstos utilizan complejos enzimáticos. Muchos hongos se distinguen por degradar celulosa.

2.6.2. Microorganismos degradadores de celulosa

La celulosa es mucho más insoluble que el almidón y, generalmente, se digiere con menor rapidez. La celulosa forma largas fibrillas y los organismos que la digieren se encuentran a menudo íntimamente asociados con ellas (Brock, 1978).

La celulosa es uno de los componentes más abundante de la biomasa vegetal que es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos o formando un complejo denominado “celulosoma”, como en Clostridios y en bacterias del rumen (Ramírez y Cocha, 2003).

Muchos hongos son capaces de digerir la celulosa y ellos son los principales responsables de la descomposición de los materiales vegetales en el bosque. Entre las bacterias, sin embargo, la digestión de la celulosa está restringida a sólo unos pocos grupos de entre los cuales las mixobacterias, los Clostridios y los actinomicetes son los más comunes (Brock, 1978).

2.6.3. Hongos

2.6.3.1. Generalidades

Los hongos son por lo común filamentosos. Los filamentos individuales se denominan hifas. Las hifas crecen sólo en sus extremos, por lo que los hongos presentan crecimiento apical, dando como resultado una red de hifas que se denomina micelio (Brock, 1978).

Todos los hongos son heterótrofos, debido a la pared rígida no pueden fagocitar el alimento; más bien, absorben nutrientes simples y solubles que obtienen de la degradación de polímeros complejos con enzimas extracelulares que liberan al medio.

Están adaptados fisiológicamente a vivir en condiciones más severas que la mayor parte de los microorganismos.

Comparando con las bacterias, los hongos en general, tienen requerimientos nutritivos extraordinariamente simples (Brock, 1978, Deacon, 1988).

Las moléculas orgánicas más simples, como monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos, se obtienen a través de la membrana celular. Sin embargo, las moléculas más complejas que incluyen quizás muchos disacáridos, deben degradarse a monómeros en el exterior de la célula por medio de enzimas liberadas a través de las paredes o unidas a éstas (Deacon, 1988).

Los hongos son eucarióticos, se reproducen tanto sexual como asexualmente, pero en cualquier caso forman esporas como producto final de diferenciación (Deacon, 1988).

Entre los hongos filamentosos de más fácil adaptación, y que se caracterizan por su alta producción de enzimas se encuentran los del género *Aspergillus*.

2.6.4. Aspergillus

Los hongos filamentosos se caracterizan por ser un grupo de gran interés para la industria, ya que se utilizan principalmente en la producción de algunas enzimas, entre éstas es posible citar a un gran número de glucanasas, capaces de degradar totalmente a la celulosa (Gretty y Marcel, 2003).

Las glucanasas son enzimas con un gran espectro de aplicación industrial, se utilizan en el blanqueo, en la extracción y clarificación de jugos, así como en la industria textil, entre otras.

Estos microorganismos ofrecen algunas ventajas para ser utilizados en la obtención de enzimas a nivel industrial, sobresalen: alto nivel de producción, la facilidad del cultivo, y el que sus productos sean considerados “GRAS” (generally regarded as safe), lo que permite que se utilicen en la industria de alimentos tanto para el hombre, como para los animales (Gretty y Marcel, 2003).

2.6.4.1. Morfología

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el substrato (Carrillo, 2003).

2.6.4.2. Cultivos

La mayoría de las especies crecen sobre Czapek-Levadura pero los *Aspergillus* osmófilos, particularmente los miembros de las secciones *Aspergilli* y *Restricti*, se desarrollan sobre Czapek-20% Sacarosa. La temperatura de incubación corriente es de 25°C pero para algunos miembros de la sección *Fumigati* es conveniente 37°C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en dos semanas las esporas están totalmente maduras (Carrillo, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar la presente investigación se plantearon las siguientes etapas:

3.1. ETAPA 1. Obtención de la materia prima

Se trabajó con semillas enteras de achiote procedente del estado de Chiapas. El achiote se obtuvo en un mercado del municipio de Acala.

Las semillas fueron mantenidas en envases plásticos y almacenados en condiciones de oscuridad.

3.1.1. Características fisicoquímicas de la semilla de achiote

Para los objetivos de la investigación, solo se procedió a realizar análisis de ceniza, humedad, bixina, grasa, fibra cruda, celulosa y lignina. Todas las determinaciones se realizaron en base a los métodos establecidos por la AOAC (1980), excepto la determinación de celulosa y lignina, que se hicieron de acuerdo a Van Soest y Wine (1968). La bixina se determinó de acuerdo a Vázquez ,2001 (anexo 7.3).

3.2. ETAPA 2. Obtención, selección y caracterización de microorganismos fúngicos con probada actividad celulolítica.

De la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, se obtuvieron 7 muestras diferentes de hongos, los cuales demostraron en estudios previos actividad celulolítica. Las muestras fueron valoradas y seleccionadas en función a dicho atributo.

3.2.1. Selección del microorganismo con mayor actividad celulolítica

Los hongos fueron viabilizados en un medio líquido y posteriormente inoculados en placas de agar carboximetilcelulosa (CMC). Después de 7 días de incubación a 28 °C se evaluó su actividad sobre la carboximetilcelulosa aplicando la técnica del rojo congo de acuerdo con los lineamientos propuestos por Iliná (2002, anexo 7.1).

Los cultivos fúngicos fueron enumerados del 1 al 7 en tanto eran identificados.

3.2.2. Caracterización de los microorganismos seleccionados

El objetivo de esta etapa es determinar específicamente el tipo de hongo con que se está trabajando a fin de elucidar de mejor manera la naturaleza del mismo, así como el comportamiento de éste en el proceso.

Los microorganismos que presentaron la mayor actividad fueron analizados tanto macroscópica como microscópicamente, mediante análisis de morfología, esporulación y asimilación de nutrientes. Todos los análisis fueron realizados de acuerdo a los lineamientos propuestos por Barnett y Hunter (1987) y Romero (1993). Dichos estudios fueron realizados en el Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA), localizado en el ejido Salaices perteneciente al municipio de López, Chihuahua.

3.3. ETAPA 3. Establecimiento de las condiciones de pH y temperatura para la degradación de la pared celular y liberación del colorante

Esta etapa se realizó mediante un proceso aeróbico en medio acuoso.

En el Cuadro 4 se muestra la composición del medio formulado en base a las pruebas realizadas en la Etapa 2, utilizándose semillas enteras de achiote como única fuente de carbono.

Cuadro 4. Medio para el proceso de biocatálisis

COMPONENTE	GRAMOS
Semillas	2.0
NaNO ₃	0.6
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄	0.1
KCl	0.1
K ₂ SO ₄	0.02
Buffer	200 ml

El medio se mantuvo a pH 3, 5 y 7, de acuerdo a la técnica propuesta por Lynch *et al.* (1987).

Una vez preparado el medio, se procedió a adicionar cada unidad experimental con un inóculo que contenía 2, 000, 000 de esporas/ml. El conteo de esporas se realizó de acuerdo a los lineamientos propuestos por Iliná (2002, anexo 7.2).

Posteriormente, cada unidad experimental (medio inoculado con esporas) fue colocada en “baño maría” para el control de la temperatura a 25, 30 y 35 °C, durante 144 hr.

Durante este tiempo se monitoreo la formación de azúcares totales y reductores, los primeros se determinaron de acuerdo a los lineamientos propuestos por Dubois *et al.* (1956) con fenol sulfúrico, los azúcares reductores se analizaron de acuerdo al método descrito por Miller (1959), que comprende el uso de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS).

3.4. ETAPA 4. Recuperación y caracterización del colorante liberado

3.4.1. Recuperación del colorante

Una vez terminado el proceso de biocatálisis, cada sistema fue esterilizado en autoclave, para detener el crecimiento y actividad fúngica. Después del proceso de esterilización se recuperó el colorante mediante tratamientos en medio acuoso de calentamiento, prensado y filtrado, hasta obtener la mayor cantidad de colorante posible.

El material obtenido en las operaciones antes citadas, fue sometido a un proceso final de evaporización en horno a una temperatura entre 60-65 °C hasta la eliminación completa de la humedad residual, monitoreado como peso constante de la muestra. La determinación del rendimiento se realizó por análisis gravimétrico.

Los datos arrojados por el análisis gravimétrico fueron sometidos a un análisis de varianza con arreglo factorial de tratamientos con $P \leq 0.05$, esto para determinar que condiciones ofrecen una mayor liberación de colorante.

