

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL



PRESENTADO POR:

Bach. CUSI CASANCA, Wilber

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA
EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS DE LA SEMILLA DE
ACHIOTE (*Bixa orellana*) POR ULTRASONIDO DE
POTENCIA**

ASESOR:

MSc. Ing. ANCCO VIZCARRA, Thomas

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

ANDAHUAYLAS – APURÍMAC – PERÚ

2022



APROBACIÓN DEL ASESOR



Quien suscribe:

MSc. Ing. Thomas Ancco Vizcarra por la presente:

CERTIFICA,

Que, el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial, WILBER CUSI CASANCA, ha culminado satisfactoriamente el Informe Final del Trabajo de Investigación intitulado: "OPTIMIZACIÓN DE PARAMETROS PARA LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS DE LA SEMILLA DE ACHIOTE (*Bixa orellana*) POR ULTRASONIDO DE POTENCIA". Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

Andahuaylas, 07 de enero del 2022.

.....
MSc. THOMAS ANCCO VIZCARRA
Asesor de Tesis

.....
Br. Wilber Cusi Casanca
Tesista

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, quién supo guiarme por el buen camino dándome las fuerzas para seguir adelante, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres, Julián Cusi Alhuay y Judith Casanca Zamora, por ser un ejemplo para mí, por su apoyo constante. Por haberme educado y soportar mis errores. Gracias a sus consejos, por el amor que siempre me han brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad., les agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindaron para culminar mi carrera profesional.

A mis maestros y jurados evaluadores, Gracias por su tiempo, por su apoyo, por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional, en especial: Msc. Ing. Thomas Ancco Vizcarra por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo, a la Ing. Gina Genoveva Toro Rodríguez, por su apoyo ofrecido en los momentos difíciles en este trabajo.

A la Universidad Nacional José María Arguedas y en especial a la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial, como también a la Facultad de Ingeniería que me dieron la oportunidad de cumplir mi objetivo.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, expresar mi agradecimiento a la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial y la facultad de ingeniería, gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a esta escuela profesional siempre llevo el nombre en alto esta casa de estudios.

Mi agradecimiento a los jurados evaluadores por la labor que desempeñan y por el apoyo moral, intelectual contribuido para tener una buena investigación. Por otro lado, agradecer al Msc.Ing. Thomas Ancco Vizcarra por la dedicación y apoyo que me ha brindado en este trabajo, por el respeto y el rigor que ha facilitado a las mismas.

Asimismo, agradezco a mis compañeros del 2009-1, su apoyo personal y humano, con quienes hemos compartido muchos conocimientos e ilusiones durante estos años. Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas.

Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología de la investigación, mi agradecimiento a la Ing. Gina Genoveva Toro Rodríguez, de la Universidad Nacional De José María Arguedas.

Pero, sobre todo, gracias a mis padres, por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto, por el tiempo que me han concedido, un tiempo robado a la historia familiar. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo. A todos, muchas gracias.

INDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE ANEXOS	x
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CHUMASQA	xiv
INTRODUCCIÓN	15
CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	17
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
1.2.1. Problema general.....	18
1.2.2. Problemas específicos	18
CAPITULO II: ANTECEDENTES	19
CAPITULO III: MARCO TEÓRICO	24
3.1. <i>Achiote (Bixa orellana)</i>	24
3.1.1. Origen.....	24
3.1.2. Distribución en el Perú.....	25
3.1.3. Clasificación taxonómica:	25
3.1.4. Descripción Morfológica	26
3.1.5. Variedades del Achiote:.....	26
3.1.3. Usos de semilla de achiote	30
3.1.4. Propiedades Medicinales de achiote	31
3.1.5. Parte utilizada	31

3.1.6. Principios Activos.....	32
3.1.7. Acción Farmacológica de achiote	32
3.1.8. Características fisicoquímicas del pigmento de la semilla de achiote.....	32
3.2. Bixina	33
3.2.1 Métodos de extracción del contenido de la materia pigmento (bixina).....	34
3.3. Norbixina	35
3.4. Ultrasonido	36
3.5. Fundamentos de las técnicas de extracción de sustancias	39
3.5.1. Extracción solido - liquido.....	40
3.5.1.1. Componentes identificados de extracción solido – liquido	40
3.6. Extracción por métodos tradicionales	41
3.7. Extracción por métodos no tradicionales	44
3.8. ESPECTROFOTOMETRIA	48
3.8.1. Transmitancia y Absorbancia.	52
3.8.2. Ley de Lambert-Beer.....	53
CAPITULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	55
4.1. Lugar de ejecución	55
4.2. Materiales, Equipos y Reactivos.....	55
4.2.1. Materiales.....	55
4.2.2. Equipos	56
4.2.3. Reactivos.....	57
4.2.4. Material vegetal	58
4.3. Población y muestra	58
4.3.1. Universo y/o población	58

4.4. Tipo de investigación	58
4.5. Métodos de análisis	58
4.5.1. Rendimiento de pigmento.....	58
4.5.2. Intensidad de color	58
4.5.3. Evaluación de bixina con cloroformo.....	58
4.6. Metodología por objetivos.....	59
4.7. Metodología experimental.....	64
4.7.1. Metodología de extracción de pigmento de la semilla de achiote.....	64
4.7.2. Descripción de la extracción de pigmento de la semilla de achiote.....	65
4.8. Diseño experimental y Análisis estadístico.....	66
4.8.1. Diseño experimental	66
4.8.2. Análisis Estadístico.....	71
CAPITULO V: RESULTADOS	72
5.1. Resultado de la determinación del rendimiento (%).....	72
5.2. Resultado de determinación del índice de color (IC).....	75
5.3. Resultado de la determinación del contenido de bixina (%).....	78
CAPÍTULO VI: DISCUSION.....	79
CONCLUSIONES	83
RECOMENDACIONES.....	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Subtipos de achiote colorado.</i>	27
Tabla 2. <i>Composición química de la semilla de achiote.</i>	29
Tabla 3. <i>Características Física de la Semilla de Achiote.</i>	29
Tabla 4. <i>Características Nutricionales de las semillas de achiote.</i>	30
Tabla 5. <i>Composición de Pigmento de Achiote.</i>	33
Tabla 6. <i>Diferencia de colores de Longitudes de onda.</i>	51
Tabla 7. <i>Materiales de laboratorio.</i>	55
Tabla 8. <i>Equipos de laboratorio</i>	56
Tabla 9. <i>Reactivos</i>	57
Tabla 10. <i>Material vegetal.</i>	58
Tabla 11. <i>Niveles de las variables independientes.</i>	66
Tabla 12. <i>Codificación de niveles</i>	66
Tabla 13. <i>Matriz del diseño compuesto central rotacional con 3 factores</i>	67
Tabla 14. <i>Factores de estudio para rendimiento.</i>	68
Tabla 15. <i>Factores de estudio para intensidad de color.</i>	69
Tabla 16. <i>Diseño experimental Estadístico del DCCR</i>	70
Tabla 17. <i>Análisis de varianza para rendimiento de extracción de achiote.</i> ...	72
Tabla 18. <i>Análisis de Varianza para Índice de color (IC)</i>	75
Tabla 19. <i>Resultados de contenido de bixina (%)</i>	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Semillas del achiote	31
Figura 2: Estructura química de bixina	34
Figura 3: Estructura química de norbixina.....	36
Figura 4: Equipo soxhlet	42
Figura 5: Equipo de laboratorio para destilación	43
Figura.6. Diagrama de fase del dióxido de carbono.....	45
Figura 7. Equipos experimentales utilizados para la extracción por ultrasonido.....	47
Figura 8. Comportamiento de las burbujas durante la cavitación.....	48
Figura 9. Diagrama de niveles de energía en una molécula	50
Figura 10. Espectro electromagnético.....	50
Figura 11: Componentes espectrofotómetro.....	54
Figura 12. Balance de materia para la obtención de pigmento seco.....	59
Figura 13. Optimización para rendimiento con interacción entre tiempo de residencia en ultrasonido y temperatura en ultrasonido.....	73
Figura 14. Optimización para rendimiento con interacción entre concentración de etanol y temperatura en ultrasonido.....	74
Figura 15. Optimización de índice de color (IC) con interacción entre tiempo de residencia en ultrasonido y temperatura en ultrasonido.....	76
Figura 16. Optimización de índice de color (IC) con interacción entre concentración de etanol y temperatura en ultrasonido.....	77

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.Resultados obtenidos en la extracción de pigmento de achiote para rendimiento.	89
Anexo 2. Resultados obtenidos en la extracción de pigmento de achiote para índice de color (IC).....	90
Anexo 3.Tabla de efectos estimados para RDTO	91
Anexo 4.Coeficiente de regresión para RDTO	91
Anexo 5. Tabla de camino de máximo ascenso para RDTO	92
Anexo 6.Tabla de efectos estimados para IC	92
Anexo 7.Coeficiente de regresión para IC	93
Anexo 8.Tabla de Camino de Máximo Ascenso para IC.....	93
Anexo 9.Norma técnica peruana NTP 209.256.....	94
Anexo 10.Fotografías del extracto de achiote obtenido	100
Anexo 11.Fotografías de soluciones con pigmento para obtención de índice de color (IC)	101
Anexo 12. Matriz de consistencia.....	102

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

NTP	: Norma técnica peruana
US	: Ultrasonido
TRU	: Tiempo de residencia en ultrasonido
TU	: Temperatura en ultrasonido
CE	: Concentración de etanol
IC	: índice de color
DCCR:	Diseño central compuesto rotable

SIMBOLOGÍAS

°C	: Grados Celsius
N°	: Número
°GL	: Grados alcohólicos
ml	: Mililitro
L	: Litro
N	: Normalidad de una sustancia
%	: Porcentaje
g	: Gramos
mg	: Miligramos
kg	: kilogramos
pH	: Potencial de hidrogeno
ppm	: Partes por millón
min	: Minuto
h	: Hora
Hz	: frecuencia

RESUMEN

La investigación se realizó con el objetivo de determinar los valores óptimos para extracción del pigmento de las semillas de achiote (*Bixa orellana*), con ultrasonido de potencia. Se evaluaron, el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) de 5 y 9 min, temperatura en ultrasonido (TU) de 30 °C y 40 °C y concentración de etanol (CE) de 80 y 90 °GL. En el rendimiento del pigmento, intensidad de color y contenido de bixina. El método empleado fue la extracción sólido líquido y el método de cloroformo para el contenido de bixina. Los resultados se analizaron bajo el diseño central compuesto rotatable (DCCR). En donde se encontraron efectos significativos de TRU, TU y CE ($P < 0,05$) para el rendimiento 9.5 % del pigmento. Sin embargo, No se encontraron efectos entre todas las interacciones, mientras que la concentración de etanol si tiene efecto significativo a nivel cuadrático. Por otro lado, se encontraron efectos significativos de TRU, TU y CE ($P < 0,05$). Sin embargo, No se encontraron efectos entre todas las interacciones. Para un índice de color (IC) de 5. 39, los parámetros óptimos son; TRU=10,36 min, TU=41.29 °C y SE=76.59 °GL. Finalmente se obtuvo 20.21 % de contenido de bixina.

Palabras claves: Optimización, extracción, pigmento, parámetros, ultrasonido de potencia.

ABSTRACT

The research was carried out with the objective of determining the optimal values for extraction of the pigment from achiote (*Bixa orellana*) seeds, with power ultrasound. The residence time in ultrasound (TRU) of 5 and 9 min, ultrasound temperature (TU) of 30 ° C and 40 ° C and ethanol concentration (CE) of 80 and 90 ° GL were evaluated. In pigment performance, color intensity and bixin content. The method used was the solid-liquid extraction and the chloroform method for the bixin content. The results were analyzed under the rotatable composite central design (DCCR). where significant effects of TRU, TU and CE ($P < 0.05$) were found for pigment performance. However, no effects were found between all interactions, while the ethanol concentration does have a significant effect at the quadratic level. On the other hand, significant effects of TRU, TU and CE were found ($P < 0.05$). However, no effects were found between all interactions. For a color index (CI) of 5.39, the optimal parameters are; TRU = 10.36 min, TU = 41.29 °C and SE = 76.59 °GL. Finally, 20.21% of the bixin content of the optimum color index (IC) and 18.17% of the bixin content of the optimum performance (%) were obtained respectively. The optimal parameters are; TRU = 10.40 min, TE = 43.40°C and CE = 77.66°GL for a 9.5% yield in the extraction of the pigment from the annatto seed.

Keywords: Optimization, extraction, pigment, parameters, power ultrasound.

CHUMASQA

Kay kuskiykuy ruwakun hatun paktay yachanapaq, imayna urqkun hatun chaninta , achioteпа muqumanta llimpi kasqanta,(*Bixa Orellana*), kay utrasonido nisqanmanta. Inallataq Chaninchakun, unaynin residencia utrasonido nisqanta (TRU) pichqa, isqun unayninta utrasonido rupay kasqanta (TU) kay kimsa chunka °C inllataq tawa chunka °C inallataq etanol kaqninta, (CE) pichqa chunka, isqun chunka °GL. llimpin atikuynin bixina llimpinta llimpintapas Uk ñanta maskakun chay sumaq cloroformo bixina atipasqanta,chay bixina llusqinampaq,inallataq chaninta ruwakun diseño compuesto rotatable (DCCR) chaypi tarikun efecto ancha chaninniyuqta TRU, TU y CE ($P<0.05$) qispinanpaq 9.5 % chay llimpin nisqanta inallataq tarikunchu efecto lliw ruwaykunwan, chay etanolñataq ichaya tarikun efecto nisqanta uk chanin nivel cuadrático,kay law ninmantañataq ,tarikun ancha efecto nisqanta kay TRU, TU y CE ($P<0.05$) inallataq mana tarikunchu efecto lliwnimpi interacciones nisqanpi kay llimpi kananpaq (IC) chay 5.39, chay parámetro óptimos nisqanta tarikun, TRU (10,36 min), TU (41.29)°C y SE =76.59 °GL. tukupanimpiñataq tarikun 20.21 % bixina winasqata.

Kamas Rimay: Optimización, extracción, (urquynin) pigmento, (llimpiy) parámetros ultrasonido de potencia.

INTRODUCCIÓN

El pigmento obtenido de las semillas de achiote (*Bixa orellana*), está compuesto en su mayoría por el carotenoide bixina, como también contiene norbixina. Se utiliza en la industria láctica, cárnica, condimentaria, cosmética, farmacéutica, etc. La bixina es un pigmento exento de certificación que ofrece tonalidades del amarillo al rojo, siendo este último uno de los pigmentos más deseados dentro de la industria de alimentos.

El método empleado en la investigación para la extracción de pigmento de semilla de achiote es la extracción sólido-líquido (semilla- etanol), este es una operación unitaria muy común en la Ingeniería Química. Se ve influenciada por diversos parámetros tales como el tipo de disolvente, la relación sólido-líquido, el tamaño de partícula, entre otros. Es un proceso que involucra fenómenos termodinámicos de transferencia de masa y de equilibrio. En este sentido, la transferencia de masa durante la extracción sólido-líquido se define como la difusión de un sólido en un medio (refinado) en contacto con una solución de volumen finito (extracto).

El uso del ultrasonido de potencia en la extracción del pigmento es muy relevante, por tratarse de una tecnología emergente amigable con el ambiente, mientras que otras técnicas tradicionales emplean solventes tóxicos para acelerar procesos que conllevan tiempo, además de gran consumo de energía, donde la estabilidad de los compuestos puede verse comprometida debido al uso de altas temperaturas o condiciones que disparen su degradación de los pigmentos. Bajo estas afirmaciones la aplicación del ultrasonido de

potencia es una excelente alternativa para extraer pigmentos. Esta técnica de ultrasonido se basa en el efecto de cavitación en el cual causa efectos extremos en fases líquida con la propagación de burbujas favoreciendo el proceso de extracción; es favorable también a bajas condiciones de temperaturas y ocasiona bajos costos, también es posible obtener mayores rendimientos en procesos más cortos. Por lo expuesto, el objetivo de la investigación fue determinar el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) (min), temperatura en ultrasonido (TU) (°C) y concentración de etanol (°GL) para lograr la máxima extracción expresado en rendimiento (%) e intensidad de color (IC) a partir de la semilla de achiote (*Bixa orellana*).

Según la técnica estadística, se tomó la muestra de mejor rendimiento e IC, para determinar el contenido de bixina con el método del cloroformo de acuerdo a NTP 209.256. En la hipótesis de la investigación se presume de que los valores óptimos de rendimiento (%), intensidad de color (IC) y contenido de bixina (%), en la extracción de pigmento de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) por ultrasonido de potencia, se dan a mayor tiempo de residencia en ultrasonido (min), temperatura en ultrasonido (°C) y concentración de etanol (°GL).

CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente los colorantes sintéticos son rechazados se ha comprobado, toxicidad que ocasionan problemas de salud, los estudios según (Fernández, 2015), han identificado una lista de ochenta (80) colorantes, de los cuales nueve (9) colorantes sintéticos no son aceptados y de acuerdo a la FDA sólo ocho son comercialmente viables. Sin embargo, el colorante rojo 2 fue prohibido en Estados Unidos y remplazado por el rojo 40. Estos no fueron aprobados por la mayoría de los países por sus riesgos contra la salud. Motivo por el cual se viene incrementado la tendencia al uso de colorantes naturales en la industria alimentaria.

De los procesos conocidos de extracción de pigmentos, con frecuencia hacen uso de solventes ácido, álcalis, entre otras sustancias tóxicas con la finalidad de remover el material pigmento impregnado en las paredes celulares de las semillas de achiote y para el consumo requiere de un proceso adicional de neutralización o lavados sucesivos, estos procesos son relativamente lentos con rendimiento bajos y son muy amigables con el ambiente además de poner en peligro la salud y el medio ambiente. En los últimos años se viene haciendo uso del ultrasonido en diversos procesos alimentarios, ejemplo de ello es la eliminación de carga microbiana, sanitización de agua por sus bondades y principios que el ultrasonido tiene, en tal sentido es una alternativa para el uso en la extracción de pigmentos al ser una tecnología limpia y amigable con el ambiente, y aprovechando el principio de cavitación de las ondas ultrasónicas pueden generar cambios en la estructura del producto haciendo más fácil la transferencia de materia, esto representa una forma eficaz de mejorar la velocidad de extracción y el rendimiento en los procesos de extracción de pigmento.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Problema general

¿Cuál es el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) (min), temperatura en ultrasonido (TU) (°C) y concentración de etanol (°GL), ¿para la máxima extracción de pigmentos de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) por ultrasonido de potencia?

1.2.2. Problemas específicos

- ❖ ¿Cuál es el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) (min), temperatura en ultrasonido (TU) (°C) y concentración de etanol (°GL) para la máxima extracción expresado en rendimiento de pigmento de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) por ultrasonido de potencia?

- ❖ ¿Cuál es el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) (min), temperatura en ultrasonido (TU)(°C) y concentración de etanol (°GL) que presente mejor color con espectrofotometría del pigmento de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) por ultrasonido de potencia?

- ❖ ¿Cuál es el contenido de bixina del tratamiento que presente mejor color y mayor rendimiento de pigmento de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) por ultrasonido de potencia?

CAPITULO II: ANTECEDENTES

Balarezo (2018), Trabajo en la obtención de bixina empleando tres soluciones extractoras. La metodología tuvo tres etapas: en la primera etapa se determinó el rendimiento de los extractos brutos de pigmentos de las semillas de achiote con etanol de 40°, etanol de 80° y KOH al 2%; en la segunda etapa se determinó el rendimiento de bixina en *Bixa orellana* L. Según las soluciones extractantes utilizadas para cada una de las tres variedades de achiote seleccionadas y en la tercera etapa se determinó la composición físico-química del extracto de achiote. Los resultados indican que de las tres variedades de semillas de achiote investigadas (verde, amarilla y roja), el mayor rendimiento de los extractos brutos de pigmentos fue de 7,8%. Realizada a la variedad verde con hidróxido de potasio al 2%. La mayor concentración de bixina determinada por UHPLC fue de 0,59% p/p como resultado de la interacción de la variedad verde con etanol de 80°. La variedad verde presentó el mayor porcentaje de humedad en sus semillas, con 44,77 % y la mayor cantidad de cenizas presentes en el extracto de achiote fue de 6,54% p/p, resultado de la interacción variedad verde-etanol 40°.

Núñez et al.(2017), obtuvo el colorante bixina, con alcohol a diferentes concentraciones seguido de una extracción enzimática; por otro lado, también una extracción alcali-ácidas a diferentes concentraciones de NaOH, seguido también de una extracción con enzimas. En cuanto a la extracción de colorante de achiote con alcohol, se obtuvo un rendimiento de 89.25 % empleando etanol 40° GL y hemicelulasa como enzima. Además, para la extracción usando NaOH, se determinó su rendimiento en 87.62 % empleando 0.3 % de NaOH. En cuanto a la Asertividad de la luz para la extracción alcohólica enzimática, se pudo determinar la mayor absorbancia con un valor de 0.8647, a una longitud de onda de 465 nm, con 40° GL de etanol, que expresado en concentración de bixina del 27.02

% usando hemicelulasa como enzima. Por otro lado, la Absortividad de la luz en la extracción álcali-acida, con 0.3 % NaOH llevo aniveles de 0.8873 de absorbancia usando como enzima la Pancreatina, a una longitud de onda de 465 nm.

Fernández (2015), adaptó el método de "HANSEN" y fue registrada en la norma técnica peruana (209.256). Basado en la solubilidad del colorante norbixina en medio alcalino que fue terminado por espectrofotometría a longitud de onda 452.5 nm. Los parámetros óptimos fueron Dilución, D3 = 1:1 (semilla: solución de NaOH); Concentración de la solución (NaOH), C1 = 3% m/v; Temperatura de extracción, T2 = 70°C; con agitación constante.

Muñoz (2015), estudio el efecto del ultrasonido (US) de potencia sobre la despolimerización de taninos de semillas de uva *Vitis vinifera* y sobre sus propiedades antioxidantes, se realizaron ensayos con US a 45 y 20 kHz de frecuencia y se observó en general un incremento en la actividad antioxidante que varió en función de la concentración y del sistema empleado. Así mismo, se detectó un aumento en las áreas de los polímeros de procianidinas respecto a los controles sin tratar indicando una posible desagregación de los complejos que forman con otras moléculas lo cual pudo contribuir al incremento en la actividad antioxidante.

Posada *et al.* (2015), trabajó con cúrcuma molida sometida a extracción asistida por ultrasonido utilizando etanol y una mezcla de etanol: agua. También fueron evaluados el tiempo de extracción (10 y 30 min), la temperatura (30 y 60°C) y la aplicación de ultrasonido (si y no) mediante un diseño factorial fraccionado (1/2) sin repetición. Fueron obtenidos rendimientos entre 6.49% y 28.61%. Los resultados indican que cuando la muestra es sometida a ultrasonido, una temperatura de 60°C, un tiempo de extracción de 30 min y utilizando como solvente una mezcla de etanol: agua 50:50 (v/v) es obtenido el mejor rendimiento correspondiente al 28.61%.

Reyes (2015), realizó la extracción del colorante de achiote utilizando como solventes: agua, solución acuosa de KOH al 1, 2 y 3 por ciento, a escala laboratorio. Para determinar el solvente que producía mayor rendimiento de extracción. Utilizó como solvente el que brindó mayor porcentaje de bixina extraído. Se aplicó el colorante natural de achiote extraído, a muestras de yogurt natural y el colorante de tartracina a otras muestras. Se confirmó que la bixina es el principio activo del colorante de achiote, responsable de su color característico. El agua fue el solvente que proporcionó mayor porcentaje de extracción de bixina. Finalmente, se logró establecer que el consumidor percibe una diferencia significativa entre el color, al utilizar el colorante natural de achiote y el colorante amarillo en un yogurt, con un 95 por ciento de confiabilidad.

García *et al.* (2008), investigó la influencia de la temperatura (50 y 60 °C), la relación disolvente-semillas (3:1 y 5:1), la agitación (100 y 300 rev/min) y la concentración de hidróxido de sodio (0,5 y 1,0 N) en la extracción de colorante de bija. La extracción se favoreció con el aumento de la temperatura y la disminución de la concentración de sosa. La agitación prácticamente no causó efectos en los niveles de extracción. Las relaciones disolvente-semillas ensayadas no tuvieron incidencia en la cantidad de pigmentos extraídos.

Vázquez (2005), plantea una alternativa para mejorar los métodos de extracción del colorante de la semilla de achiote sin la necesidad de recurrir al empleo de materiales tóxicos. El cual consiste en romper las cadenas de celulosa que forman gran parte del material en donde se encuentra adherido el colorante y de esta manera hacerlo más disponible para ser recuperado por el método tradicional. Para lograr esto se empleó una enzima celulosa comercial, la cual, actúa sobre la celulosa de la capa de la semilla de achiote, degradándola a azúcares más simples. Para determinar la concentración de enzima con la que era más factible obtener mejores resultados de recuperación de pigmento, se estudió la actividad

de cuatro diferentes concentraciones de enzima (0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001%, relación (p/p) los cuales actuaron sobre un gramo de semilla. Para determinar el tiempo en el que existe una mayor actividad enzimática sobre la semilla se monitoreo un rango de tiempo de (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas).

Casanova D.et (2005), Trabajó una investigación de procesos biotecnológicos como la extracción mediante biocatalizadores (enzimas) de pigmentos en este caso la bixina, principal colorante de las semillas de achiote (*Bixa orellana* L.) como propuesta en el reemplazo de la tartrazina la cual se utiliza en la industria alimenticia y se encuentra catalogada como cancerígena a concentraciones altas. Las enzimas comerciales α -amilasa, celulasa y pectinasa, empleadas en la extracción de bixina de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L.) beneficiaron la obtención de este colorante al mostrar rendimientos mayores a la extracción realizada con agua reportada en la literatura. En el rango de operación evaluado para cada enzima, la que presentó mejores resultados en las variables de respuesta (concentración de bixina: 16 % y porcentaje de rendimiento: 8,93 %) fue la α -amilasa. La extracción enzimática no desnaturaliza la bixina obtenida en el colorante, ni por aumento de la temperatura o concentración de la enzima, ya que los análisis realizados así lo demuestran (IR, espectro de masas y UV-visible).

Gallegos (2005), realizó la extracción 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. 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%.

Devia Pineda & Saldarriaga Calderón, (2003) trabajo por medio de un diseño de experimentos, se seleccionaron los parámetros necesarios para el diseño de una planta piloto para obtener el colorante, a saber, tipo de solvente, relación cantidad de semilla / volumen de solvente, pH y tiempo de agitación. Con estos parámetros se diseña una planta piloto para la cual se seleccionan los equipos necesarios que se organizan según el correspondiente diagrama de flujo, luego de un proceso se obtuvo un rendimiento cercano al 8%, se logra cuando se trabaja con una relación de cantidad de semilla a volumen de solvente de 1:3, una concentración del solvente de 2% de KOH y un tiempo de agitación, a 140 rpm, de 45 minutos.

Salvá, B. (1997) Utilizo enzimas en la extracción de colorante a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana* L.). Al utilizar el complejo enzimático extrazyme se aumenta el rendimiento de extracción de norbixina en 13 % y de bixina en 11 %, respecto a la extracción acuosa. En cuanto a la extracción alcalina, los rendimientos de extracción son menores, pero en cuanto a la pureza del annato es mayor, 5 % y 10 % más en bixina y norbixina, respectivamente. "Es posible aumentar la pureza del annato obtenido por extracción alcalina, realizando una hidrólisis previa del extracto con células.

CAPITULO III: MARCO TEÓRICO

3.1. Achiote (*Bixa orellana*)

Es una planta arbustiva de la familia Bixaceae. Es una planta cultivada, perenne, que mide entre 3 y 10 metros de altura. Sus hojas son simples, grandes, de forma acorazonada y dispuesta de manera alterna, de bordes lisos y con largos pecíolos. El fruto es una cápsula ovoide u ovoide-globosa, pardo-rojiza, que mide de 2 a 5 centímetros de diámetro, puede tener espínulas sedosas (escasas o abundantes) o carecer de ellas. Puede ser de color naranja, verde, amarillo, rojo o poseer diferentes tonalidades entre éstos. En su interior se encuentran de 10 a 50 semillas rojas, casi triangulares y pequeñas, rodeadas con los arbustos de achiote comienzan su producción comercial entre los 3 y 4 años de edad. La cosecha se realiza de manera manual, cortando los frutos para luego extraer la semilla. Regularmente las semillas se secan al sol durante 3 a 4 días o en secadores industriales antes de ser envasadas para su venta. El color rojo del achiote o annatto se debe a varios compuestos carotenoides, principalmente apocarotenos, que se encuentran en la semilla (Pérez y Becerra, 2003).

3.1.1. Origen

El achiote es cultivado en épocas precolombinas desde Brasil y Bolivia hasta México. El nombre popular, "achiote", es el más conocido en el comercio mundial y procedería de la palabra nahuatl "axiotl". Este vegetal sería nativo, según algunos autores, de una región del alto Amazonas en el Brasil, aunque otros lo dicen que es originario de una zona comprendida entre el centro de México y Panamá (Vilma, 2014).

3.1.2. Distribución en el Perú

El Perú ofrece condiciones ecológicas óptimas para su cultivo en la costa, valles interandinos y en la selva. En la costa: en huertos familiares desde Tumbes hasta Moquegua. En la Ceja de Selva: Tingo María, Sapito, Apurímac, Cusco, Pasco y Cajamarca, también en huertos pequeños incluso en Selva Baja. A nivel mundial se cultiva en Kenia, India, Ecuador, Brasil, República Dominicana, Colombia, Bolivia, Belice, Costa de Marfil, Costa Rica, Guatemala, Guyana, Haití, Jamaica, México, Sri Lanka, Surinam, Angola, Nigeria, Tanzania, Filipinas, Hawái (Vilma, 2014)

3.1.3. Clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Embriofita

Subdivisión: Diploidalia

Sección: Espermatofita

Subsección: Angiosperma

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Arquiclamídea

Orden: Violales (parietales)

Familia: Bixaceae

Género: *Bixa*

Especie: *Bixa orellana*

Fuente: (Pérez y becerra, 2003)

3.1.4. Descripción Morfológica

Achiote es un árbol de 2-10 m de altura, con copa piramidal, redondeada o irregular y ramificación dicotómica. La corteza del tallo es lisa o poco fisurada, de color pardo-rojizo, pardo-oscuro, pardo-verdoso o pardo-grisáceo, con pocas o muchas lenticelas de color pardo claro o amarillento. Las hojas son simples, dorsiventrales, alternas, de textura cartácea, forma deltoide, cordiforme o lanceolada, lámina simétrica o asimétrica y pubescentes. Las flores se producen en panículas terminales de 10-25 cm de longitud, con 5-60 primordios florales. Los pétalos son imbricados y su color varía de blanco a rosado intenso; los sépalos son cóncavos, de color pardo-rojizo o pardo-verdoso, con 5 glándulas basales persistentes aún en el fruto maduro (Vilma, 2014)

La época de floración y madurez del achiote varía según la latitud y según la temperatura de la zona, siendo más temprana en las regiones cálidas y húmedas. La floración dura entre 3 y 4 meses, y no es sincronizada (Pérez y Becerra, 2003).

3.1.5. Variedades del Achiote:

Existen tres variedades de achiote según (Vilma,2014) siendo estas las siguientes:

3.1. 5.1. Achiote colorado

Plantas de flores blancas y semillas de color oscuro o bermellón. Mayor rendimiento, alto contenido de colorante; cápsulas indehiscentes, uniformidad en la maduración, mayor rusticidad y rápido crecimiento. En el siguiente cuadro se presentan algunos subtipos encontrados en los valles de la Convención y Lares en el Cusco (Vilma, 2014)

Tabla 1

Subtipos de achiote colorado.

Subtipo	Forma de capsula	Color	Otros
Supu (chupo)	Punta de lanza	Rojo	Indehiscente
Punta de lanza pamuco	Punta de lanza	Rojo	Indehiscente 2 cosechas al año
Pumko (puerta)	Rojo	Indehiscente
Qara (desnudo)	Ovoide	Rojo	Indehiscente
Pilosa	Ovoide	Rojo	Indehiscente
punta de lanza típica	Grande puntiaguda	Rojo	Indehiscente de mayor producción

Fuente: Pérez y becerra, (2003).

3.1.5.2. Achiote amarillo

Planta de flores rosadas, semillas de color rojo claro amarillento. presentan menor rendimiento, son dehiscentes, poseen buen contenido de colorante, pero posee menor rusticidad.

3.1.5.3. Achiote negro o morado

El tallo, hojas y frutos son de color más oscuro que los anteriores, además de contener bajo porcentaje de materia colorante. Es necesario mencionar que por ejemplo en la estación experimental del Tulumayo en Tingo María, se tiene una colección de 23 agro tipos de los cuales 15 son de Perú y 8 de Costa Rica, (Vilma, 2014).

3.1.2. Características Físico-químicas principales de la semilla de achiote

Las semillas de Achiote están principalmente constituidas por bixina representando un 80% de los pigmentos presentes, lo cual, facilita su extracción; los componentes principales de la semilla del achiote son: Bixina (materia colorante roja) (80%); Resina; orellana (materia colorante amarilla); aceite volátil y aceite graso (Córdoba, 1987).

La Humedad oscila entre 8 -13 %, Proteína 13 -1.24 %; Celulosa 13.8 %; Fibra Cruda 18.48 %; Almidones 11.45 %; Carbohidratos totales 39.91 %; Ceniza 4.50 – 7.97 %; Energía 54 kcal (Mosquera ,1989).

