

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA VISIBLE E INFRARROJA DEL COLORANTE DEL ACHIOTE (*Bixa orellana*)

ANNATTO (*Bixa orellana*) COLORING ISOLATION AND
 CHARACTERIZATION BY VISIBLE AND INFRARED SPECTROSCOPY

Elga Narváez V.¹ & Cristina Mena P.¹

Palabras claves: achiote, bixina, colorante, espectroscopia, UV/VIS,
 infrarrojo.

Keywords: achiote, bixin, dye, spectrophotometry, UV-Vis, infrared.

RESUMEN

Los colorantes han sido ampliamente utilizados desde la antigüedad tanto para teñir telas como para colorear alimentos. Debido a las reacciones adversas que se atribuyen a algunos colorantes sintéticos, los consumidores buscan en la actualidad productos que contengan sustancias de origen natural. Por este motivo, en esta investigación se extrajo y caracterizó por espectrofotometría visible e infrarroja el colorante del achiote (*Bixa orellana*) que se produce y comercializa en el Ecuador. La extracción del colorante se realizó, utilizando tres solventes: acetona, hidróxido de potasio acuoso al 2 % y cloroformo, para determinar

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador,
(cemena@puce.edu.ec)

con cuál de ellos se obtiene un mayor porcentaje de rendimiento. Adicionalmente, se compararon los espectros visible e infrarrojo obtenidos con cada solvente con los espectros obtenidos en la literatura. A los resultados de porcentaje de colorante obtenidos, se les realizó un análisis de varianza de dos factores, para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro muestras obtenidas y de igual manera entre los tres solventes utilizados. Los resultados muestran que el mejor solvente para la extracción del colorante es el hidróxido de potasio al 2 % con un promedio de extracción del 9,18 %. En los espectros visibles obtenidos se aprecian dos picos representativos, a longitudes de onda de 471 y a 504 nanómetro, mientras que al analizar los espectros infrarrojos se identifican todos los grupos funcionales propios de la bixina, por lo que se puede concluir que el colorante extraído contiene dicha molécula.

ABSTRACT

Dyes have been widely used for generations to add color to fabrics and food. Due to adverse reactions attributed to some synthetic dyes, consumers now seek products containing substances of natural origin. In this research, the dye from the seeds of "achiote" (*Bixa orellana*), consumed and commercialized in Ecuador, was extracted and characterized. Dye extraction was performed using three solvents: acetone, chloroform and 2% aqueous potassium hydroxide, in order to find out which one is efficient extraction solvent. Visible and infrared spectra obtained from the different solvents were compared with the spectra obtained from literature. The results obtained underwent a two-way analysis of variance to determine if there is a statistical significance between the four samples and the three solvents used. Results show that the best solvent for dye extraction is 2 % potassium hydroxide with an average extraction percentage of 9,18 %. In the visible spectra obtained, at 471 and 504 nanometers, two representative peaks were observed. In the infrared spectra analysis, all the functional groups for bixin were found. Therefore, it can be concluded that the extracted dye contains this molecule.

INTRODUCCIÓN

El achiote (*Bixa orellana*) conocido también como bija, annatto, rocou, onoto, orellana, urucú, es un arbusto que crece en el Caribe y Sudamérica (Villamar, 2011). En el Ecuador se cultiva achiote principalmente en las provincias de Pichincha, Manabí, y Napo (Idrovo, 2006). En las restantes provincias de la Costa y Oriente están se encuentran en estado natural Su fruto es una cápsula como se aprecia en la Figura 1, que contiene

de 30 a 60 semillas, las mismas que están recubiertas por una resina de color que varía entre el rojo y el anaranjado (CNTAF, 2009; FAO, 2006). Dicho colorante se utiliza en la industria de derivados lácteos, cárnicos, grasas, helados, cosméticos, condimentos, cerámica, pintura, tintes, jabones, esmaltes, barnices, lacas, teñido de sedas y en la medicina y la industria farmacéutica (Díaz y Oyola, 2002).