3.4.2. Caracterización del producto final

Los información obtenida en el análisis de pesos ofrecen datos sobre la cantidad de materia bruta extraída a partir de la semilla del achiote después del tratamiento, más sin embargo, no revelan cual es la pureza del extracto recuperado. Para esto se procedió a aplicar un análisis por espectroscopia infrarroja (IR) a los extractos obtenidos, mediante la metodología propuesta por Devia y Saldarriaga (2004), consistente en preparar la pastilla de KBr con la muestra del colorante en polvo y se obtiene el espectro infrarrojo en un espectrofotómetro Perkin – Elmer. El extracto obtenido se comparo con una muestra comercial de achiote de la empresa la yucateca.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA 1. Obtención de la materia prima

La semilla de achiote que se adquirió no fue obtenida bajo requerimientos específicos como tamaño, peso, etc., únicamente se busco obtener semilla de achiote que estuviera en su madurez fisiológica. La semilla no presentó signos de algún tipo de alteración, por lo que se utilizo sin ningún problema.

4.1.1. Características fisicoquímicas de la semilla de achiote

Los resultados de los análisis químicos que se aplicaron a la semilla de achiote se detallan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados de análisis químico de la semilla de achiote

COMPONENTE	CONTENIDO (% bMS)
Humedad.	1.61
Ceniza.	3.51
Grasa.	4.52
Fibra cruda.	16.9
Celulosa.	9.74
Lignina.	3.76
Bixina	1.4

Se puede observar que uno de los menores componentes de la semilla utilizada en la presente investigación es la humedad, esto se traduce en un alto contenido de materia seca que se caracteriza por su elevado contenido en fibras.

Lo anterior permite proponer que en la semilla puede ser utilizada en el proceso de biocatálisis como una fuente de carbono representada en parte por fibras que pueden ser desdobladas por complejos enzimáticos presentes en organismos como los hongos.

El porcentaje de grasa, reportado en el Cuadro 5, es muy similar al reportado por Vázquez (2001), que es de 4.6%.

El porcentaje de bixina (Cuadro 5) obtenido en el análisis químico aplicado a la materia prima que se utilizó en la presente investigación, es inferior al reportado por Vázquez (2001) y la FAO (1995), que es 2 al 3%. Sin embargo, es un valor cercano al 2% y la posible causa de que sea inferior se puede deber a que la fricción entre las semillas, al momento de su manejo, ocasiona desprendimiento del pigmento.

Devia y Saldarriaga (2003), reportaron un contenido del 13.8% de celulosa, valor que se encuentra por encima del obtenido en esta investigación. Por otro lado el contenido de fibra cruda que reporta el mismo autor, que es del 18.48%, es similar al 16.9% presente en las semillas utilizadas para los fines del presente trabajo de investigación.

Es evidente que los resultados obtenidos en el análisis químico pueden ser diferentes en comparación con los que otros autores reportan lo que se puede deber a la variedad, estado fisiológico de madurez, así como el tiempo y condiciones de almacenamiento de la semilla con que se trabajó.

4.2. ETAPA 2. Obtención, selección y caracterización de microorganismos fúngicos con probada actividad celulolítica

4.2.1. Selección de microorganismos con mayor actividad celulítica

En la Figura 6 se puede observar como el rojo congo revela la actividad fúngica sobre la carboximetilcelulosa.



Figura 6. Ensayo de rojo congo en el cultivo 7. A: placa con hongo. B: placa con rojo congo. C: placa después de lavado con solución salina

En la Figura 6A se puede apreciar el crecimiento fúngico sobre la periferia de los círculos presente en la placa. Una vez que se aplica la solución de rojo congo (Figura 6B) la placa se adquiere coloración roja. Después que se procede al lavado con solución salina se obtienen las zonas decoloradas observadas en la Figura 6C que ponen de manifiesto la actividad celulolítica de las muestras de hongos analizadas, en este caso particular el cultivo ensayado fue el 7.

Los resultados obtenidos aplicando la técnica del rojo congo fueron sometidos a un análisis de varianza ($P \leq 0.05$); esto con la finalidad de elegir con mayor seguridad cual o cuales microorganismo son los que más se adecuan a la investigación.

Los resultados del análisis se reportan en el Cuadro 6, como las medias analizadas por la prueba de t-Student ($P \leq 0.05$).

Cuadro 6. Resultados de rojo congo analizados mediante t-Student ($P \leq 0.05$)

CULTIVO FÚNGICO						PROMEDIOS ESTIMADOS POR MÍNIMOS CUADRADOS
Cultivo 7	A					3,90 cm.
Cultivo 5		B				3,40 cm.
Cultivo 2		B	C			3,23 cm.
Cultivo 6			C	D		3,10 cm.
Cultivo 1			C	D		3,05 cm.
Cultivo 4				D		2,91 cm.
Cultivo 3					E	2,63 cm.

El análisis de medias permite concluir que el cultivo con mayor producción de celulasas, es el cultivo 7, ya que en el análisis estadístico fue el mejor, mostrándose una diferencia significativa con el resto.

Por otro lado, el cultivo 5 y el cultivo fúnico 2 resultaron estadísticamente semejantes al no existir diferencia significativa entre ambas. Estos dos cultivos fúngicos estadísticamente presentaron menor actividad que el cultivo 7, pero mayor que el resto de los demás preparados fúngicos .

Los cultivos 7, 5 y 2 fueron caracterizados y probados en el proceso de biocatálisis, para seleccionar el mejor de acuerdo a su pureza y adaptabilidad al proceso de extracción del colorante.

4.2.2. Caracterización de los microorganismos seleccionados.

Los resultados de los estudios llevados a cabo en el CIRENA se reportan en el Cuadro 7. Se puede observar que el género *Aspergillus* es predominante.

Los cultivos fúngicos 7 y 5, que presentaron una mayor actividad celulolítica; fueron identificadas como *Aspergillus*. De acuerdo con Gretty y Marcel (2003), este género se caracteriza por su alta producción de glucanasas y fácil crecimiento.

En la cepa 2 se encontró que no se trataba de un solo género, sino de una mezcla de *Aspergillus* y *Penicillium*. Este fenómeno puede deberse a la existencia de una relación simbiótica entre ambos géneros que dificulta su purificación.

Cuadro 7. Resultados de la caracterización de los microorganismos

CULTIVO FÚNGICO	GÉNEROS FÚNGICOS
7	<i>Aspergillus</i>
5	<i>Aspergillus</i>
2	<i>Penicillium</i> y <i>Aspergillus</i>

El cultivo 2, al no ser puro, presentó dificultades para su crecimiento, por lo que no se utilizó este microorganismo en el proceso de biocatalisis.

Los hongos se diferencian de las bacterias por ser microorganismos eucarióticos de fácil desarrollo, crecen en condiciones ambientales y nutricionales más críticas que estas.

4.3. ETAPA 3. Establecimiento de las condiciones de pH y temperatura para la degradación de la pared celular y liberación del colorante.

4.3.1. Monitoreo de azúcares totales.

Se monitoreó el comportamiento de azúcares totales y reductores por un tiempo de 144 hrs. Esta prueba se realizó para mostrar la existencia de actividad celulolítica bajo las condiciones aplicadas al proceso.

En las Figuras 7, 8 y 9, se puede observar que los niveles de los azúcares en el medio aumentan y disminuyen su concentración. Esto se debe al propio metabolismo de los microorganismos inoculados, así como el de la flora nativa, el cual consiste en la hidrólisis de los polímeros que integran la pared celular de las semillas del achiote, presente como única fuente de carbono disponible en el medio para posteriormente asimilar los azúcares más simples formados a partir de dicha degradación.

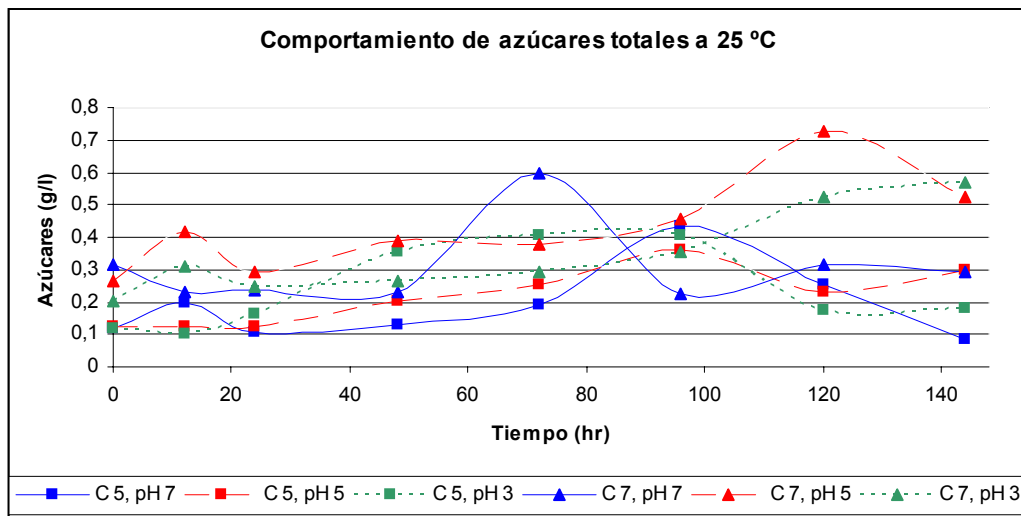


Figura 7. Comportamiento de niveles de azúcares totales en el reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3, 5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 25 °C.