En otra investigación en semillas de achiote se encontraron los siguientes resultados 40% - 45% de celulosa; 3.5% - 5.5% sacarosa; 0.3% - 0.9% aceite esencial;

3% aceite fijo; 4.5% - 5.5% pigmentos y de 13% - 16% proteína. (%)
1.1.4 (Jaramillo, 1992).

Asimismo, las características químicas que presenta el achiote es posible observar en la Tabla 2 y las características físicas del grano en la Tabla 3, y las características nutricionales de las semillas de achiote en Tabla 4.

Tabla 2

Composición química de la semilla de achiote.

Análisis	Base húmeda	Base seca
Humedad	9.30%
Proteína	16.15%	17.80%
Ceniza	5.05%	5.56%
Grasa	3.39%	3.73%
Carbohidratos	66.11%	72.82%
Fibra cruda	9.19%	101.13%
Calcio	0.39%	0.42%
Fosforo	0.43%	0.47%
Hierro	104.97 ppm	11.73 ppm
Potasio	1.42%	1.56%
Zinc	76.07 ppm	83.37 ppm
Magnesio	0.33%	0.36%

Fuente: Laboratorio de química agrícola CENTA.

Tabla 3

Características Física de la Semilla de Achiote.

Apariencia :	Grano pequeño de forma triangular - ovoide y pulposa
Color :	Anaranjado rojizo
Longitud :	Semillas de achiote de 3.5 a 5 mm de longitud
Impureza :	Ninguna impureza

Fuente: Laboratorio de química agrícola CENTA.

Tabla 4

Características Nutricionales de las semillas de achiote

COMPOSICIÓN (mg/100g)	
Calcio	7
Fosforo	10
Hierro	1.4
Vitamina A	45
Niacina	0.2
Riboflavina	1.46
Tiamina	0.39
Ácido ascórbico	12.5

Fuente: Laboratorio de química agrícola CENTA.

3.1.3. Usos de semilla de achiote

Según Zotyén (2002), los usos de la semilla son:

- a) **Cosmético:** El aceite de las semillas es emoliente y su contenido alto en carotenoides provee propiedades antioxidantes. Se utiliza en productos para el cuidado del cuerpo como son: Cremas, lociones y champú.
- b) **Repelentes:** Algunos indígenas en América del Sur usan el achiote, corteza y fruto (cáscara) adicionándole grasa para frotarse la piel y defenderse del piquete de los mosquitos. La mancha que deja es muy intensa.
- c) **Medicinal:** Posee propiedades y acciones: astringente, antiséptico, emoliente, antibacterial, antioxidante, expectorante, cicatrizante, febrífugo y anti disentérico. La utilización de la semilla y el fruto se consideran un antídoto eficaz contra envenenamiento.

3.1.4. Propiedades Medicinales de achiote

Se le atribuyen diferentes propiedades terapéuticas: astringente, antiséptico, emoliente, antibacterial, antioxidante, expectorante, cicatrizante, febrífugo, estomáquico y anti disentérico, diurético y antigonorreico, purgante, desinflamatorio e hipoglucemiante.

La semilla molida es utilizada para tratar sarampión, viruela, afecciones estomacales, enfermedades del riñón, disentería y febrífugo, astringente y ligero purgante. Los frutos y semillas en infusión controlan el dolor de cabeza. También tiene propiedades cicatrizantes (Benítez, 2008).

3.1.5. Parte utilizada

La semilla posee forma poliédrica, generalmente piramidales que se encuentran cubiertas por una membrana (arilo) pulposa, pegajosa, resinosa de color rojo o anaranjado (Figura 1).



Figura 1. Semillas del achiote

Fuente: Pérez y Becerra, (2003).

3.1.6. Principios Activos

Las semillas de achiote enteras contiene, además: 17.5% de Lípidos; 10.6% de Aminoácidos. De esta última, la semilla aporta 6 de los 8 aminoácidos esenciales contemplados en el patrón ideal de la OMS. Es una fuente rica de hierro y zinc (Mosquera, 1989).

3.1.7. Acción Farmacológica de achiote

- ❖ **Semillas:** En estudios en animales, los extractos de la semilla han mostrado actividad diurética e hipoglucemiante, así como su capacidad de disminuir la actividad motora
- ❖ **Cicatrizante:** La vitamina A, se usa en el tratamiento de lesiones dérmicas, favoreciendo la curación de heridas.
- ❖ **Antibacteriana:** El extracto etanólico de la hoja demuestra actividad antibacteriana sobre *Salmonella typhi* y *S. flexneri* (Jaramillo, 1992)

3.1.8. Características fisicoquímicas del pigmento de la semilla de achiote

Las principales características fisicoquímicas del pigmento de la semilla de achiote son: Resina o Orellina (materia colorante amarilla). o Bixina (materia colorante roja) (80%). o Aceite volátil y aceite graso (Córdoba, 1987) Asimismo en la siguiente Tabla 5 se observa la composición de pigmento de achiote.

Tabla 5

Composición de Pigmento de Achiote.

COMPOSICIÓN (mg/100g)	
Proteínas	12.3 - 13.2
Pectina	23
Carbohidratos	39.91 - 47.90
Ceniza	5.44 - 6.92
Taninos	33 – 91
Pentosas	11.35 -14.97
Carotenoides	1.21 - 2. 30
B -carotenoides	6.8 -11.30

Fuente: Devia (2003).

3.2. Bixina

La bixina es una sustancia cristalina de color rojo oscuro, soluble en alcohol, aceites y grasas e insoluble en agua. También se encuentran pequeñas cantidades de isobixina y norbixina; esta última, de color amarillo y soluble en agua e insoluble en grasas, también es un colorante con valor comercial (Pérez y becerra, 2003).

El principal constituyente colorante de la semilla del achiote es la bixina, que se encuentra en la cubierta exterior de la semilla del fruto, representa más del 80% de los pigmentos presentes, lo cual facilita su extracción, los componentes principales de la semilla de achiote son: Resina, orellana (Materia colorante amarilla), Bixina (Materia colorante roja) (80%), aceite volátil y aceite graso (Benítez, 2008).

Es la parte de la semilla de achiote que presenta coloración, la cual es un carotenoide de color anaranjado, cuya fórmula es: cis-bixina (9-cis-6,6-diapocaroteno-6,6 dioato), detalles de estructura química de bixina en la figura 2(Santos Fredy, 2019).

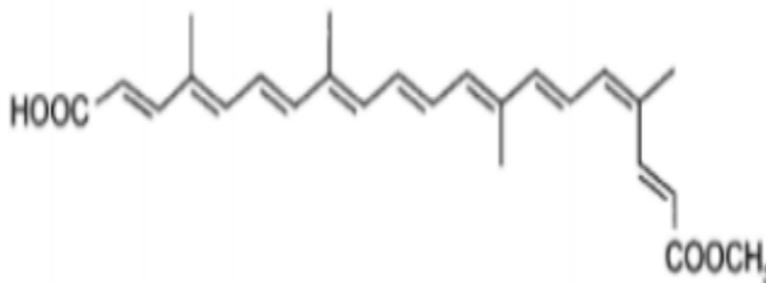


Figura 2: Estructura química de bixina

Fuente :(Santos Fredy, 2019).

3.2.1 Métodos de extracción del contenido de la materia pigmento (bixina)

Avila y Remond (1986), exponen cuatro métodos de extracción de la materia pigmento del achiote, los cuales son:

- a) Lixiviación con agua potable
- b) Lixiviación con hidróxido de sodio-diluido
- c) Lixiviación con aceites comestibles
- d) Extracción con solventes volátiles

Los mismos autores recomiendan el método de lixiviación con soda cáustica y las razones que motivan esta decisión son:

- a) El bajo costo del solvente, y su uso en soluciones diluidas.
- b) El rendimiento elevado en la extracción del colorante y la obtención de un producto de óptima calidad.

También existen dos métodos principales para extraer bixina del extracto de achiote se detalla a la seguida:

a) Método de L. Zechmeister

Consiste en separar la bixina de todo el material pigmento en forma de sal amónica teniendo en cuenta su solubilidad en alcohol. De allí, cristaliza la sal amónica por concentración de la solución de cuyos cristales se libera la bixina por tratamiento con ácido acético concentrado.

b) Método de Morez-Smith

Parte de las semillas de achiote extrae la materia pigmento (tricloro etileno- etanol) y se separa la bixina.

Para determinar el contenido de la materia pigmento, Avila y Remond (1986) recomiendan el método estándar que consiste en preparar un extracto de cloroformo conteniendo de 20 a 100 gramos de semilla por litro de cloroformo. Estos extractos deben ser preparados a temperatura ambiente; de la solución se separa una alícuota de 1 ml para ser diluida a 100 ml con cloroformo y la absorbancia es medida en un espectrofotómetro a 453 nm.

3.3. Norbixina

La Norbixina es un ácido carboxílico que, al agregarle un álcali acuoso, forma sales del álcali solubles en agua, lo cual hace posible extraer fácilmente el colorante. Las semillas se lavan con esta solución, el extracto y el lavado se acumulan y la solución roja oscura se neutraliza con un exceso de ácido mineral, el cual precipita el pigmento. Luego se filtra, se lava y el líquido sobrante se separa hasta obtener la masa colorante para secar (Mosquera, 1989).

Es uno de los principios activos de la semilla es la bixina sometiéndolo a la solución acuosa de NaOH se convierte en norbixina, la cual es de color rojo, detalle de estructura química de la norbixina en la figura 3 (Santos Fredy, 2019).

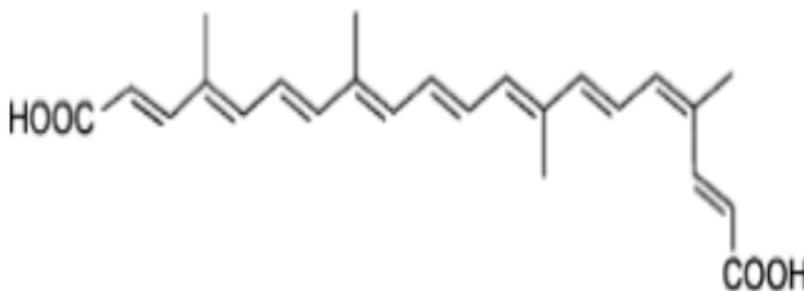


Figura 3: Estructura química de norbixina

Fuente :(Santos Fredy, 2019).

3.4. Ultrasonido

Son ondas acústicas de frecuencia superior al límite de audición humano. Los ultrasonidos de potencia, son concretamente, aquellos cuya frecuencia oscila entre los 20 y los 100 kHz (Chemat y Khan, 2011).

3.4.1. Ultrasonido de potencia (18-100 kHz)

El ultrasonido de potencia se considera una tecnología prometedora para la industria de procesamiento de alimentos. Son señales de alta intensidad que se utilizan para modificar un proceso o un producto (Mulet et al., 1999). Con una frecuencia más baja y mayor potencia producen cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido.

Esto ocurre asimétricamente cerca de las interfases y golpes sobre la superficie sólida. Se requiere de un medio líquido, un generador de energía y un transductor, el cual convierte energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica (Mulet et al., 2003).

Actualmente, existen tres diferentes tipos de transductores:

- a) **Transductores de manejo de líquidos:** producen una onda acústica cuando la energía cinética del líquido hace que una parte móvil del sistema vibre. Ejemplos de estos son las sirenas y pitos (Mulet et al., 2003). Son equipos muy durables especialmente importantes para procesos de homogeneización y mezclado (Masón, 1999).
- b) **Transductores magnéticos:** Se basan en el cambio de dimensión de un material debido a la aplicación de un flujo magnético (Mulet et al., 2003). Son muy poderosos, pero su eficiencia eléctrica es menor al 60%. Considerados para aplicaciones de uso muy pesado (Masón, 1999).
- c) **Transductores piezoeléctricos:** La piezoelectricidad es la habilidad de los cristales para generar un voltaje en respuesta a un estrés mecánico aplicado (Mulet et al., 2003). Estos transductores producen energía acústica por medio de cambio en el tamaño, debido a señales eléctricas en materiales piezocerámicos. Ejemplos de estos equipos son los baños ultrasónicos utilizados en equipos experimentales (Mulet et al., 2003). Son los equipos más ampliamente utilizados; usan cargas con distintas polaridades hacia las cuales el material responde por contracción o expansión. Altamente eficientes (>95%), pueden utilizarse en un amplio rango de frecuencias (Masón, 1999).

Según Masón (1999), ha sido bien reconocido por muchos años que esta técnica tiene gran potencial para su uso en una gran variedad de procesos, aunque no han sido ampliamente explotados hasta la fecha. Algunos posibles usos del ultrasonido de potencia se citan a continuación:

- a) Limpieza y desinfección: por remoción de contaminación biológica debido al colapso cavitacional cerca de la superficie. Alcanza puntos que son difícilmente cubiertos por métodos convencionales de limpieza.
- b) Mezclado y emulsificación: se generan bases emulsificadas para sopas y salsas, que al pasar por el homogeneizador ultrasónico tienen una textura suave y mejor sabor (Masón, 1999).
- c) Impregnación: la impregnación de pigmentos en cuero se ve sustancialmente incrementada por el uso del ultrasonido durante el proceso (Masón, 1999).
- d) Filtración: la aplicación de ultrasonido permite al sistema operar más eficientemente y por períodos más largos, sin necesidad de mantenimiento, limpieza y cambios de filtros (Masón, 1999).
- e) Cristalización y precipitación: Price, en 1997, comprobó que el ultrasonido puede iniciar la cristalización y controlar el crecimiento de los cristales en medio saturados o enfriados, produciendo cristales uniformes (Masón, 1999).
- f) Congelación: mejora el coeficiente de transferencia de calor y ha sido utilizado para acelerar procesos de congelación por inmersión de papas (Mulet et al., 2003).

- g) Deshidratación: mejora los procesos de secado en arroz, zanahorias, cebolla, y deshidratación osmótica de manzana (Mulet et al., 2003).
- h) Extracción: las técnicas clásicas de extracción de solventes a partir de material vegetal se basan en la correcta elección del solvente y condiciones como temperatura y agitación. Vinatoru et al., (1997), demostró que la extracción por solvente de compuestos orgánicos en materiales vegetales es significativamente más eficiente utilizando el ultrasonido de potencia (Masón, 1999).

Según Masón (1999), aumenta la eficiencia de desinfectantes como el cloro para la descontaminación del agua. En 1997, Tiehm estudió el efecto del ultrasonido en el tratamiento de aguas y encontró que el proceso anaeróbico de digestión se aceleró considerablemente al reducir el tiempo de 20 a 8 días, y aumentar la producción de biogás 2,2 veces más que en un fermentador control (Masón, 1999).

3.5. Fundamentos de las técnicas de extracción de sustancias

Para obtener un extracto, primero que todo es importante identificar la hierba deseada y la parte que contiene los constituyentes útiles. Adicionalmente, la determinación de una técnica precisa de cosecha y métodos de preservación de la planta por utilizar es de crucial importancia. El mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto (Dolphqwrv et al., 2007)

3.5.1. Extracción solido- liquido

Es una operación unitaria de separación de los componentes solubles presentes en una fase o matriz sólida utilizando como agente de separación un solvente líquido específico, que actúa bajo ciertas condiciones en los equipos denominados lixivadores. (Arias, 2011).

La lixiviación es extracción sólido-líquido; sin embargo, existen algunas denominaciones alternativas que califican a la lixiviación, que en esencia representan a la misma operación, pero que por sus usos y costumbres han adquirido calificaciones particulares, como son: Infusión, percolación, elución, decocción, remojado, macerado, lavado. (Arias, 2011).

3.5.1.1. Componentes identificados de extracción solido-liquido

Los componentes representativos son:

A: Sólidos solubles.

I: Insolubles que algunos denominan inertes
(Con respecto al proceso extractivo).

D: Solvente líquido (opcional, de acuerdo al solvente utilizado).

En la lixiviación, el solvente actúa sobre el grupo de los sólidos solubles, solubilizándolos y provocando su extracción. Los componentes de la matriz sólida (A, I y en ocasiones D) se encuentran distribuidos e interconectados bajo una estructura compleja.

Los materiales sólidos destinados a la lixiviación podrán ser:

- ❖ Recursos naturales: estructuras vegetales (semillas, tallos, hojas, etc.) y animales (insectos, hígados, etc.)
- ❖ Materiales inorgánicos: minerales, sales, etc.
- ❖ Materiales de procesos intermedios
- ❖ Precipitados
- ❖ Cristales

El solvente utilizado para la lixiviación está normalmente conformado por el disolvente líquido D, pudiendo en los casos de recirculación contener pequeñas cantidades de soluto A. Sin embargo, el extracto líquido obtenido al final de la lixiviación es un sistema binario, formado por el soluto y el disolvente: A + D; en ocasiones, cuando no existe una buena separación mecánica sólido líquido, podrá percibirse el arrastre de sólidos finos, que da lugar a la presencia de insolubles: I, en el extracto (Arias, 2011).