Figura 1 Achiote (*Bixa orellana*) – 1. rama con flor; 2. flor; 3. fruto; 4. Fruto (PROTA Foundation, 2005)

Uno de los principales pigmentos que se encuentran en el pericarpio de las semillas es el carotenoide bixina, de fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$ (Ávila, 1983) y constituye uno de los principales colorantes naturales de gran interés comercial debido a que su uso está exento de certificación y puede ser empleado nacionalmente e internacionalmente en la industria de alimentos, de cosméticos y farmacéutica (FDA, 2013; European Commission, 2014). Químicamente es el éster monometílico del ácido dicarboxílico norbixina, que es otro pigmento importante que se encuentra

en las semillas de achiote, como se observa en la Figura 2.

Los estudios realizados sobre el achiote demuestran gran conocimiento de los aspectos agronómicos de la planta y sobre algunos métodos de extracción del colorante, unos muy rudimentarios, otros más técnicos. Entre los diferentes métodos de extracción del pigmento a escala industrial se encuentran la extracción por solventes orgánicos (cloroformo, dicloroetano, acetona, entre otros) y con soluciones acuosas alcalinas, (Jaramillo y Muñoz, 1992).

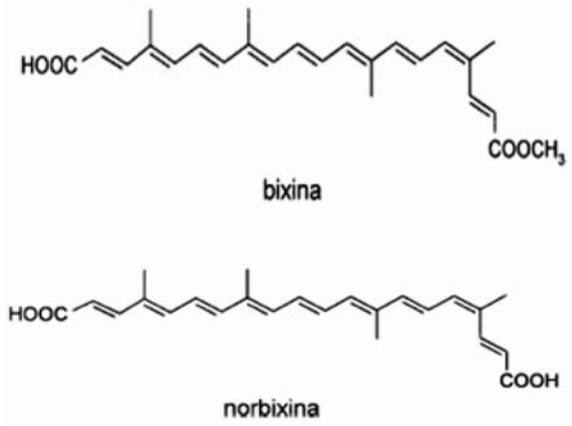


Figura 2 Estructura química de los principales pigmentos de la *Bixa orellana* (FAO/WHO, 2006)

La demanda creciente que ha adquirido el colorante natural del achiote en el mercado agroindustrial, tanto nacional como internacional, ha despertado el interés para desarrollar el cultivo comercialmente, logrando un cupo en la canasta de productos no tradicionales con fines exportables (Revista El Agro, 2013). Teniendo en

cuenta que la mayor parte de la producción ecuatoriana se comercializa en forma de semilla, se vio la necesidad de reportar datos de la extracción del colorante del achiote en polvo, así como también generar información de la caracterización por espectrometría visible e infrarroja de dicho pigmento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción del colorante

Se seleccionaron cuatro muestras, tres obtenidas en la provincia de Pichincha y una en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (Ecuador).

A cada muestra se le realizó la extracción del pigmento utilizando los solventes: acetona, hidróxido de potasio acuoso al 2 % y cloroformo. En un vaso de precipitación de 250 mL se pesaron 10 g de muestra en la balanza analítica Mettler Toledo® AB204, se agregaron 40 mL de solvente y se dejó en reposo durante 3 horas. La solución coloreada se separó y a las semillas se les agregó 10 mL más de solvente y se agitó. Se recolectaron

las soluciones coloreadas en un balón de base redonda de 100 mL previamente pesado y se eliminó el solvente en un rotavapor Yamato® BM-200. Se secó el residuo en la estufa Memmert® UNB 500 a 55 °C, y una vez frío el balón se pesó. Se colocó el colorante seco en un mortero y se molió hasta obtener un polvo fino.

En el caso de la extracción con hidróxido de potasio al 2 %, después de juntar las soluciones coloreadas, se ajustó el pH a 2 con ácido sulfúrico diluido, luego se filtró la solución acidificada en un equipo de filtración al vacío. El residuo obtenido fue secado y molido en mortero al igual que las muestras obtenidas con los otros solventes.

Se realizó el análisis de varianza, más conocido como ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre las muestras y los diferentes solventes utilizados. La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA es que las medias poblacionales son iguales, si las medias son iguales significa que los grupos no difieren entre sí.