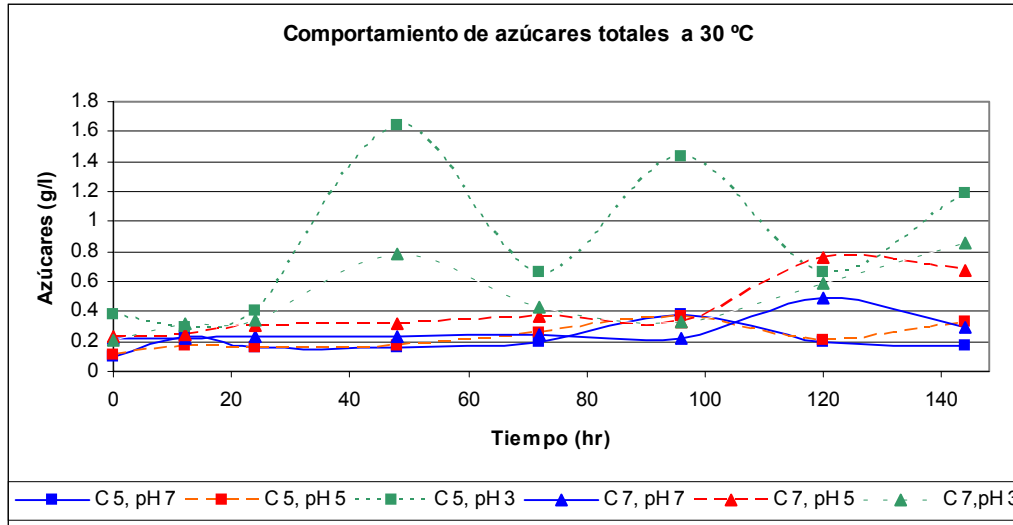


Figura 8. Comportamiento de niveles de azúcares totales en el reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3, 5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 30 °C.

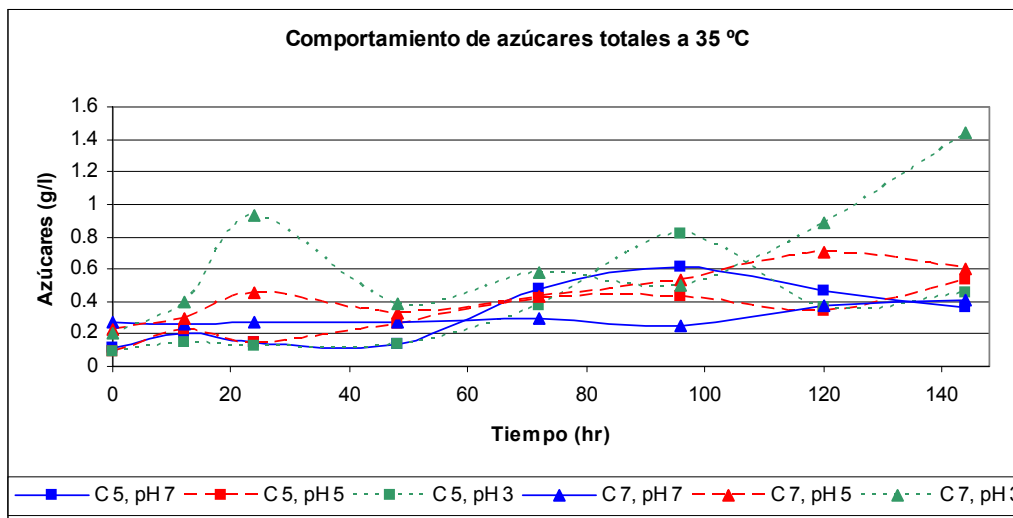


Figura 9. Comportamiento de niveles de azúcares totales en el reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3, 5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 35 °C.

En las figuras anteriores, se observa a temperaturas de 25 °C (Figura 7) que ambos cultivos bajo los diferentes pH muestran incrementos y decrementos en cuanto a la concentración de azúcares totales de manera inestable, contrastándose contra las temperaturas de 30 °C (Figura 8) y 35 °C (Figura 9) en la cual destaca la estabilidad del cultivo 7 a pH 7. Es posible apreciar que se mantienen la tendencia de incremento de

la variable en estudio lo cual muestra la existencia de actividad celulolítica. Sin embargo, el comportamiento. El comportamiento que se irregular de las gráficas se puede estar relacionado con el consumo de glucosas liberadas. Brock (1978) y Deacon (1988), consideran que para el desarrollo fúngico se absorben los nutrientes simples y solubles que obtienen de la degradación de polímeros complejos con enzimas extracelulares que liberan al medio. En el caso del cultivo⁷ se observó la formación de una gran cantidad de micelio flotando en el medio y rodeando a las semillas del achiote. Por otra parte, la cepa 5 a pH 3 y temperatura de 30 °C presenta un comportamiento inestable en la que hay una gran formación de azúcares a las 48 hr para su posterior consumo a las 72 hr apreciándose pobre formación de micelio y crecimiento levaduriforme, corroborado, además de la apreciación visual, por la detección de olores a solventes, los cuales pueden ser el resultado de algún tipo de fermentación.

4.3.2. Monitoreo de azúcares reductores

Las lecturas de azúcares reductores revelan la presencia de las sustancias simples como pueden ser la glucosa o la fructosa.

De acuerdo al monitoreo, se observa en las Figuras 10, 11 y 12, que la concentración de azúcares reductores se incrementa en un menor tiempo en función al aumento de temperatura expresándose a tiempos tardíos a 25 °C y tempranamente a partir de los 30 °C.

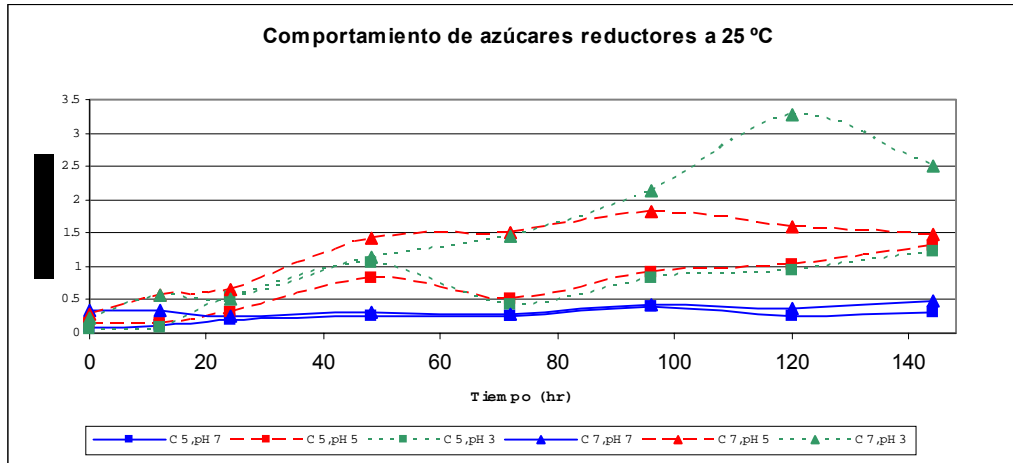


Figura 10. Comportamiento de niveles de azúcares reductores en el reactor con cultivo fúngico 5 y 7 a pH 3, 5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 25 °C.

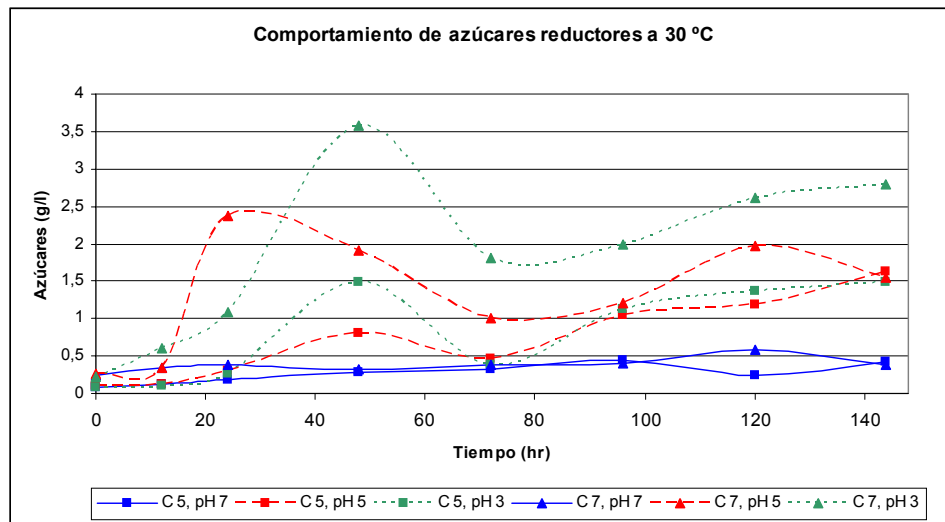


Figura 11. Comportamiento de niveles de azúcares reductores en el reactor con cultivo 5 y 7 a pH 3, 5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 30 °C.