3.6. Extracción por métodos tradicionales

a) Extracción por solventes: se basa principalmente en la selección de solventes, temperatura o agitación, con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa. Se separan los compuestos con base en sus solubilidades por dos líquidos inmiscibles, usualmente agua y un solvente orgánico. En la industria, este proceso se realiza continuamente bombeando una corriente orgánica y otra acuosa dentro de una mezcladora, donde se mezclan ambos componentes y se permite el intercambio iónico hasta que se logra el equilibrio (Dolphqwrv et al., 2007)

La introducción de un transductor ultrasónico dentro de la

unidad de extracción, puede incrementar considerablemente la eficiencia del método, debido a que, por lo general, se utilizan solventes fríos (Dolphqwrv et al., 2007)

- b) Soxhlet.** un tipo de material de vidrio utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, por medio de un solvente afín. El equipo está integrado por un extractor, un condensador especial de tipo bulbo y un matraz (véase figura 4). Funciona cíclicamente, cuando se evapora el solvente sube hasta el área donde es condensado; aquí, al caer y regresar a la cámara de solvente, va separando los compuestos, hasta que se llega a una concentración deseada. (Vinatoru, 2001).

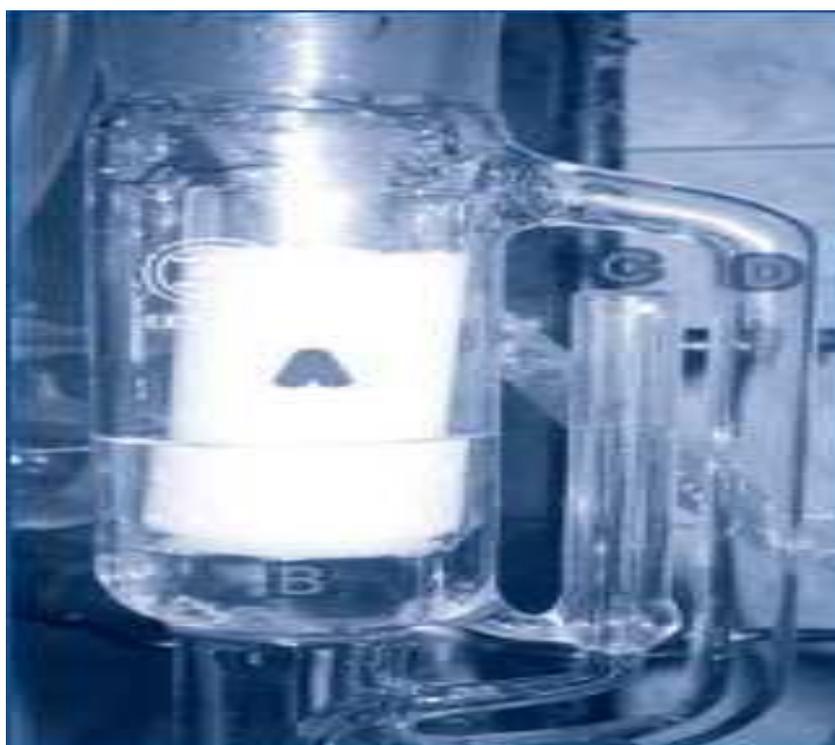


Figura 4: Equipo soxhlet

Fuente: (Dolphqwrv et al., 2007)

c) Destilación: es la operación de separar, mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla, aprovechando las diferencias de volatilidades de los compuestos por separar. El aparato utilizado para la destilación en el laboratorio (figura 5) consta de un recipiente donde se almacena la mezcla, a la que se le aplica calor, un condensador donde se enfrían los vapores generados, llevándolos de nuevo al estado líquido y un recipiente donde se almacena este líquido concentrado. En este método, los materiales vegetales son mezclados con agua, seguidos por el calentamiento o la introducción de una corriente de vapor. Durante la destilación, el uso de ultrasonido no tiene ningún efecto debido a las temperaturas de ebullición, pero puede ser utilizado para mejorar la extracción cuando se utilizan solventes de punto de ebullición bajo y la temperatura de extracción se mantiene por debajo del punto de ebullición de la mezcla (Dolphqwrv et al., 2007)

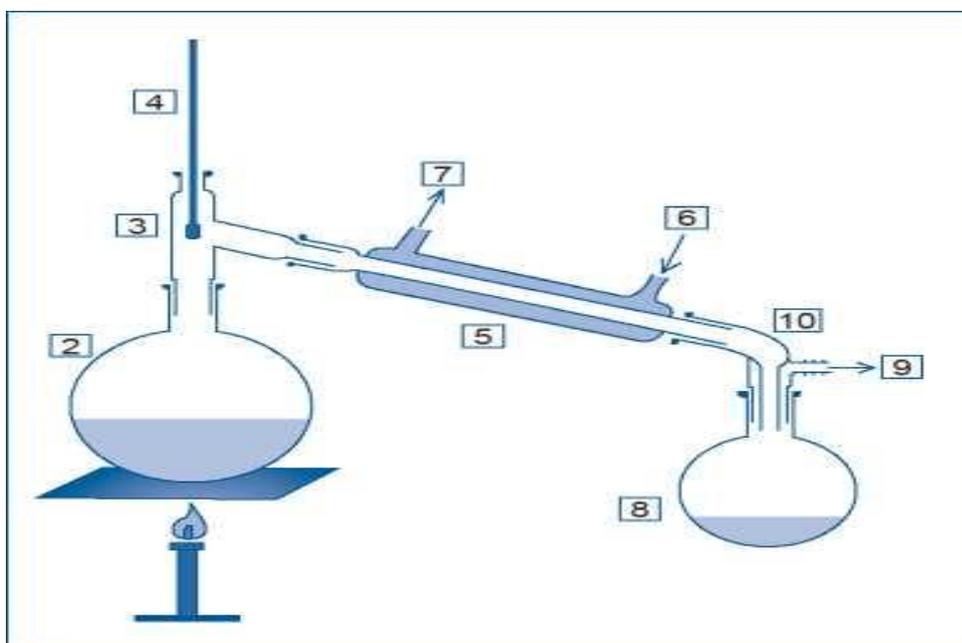


Figura 5: Equipo de laboratorio para destilación

Fuente: (Dolphqwrv et al., 2007)

3.7. Extracción por métodos no tradicionales

Según (Dolphqwrv et al., 2007) los métodos de extracción más modernos se basan en la mejora de la eficiencia de los métodos tradicionales por acción física sobre el medio.

a) Extracción asistida por microondas: La irradiación de microondas causa movimiento moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia vegetal.

b) Extracción por fluidos supercríticos: Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico figura 6.

Tiene una habilidad única para difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido, generando solvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial. Se utilizan, principalmente, dióxido de carbono y agua. Se puede realizar una extracción selectiva de diferentes compuestos utilizando distintas presiones del fluido supercrítico.

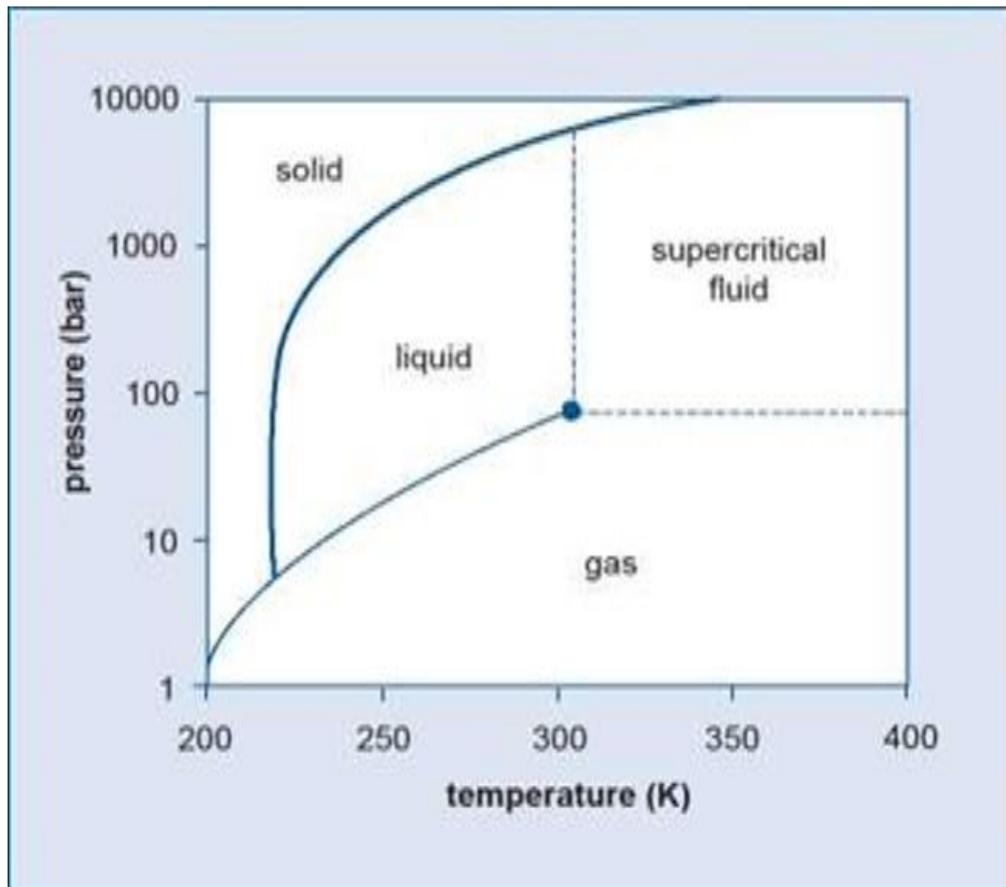


Figura.6. Diagrama de fase del dióxido de carbono

Fuente: (Dolphqwrv et al., 2007)

- c) **Extracción turbo:** utiliza un agitador de alta velocidad, que induce cavitación hidrodinámica, aumentando el rendimiento de extracción, ya que, se aumenta el contacto entre el material vegetal y el solvente y el proceso de difusión a través de las paredes celulares se incrementa (Dolphqwrv et al., 2007)

- d) **Extracción eléctrica:** Se aplican descargas eléctricas a la mezcla de extracción, incrementando la extracción hasta un 25% al formarse burbujas de cavitación (Dolphqwrv et al., 2007)

e) Extracción asistida por ultrasonido: la extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Dolphqwrv et al., 2007)

Según (Dolphqwrv et al., 2007) esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas. El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos.

En la figura 7 se observan distintos equipos experimentales comúnmente utilizados en la extracción de sustancias asistida por ultrasonido.

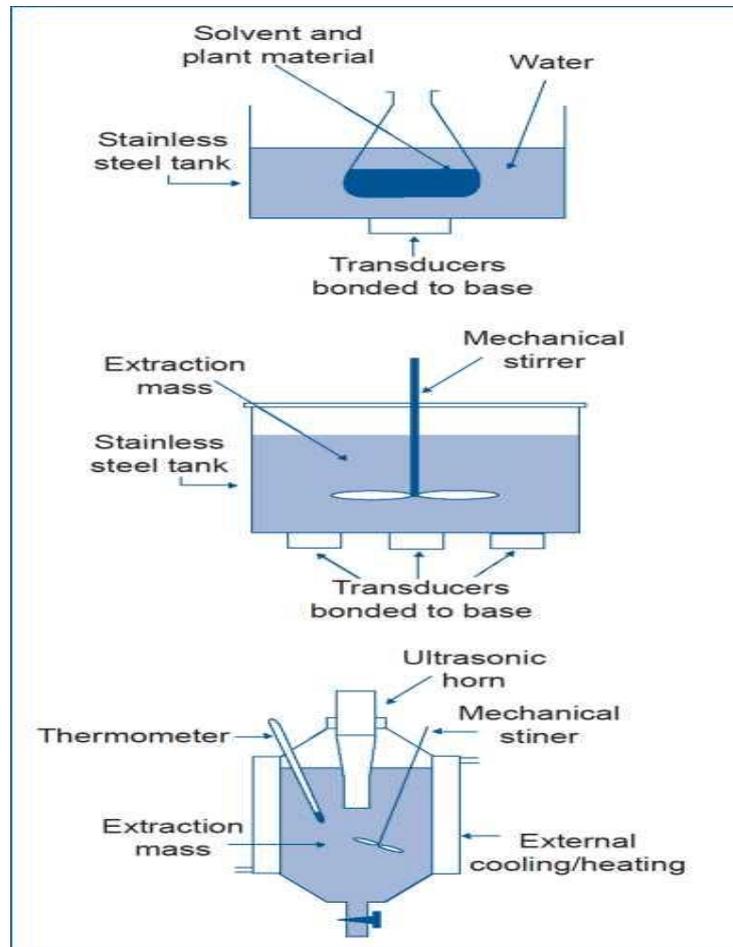


Figura 7. Equipos experimentales utilizados para la extracción por ultrasonido.

Fuente: (Dolphqwrv et al., 2007)

Por otro lado, el mecanismo de acción del ultrasonido de potencia es principalmente por la cavitación lo cual se detalla a continuación:

- a) Cavitación.** La cavitación se produce cuando las burbujas provocadas por la agitación del medio colapsan entre ellas, o implosionan sobre ellas mismas, generando energía, y, por consiguiente, aumentos de la temperatura en esa zona. Cuando la implosión de una burbuja se produce cerca de la superficie del sólido, se genera una corriente de

líquido hacia el interior de la burbuja (microjet). Esto provoca la rotura de las capas externas del sólido, facilitando la transferencia de materia entre el líquido y el sólido, como se muestra en la figura 6. (Deng y Zhao, 2008).

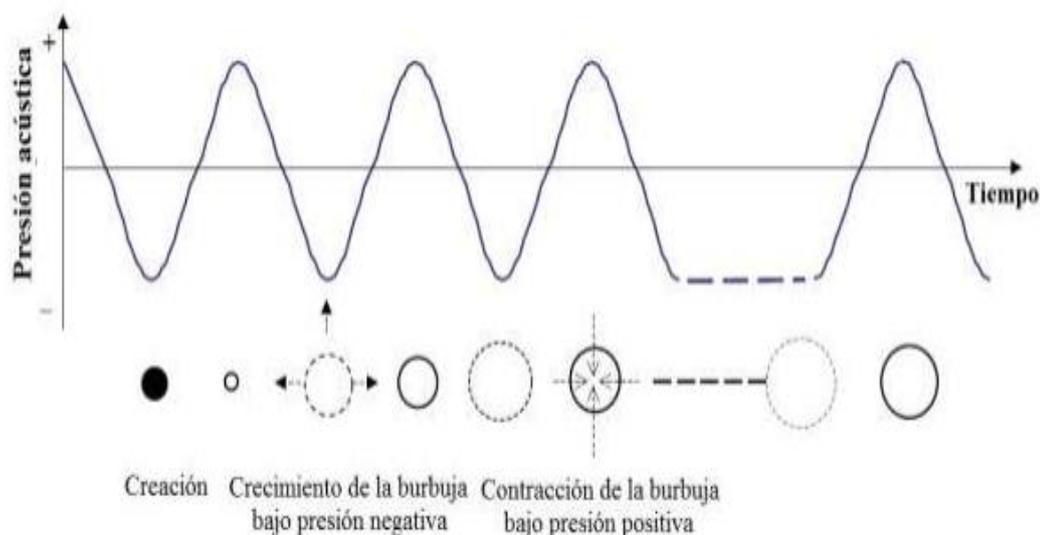


Figura 8. Comportamiento de las burbujas durante la cavitación

Fuente: (Deng y Zhao, 2008)

3.8. ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Clingingsmith, 1984).

En esta práctica se darán a conocer las características generales y conceptos relacionados con la espectrofotometría. Tras la explicación del funcionamiento del espectrofotómetro se harán espectros de absorción con el fin de determinar la longitud de onda donde la muestra presenta la máxima absorción, y tras realizar las correspondientes rectas de calibrado se cuantificarán las concentraciones de distintas biomoléculas (Clingingsmith, 1984).

El fundamento de la espectrofotometría se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas(Clingingsmith, 1984).

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Esto permite poner en funcionamiento ciclos vitales como la fotosíntesis en plantas y bacterias. Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, E1, a un estado de mayor energía (estado excitado), E2. Y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula, esto es, su espectro de absorción constituye una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental. (Clingingsmith, 1984).

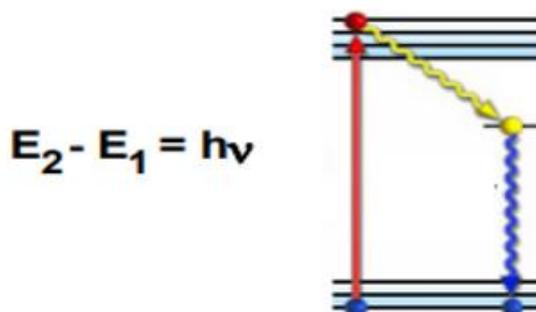


Figura 9. Diagrama de niveles de energía en una molécula

Fuente: (Clingsmith, 1984).