Caracterización del colorante **Espectroscopia visible**

Se disolvieron 10 mg del colorante obtenido y se aforó en un balón de 100 mL con cloroformo. Con una pipeta volumétrica se tomó una alícuota de 10 mL de la solución y se aforó con cloroformo en un balón de 50 mL. Se colocó la solución en una

celda de cuarzo y se realizó un barrido entre 350 y 550 nm en el espectrofotómetro visible Thermo Electric® Genesys 10vis.

Espectroscopia Infrarroja

En Espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer® Spectrum BX con ATR Miracle Pike; se colocó una pequeña cantidad de pigmento y se realizaron 10 barridos bajo las siguientes condiciones: resolución de 4 cm^{-1} , en el rango de 4400 a 520 cm^{-1} y a un intervalo de 2 cm^{-1} . Una vez obtenido el respectivo espectro y con ayuda del software Spectrum se realizó la corrección de la línea base, normalización, corrección de la reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) y suavizado automático.

RESULTADOS

Extracción del colorante

En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de colorante sin purificar obtenido en con cada solvente. Se puede observar que tanto con los solventes orgánicos cloroformo y acetona, y con el hidróxido de potasio acuoso al 2% se logran extraer cantidades similares de materia colorante.

El ANOVA de dos factores se realizó para tener una visión clara de la relación entre muestras y solventes; y determinar si existen diferencias significativas entre las muestras y los diferentes solventes utilizados (Tabla 2).

Tabla 1 Promedio de las extracciones del colorante del achiote

Método de extracción	Porcentaje de colorante en materia seca (%)
Acetona	7,6 ± 0,2
Hidróxido de Potasio acuoso al 2 %	9,2 ± 0,7
Cloroformo	8,1 ± 0,4

Tabla 2 ANOVA de dos factores

Origen Variación	Variación	Grados Libertad	F	F crítico	Criterio
Filas (Solventes)	9,98	2	152,26	3,89	H ₀ ⁽¹⁾
Columnas (Muestras)	1,69	3	17,18	3,49	H ₀ ⁽²⁾
Interacción	3,17	6	16,09	3,00	H ₀ ⁽³⁾
Residual	0,39	12			
Total	15,23	23			

Entre los factores básicos (filas y columnas), vemos que H₀⁽³⁾ ha sido rechazada por lo que quiere decir que las interacciones entre solventes y muestras son considerablemente grandes. El F para las filas es 152,26 puesto que el Fcrítico es 3,89 podemos rechazar la hipótesis H₀⁽¹⁾ de que las filas tienen medias iguales. Esto es equivalente a decir que los solventes no son igualmente efectivos. Para 3 y 12 grados de libertad el Fcrítico es 3,49. Por lo tanto el F cal-

culado para las columnas es 17,18 se rechaza la hipótesis H₀⁽²⁾ de que las columnas tengan medias iguales. Lo que significa que existen diferencias significativas entre las muestras.

Espectroscopia visible

El espectro visible de los carotenoides es bastante característico en el rango de 400 a 500 nanómetros. Se observa un máximo alrededor de 450 nanómetros y generalmente se en-

cuentran dos bandas con alta intensidad a cada lado.

En la Figura 3 se muestra el espectro visible de una de las muestras del colorante extraído con los tres solven-

tes, encontrándose semejanzas con el espectro bibliográfico de la bixina, que como en todas las muestras los puntos máximos se encontraron en 471 y 504 nanómetros respectivamente.

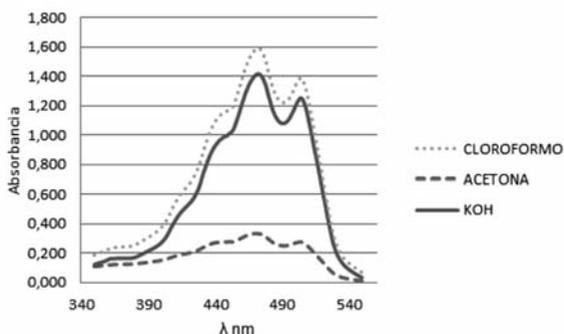


Figura 2. Espectros visibles del colorante del achiote con los diferentes solventes

Tomando en cuenta los datos obtenidos en la extracción, el espectro obtenido usando hidróxido de potasio al 2% confirma una alta concentración de bixina, y entre los dos solventes orgánicos acetona y cloroformo, la absorbancia más alta se obtiene con cloroformo.