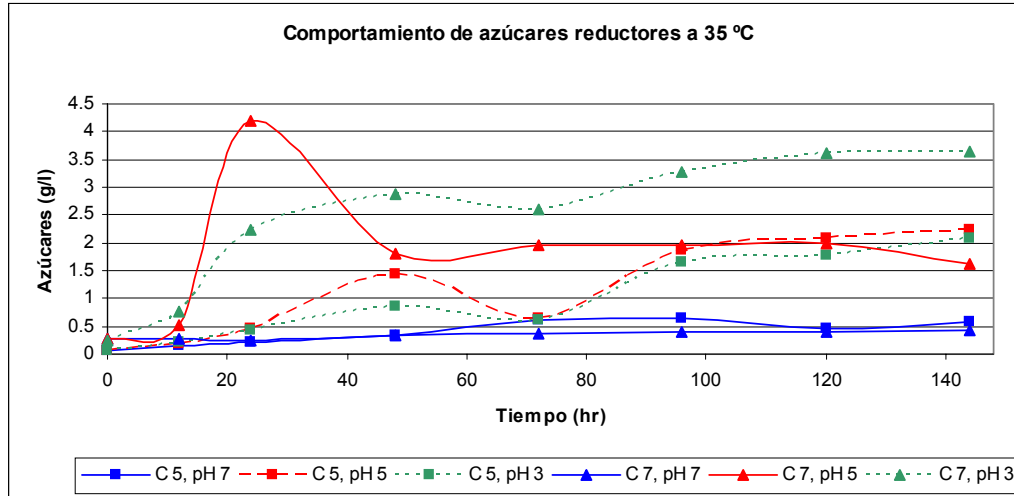


Figura 12. Comportamiento de niveles de azúcares reductores en el reactor con cultivo 5 y 7 a pH 3, 5 y 7 en función al tiempo con temperatura de 35 °C.

En función del pH se destaca el comportamiento del pH 7 en el cual se mantiene prácticamente constante la concentración de la variable en estudio para ambos cultivos fúngicos y en todas las temperaturas monitoreadas.

En función al testigo, sin inóculo fúngico, se presentaron resultados apenas perceptibles y prácticamente constantes lo que indica la nula presencia de actividad celulolítica.

4.4. ETAPA 4. Recuperación y caracterización del colorante liberado

4.4.1. Recuperación del colorante.

El extracto recuperado presenta la coloración característica del achiote, fue posible observar fibras provenientes de las semillas tratadas con el hongo debido a la degradación experimentada durante el tratamiento.

En la Figura 13 se aprecia el resultado del proceso de biocatálisis, ambas muestras fueron sometidas a las mismas condiciones de temperatura y agitación en medio acuoso. La única diferencia es que la muestra A no fue inoculada con esporas y la B si, observándose claramente que la muestra B presenta severos daños en su estructura, debido a la acción fúngica ejercida sobre la pared celular de esta, a diferencia de la A, la cual presenta semillas íntegras.



Figura 13. Semillas después del proceso de biocatálisis a 35 °C. A: semillas sin inóculo en el medio. B: semillas inoculadas con hongo con cepa 7 y pH 7 .

En la Figura 14 se aprecia el extracto del colorante recuperado después de terminar el proceso de biocatálisis. Ambas muestras fueron sometidas al proceso en estudio bajo las mismas condiciones de trabajo, la diferencia radica en que la muestra A no incluyó inoculación microbiana alguna, en tanto que la B fue inoculada con esporas de hongo.

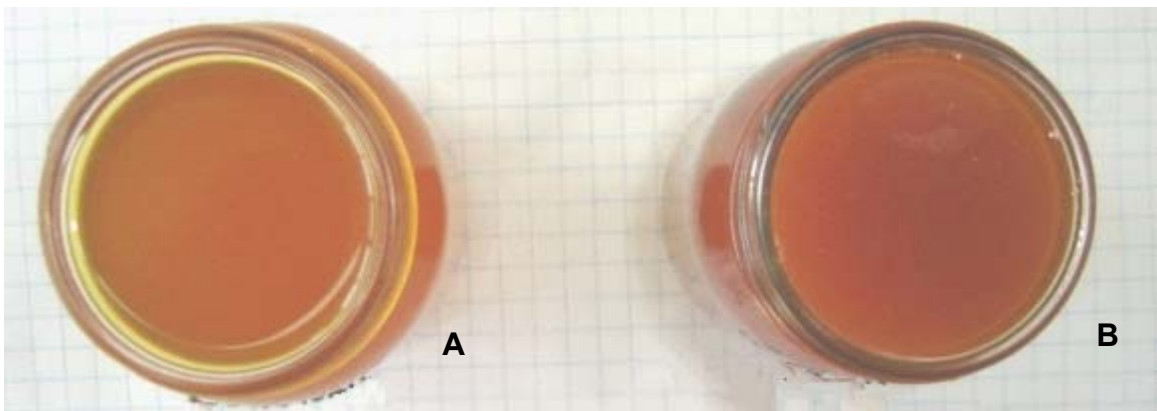


Figura 14. Extracto de colorante recuperado después del proceso de biocatálisis. A: colorante obtenido sin inóculo en el medio a 35 °C. B: colorante obtenido con *Aspergillus* (cultivo 7) a 35 °C y pH 7.

Se puede notar que existe una diferencia notable en cuanto a la intensidad del color, siendo menos pronunciada en el testigo (muestra A).

Por otro lado, en la Figura 15 se muestra el colorante liberado, en solución acuosa, por el testigo y el liberado por el cultivo fúngico bajo tres diferentes condiciones de pH y temperatura de 35 °C. El colorante recuperado en las muestras B, C y D es el resultado de un medio inoculado con esporas de hongo del cultivo 7 a temperatura de 35 °C, variando el pH 3, 5, y 7. Se puede observar que a medida que aumenta el pH la coloración es más intensa.

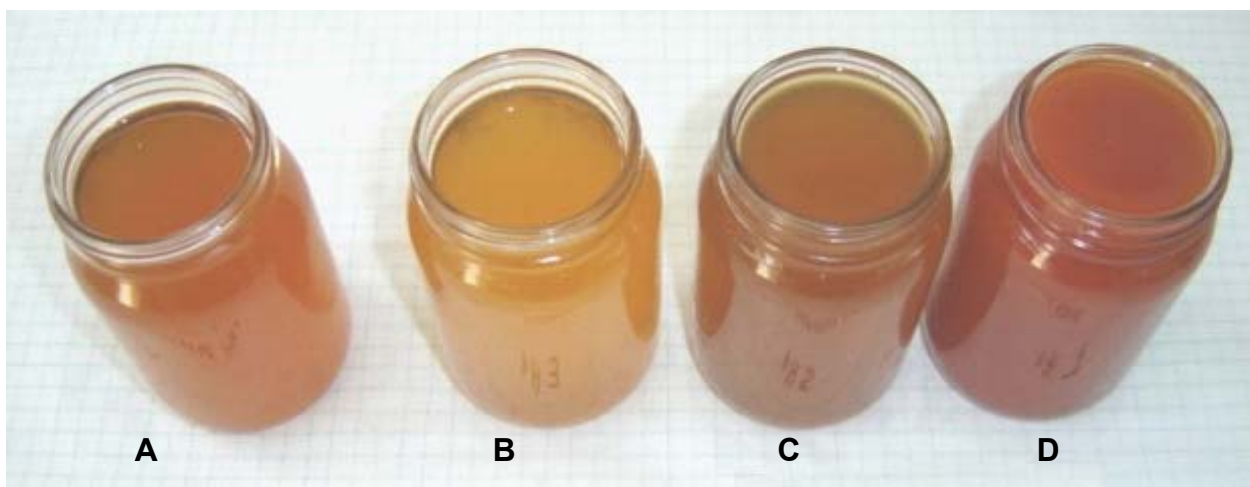


Figura 15. Extracto de colorante recuperado en diferentes tratamientos de biocatálisis.
A: medio agua y 35 °C. B: medio con esporas pH 3, 35 °C. C: medio con esporas pH 5, 35 °C.
D: medio con esporas pH 7, 35 °C.

Los pesos de los extractos recuperados de cada ensayo (muestra) fueron sometidos a un análisis de varianza con arreglo de tratamientos factorial con el objetivo de determinar si cada factor actúa independientemente o existe interacción entre los mismos.

Se obtuvieron 81 observaciones, ya que se trabajó con 27 tratamientos y tres repeticiones.

En el Cuadro 8 se puede observar que el modelo resultó ser significativo ($P \leq 0.05$) para los tratamientos en estudio.