La absorción de energía luminosa hace que la molécula pase desde un estado fundamental (E_1) a otro excitado (E_2). Posteriormente la molécula relaja su energía mediante distintos mecanismos (vibración, rotación, etc.)

En espectrofotometría el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm). (Clingsmith, 1984).

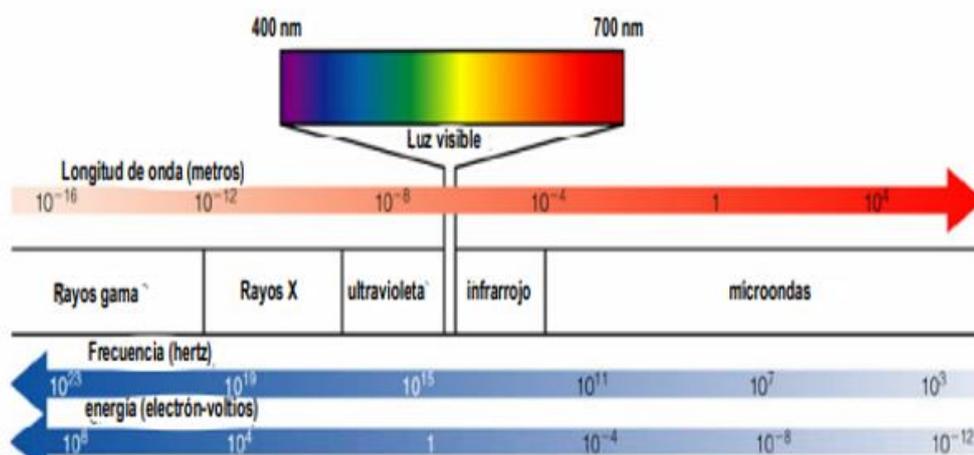


Figura 10. Espectro electromagnético

Fuente: (Clingsmith, 1984).

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano, así como, quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores -como pH, concentración de sal y el disolvente- que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio.

En la región visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm. (Clingsmith, 1984).

Tabla 6

Diferencia de colores de Longitudes de onda.

Longitud de onda Aproximada	Color de luz que se absorbe	Color de luz que se refleja o ve
390-435	Violeta	Amarillo verdoso
435-490	Azul	Amarillo
490-580	Verde	Rojo
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Azul verdoso
650-780	Rojo	Verde azulado

Fuente : (Clingsmith, 1984)

3.8.1. Transmitancia y Absorbancia.

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_0) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple: $I_0 = I_0 + I_t$.

La transmitancia (T) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, I_t , y la cantidad de luz que incidió sobre ella y se representa normalmente en tanto por ciento: $\% T = I_t/I_0 \times 100$.

La transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre %T y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa (Clingsmith, 1984).

La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de $1/T$, en consecuencia: $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t/I_0$. Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_0 = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale $\log 1 = 0$. La I_t/I_0 3 La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste.

3.8.2. Ley de Lambert-Beer

Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{Ec.1})$$

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará; y por último, depende de ε , una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de ε dependen de las de c y l. La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno (Clingsmith, 1984).

Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de doble haz (con dos celdillas para dos cubetas); en nuestro caso se trabajará con los de un solo haz.

Se mide primero la absorbancia del disolvente (conocido como blanco) y al que se le asigna el valor de cero mediante el ajuste del mando, de forma que la intensidad incidente y transmitida sean iguales ($I_0 = I_t$), y por tanto la absorbancia es cero.

Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar (ε_M). Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en

otras unidades distintas de M, por ejemplo, g·L⁻¹, las dimensiones de ϵ resultan ser distintas, por ejemplo, g⁻¹·L·cm⁻¹, y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico (ϵ_s).

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de c altos, ϵ varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc (Clingingsmith, 1984).

✓ **Instrumentación para la medición de absorbancias de la luz visible y ultravioleta: espectrofotómetro UV-visible**

(Clingingsmith, 1984). La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros. Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura 11.

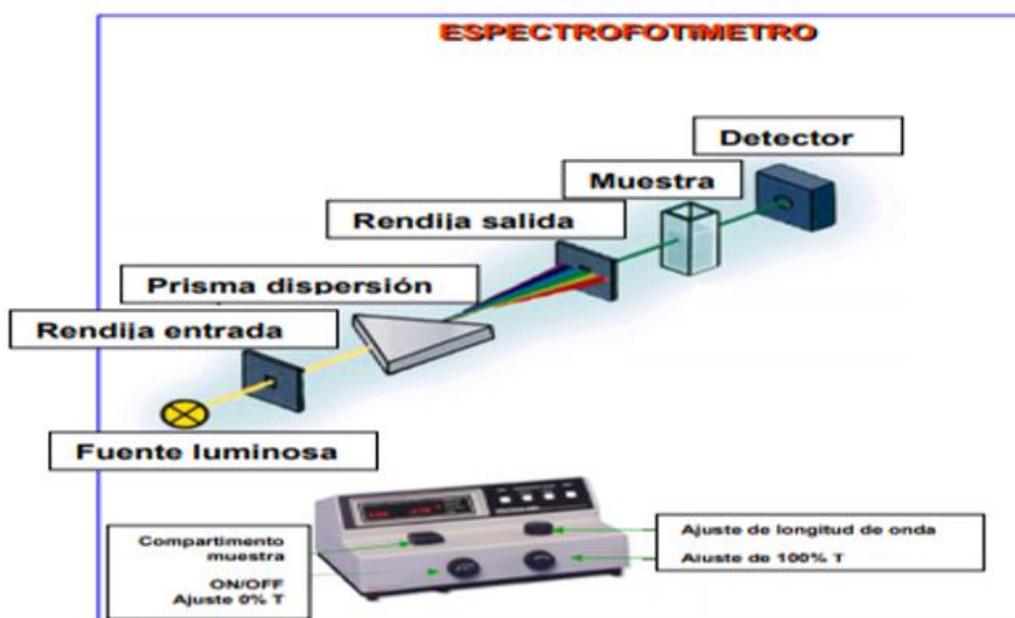


Figura 11: Componentes espectrofotómetro.

Fuente : (Clingingsmith, 1984)

CAPITULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. Lugar de ejecución

La investigación se realizó en los laboratorios de física, química y procesos agroindustriales de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial (EPIA) de la Universidad Nacional José María Arguedas. En la sede académica de Santa Rosa, Distrito de Talavera, Provincia de Andahuaylas y Región Apurímac.

4.2. Materiales, Equipos y Reactivos

4.2.1. Materiales

En la tabla 7, se mencionan los materiales empleados en esta investigación.

Tabla 7

Materiales de laboratorio

Cantidad	Nombre	Descripción
4	Envases de vidrio de 700 ml	Material de vidrio
27	Envases aforados	Material de vidrio
02	Espátula	Lámina plana angosta que se encuentra adherida a un mango hecho de madera, plástico o metal.
01	Gotero	Material de plástico
01	Pizeta	Material de plástico
01	Probeta de 100ml	Material de vidrio de 100 ml

02	Matraz de 25ml	Material de vidrio de 25 ml
01	Tamiz	Material de metal
01	Embudo de vidrio	Material de vidrio
02	Matraz de 150ml	Material de vidrio de 150 ml
01	Rotulador	Material plástico

4.2.2. Equipos

En la tabla 8, se describen los equipos empleados en la investigación.

Tabla 8

Equipos de laboratorio

Cantidad	Nombre	Descripción	Marca
01	ultrasonido de potencia ultrasonic cleaner 40 kHz		GT SONIC – D3 40 KHZ 220 V - 240 V 50 HZ
01	Alcoholímetro	Instrumento que mide el grado alcohólico (°GL)	
01	Espectrofotómetro	Dispositivo de medición del color	
01	Termómetro	Instrumento que mide la temperatura (°C)	
01	Rota vapor	Instrumento que sirve para evaporar sustancias mediante una destilación.	

01	Balanza digital	Equipo electrónico con capacidad de 100 g y sensibilidad 0.0001 g	OHAUS Aventurer
01	Estufa (Incubadora), temperatura graduable hasta más de 105 °C	Equipo electrónico que calienta el ambiente sin secarlo y así, conserva el calor por más tiempo.	Kert Lab Laboratory

4.2.3. Reactivos

En la tabla 9, se detallan los reactivos usadas en la investigación.

Tabla 9

Reactivos

Cantidad	Nombre	Descripción
5 litros	Agua destilada	s/m
500 ml	Cloroformo	Líquido incoloro altamente volátil.
15 litros	Etanol	Líquido incoloro, de olor característico, soluble tanto en agua como en grasas

4.2.4. Material vegetal

En la tabla 10, se menciona la materia prima utilizada en esta investigación
Tabla 10.

Material vegetal

Cantidad	Nombre	Descripción
3 kg	Semillas de achiote	Pigmento natural de color rojo amarillento.

4.3. Población y muestra

4.3.1. Universo y/o población

4.3.1.1. Muestra

La muestra utilizada en esta investigación fue la semilla de achiote (*Bixa orellana*) de variedad colorada, con forma de capsula puntiaguda de color rojo, adquiridas de los productores de achiote del distrito de San Juan de Oro, Provincia Sandía, Región Puno.

4.4. Tipo de investigación

La investigación es experimental.

4.5. Métodos de análisis

4.5.1. Rendimiento de pigmento

Método sólido - líquido, propuesta por Payes y Mérida (2017).

4.5.2. Intensidad de color

Método de análisis según Alcarraz (2011) y Elejalde (1999).

4.5.3. Evaluación de bixina con cloroformo

Método del cloroformo (NTP 209.256).

4.6. Metodología por objetivos

OBJETIVO 1: Rendimiento de pigmento de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) por ultrasonido de potencia.

Las muestras de achiote fueron pesadas (10 g) en la balanza analítica, y luego se colocaron en un matraz Erlenmeyer (50 ml) y se adiciono 25 ml de etanol (80 °GL y 90 °GL), las que fueron sometidas a ultrasonido de potencia, por 5 min y 9 min, a temperatura de 30 °C y 40 °C, posteriormente se filtró a un envase de vidrio de 25 ml y se secó en estufa a 60 °C, como se muestra en la figura 12.

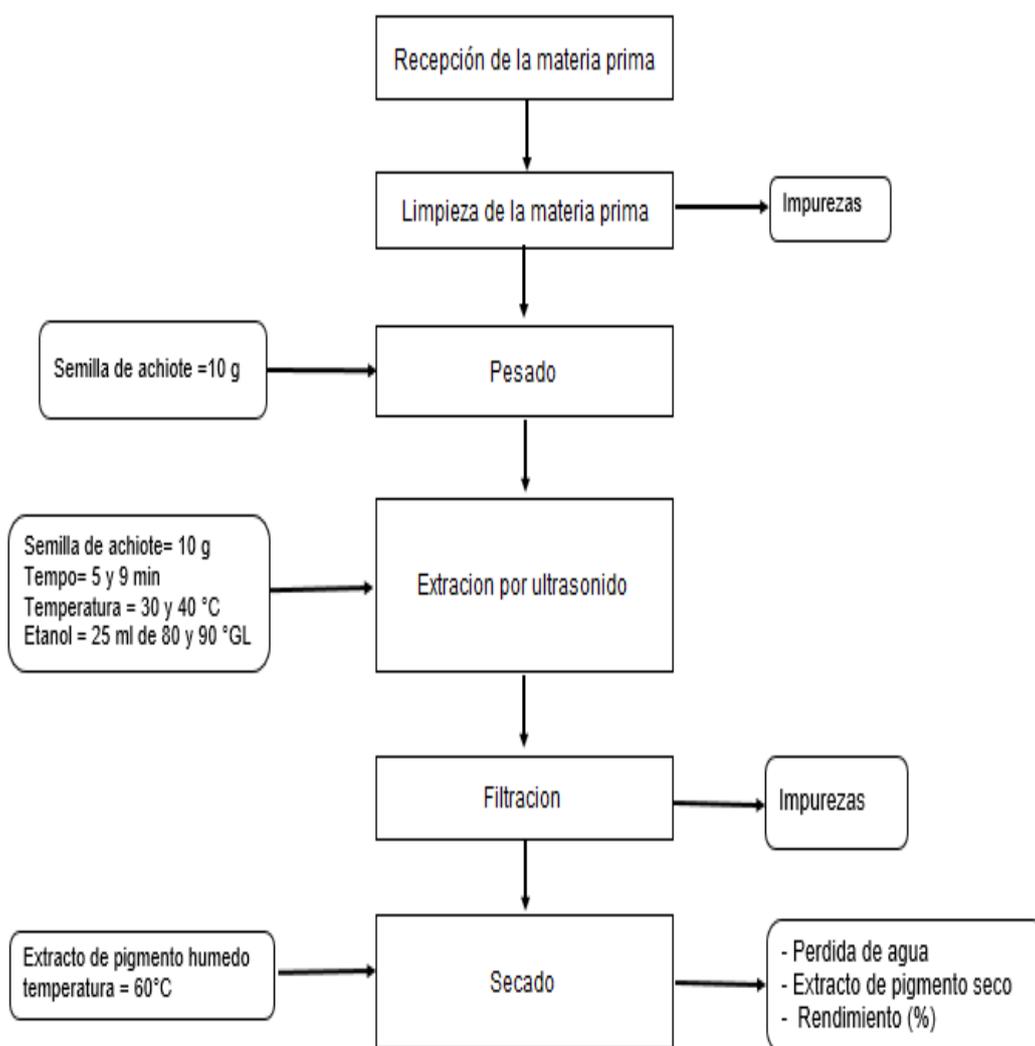


Figura 12. Balance de materia para la obtención de pigmento seco

Finalmente se determinó el rendimiento con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_f - W_t}{W_{mp}} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde:

% = Rendimiento: porcentaje de rendimiento del pigmento natural

W_f = peso final del vaso precipitado con el pigmento seco (g)

W_t = peso del vaso precipitado vacío (g).

W_{mp} = peso de la materia prima seco (g)

OBJETIVO 2: Intensidad de color en espectrofotometría del pigmento de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) por ultrasonido de potencia.

El procedimiento según Alcarraz (2011), es el siguiente:

- ❖ Se tomó una cantidad suficiente del extracto obtenido de la operación unitaria de lixiviación para hacer la lectura de la absorbancia.
- ❖ Luego se programó el valor de la longitud de onda adecuado en el equipo de espectrometría.
- ❖ Se realizó la calibración del equipo usando agua destilada añadida a otra celda, es decir al realizar la lectura de la absorbancia del agua tiene que ser igual a cero.
- ❖ Una vez que se tuvo la muestra, esta se colocó en la cubeta del equipo de espectrofotometría.

- ❖ Se limpió la parte externa de la cubeta de preferencia con un material suave, con el papel tissue.
- ❖ Se realizó otra vez la calibración del equipo usando agua destilada para luego colocar la celda que contiene la muestra a analizar en el equipo para su lectura de absorbancia de 420 nm y 520 nm.
- ❖ Después se retiró la cubeta del equipo y procediendo a limpiarla o lavarla por lo menos tres veces, luego se secó la cubeta para proceder a la siguiente lectura de la absorbancia de otra muestra a analizar.

Posterior a las lecturas realizadas de tres replicas , se aplicó el procedimiento de determinación de la intensidad de color (IC) según (Elejalde, 1999) bajo la Normativa Europea, en donde dicta que la Intensidad de Color , son la suma de absorbancias a 420 y 520 nm de longitud de onda. Determinándose la intensidad de color o índice de color con la siguiente ecuación.

$$IC = \frac{A_{420} + A_{520}}{b} \quad (\text{Ec.4})$$

Donde:

IC : Intensidad de color.

A_{420} : Es la Absorbancia medida a longitudes de onda 420 nm.

A_{520} : Es la Absorbancia medida a longitudes de onda 520 nm.

b : Es el espesor de la cubeta en centímetros.

OBJETIVO 3: Contenido de bixina

En base a los resultados obtenidos del objetivo 1 y 2, se procedió a determinar el contenido de bixina (%) utilizando el método del cloroformo según la NTP N°209.256, cumpliendo con el siguiente procedimiento:

- ❖ Se pesó 1g de muestra en un matraz volumétrico de 100ml.
- ❖ Se adiciono 50 ml de cloroformo.
- ❖ Luego se procedió a agitar el contenido del matraz con un agitador magnético por un tiempo aproximado de 15 minutos.
- ❖ Después se llevó a volumen con cloroformo y se homogenizo bien la mezcla.
- ❖ Se tomó 1 ml de la solución anterior y se llevó a un matraz volumétrico de 100 ml. Se enraso con cloroformo y se agito.
- ❖ Se tomó 5ml de la solución anterior y se lleva a un matraz volumétrico de 100 ml. Se enraso con cloroformo y se agito.
- ❖ Se hizo la lectura de absorbancia a 503 nm y a 404 nm en el espectrofotómetro empleando cloroformo como blanco de referencia.