Espectroscopia Infrarroja

En la Figura 4 se observa uno de los espectros infrarrojos obtenidos, en este se pueden identificar las bandas en 1700 a 1750 cm^{-1} y en 1160 cm^{-1} correspondientes a los grupos funcionales más representativos de la bixina como son el ácido carboxílico y el éster respectivamente.

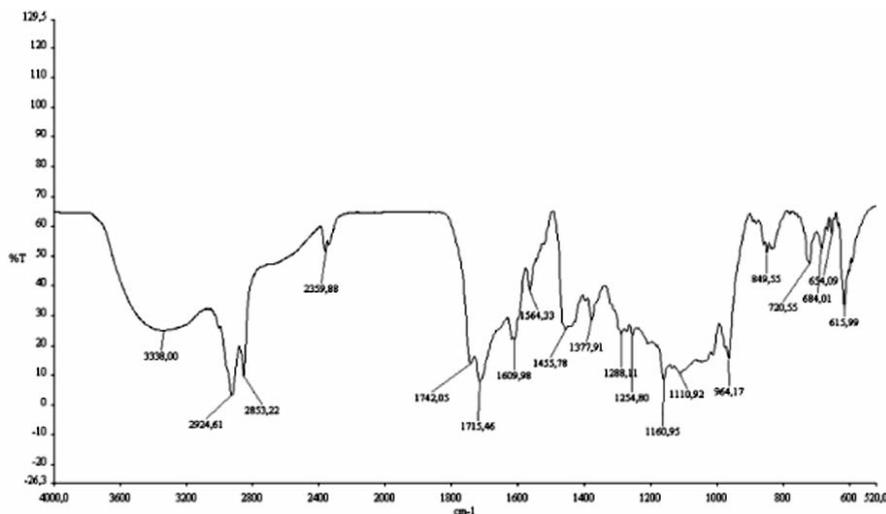


Figura 3 Espectro infrarrojo del colorante del achiote extraído con KOH acuoso al 2 %

DISCUSIÓN

Dependiendo del solvente utilizado para la extracción del colorante se obtiene un producto distinto en cuanto a calidad, al que las industrias le dan diferentes usos. El extracto hidrosoluble, obtenido con solución de hidróxido de potasio, se utiliza en la fabricación de productos con fase acuosa como quesos duros y productos de panadería. El extracto liposoluble, obtenido con solventes orgánicos, se utiliza en productos con alto contenido de grasas como margarinas

y aderezos para ensaladas (Toledo De Oliveira et al., 2004).

Como lo señalan varios autores, el empleo de hidróxido de potasio como solvente cuando se necesita extraer el colorante de la semilla del achiote es el predilecto por algunas empresas extranjeras que se dedican a la comercialización del pigmento en polvo, pues lo catalogan como el solvente más apropiado porque se puede obtener bixina y norbixina en

forma simultánea, ya que cuando la bixina entra en contacto con la solución de álcali forma una molécula de metanol y una sal dipotásica que, por acidificación, produce el ácido dibásico norbixina (Pineda y Saldarriaga, 2003). A este factor se suma además que el empleo de solvente orgánicos aunque dan buenos resultados como se evidencia con el cloroformo y la acetona, presentan inconvenientes por todos los procesos adicionales y los gastos económicos que resultan al tener que recuperar el solvente. Cabe señalar que aunque con el hidróxido de potasio al 2% se obtuvo una mayor variabilidad, esto puede atenuarse al controlar las variables del proceso extractivo.

Al determinar si existen interacciones significativas entre los factores básicos (solventes y muestras) vemos que en todos los casos el F calculado es mayor que el $F_{crítico}$, lo que significa que los solventes no son igualmente efectivos y que existen diferencias significativas entre las muestras.