Cuadro 8. Análisis de varianza para todos los datos

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fc
Modelo	26	4,1149846	0,158269	34,1805
Error	54	0,2500402	0,004630	Prob > F
Total corregido	80	4,3650248		<.0001

En el Cuadro 9 se observa un análisis de varianza para cada factor, así como para cada una de las diferentes interacciones.

En dicho cuadro se muestra que todas las fuentes de variación presentan significancia, excepto el factor temperatura.

Cuadro 9. Análisis de varianza para cada factor

F.V.	gl	SC	Fc	Prob > F
Cultivo fúngico	2	2,5860263	279,2459	<.0001
pH	2	0,1434548	15,4906	<.0001
Cultivo fúngico*pH	4	0,9323612	50,3394	<.0001
Temperatura	2	0,0244957	2,6451	0,0802
Cultivo fúngica*Temperatura	4	0,1215807	6,5643	0,0002
pH*Temperatura	4	0,1451940	7,8392	<.0001
Cultivo fúngico*pH*Temperatura	8	0,1618720	4,3698	0,0004

FV = fuente de variación, gl = grados de libertad, Fc = F calculada, Prob > F = Probabilidad $F_c < F$ teórica

Después de que el análisis de varianza demostró que la temperatura no es una variable que afecte el proceso de extracción, para efecto del presente estudio habrá que centrarse en las interacciones, especialmente en la triple (cultivo fúngico x pH x temperatura) ya que lo que interesa es el efecto de esta sobre la extracción del colorante.

4.4.1.1. Efecto del pH, temperatura y cultivo fúngico sobre la liberación del colorante

El efecto de la temperatura y el pH sobre el microorganismo resulto ser significativa ($P \leq 0.05$), lo cual es relevante para efecto del presente estudio, ya que el buen funcionamiento del microorganismo empleado estará en función del medio circundante, constituido por la interacción de dichos factores, lo cual favorecerá la degradación de celulosa con la consecuente mejora en cuanto a la liberación y recuperación del pigmento, que es el propósito planteado.

4.4.1.1.1. Efecto del pH y temperatura sobre cultivo fúngico 7 en la liberación del colorante (interacción doble).

En la Figura 16 se observan los efectos de la doble interacción para la cepa fúngica 7.

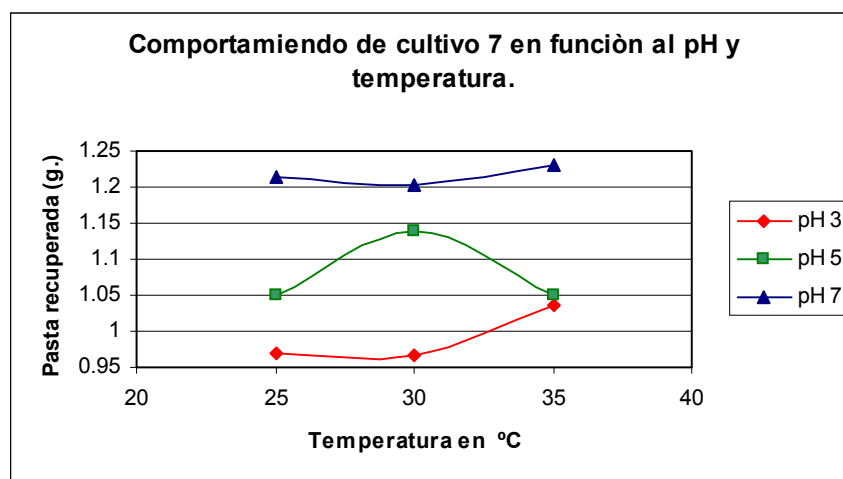


Figura 16. Efecto de pH y temperatura en peso de extracto obtenido con cultivo fúngico 7.

En la misma figura se puede apreciar que el cultivo 7 ofrece la mayor liberación y recuperación de la pasta colorante a pH 7, siendo siempre superior al 5 y 3 en todas las temperaturas. A pH 7 bajo temperatura de 35 °C se registran los mejores resultados.

El pH 3 ofrece un comportamiento muy similar al pH 7, pero inferior, en todos los valores de temperatura.

En cuanto al pH 5, este muestra valores superiores al pH 3, pero de niveles inferiores al 7 bajo todas las condiciones de trabajo, presentando los mejores resultados al interactuar con la temperatura de 30 °C.

4.4.1.1.2. Efecto del pH y temperatura sobre cultivo fúngico 5 en la liberación del colorante (interacción doble).

En la Figura 17 se muestra el comportamiento de los resultados obtenidos con el cultivo 5 bajo las diferentes temperaturas y condiciones de pH estudiadas en el medio circundante.

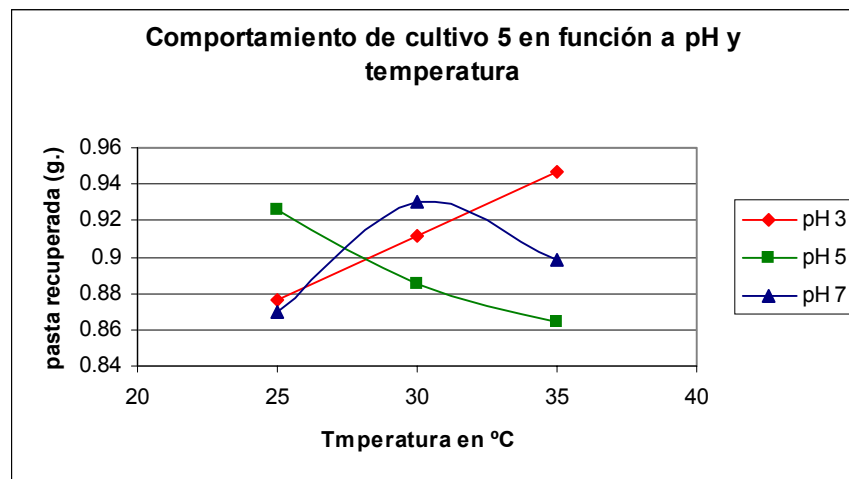


Figura 17. Efecto de pH y temperatura en peso de extracto obtenido con cultivo fúngico 5.

En esta figura se puede apreciar que la variable de respuesta tiene un comportamiento inversamente proporcional con la temperatura cuando el pH del medio es de 5.

En el pH 3 el comportamiento de la variable de respuesta es directamente proporcional con la temperatura.

El pH 3 ofrece su mejor resultado cuando la temperatura del medio es de 35 °C, dicho valor es el más elevado de los reportados para el cultivo 5.

El segundo mejor comportamiento de la variable peso de pasta recuperada, se presenta cuando el pH del medio es de 5 y la temperatura de 30 °C

En la misma figura se puede apreciar que la diferencia en gramos no es muy significativa en el pH 3 y 7 bajo todas las condiciones de temperatura.

4.4.1.1.3. Efecto del pH y temperatura sobre el testigo sin inoculo en la liberación del colorante (interacción doble)

En la Figura 18 se muestra el comportamiento del testigo bajo todas las condiciones de trabajo.

El testigo no fue inoculado con ningún tipo de microorganismo, esto con el objetivo de comparar cuales serian los resultados en el proceso de liberación del colorante cuando no se usara microorganismo alguno. Cabe mencionar la presencia de flora nativa.

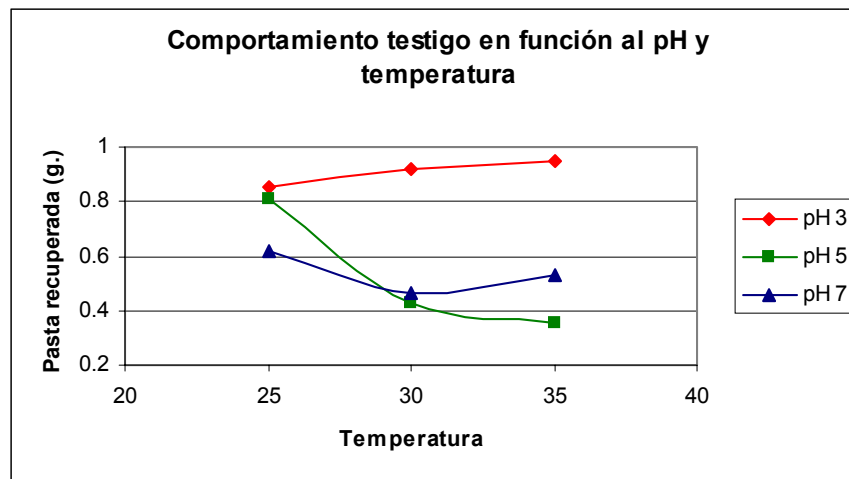


Figura 18. Efecto de pH y temperatura en peso de extracto obtenido sin cultivo fúngico.

En la figura anterior se observa que el comportamiento de la variable de respuesta para el pH 7 y 5 es similar en todas las temperaturas, aunque en 30 y 35 °C el pH 7 ofrece mejores resultados que el pH 5, pero estadísticamente no hay significancia.