Para determinar el contenido de bixina (%) se ha considerado la siguiente formula:

$$\% \text{ bixina} = \frac{l(A_{503} + A_{404}) - 0.256 (A_{503}) l * 100}{c * b * k} \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

A = Es la absorbancia medida a longitudes de onda de 404 nm y 503 nm.

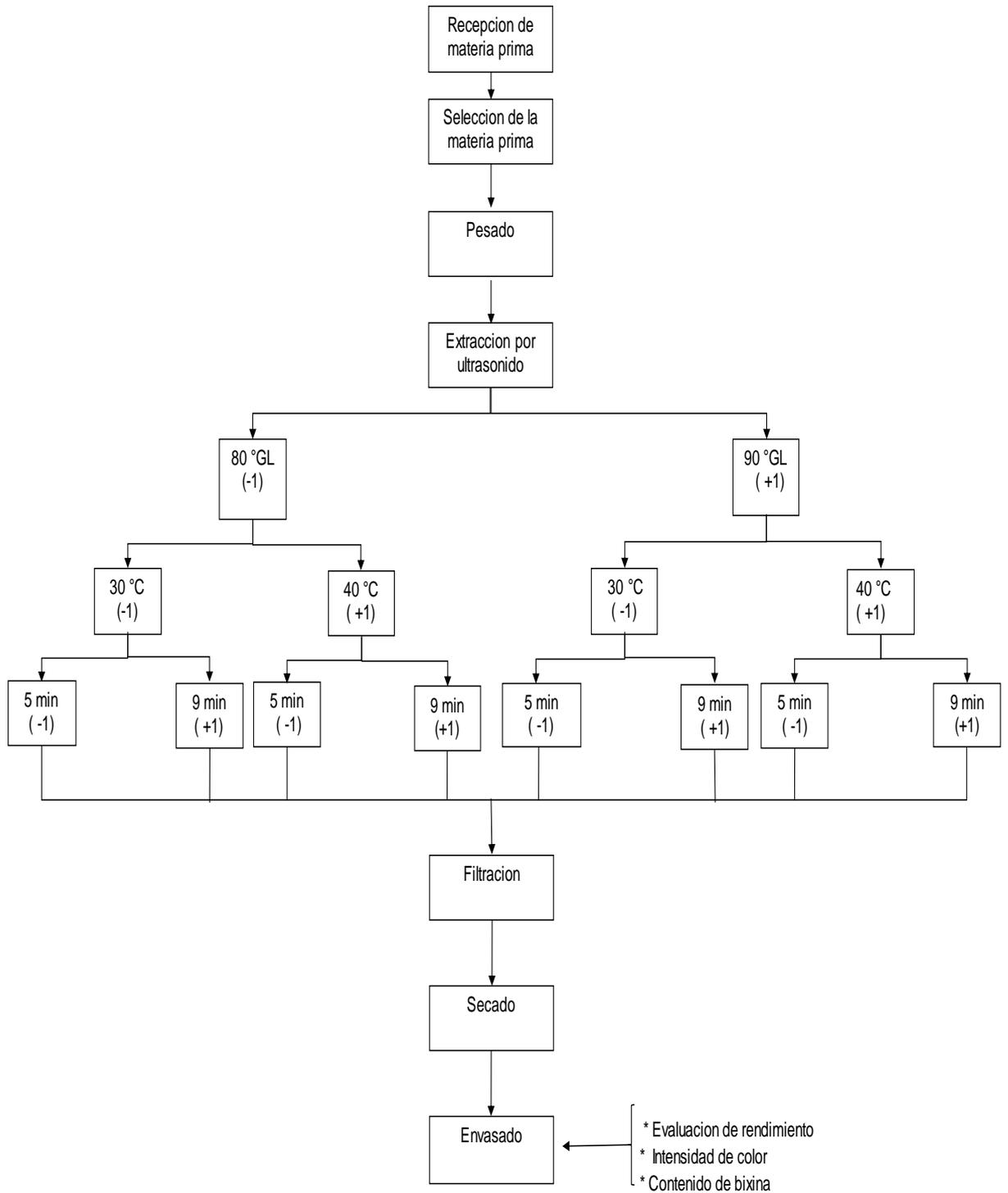
b = Es el diámetro del tubo en cm (1ml)

c = Es la concentración en g/l de la solución mencionada.

k = Es el coeficiente de extinción en l/g .cm

4.7. Metodología experimental

4.7.1. Metodología de extracción de pigmento de la semilla de achiote



4.7.2. Descripción de la extracción de pigmento de la semilla de achiote

- a) **Recepción de la materia prima:** Las semillas de achiote fueron recepcionadas, pesadas y almacenadas en envases herméticos para mantener las semillas y aislarlas de los posibles daños físicos que pudieran sufrir.
- b) **Limpieza de la materia prima:** Las semillas de achiote fueron seleccionadas (material extraño, impurezas) manualmente afín de no dañar las paredes donde se ubica el pigmento que es de interés para el estudio.
- c) **Pesado:** Las muestras selectas se pesaron a razón de 10 g de semillas de achiote. Para cada tratamiento.
- d) **Extracción:** Los 10g de semillas de achiote fueron colocadas a un matraz de 50 ml, al que se añadió 25 ml de etanol (80 ° GL y 90 ° GL), sometiéndose a ultrasonido a temperaturas de 30 °C y 40 °C. controlándose el tiempo según el diseño propuesto.
- e) **Filtración:** Con la ayuda de un tamiz se procedió a separar el líquido que contiene el pigmento del material sólido (semillas de achiote).
- f) **Secado:** Esta operación se realizó en una estufa a una temperatura a 60 °C con la que paulatinamente se logró evaporar el solvente quedando solamente el pigmento extraído en el material empleado.
- g) **Envasado:** El material obtenido se envaso en frascos de vidrio de 25 ml de capacidad para conservar las muestras y efectuar los análisis según los objetivos propuestos.

4.8. Diseño experimental y Análisis estadístico

4.8.1. Diseño experimental

Se empleó el diseño central compuesto rotatable “DCCR” (Ibáñez, 2009), considerando para ello los valores mínimos y máximos de los factores en estudio (Tabla 11)

Tabla 11

Niveles de las variables independientes

VARIABLES INDEPENDIENTES	UNID	NIVELES		Y
		-1	1	Y1; Y2
Tiempo de residencia en ultrasonido	min	5	9	
Temperatura en ultrasonido	°C	30	40	
Concentración de etanol	°GL	80	90	

Las variables dependientes o de respuesta son:

Y1 = Rendimiento (R)

Y2 = Intensidad de color (IC)

En la tabla 12 se presenta los valores codificados para cada nivel de estudio, mientras que en la tabla 13 se describe la matriz con los códigos de las combinaciones bajo la metodología DCCR, en donde $\alpha=1.682$ son los puntos axiales o estrella.

Tabla 12

Codificación de niveles

Nivel codificado (xi)	Denominación
$-\alpha$	Nivel mínimo
-0	
-1	Nivel bajo
0	Nivel medio
1	Nivel alto
$+\alpha$	Nivel máximo

Tabla 13

Matriz del diseño compuesto central rotacional con 3 factores

N°	X ₁	X ₂	X ₃	Y
1	-1	-1	-1	Y ₁
2	1	-1	-1	Y ₂
3	-1	1	-1	Y ₃
4	1	1	-1	Y ₄
5	-1	-1	1	Y ₅
6	1	-1	1	Y ₆
7	-1	1	1	Y ₇
8	1	1	1	Y ₈
9	-1.682	0	0	Y ₉
10	1.682	0	0	Y ₁₀
11	0	-1.682	0	Y ₁₁
12	0	1.682	0	Y ₁₂
13	0	0	-1.682	Y ₁₃
14	0	0	1.682	Y ₁₄
15	0	0	0	Y ₁₅
16	0	0	0	Y ₁₆
17	0	0	0	Y ₁₇
18	0	0	0	Y ₁₈
19	0	0	0	Y ₁₉
20	0	0	0	Y ₂₀

En la tabla 14, se muestran los factores de estudio codificados con sus respectivos factores reales para la variable de respuesta rendimiento (Y1).

Tabla 14

Factores de estudio para rendimiento

	FACTORES CODIFICADOS			FACTORES DE ESTUDIO REALES			RENDIMIENTO
	X_1	X_2	X_3	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración etanol (°GL)	
1	-1	-1	-1	5	30	80	R_1X_{123}
2	1	-1	-1	9	30	80	R_2X_{123}
3	-1	1	-1	5	40	80	R_3X_{123}
4	1	1	-1	9	40	80	R_4X_{123}
5	-1	-1	1	5	30	90	R_5X_{123}
6	1	-1	1	9	30	90	R_6X_{123}
7	-1	1	1	5	40	90	R_7X_{123}
8	1	1	1	9	40	90	R_8X_{123}
9	-1.682	0	0	3.63641	35	85	R_9X_{123}
10	1.682	0	0	10.3636	35	85	$R_{10}X_{123}$
11	0	-1.682	0	7	26.591	85	$R_{11}X_{123}$
12	0	1.682	0	7	43.409	85	$R_{12}X_{123}$
13	0	0	-1.682	7	35	76.591	$R_{13}X_{123}$
14	0	0	1.682	7	35	93.409	$R_{14}X_{123}$
15	0	0	0	7	35	85	$R_{15}X_{123}$
16	0	0	0	7	35	85	$R_{16}X_{123}$
17	0	0	0	7	35	85	$R_{17}X_{123}$
18	0	0	0	7	35	85	$R_{18}X_{123}$
19	0	0	0	7	35	85	$R_{19}X_{123}$
20	0	0	0	7	35	85	$R_{20}X_{123}$

En la tabla 15, se detallan los factores de estudio codificados con sus respectivos factores reales para la variable de respuesta intensidad de color (Y2).

Tabla 15

Factores de estudio para intensidad de color

	FACTORES CODIFICADOS			FACTORES DE ESTUDIO REALES			INTENSIDAD DE COLOR
	X_1	X_2	X_3	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración Etanol (°GL)	Y_2
1	-1	-1	-1	5	30	80	I_1X_{123}
2	1	-1	-1	9	30	80	I_2X_{123}
3	-1	1	-1	5	40	80	I_3X_{123}
4	1	1	-1	9	40	80	I_4X_{123}
5	-1	-1	1	5	30	90	I_5X_{123}
6	1	-1	1	9	30	90	I_6X_{123}
7	-1	1	1	5	40	90	I_7X_{123}
8	1	1	1	9	40	90	I_8X_{123}
9	-1.682	0	0	3.63641	35	85	I_9X_{123}
10	1.682	0	0	10.3636	35	85	$I_{10}X_{123}$
11	0	-1.682	0	7	26.591	85	$I_{11}X_{123}$
12	0	1.682	0	7	43.409	85	$I_{12}X_{123}$
13	0	0	-1.682	7	35	76.591	$I_{13}X_{123}$
14	0	0	1.682	7	35	93.409	$I_{14}X_{123}$
15	0	0	0	7	35	85	$I_{15}X_{123}$
16	0	0	0	7	35	85	$I_{16}X_{123}$
17	0	0	0	7	35	85	$I_{17}X_{123}$
18	0	0	0	7	35	85	$I_{18}X_{123}$
19	0	0	0	7	35	85	$I_{19}X_{123}$
20	0	0	0	7	35	85	$I_{20}X_{123}$

A continuación, se muestra en la tabla 16, el diseño experimental estadístico del DCCR para las variables de respuesta rendimiento (Y1), índice de color (Y2).

Tabla 16

Diseño experimental Estadístico del DCCR

	FACTORES CODIFICADOS			FACTORES DE ESTUDIO REALES			Y ₁	Y ₂
	X ₁	X ₂	X ₃	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración Etanol (°GL)		
1	-1	-1	-1	5	30	80	R ₁ X ₁₂₃	I ₁ X ₁₂₃
2	1	-1	-1	9	30	80	R ₂ X ₁₂₃	I ₂ X ₁₂₃
3	-1	1	-1	5	40	80	R ₃ X ₁₂₃	I ₃ X ₁₂₃
4	1	1	-1	9	40	80	R ₄ X ₁₂₃	I ₄ X ₁₂₃
5	-1	-1	1	5	30	90	R ₅ X ₁₂₃	I ₅ X ₁₂₃
6	1	-1	1	9	30	90	R ₆ X ₁₂₃	I ₆ X ₁₂₃
7	-1	1	1	5	40	90	R ₇ X ₁₂₃	I ₇ X ₁₂₃
8	1	1	1	9	40	90	R ₈ X ₁₂₃	I ₈ X ₁₂₃
9	-1.682	0	0	3.63641	35	85	R ₉ X ₁₂₃	I ₉ X ₁₂₃
10	1.682	0	0	10.3636	35	85	R ₁₀ X ₁₂₃	I ₁₀ X ₁₂₃
11	0	-1.682	0	7	26.591	85	R ₁₁ X ₁₂₃	I ₁₁ X ₁₂₃
12	0	1.682	0	7	43.409	85	R ₁₂ X ₁₂₃	I ₁₂ X ₁₂₃
13	0	0	-1.682	7	35	76.591	R ₁₃ X ₁₂₃	I ₁₃ X ₁₂₃
14	0	0	1.682	7	35	93.409	R ₁₄ X ₁₂₃	I ₁₄ X ₁₂₃
15	0	0	0	7	35	85	R ₁₅ X ₁₂₃	I ₁₅ X ₁₂₃
16	0	0	0	7	35	85	R ₁₆ X ₁₂₃	I ₁₆ X ₁₂₃
17	0	0	0	7	35	85	R ₁₇ X ₁₂₃	I ₁₇ X ₁₂₃
18	0	0	0	7	35	85	R ₁₈ X ₁₂₃	I ₁₈ X ₁₂₃
19	0	0	0	7	35	85	R ₁₉ X ₁₂₃	I ₁₉ X ₁₂₃
20	0	0	0	7	35	85	R ₂₀ X ₁₂₃	I ₂₀ X ₁₂₃

En base al diseño aplicado se plantea un modelo matemático para este diseño de tres factores está dado por:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{Ec.4})$$

Donde:

Y: Variable dependiente

X1, X2, X3 = Factores de estudio.

4.8.2. Análisis Estadístico

Los datos de los resultados de rendimiento y intensidad de color fueron sometidos a análisis de varianza al 95% de nivel de confianza, con las que se evaluaron los factores de tiempo de residencia en ultrasonido (TRU), temperatura en ultrasonido (TU) y concentración de etanol (CE). Asimismo, con el programa STATGRAPHICS Plus 5.1, se efectuó el análisis estadístico ANOVA, y con la opción de análisis de modelos de superficie de respuesta (DOE) se procedió a establecer los valores óptimos de extracción bajo las condiciones propuestas de estudio.

CAPITULO V: RESULTADOS

5.1. Resultado de la determinación del rendimiento (%)

El rendimiento del pigmento de achiote al 95% de nivel de confianza, fue influenciado por el tiempo de residencia en ultrasonido (A), temperatura en ultrasonido (B) y concentración de etanol (C) de las semillas de achiote. Observando la tabla 17 del ANOVA, hace notar que existe efecto cuadrático de la concentración de etanol (CC), resultado significativo al 95% de nivel de confianza, hace pensar que es posible encontrar un valor máximo de la variable concentración de etanol para mejorar el rendimiento obtenido bajo la propuesta de investigación.

Tabla 17

Análisis de varianza para rendimiento de extracción de achiote

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: tiempo	3.74	1	3.74	6.87	0.04
B: temperatura	4.83	1	4.83	8.87	0.03
C:concentración de etanol	5.02	1	5.02	9.23	0.02
AA	0.18	1	0.18	0.33	0.58
AB	0.55	1	0.55	1.01	0.36
AC	0.55	1	0.55	1.01	0.36
BB	0.09	1	0.09	0.18	0.69
BC	0.0003	1	0.00031	0.00	0.98
CC	9.90	1	9.90	18.18	0.008
Falta de ajuste	9.56	5	1.91	3.51	0.09
Error puro	2.72	5	0.54		
Total (corr.)	37.76	19			

Efectuando los análisis referidos al trayecto de máximo ascenso para optimizar (Figuras 13 y 14), considerando Tiempo de residencia en ultrasonido (3.63641 y 10.3636 min); temperatura en ultrasonido (26.591 y 43.409°C) y concentración de etanol (76.59 y 93.41°GL) se logró optimizar el rendimiento a 9.5 %, bajo los siguientes parámetros tiempo de residencia en ultrasonido (10.40 min); temperatura de extracción (43.40°C) y concentración de etanol (77.66°GL),el mismo que se logra estimar con el modelo matemático de segundo orden siguiente:

$$R_{dto} = 232.72 + 1.96744 * A + 0.184333 * B - 5.5661 * C - 0.0280806 * A^2 + 0.02625 * AB - 0.02625 * AC - 0.00325541 * B^2 - 0.00025 * BC + 0.0331603 * C^2 \quad (\text{Ec.5})$$

El R-cuadrado ajustado del modelo matemático del segundo orden en cuanto al rendimiento es de 38.18 %, es fundamental tener la siguiente apreciación según (Martínez Rodríguez, 2005) indica que en ocasiones los investigadores tratan de maximizar R^2 , es decir, escogen el modelo para el cual la R^2 es más elevada. Pero esto puede ser peligroso por varios motivos. En primer lugar, en el análisis de regresión el objetivo no es obtener un valor elevado de R^2 , sino obtener estimadores precisos de los verdaderos coeficientes de regresión poblacional. En el análisis empírico no es raro encontrarnos con valores altos de R^2 , pero tampoco que encontremos que alguno de los coeficientes de regresión no son estadísticamente significativos o muestran signos contrarios a los esperados a priori.