El espectro UV-VIS muestra que la máxima absorbancia se encuentra en un rango de 450 a 500 nanómetros, lo que se corrobora con lo encontrado en la literatura, que a 480 nanómetros se presenta la mayor absorbancia para el colorante del achiote (Britton et.al, 2004; Jaramillo y Muñoz, 1992). Se aprecian además intensidades diferentes, debido a la presencia de impurezas, puesto que no se realizó un proceso de purificación del colorante.

El espectro infrarrojo obtenido muestra un pico sobresaliente aproximadamente a los 1600 cm^{-1} representativo de grupos carbonilo. Entre 1700 cm^{-1} y 1800 cm^{-1} se presenta una serie de picos consecutivos que, aunque no son muy sobresalientes, son representativos de los dobles enlaces, todos los cuales son característicos de la estructura química de los carotenoides presentes en los pigmentos aislados.

CONCLUSIONES

Para la extracción de colorante, el achiote es una especie vegetal muy versátil, ya que con sólo variar el solvente de extracción se tiene la posibilidad de obtener colorantes solubles en agua (hidrosolubles) o solubles en aceite (liposolubles).

El solvente más apropiado para la extracción del colorante sin purificar

por las ventajas económicas y ecológicas es el hidróxido de potasio acuoso al 2 %.

En los espectros visible e infrarrojo de los productos obtenidos se identificó la presencia de bixina, principal componente del colorante de la semilla del achiote.

LITERATURA CITADA

Avila, A. (1983). Aspectos analíticos del estudio realizado en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), *Seminario aspectos sobre el achiote y perspectivas para Costa Rica*, Centro Agrónomo Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, 29 – 30.

Britton, G. Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. (2004). *Carotenoids Handbook*, Birkhäuser, Basilea, Suiza.

Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, (2009). *Manual Técnico. El cultivo del achiote, Bixa orellana L.* El Salvador. <http://www.cich.org/publicaciones/3/CNTAF-Manual-Tecnico-del-Achiote.pdf>

Díaz, J. y Oyola, J. (2002). *Sondeo del mercado internacional de achiote (Bixa orellana L.)*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humbolt, Bogotá, Colombia.

- El achiote: comestible y adorno para los Tsáchilas (20 de febrero de 2013).
- Revista El Agro, <http://www.revistaelagro.com/2013/02/20/el-achiote-comestible-y-adorno-para-los-tsachilas/>, 10 de agosto de 2015.
- European Commission, (2014). Food Additives Database: Authorization of additives, https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/index.cfm?event=substance.view&identifier=31
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, (2006). Fichas técnicas productos frescos y procesados. Achiote (*Bixa orellana*). http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/ACHIOTE.HTM, enero de 2014
- Idrovo, R. (2006). *El Achiote. Bixa Orellana*, Guayaquil, Ecuador.
- Jaramillo, C. y Muñoz, O. (1992). *Extracción de colorante de Achiote*. (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Pineda, J., y Saldarriaga, L. (2003). Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*), *Revista Universidad EAFIT*, 39, 131, 8 – 22.
- PROTA Foundation, (2005). *Plant Resources of Tropical Africa 3. Dyes and Tannins*. Wageningen, Países Bajos.
- FAO/WHO. (2006). *Annatto Extracts. Chemical and Technical Assesment*, <ftp://ftp.fao.org/esn/jecfa/jecfa61sc.pdf>, julio 2014
- Toledo De Oliveira, T., Nagem, T. J., Rocha Da Costa, M., Marciano Da Costa, L., Magalhaes, N. M., Stringheta, P. C. y Da SilvaVieira, H. (2004). Propiedades biológicas de los tintes naturales, *Ars Pharmaceutica*, 45:1, 5 – 20.
- U.S. Food and Drug Administration, FDA, (2013). *CFR – Code of Federal Regulations Title 21*, U.S.A.
- Villamar, A. (2011, junio). Oportunidades para la exportación de achiote. Boletín de Comercio Exterior, http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2011/07/PROECUADOR_IC_01-06.pdf, agosto 2015