El pH 7 reporta su mejor comportamiento a temperatura de 25 °C, valor que es inferior al que se registra bajo las mismas condiciones para el pH 5.

La variable de respuesta, gramos de pasta recuperada, es mayor que el pH 5 y 7 cuando el medio se encuentra en pH 3 y se ve incrementada a medida que aumenta la temperatura.

Cabe mencionar que el testigo a pH 3 es tiene un comportamiento muy similar al que muestra la variable de respuesta con el cultivo 5 al mismo pH (Figura 17).

De manera general, la interacción de los tres factores (cultivo fúngico x temperatura x pH) se aprecia en el Cuadro 10. De acuerdo al análisis de medias con t-Student ($P \leq 0.05$) aplicado a todas las observaciones, se puede decir que la variable de respuesta en estudio (gramos de pasta recuperada) se ve incrementada a medida que se incrementa el pH y la temperatura del medio, aunque esta por si sola no es significativa.

Es importante mencionar que a pH 5 se promueve el crecimiento de levaduras, por lo que estas condiciones de trabajo no son recomendadas.

Cuadro 10. Análisis de medias del extracto liberado mediante t-Student ($P \leq 0.05$)

TRATAMIENTO (cultivo, pH, temp.)												PROMEDIO ESTIMADO POR MÍNIMOS CUADRADOS
7,7,35	A											1,2319
7,7,25	A											1,2137
7,7,30	A											1,2038
7,5,30	A	B										1,1401
7,5,25		B	C									1,0505
7,5,35		B	C									1,0487
7,3,35		B	C	D								1,0368
7,3,25			C	D	E							0,9704
7,3,30			C	D	E	F						0,9662
1,3,35			C	D	E	F						0,9497
5,3,35			C	D	E	F						0,9466
5,7,30				D	E	F						0,9301
5,5,25				D	E	F						0,9257
1,3,30					E	F	G					0,9209
5,3,30					E	F	G					0,9117
5,7,35					E	F	G					0,8986
5,5,30					E	F	G					0,8851
5,3,25					E	F	G					0,876
5,7,25					E	F	G					0,8692
5,5,35					E	F	G					0,8639
1,3,25						F	G					0,8554
1,5,25							G					0,8104
1,7,25								H				0,6165
1,7,35								H	I			0,5304
1,7,30									I	J		0,4657
1,5,30									I	J		0,4246
1,5,35										J		0,3572

Cultivo 7: 7, cultivo 5: 5, control: 1

4.4.1.2. Rendimientos

En la Figura 19 se pueden observar los pesos de pasta de achiote obtenidos después de terminado el tiempo 144 horas en cada tratamiento. Se observa que el cultivo 7 ofrece los mayores rendimientos bajo todas las condiciones de trabajo.

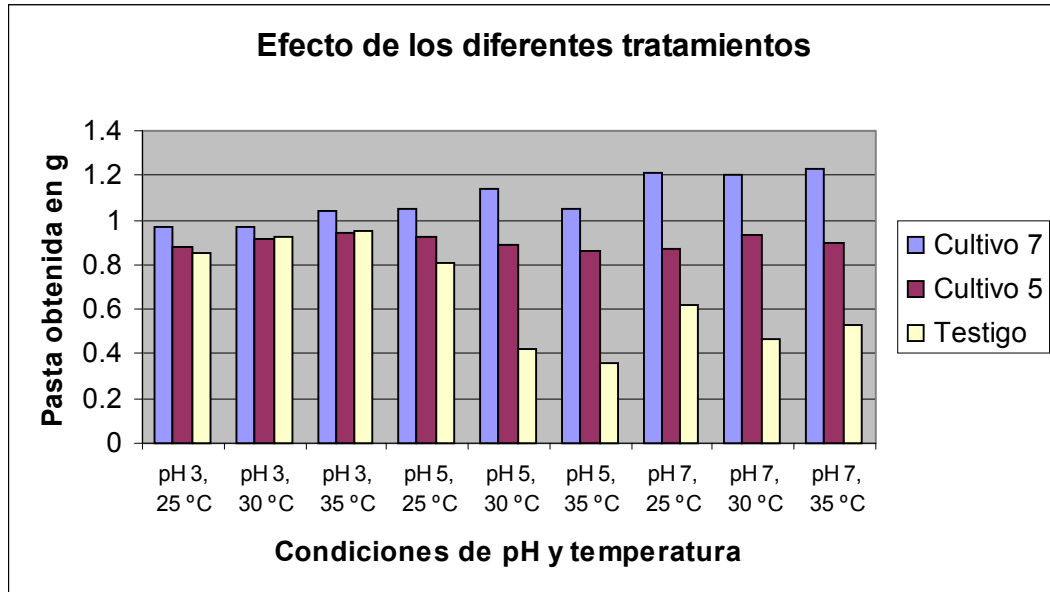


Figura 19. Pesos de pasta colorante obtenida por cada tratamiento.

De la misma manera que en el análisis de varianza, se observa que la combinación que ofrece el mayor rendimiento es cultivo fúngico 7, pH 7 y temperatura 35 °C, presentando 1.2 g. de extracto colorante. Por medio de un ensayo espectrofotométrico se demostró que este extracto contiene 0.022 g de bixina total obtenidos a partir de una muestra de 2 g. de semilla; por lo que se espera que de 100 g de semilla se obtengan 1.13 g de bixina lo que representa el 80.7% de extracción ya que la semilla contiene 1.4 g de bixina por 100 g de semilla como se muestra en los resultados de la etapa uno (Cuadro 5).

En la misma figura es posible apreciar que bajo las mismas condiciones, el cultivo 5 ofrece menores rendimientos que el 7, pero generalmente mayores que el testigo a pH 5 y 7.

El rendimiento obtenido del 80.7% es superior al que se reporta cuando la extracción se lleva a cabo con agua. Esto concuerda con Dendy (1996), quien señala que los pigmentos carotenoides de las semillas de achiote, contienen 45 % de celulosa, por lo que su degradación parcial permitiría incrementar los rendimientos de extracción del colorante con respecto a la extracción en agua.

Por otra parte, se reporta que la extracción con métodos alcalinos ofrece rendimientos superiores al 70% (Pérez, 2003, Vázquez, 2001). De acuerdo con Devia y Saldarriaga (2003), el colorante de la semilla de achiote puede extraerse hasta en un 90% aplicando soluciones de KOH (método alcalino). Los extractos colorantes obtenidos con métodos alcalinos contienen componentes celulolíticos u otros biopolímeros solubilizados durante el proceso de extracción (Campos y Salvá, 1997).

La extracción empleando hongos celulolíticos como el *Aspergillus* ofreció en el presente estudio un rendimiento de hasta un 80 %, valor que es superior a los reportados cuando se aplica la extracción con agua que de acuerdo a Campos y Salvá (1997) es de un 40%. Si bien este valor puede estar por debajo de los reportados por los métodos alcalinos, cabe recalcar que en el método con hongos no se usaron productos químicos de riesgo a la salud humana. En los últimos años el uso de sustancias químicas en los procesos de extracción ha cobrado importancia, ya que la unión Europea está reduciendo cada vez más la Dosis Diaria Admisible de achiote, basándose en estudios toxicológicos (Liceras, 1998), ya que como es sabido, la totalidad del colorante de achiote exportado actualmente, es obtenido por método alcalino.

4.4.2. Caracterización del producto final.

El extracto recuperado no se encuentra constituido solamente por el carotenoide bixina, ya que se pueden encontrar sustancias como restos de fibras, sustancias solubles como azúcares y muy probablemente otras que pueden ser el como resultado del metabolismo del inóculo y/o la flora nativa.

En la Figura 20 se muestra un espectro de infrarrojo (IR) para la pasta colorante recuperada utilizando hongos y uno para una muestra comercial de achiote. En esta figura se puede observar la similitud entre ambas muestras, aunque en algunos casos la muestra comercial presenta unos picos más pronunciados y viceversa.