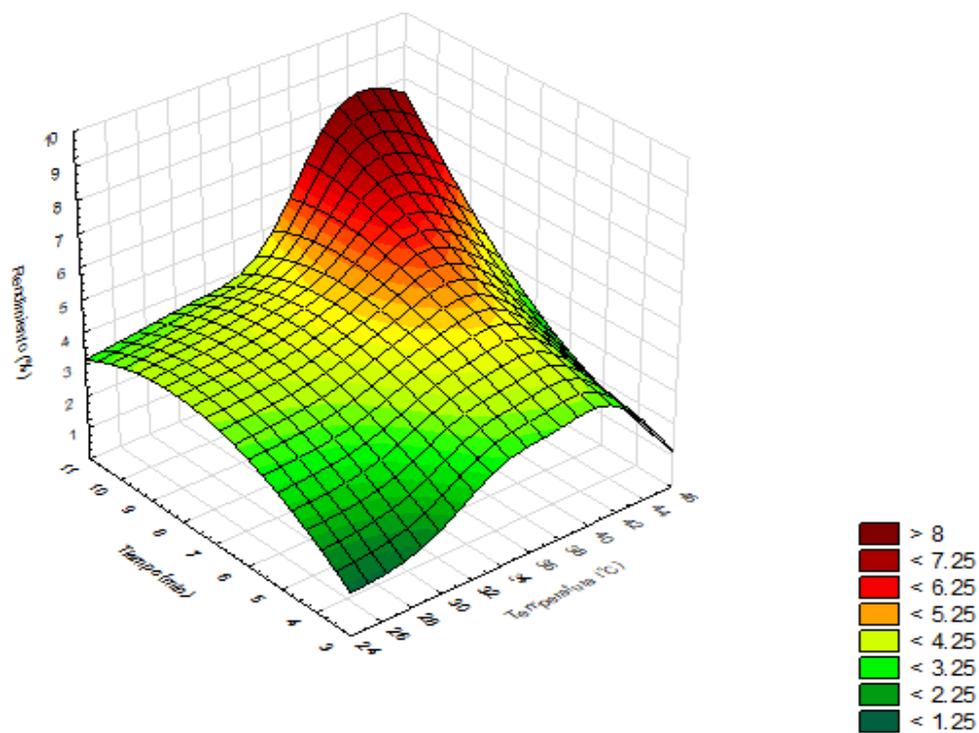


Figura 13. Optimización para rendimiento con interacción entre tiempo de residencia en ultrasonido y temperatura en ultrasonido.

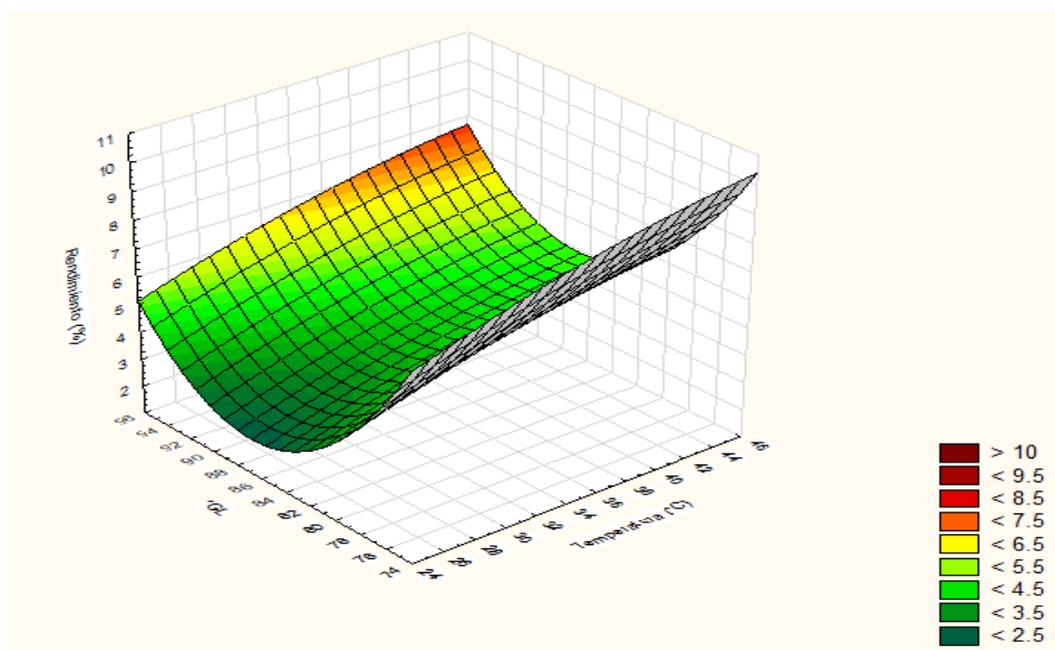


Figura 14. Optimización para rendimiento con interacción entre concentración de etanol y temperatura en ultrasonido.

5.2. Resultado de determinación del índice de color (IC)

Referente al índice de color (IC) el análisis de varianza (Tabla 18), hace notar que los factores estudiadas tiempo de residencia en ultrasonido (TRU), Temperatura en ultrasonido (TE) y concentración de etanol (CE) no presentaron efectos significativos al 95% de nivel de confianza. Sin embargo, los efectos cuadráticos AA; BB y CC, nos dan a entender que muy posiblemente haya un valor óptimo para lograr mejorar el índice color (IC) del pigmento de achote.

Tabla 18

Análisis de Varianza para índice de color (IC)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:tiempo	0.00429254	1	0.00429254	0.03	0.8697
B:temperatura	0.0264447	1	0.0264447	0.18	0.6861
C:GL	0.674999	1	0.674999	4.69	0.0827
AA	1.32966	1	1.32966	9.23	0.0288
AB	0.157641	1	0.157641	1.09	0.3434
AC	0.306153	1	0.306153	2.13	0.2046
BB	1.63654	1	1.63654	11.36	0.0199
BC	0.119805	1	0.119805	0.83	0.4036
CC	2.2825	1	2.2825	15.85	0.0105
Falta de ajuste	1.31615	5	0.263229	1.83	0.2620
Error puro	0.720085	5	0.144017		
Total (corr.)	7.72277	19			

Sobre los indicios determinados, y habiendo efectuando los análisis referidos al trayecto de máximo ascenso para optimizar (Figuras 15 y 16), considerando Tiempo de residencia en ultrasonido (3.63641 y 10.3636 min); temperatura de extracción (26.591 y 43.409°C) y concentración de etanol (76.59 y 93.41°GL) se logró optimizar el índice de color a 5.39 bajo los siguientes parámetros Tiempo de residencia en ultrasonido (10.3636 min); temperatura de extracción (41.28°C) y concentración de etanol (76.59°GL), el mismo que puede estimarse con en modelo matemático de segundo orden siguiente:

$$IC = 146.849 + 0.117237 * A - 1.44909 * B - 2.78505 * C + 0.0759376 * A^2 + 0.0140375 * AB - 0.0195625 * AC + 0.0134793 * B^2 + 0.004895 * BC + 0.0159188 * C^2 \quad (Ec.6)$$

En cuanto al R-Cuadrado ajustado del modelo del segundo orden de la intensidad de color (IC) es de 49.90 %, concerniente a este valor según (Martínez Rodríguez, 2005) se ha tratado de transmitir la idea de que R2 no es la medida “mágica” que resuelve, en todos los casos, el problema de la medición del grado de bondad del ajuste realizado. La propia estructura de los datos, desconocida a priori, y unos grados de libertad del modelo inadecuados (número reducido de observaciones y/o un número elevado de variables exógenas en el modelo) son algunas de las situaciones que nos han permitido poner de manifiesto las deficiencias y limitaciones mostradas por R2 en cuanto a medida de la bondad del ajuste, al tiempo que se evidencia la necesidad de profundizar en el análisis econométrico, proponiendo medidas complementarias al coeficiente de determinación, de forma que su utilización conjunta garantice una mayor confianza en las conclusiones obtenidas. De hecho, varios autores comparten la idea de reducir el énfasis en el uso de R2 como medida de bondad del ajuste al igual que su uso para comparar dos o más valores de este coeficiente con el objetivo de decidir qué modelo de regresión es preferido.

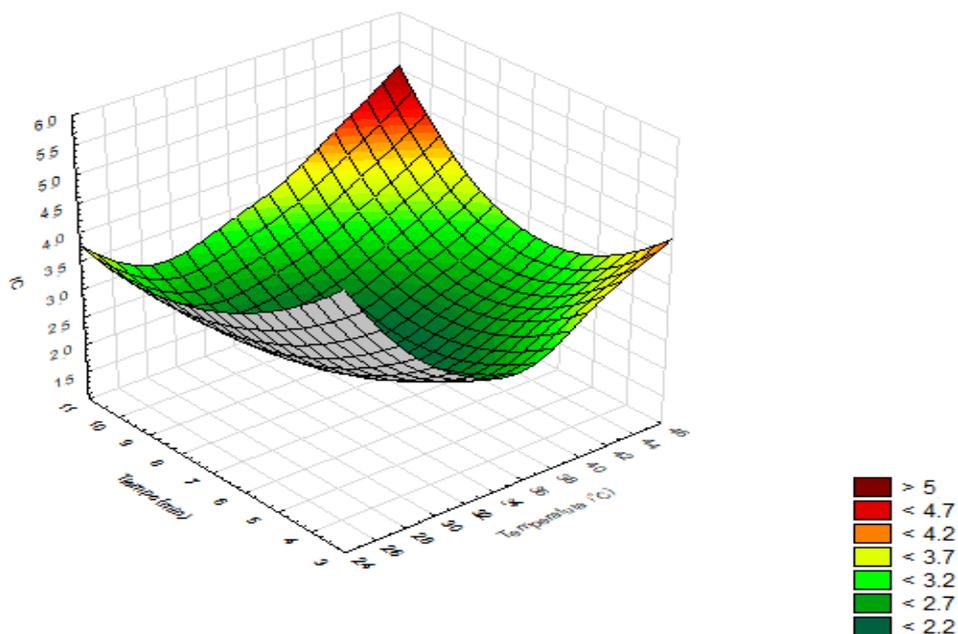


Figura 15. Optimización de índice de color (IC) con interacción entre tiempo de residencia en ultrasonido y temperatura en ultrasonido

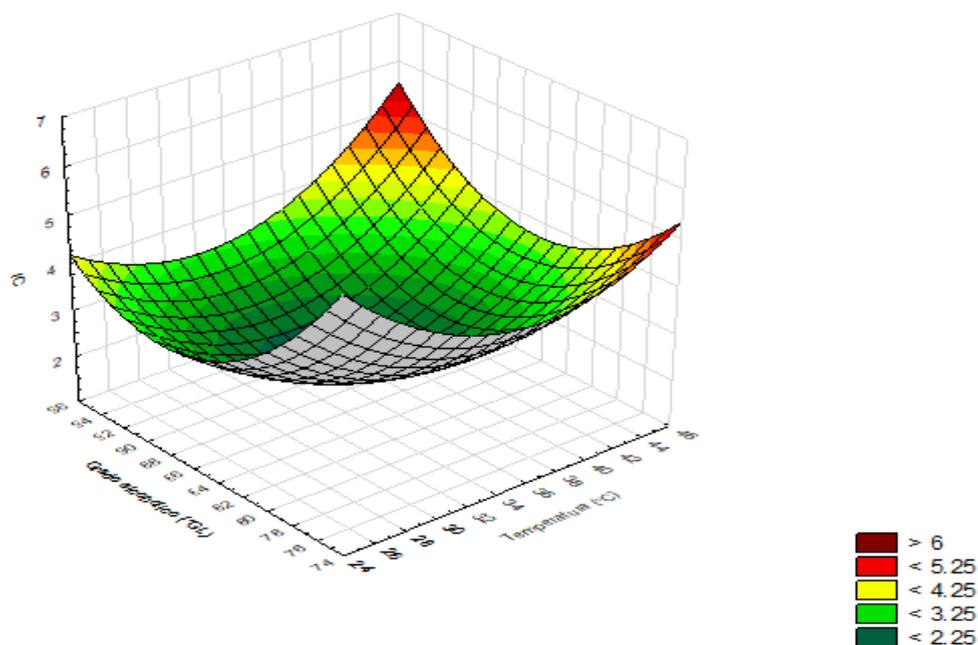


Figura 16. Optimización de índice de color (IC) con interacción entre concentración de etanol y temperatura en ultrasonido.

5.3. Resultado de la determinación del contenido de bixina (%)

Bajo los parámetros óptimos obtenidos, tanto de rendimiento e índice de color (IC) y habiendo efectuado nuevas corridas experimentales, se corrobora y obtuvo el contenido de bixina (Tabla 19).

Tabla 19

Resultados de contenido de bixina (%)

Replicas	ABS -503 nm	ABS-404nm	Bixina (%)	% bixina promedio
B1	0.204	0.136	20.37	20.21±
B2	0.205	0.134	20.28	
B3	0.202	0.132	19.98	

CAPÍTULO VI: DISCUSION

6.1. Rendimiento de pigmento (%)

Los valores de rendimiento obtenidos (9.5%) superan al rendimiento obtenido por Devia et al (2003), y hace notar que el ultrasonido tiene mejor efectividad (1.5 % más) en extraer el pigmento de achiote (Chemat et al. 2011), así mismo a demostrado ser mucho más simple, más rápida y más eficaz que otros métodos convencionales, como también supero en 1.7% al método aplicado por Balarezo (2018) muy a pesar que haya empleado etanol al 80%, y posiblemente porque hubo pérdidas en las etapas que considero para extraer el pigmento de achiote.

Es fundamental mencionar que la búsqueda de tecnologías no contaminantes y consideradas “verdes”, se ha encontrado que la extracción con US llena estos requisitos ya que emplea menos solvente y energía. Asimismo, esta metodología es considerada actualmente emergente (Chemat et al, 2011). Mason (2008) se fundamenta en la aceleración de la transferencia de masa y calor, de manera que interaccionan con el material alterando sus propiedades físicas y químicas, el efecto de cavitación favorece, La liberación de los compuestos a extraer y mejora el transporte de masa debido al rompimiento de la pared celular. Sin embargo, el uso de US como tecnología de extracción se ha reportado como la más ventajosa que el emplear procesos tradicionales en extracción.

Según (Martínez Rodríguez, 2005) en referencia al valor de R-cuadrado ajustado ,el investigador debe preocuparse por la relevancia lógica o teórica que tienen las variables explicativas para la variable endógena y por su significación estadística. Si en este proceso se obtiene un valor de R^2 elevado, muy bien, aunque ello no es evidencia a favor del modelo, y si este valor es pequeño, esto no significa que el modelo sea necesariamente malo. Respecto a esta cuestión, señalar, sin entrar en más detalles, que la práctica

de seleccionar un modelo con base en R^2 más elevada puede tener como consecuencia la introducción en el modelo de lo que se conoce como sesgo preprueba. En cuestiones que, en ocasiones, no son tenidas en cuenta por el investigador, quien basándose exclusivamente en el valor de R^2 como única medida del grado de bondad del ajuste realizado y, por tanto, en una interpretación errónea de este coeficiente decide trabajar con el modelo que proporciona un máximo valor de R^2 . De nuevo un mal uso de este coeficiente puede conducir a conclusiones no acertadas.

Los efectos del ultrasonido están asociados principalmente al fenómeno de la cavitación. Este fenómeno es un proceso físico donde las burbujas de gas al interior de un medio líquido son creadas y posteriormente su tamaño aumenta y finalmente ocurre una implosión. Debido a la cavitación, aumentó la disrupción en las células de la semilla de achiote y fue posible obtener un mejor contacto con el solvente etanol.

En consecuencia, las tasas de transferencia de masa se elevan y el contenido celular se difundió rápidamente desde el interior de la matriz al medio de extracción con etanol.

El tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) también tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento de extracción, ya que a mayores tiempos de extracción es posible obtener mayores rendimientos de extracción. El contacto más prolongado entre la materia prima y el solvente de extracción (etanol) permite que una mayor cantidad de compuestos de la matriz se solubilicen y se difundan a través del solvente.