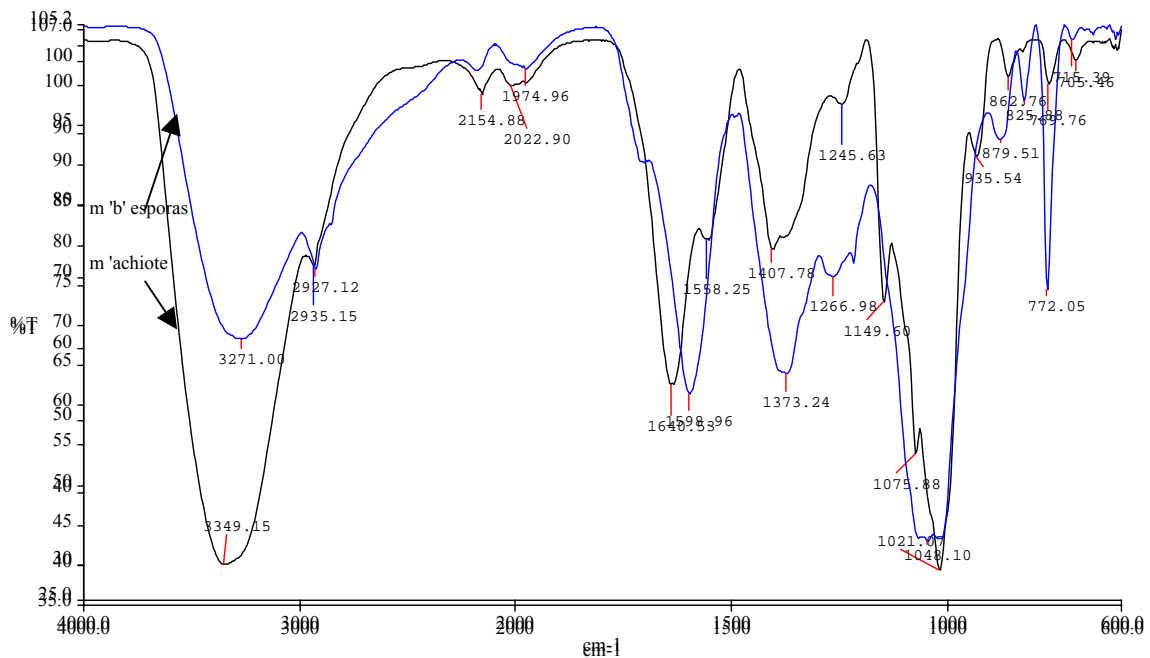


Figura 20. Espectro IR para pasta recuperada y colorante comercial.

Estos espectros muestran un pico sobresaliente cercano a 1600 cm^{-1} , el cual es representativo de los grupos carbonilos,

característicos de la estructura de la bixina. Así como en la muestra obtenida se presenta un pico en el intervalo de los 1700 a 1800 cm^{-1} aproximadamente, que aunque no es muy sobresaliente es característico de los dobles enlaces presentes en las estructuras orgánicas, las cuales son características de la bixina (Figura 4).

Se puede apreciar la presencia de otros picos en los espectros presentados en la Figura 20, esto se debe muy posiblemente a que la muestra con la que se trabajó como comparativo es un condimento comercial, por lo que ácidos como el acético y otras sustancias se pueden manifestar

5. CONCLUSIONES

Se observó que el mayor constituyente de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) es la fibra cruda, a la cual se encuentra adherido el pigmento de interés.

Se concluye que es posible liberar el colorante presente en la semilla de achiote utilizando hongos productores de celulasas.

De los preparados fúngicos evaluados, el que presentó mayor actividad celulolítica, de acuerdo a la técnica del rojo congo, fue el designado como 7, identificado como una especie de *Aspergillus*, lo cual fue posteriormente confirmado al monitorear la formación y consumo de azúcares totales y reductores presentando un comportamiento típico para los hongos de este tipo al excretar la enzima al medio para obtener carbohidratos simples y asimilarlos de una manera constante.

Las condiciones de pH y temperatura influyen en la actividad fúngica lo que se refleja directamente en la liberación del colorante.

Fue posible establecer que las condiciones para el óptimo desarrollo fúngico con su consecuente efectividad en la degradación de la materia en cuestión para facilitar la liberación del pigmento fueron de pH 7, y temperatura de 25 a 35°C el cultivo fúngico 7 identificado como *Aspergillus spp.*

Comparando los procesos llevados a cabo bajo la presencia de los cultivos fúngicos en estudio y el testigo o control (reactor sin inóculo) es posible citar que el tratamiento utilizando la cepa de *Aspergillus* identificada en la preparación 7 es 30% más efectivo que los antes mencionados.

Las condiciones antes citadas ofrecen un rendimiento de extracción de la bixina de hasta un 80%, valor que es superior a los obtenidos con agua. Cabe destacar que este valor, aunque es inferior al reportado por los métodos alcalinos, no contiene los residuos

químicos tóxicos que se presentan en dicha extracción, cuestionados recientemente por la Unión Europea.

6. LITERATURA CITADA

- ARCE**, J. 1983. Aspectos para el achiote y perspectivas para Costa Rica. CATIE. Turrialaba, Costa Rica. 167 p.
- AOAC**. 1980. Official Methods of Análisis of the Association of Official Analytical Chemists. Thirteenth edition. AOAC INTERNATIONAL 353 p.
- BADUI**, D. S. 1993. Química de los alimentos. Addison Wesley Longman de México,. México D. F. pp. 379-402
- BAEZ**, V. M. 2005. Biocatálisis. [Fecha de consulta: 28/04/05 9:28 pm]. Disponible en: <http://www.sistema.itesm.mx/va/topicos/Sinteticos/Analiticos/Ta95129.html>
- BARNETT**, H. L. and Hunter, B. B. 1987. Illustrated general of imperfect fungi. 4th edition. Mc Millan Publishing Company. pp 70-85.
- BÁRZANA**, G. E. 2002. Biocatálisis en medios no acuosos: una historia de 20 años, desde los fundamentos a las aplicaciones industriales. Revista Academia de Ingeniería. IV (2-5)
- BOUVIER**, F., Dogbo, O. and Camara, B. 2003. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). *Science* 300 (27)
- BROCK**, D. T. 1978. Biología de los microorganismos. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp. 703- 707.
- CAMPOS**, G. D. y Salvá, R. B. 1997. Utilización de enzimas en la extracción del colorante a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana* L.). Tesis Lic. Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú

CARRILLO, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad nacional de Salta. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta.pdf>
[Consulta: 15/01/05 5:30 pm].

CHAMIZO, J. P. 2004. Categorías, conceptos y leyes de la bioquímica. Disponible en: <http://jaqua.cfg.sld.cu/bioquimica/leydebioqhtm.htm#Biocatálisis>.
[consultado: 28/05/05 9:48 pm.].

COULTATE, T. P. 1984. Alimentos, química de sus componentes. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 101-109.

DEACON, J. W. 1988. Introducción a la Micología Moderna. Ed. Limusa. México, D. F. pp 120-125.

DENDY, D. 1996. Annato, the pigment of *Bixa orellana*. E. Afr. J. 32(2): 126-132

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

DOF. 2004. Diario Oficial de La Federación. Aviso de cancelación de Normas Oficiales Mexicanas. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/av221004.html> [consultado: 12/05/05 3:35 pm].

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

FAO. 1995. Natural colourants and dyestuffs. Serie No.4: Non-wood forest products. Disponible en: http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/V8879E/V8879e03.htm [consultado 25/02/05 9:20 pm].

FAO/OMS. 1995. Codex Alimentarius. Segunda edición. FAO. pp. 3-10.

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

FURIA, E. T. 1972. Handbook of food additives. Second edition. CRC PRESS. pp. 587-602.

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

GRETTY, K., V. y **Marcel,** G. C. 2003. Biopelículas de *Aspergillus Níger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. nombre de la revista (1): 78-87. Perú.

ILINÁ, A. 2002. Manual de Prácticas del curso crédito 1. Introducción a la Biotecnología U. A. de C. 38 p.

KALSEC. 2005. Achiote. Disponible en: http://www.kalsec.com/es/products/annatto_over.cfm [consultado: 15/01/05 3:40 pm].

LICERAS, L. 1988. Comentarios sobre el Forum: El Achiote: Problemáticas y perspectivas. Revista Agroenfoque 3(20): 35-36.

LYNCH, M. J. R., S. S. Mellor, D. L. Spare, D. P. Inwood, H. M. J. 1987. Métodos de Laboratorio. Vol 2. 2ª ed. Nueva Editorial Interamericana. México, D. F. pp. 1446-1447.

MILLER, G. L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars" Ana. Chem. 31: 426-428.

MULTON, J. L. 2000. Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 343-351

PÉREZ, M. y Becerra, R. 2003. El achiote. Biodiversitas, Boletín bimestral de la CONABIO. 46: 7-11

RAMÍREZ, P. y COHA, J. M. 2003. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Perú Biol. [en línea] 10(1) : 67-77

REYES, M. C. 2003. Libros y revistas. Avance y Perspectiva.[en línea]. Octubre-diciembre. Disponible en:
<http://www.cinvestav.mx/publicaciones/avayper/octdic03/libros.pdf> [consultado: 28/01/05 11:40 am].

RODRÍGUEZ, M. K. 2004. Evaluación del colorante líquido obtenido a partir del fruto de la planta de onoto (bixa orellana) para uso en productos alimenticios. Centro de

Investigaciones Científicas (CITEC). Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Venezuela

RODRÌGUEZ, M. M. C. 2002 Alimentos con color natural. Disponible en: <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2002/10/29/3885.php> [consultado: 08/06/05 5:12 pm].

ROMERO, C. S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, México. 348 p.

ROSALES, de S., G. 1991. El Cultivo de annato en Venezuela. Fonaiap Divulga 36 abril-junio. Disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd36/texto/cultivo.htm> [consultado: 12/05/05 10:12 am].

ROOSEVELT, I. D. 2005. El achiote. Disponible en: http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfiles_productos/A CHIOTE.pdf [consultado: 23/04/05 9:40 pm].

ROZZI, N. L y Sing, R. K. 2002. Supercritical fluid and the food industry. April de 2002. Comprehensive reviews in food science and food safety. Vol. 1.: 33-34

SALAS, G. L. 2003. Educación Alimentaria, manual indispensable en educación para la salud. Ed. Trillas. México, D. F. pp. 97.

SDIC. 2005. Secretaria de Desarrollo Industrial y Comercial. Achiote. Disponible en: <http://oaxaca.gob.mx/sedic/agronegocios/spanish/achiote.html> [consultado: 04/11/04 4:28 pm].

SENSIENT, 2005. Descripción del extracto del innato. Disponible en: http://www.sensient-tech.com/cosmetics_sku_color/annatto_extract_overview.htm
[consultado: 23/02/05 6:10 pm].

SHIBAMOTO, T. y Bjeldanos, L. F. 1996. Introducción a la toxicología de los alimentos. Edt. Acribia. Zaragoza, España. pp. 171-173.

SIRE. 2005. Paquetes tecnológicos: *Bixa orellana* L. Disponible en: http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/pronare/Fichas%20Tecnicas/Bixa%20orellana.pdf [consultado: 18/05/05 12:20 pm]

TAKAHASHI, M. Y., Yabiku H. Y, and Martins. M. S. 1993. Levels of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. Food Additives and Contaminants 10 (4): 85- 98.

TOLEDO de Olivera T. y ROCHA da Costa M. 2004. Propiedades biológicas de los tintes naturales. Ars Farmacéutica., 45 (1): 5-20.

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

VAN SOEST, P. J. y Wine, R. H.1968. Determinación de fibra por el método ácido detergente/ determinación de lignina, celulosa y silicio por el método de permanganato. J. Anal. Chem. 51: 780 p

WONG, W.S., Dominic.1989. Editorial. Química de los alimentos, Mecanismos y teoría.
Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp. 171- 189.

7. ANEXOS

**7.1. Técnica de rojo congo para evaluar actividad celulolítica
(Iliná, 2002)**

Se prepara el medio agar-carboximetilcelulosa (CMC) a un pH 6.0 ± 0.3 conteniendo los siguientes elementos: 0.5 g de carboximetilcelulosa (una forma soluble de la celulosa); 0.1 g de KCl; 0.1 g de NaNO_3 ; 0.1 g de K_2HPO_4 , 0.005 g de MgSO_4 ; 0.005 g de extracto de levadura y 0.1 g de glucosa para cada 100 ml de medio agregando para solidificación un 1.7 g de agar-agar.

Mojar en alcohol un taladro para corcho de 5 mm de diámetro (o un sacabocados). Prenderlo hasta que el alcohol se consuma. Precaución: Mientras que se realiza esta operación, el taladro (o sacabocados) debe sostenerse en posición horizontal, para evitar que la llama atraviese el orificio central del taladro y produzca quemaduras en la mano.

Vaciar 15 ml del medio agar-CMC en cajas Petri y esperar hasta que solidifique. Sujutando la placa con el medio de cultivo, cortar con el sacabocados 4 círculos del mismo. Separar dicho tapón de agar del sacabocados, utilizando una aguja si resulta necesario y volver a paso anterior cada vez antes de hacer agujero.

Identificar cada caja con el número de la cepa, marcar 3 de los orificios de la caja con la letra P (problema) y otro con la letra C. Inocular con pipeta estéril el cultivo microbiano, que con anterioridad fue sembrado en medio de propagación líquido, en cada orificio de círculo de caja marcada como P_x y 0.1 ml de agua estéril en caja marcada como C. Observar el crecimiento (no más de 1 semana) a temperatura ambiente. El crecimiento se observa monitoreando formación de hifas observado por apariencia de zonas de color claro que no deben de extenderse más que 10 mm de diámetro.

Lavar las placas con disolución de rojo Congo (1 mg/ml) durante 15 minutos. A continuación, eliminar el tinte con una dilución de sal (NaCl a 1 M) durante 10-15 minutos. Las zonas que no se hayan teñido indican que el medio de cultivo se ha

hidrolizado en beta-(1-4) glicanos con siete o menos unidades de glucosa por cadena. El diámetro de la zona despejada puede medirse para obtener una comparación cuantitativa de la actividad lítica sobre celulosa.

7.2. Técnica para obtención y conteo de esporas (Iliná, 2002)

El hongo es sembrado en matraces Erlenmeyer con agar Sabouraud (o equivalente disponible), mediante el agregado de una solución de esporas seguido de agitación en forma de 8 ó en su defecto si se proporciona una cepa conservada del hongo, tome una asada e inocule por punción del agar. Estos se incuban por 7 días a 30 °C.

Posteriormente se prepara una suspensión de esporas empleando una solución de elementos traza previamente esterilizada. La recolección de esporas se hace agregando 50 ml de una solución estéril de sales traza ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/L y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg/L) a cada uno de los matraces con cultivo. Estos se colocan en agitación a 250 rpm durante una hora, para lograr el arrastre de las esporas por la solución que se adiciona de manera aséptica a los matraces que contenían el cultivo. Finalmente la solución se filtra a través de lana de vidrio estéril, recuperando el filtrado en un matraz estéril de 100 ml. El número de esporas se determina por conteo en una cámara de Neubauer. La solución se almacena a 4°C.

Para determinar la cantidad de esporas por mililitro de las soluciones extraídas, se utiliza una cámara de Neubauer. El fondo de la cual, está constituido por un portaobjetos que tiene grabados cuadrados microscópicos de dimensiones conocidas; la tapa es un cubreobjetos que se halla separado del portaobjetos marcado mediante unas barras de elevación también conocida.

La distancia entre porta y cubre es de 0.1 mm. Cada zona de la cuadrícula corresponde a un cuadrado de 3 mm de lado, dividido en 9 cuadros grandes, cada uno

de 1 mm^2 . El cuadrado central se divide a su vez en 25 grupos de 16 limitados por líneas triples; cada uno de los 25 cuadros pequeños mide 0.04 mm^2 y cada uno de los 400 cuadros menores tiene 0.05 mm de lado.

Se pone el cubreobjetos sobre la cámara y con ayuda de una micropipeta se coloca una gota de solución de esporas (diluida en 10 veces) hasta que la plataforma de recuento quedó completamente cubierta. El líquido es atraído al interior por capilaridad. La camarilla se lleva a la platina del microscopio y se deja en reposo durante 2 minutos para que las esporas sedimenten y se utiliza el objetivo 10x para asegurarse que éstas se hayan distribuido homogéneamente. Con el seco fuerte (40x) se procede a contar las esporas en ochenta cuadros pequeños; 5 cuadros medianos, uno en el centro y 4 angulares del gran cuadrado central.

Para obtener la cantidad de esporas por mililitro se realizan las siguientes operaciones:

$$\text{Área de cada cuadrado pequeño: } 0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} = 2.5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$$

$$\text{Volumen de los 80 cuadros pequeños: } (2.5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2) \times (0.1 \text{ mm}) \times 80 = 0.02 \text{ mm}^3$$

$$(\text{Total de esporas contadas}) \times (1/\text{dilución}) \times (1/0.02 \text{ mm}^3) = \text{Esporas /mm}^3.$$

$$(\text{Total de esporas contadas}) \times (1/\text{dilución}=1/10) \times (1/0.02) \times 1000 = \text{Esporas / mL}$$

De donde se obtiene la siguiente fórmula:

$$N \times (5 \times 10^5) = \text{Número de esporas por mililitro.}$$

Donde N es igual a las esporas contadas en los 80 cuadros y el factor de dilución utilizado es de 10.

7.3. Técnica para cuantificación de bixina (Vázquez, 2001)

Se disuelven 0.1 g de la muestra en cloroformo y se diluyen con cloroformo en un matraz volumétrico a 100 ml. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro usando una celda de 1 cm entre 500 nm y 404 nm y correr un blanco con el solvente.

El contenido de bixina se determina aplicando la siguiente formula:

$$\% \text{ de color puro (como bixina)} = \frac{[A_{500} + A_{404} - (0.256 \times A_{500})] \times 100}{286.6 \times 1 \times a}$$

Donde:

A = Absorbancia de la solución problema a la longitud de onda indicada.

1 = Longitud de la celda patrón (en cm)

a = Concentración de la muestra (en g/L)

286.6 = Absortibilidad de bixina a 500 nm en cloroformo (coeficiente de extinción molar)

0.256 = Factor relacionado con la absorbancia de bixina en cloroformo a 404 nm y 500 nm