El aumento de la temperatura en ultrasonido (TU) y concentración de etanol (CE) también tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento de extracción. Sin embargo, hay que tener cuidado con el uso de altas temperaturas ya que pueden comprometer la estabilidad de los compuestos bioactivos y generar la extracción de compuestos indeseados de la matriz.

6.2. Intensidad de color (IC)

Según (Elejalde, 1999), La determinación de las características cromáticas de los vinos, se realiza tras la medida de la absorbancia a dos longitudes de onda 520 nm y 420 nm. Sugiere que se calcule la densidad de color (definida como la suma de las absorbancias a 520 nm y 420 nm) como índice "intensidad de color", y el índice "tonalidad" (definida como la razón entre las absorbancias a 420 nm y 520 nm) expresando el matiz de color. Bajo esta metodología de esta bibliografía de aplico en nuestra investigación, ya que no se pudo encontrar una metodología en específico para pigmento de achiote (*bixa orellana*).

Por otro lado en cuanto a los autores antes indicados con respecto a la metodología aplicada, plantean una metodología para determinación de la intensidad de color para los vinos, estas referencias bibliográficas se utilizó para el trabajo de investigación, ya que no se tiene mucha información con respecto a la determinación de color del achiote extraído por ultrasonido de potencia, por consiguiente nuestra máxima intensidad de color estará acorde a la máxima absorbancia obtenida por el espectrofotómetro.

En base a la Normativa Europea dicta que la Intensidad Colorante, representada como IC, debe medirse como la suma de las absorbancias a las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm, correspondientes a los colores de la luz absorbida violeta, verde y naranja. Sin embargo, existen diversos autores como (Puras et al., 1995), realizaron el cómputo de la Intensidad Colorante de un vino considerando únicamente las absorbancias a 420 y 520 nm de longitud de onda, IC', teniendo en cuenta que el máximo de absorción de los vinos tintos y claros se halla en torno a 520 nm, debido a los antocianos y que presentan un mínimo a 420 nm debido fundamentalmente a los taninos.

Cabe mencionar que la intensidad de color está en función a la absorbancia según la metodología aplicada en nuestra investigación, nuestros resultados obtenidos reflejan que se tendrá una mejor intensidad de color o índice de color con los siguientes parámetros óptimos de tiempo residencia en ultrasonido (TRU) 10.36 minutos; temperatura en ultrasonido (TU) 41.29°C y concentración de etanol de 76.59°GL, obteniendo un valor óptimo de 5.39. este valor representa que se tendrá una intensidad de color máxima siempre en cuando se trabajen con los parámetros óptimos encontrados con la tecnología de extracción del pigmento con ultrasonido de potencia, en consecuencia, si se usa la metodología tradicional de extracción de pigmento de achiote, no se estaría llegando a la intensidad de color (IC) máximo.

6.3. Contenido de bixina (%)

De acuerdo a Casanova D.et (2005), obtuvo una concentración de bixina de 16 % empleando como método de extracción biocatalizadores (enzimas), y comparando con los resultados obtenidos, se logró mejorar la concentración a 20.21% de bixina, considerando como parámetros óptimos de tiempo residencia en ultrasonido (TRU) 10.40 minutos; temperatura 43.40 °C y concentración de etanol 77.66°GL, logrando superar en 4.21 %, respecto al valor obtenido por Casanova D.et (2005), por lo que enfatizamos que el uso del ultrasonido de potencia para la obtención del contenido de bixina(%) es una alternativa a ser considerada en procesos similares. Asimismo, el resultado obtenido, superó en 9.21% al efectuado por a salva B (1997).

CONCLUSIONES

- ❖ Se logró optimizar 1.65 % de rendimiento a diferencia de los métodos convencionales., bajo los parámetros de tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) 10.40 min; temperatura en ultrasonido (TU) 43.40 °C y concentración de etanol 77.66 °GL.
- ❖ Se logró maximizar el índice de color a 5.39, bajo los parámetros de tiempo residencia en ultrasonido (TRU) 10.36 minutos; temperatura en ultrasonido (TU) 41.29 °C y concentración de etanol de 76.59 °GL.
- ❖ Se llegó a optimizar 6.71 % de contenido bixina con la aplicación del ultrasonido de potencia, a comparación de los métodos tradicionales de extracción de pigmento de achiote.

RECOMENDACIONES

Del estudio se recomienda:

- ❖ Para futuras investigaciones considerar como punto de partida mayores tiempos de residencia de las semillas de achiote en ultrasonido, considerar también el coeficiente de conductividad térmica del material vidrio (matraz Erlenmeyer) y variaciones superiores de concentración de etanol para lograr mejores resultados.
- ❖ Desarrollar metodologías para cuantificar el contenido de bixina y norbixina, con técnicas más sofisticadas (HPLC, FTIR, etc.).
- ❖ El uso del ultrasonido de potencia será relevante para futuras investigaciones referentes a este tipo, ya que este equipo contribuye a la innovación en la extracción de pigmento de achiote, existe una serie de investigaciones que tendría que realizar utilizando el ultrasonido. Debido a que existen pocos trabajos de investigación aplicando el ultrasonido de potencia en la extracción de pigmento de achiote. Más aun en la optimización de parámetros óptimos, lo cual repercutirá para seguir investigando con la aplicación de esta metodología de extracción, asimismo en el escalamiento en la optimización e encontrar el punto óptimo e realizar el análisis de cordillera fuera de la región experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcarraz, T. (2011). Análisis Químico Instrumental. Ayacucho-Perú: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.
- Avila y Remond. (1986). El achiote y su industrialización t. Universidad Lima - Perú. 25p. Agraria La Molina.
- Arias, A. (2011). Fundamentos y Aplicaciones de Transferencia de Masa 1a ed. Ayacucho - Perú: Mafer servicios generales.
- Balarezo, R. (2018). Universidad Nacional De San Martín - Tarapoto. Estrategias de Promoción y Notoriedad de Marca de La Empresa Veronika Solar CateringC Company de La Ciudad de Tarapoto Año 2017. Tesis, Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Administración, 1–57.
- Benítez T, 2008, propuesta para la obtención de extractos a ser utilizados como indicadores ácido-base en valoraciones de medio acuoso y no acuoso a partir de *bixa orellana*. (Achiote), e, *indigofera suffruticosa mill* (añil). Universidad de el Salvador, san salvador centro américa.
- Canabio, (2005). Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Dirección de Mercadeo y Agroindustria Área Desarrollo de Producto Ficha Técnica de industrialización de ACHIOTE (*bixa orellana*).
- Casanova D., Ortiz M; (2005). Extracción de bixina de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L). Con biocatalizadores. Cali-Colombia: Grupo de Investigación. Universidad del Valle. 2005. 315 p.
- Chemat, F., Zill e, H., Y Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry, 18(4), 813-835

- Clingingsmith, T. W. (1984). Series flow tandem fan: A high-speed V/STOL propulsion concept. SAE Technical Papers, 1–8.
- Córdoba V.1987. “El achiote: Cultivo, Beneficio y Posibilidades de exportación”. Revista ESSO Agrícola. Vo. 34. No. 1. pp. 3-7.
- Deng, Y Zhao, Y. (2008). Effects of pulsed-vacuum and ultrasound on the osmodehydration kinetics and microstructure of apples (Fuji). Journal of Food Engineering, 85(1), 84-93
- 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.
- Elejallde, E. (1999). Aplicación de métodos espectroscópicos al estudio de las características cromáticas de los componentes polifenólicos presentes en vinos. Biblid, 5, 39–66.
- Fernández L, 2015. Extracción alcalina de la norbixina a partir de la semilla de achiote (*bixa orellana*) y su aplicación en la elaboración de salchicha huachana. Repositorio de tesis, Universidad Católica de Santa María Arequipa –Perú pág. 5-7.
- Gallegos J, (2005). “obtención del colorante de la semilla de achiote (*bixa orellana*) utilizando microorganismos celulolíticos universidad autónoma agraria “Antonio narro” Buenavista, saltillo, coahuila, México. pág. 12-13.
- García Y, Núñez M, Rodríguez J, Borrego I, Cruz L (2008). Efecto de los parámetros en la extracción alcalina de colorante de bija” Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia Ciencia y Tecnología de Alimentos Vol. 18, La Habana.

- Jaramillo M, Muños M, (1992). Extracción del colorante de achiote. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Medellín: Universidad Nacional. Facultad Nacional de Minas. Departamento de Procesos Químicos.
- Laboratorio de Química Agrícola de Centa. Manual Técnico del Achiote, *Bixa orellana*.
- Martínez Rodríguez, M. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Juridico y Economico Escorialense*, 38, 315–331
- Mosquera, (1989). Factibilidad técnica e industrial de la extracción del colorante del achiote. Trabajo de grado ingeniero químico. Medellín: Universidad de Antioquia. Facultad de ingeniería
- Mulet, A. Benedito J.bon, J san juan, N. 1999. “revisión: ultrasonido de baja intensidad en tecnología de alimentos” *food sciencie and technology internacional* 5(4):285-297.
- Muñoz A, (2015). Efecto de los ultrasonidos de potencia en la despolimerización de taninos procedentes de semillas de uva *Vitis vinífera*. Ciencias De La Alimentación Universidad Autónoma De Madrid Facultad De Ciencias, Departamento De Química Física Aplicada, Madrid.
- Núñez H, Echeverre J (2017). “Evaluación de la extracción de bixina a partir de semillas de achiote (*bixa Orellana l.*) Aplicando métodos físicos y enzimáticos Tesis Universidad Señor De Sipan.
- Payes Edy, Cano T, Mérida J (.2017).obtención y caracterización fisicoquímica del extracto colorante del achiote (*bixa orellana l.* Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ingeniería Escuela de Ingeniería Química Perú Cóndor. Artículos Sobre la Semilla de Achiote.

- Pérez, M. y Becerra, R. (2003). El achiote. biodiversitas, boletín bimestral de
- Reyes Zoila C (2015). Extracción y evaluación del colorante natural de achiote (bixa Orellana.) como sustituto del colorante e-102 amarillo no. 5 (tartracina) en la elaboración de un yogurt”. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Salvá, B;(1997) Utilización de enzimas en la extracción de colorante a partir de semilla de achiote (Bixa orellana L). Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina – UNALAM.388.
- Santos Fredy, q. t. (2019). Evaluación de los parámetros de extracción de la norbixina a partir de las semillas de achiote (Bixa orellana L.). Escuela Profesional De Ingeniería Agroindustrial Evaluación, 170.
- Vázquez J M (2005). Obtención y evaluación de rendimientos en la extracción de colorante bixina mediante tratamiento enzimático a partir de semillas de achiote (Bixa orellana). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuil.orellana.
- Vilma, H. (2014). El achiote (*Bixa orellana*) producción, obtención del colorante, aplicación en los alimentos pág.1–7.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos en la extracción de pigmento de achiote para rendimiento.

Tratamiento	Tiempo (min)	Temperatura (C°)	Concentración		Peso final(g)	Peso inicial(g)	Rendimiento R (g)
			de etanol (°GL)				
T1	5	30	80		48.53	48.11	0.42
T2	9	30	80		48.63	47.68	0.95
T3	5	40	80		50.2	49.44	0.76
T4	9	40	80		52.89	50.95	1.94
T5	5	30	90		49.34	48.63	0.71
T6	9	30	90		49.46	48.85	0.61
T7	5	40	90		52.22	51.31	0.91
T8	9	40	90		49.29	47.85	1.44
T9	3.63641	35	85		49.65	48.62	1.03
T10	10.3636	35	85		48.74	48.17	0.57
T11	7	26.591	85		49.55	48.89	0.66
T12	7	43.409	85		50	49.26	0.74
T13	7	35	76.591		49.25	47.82	1.43
T14	7	35	93.409		48.38	47.83	0.55
T15	7	35	85		51.98	51.02	0.96
T16	7	35	85		48.41	47.83	0.58
T17	7	35	85		47.94	47.35	0.59
T18	7	35	85		49.76	48.81	0.95
T19	7	35	85		47.99	47.3	0.69
T20	7	35	85		48.94	48.17	0.77

Anexo 2. Resultados obtenidos en la extracción de pigmento de achiote para índice de color (IC)

Tratamiento	Tiempo (min)	Temperatura (C°)	Concentración de etanol (°GL)	Longitud-		
				Longitud - Onda 420 nm ABS	Onda 520nm ABS	IC
T1	5	30	80	2.327	0.749	3.076
T2	9	30	80	2.338	1	3.448
T3	5	40	80	2.312	0.666	2.978
T4	9	40	80	2.322	0.746	3.068
T5	5	30	90	2.3	0.591	2.891
T6	9	30	90	2.046	0.511	2.557
T7	5	40	90	2.06	0.448	2.508
T8	9	40	90	2.06	0.483	2.543
T9	3.63641	35	85	2.216	0.79	3.006
T10	10.3636	35	85	2.191	0.757	2.948
T11	7	26.591	85	2.276	0.821	3.097
T12	7	43.409	85	2.22	0.695	2.915
T13	7	35	76.591	2.323	0.975	3.298
T14	7	35	93.409	2.259	0.845	3.104
T15	7	35	85	1.677	0.574	2.251
T16	7	35	85	1.587	0.226	1.813
T17	7	35	85	1.217	0.251	1.468
T18	7	35	85	1.039	0.222	1.261
T19	7	35	85	1.697	0.116	1.813
T20	7	35	85	1.937	0.276	2.213

Anexo 3. Tabla de efectos estimados para RDTO

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	4.11369	0.30105	
A:tiempo	1.04726	0.399479	1.0
B:temperatura	1.18954	0.399479	1.0
C:GL	-1.21349	0.399479	1.0
AA	-0.224645	0.388881	1.01827
AB	0.525	0.521945	1.0
AC	-0.525	0.521945	1.0
BB	-0.16277	0.38888	1.01827
BC	-0.0125	0.521945	1.0
CC	1.65801	0.38888	1.01827

Anexo 4. Coeficiente de regresión para RDTO

Coeficiente	Estimado
constante	232.72
A:tiempo	1.96744
B:temperatura	0.184333
C:GL	-5.5661
AA	-0.0280806
AB	0.02625
AC	-0.02625
BB	-0.00325541
BC	-0.00025
CC	0.0331603

Anexo 5. Tabla de camino de máximo ascenso para RDTO

<i>tiempo</i>	temperatura	GL	Predicción para RDTO
7.0	35.0	85.0	4.11369
8.0	37.4257	79.8213	6.33734
9.0	39.1296	70.3191	14.892
10.0	40.397	58.06	35.1122
11.0	41.4226	44.2431	70.3899

Anexo 6. Tabla de efectos estimados para IC

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	1.83063	0.154777	
A:tiempo	0.0354578	0.205381	1.0
B:temperatura	0.0880082	0.205381	1.0
C:GL	-0.444637	0.205381	1.0
AA	0.607501	0.199933	1.01827
AB	0.28075	0.268344	1.0
AC	-0.39125	0.268344	1.0
BB	0.673967	0.199932	1.01827
BC	0.24475	0.268344	1.0
CC	0.795942	0.199932	1.01827

Anexo 7. Coeficiente de regresión para IC

Coeficiente	Estimado
constante	146.849
A: tiempo	0.117237
B: temperatura	-1.44909
C: GL	-2.78505
AA	0.0759376
AB	0.0140375
AC	-0.0195625
BB	0.0134793
BC	0.004895
CC	0.0159188

Anexo 8. Tabla de Camino de Máximo Ascenso para IC

Predicción para			
Tiempo	Temperatura	GL	IC
7.0	35.0	85.0	1.83063
8.0	35.4122	77.164	3.39049
9.0	35.2366	71.4163	6.21859
10.0	34.9496	66.0226	10.2334
11.0	34.6036	60.8061	15.3914

**NORMA TÉCNICA
PERUANA**

**NTP 209.256
1991 (Revisada el 2010)**

Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales no Arancelarias-INDECOPI
Calle de La Prosa 138. San Borja (Lima 41) Apartado 145
Lima, Perú

**ACHIOTE Y SUS DERIVADOS. Determinación de bixina
y de norbixina**

1. NORMAS A CONSULTAR

1.1 Para la aplicación de esta Norma Técnica Peruana no es necesaria la consulta específica de ninguna otra.

2. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2.1 La presente Norma establece los métodos para determinar el contenido de bixina (% m/m) y de norbixina (% m/m) en el achiote y sus productos derivados en el sentido siguiente:

Producto	Determinación	Método
- Semilla de achiote	Bixina	Cloroformo
- Bixina en cristales	Bixina	Cloroformo
- Extracto de achiote en polvo (véase apéndice O)	Bixina	Cloroformo
- Norbixina en polvo	Norbixina	Hansen

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

3.1 Método del cloroformo

3.1.1 El método se basa en la extracción del colorante bixina en el solvente orgánico cloroformo y su posterior determinación espectrofotométrica a una longitud de onda de 503 nm y 404 nm .

3.2 Método de Hansen

3.2.1 El método se basa en la solubilidad del colorante norbixina en un medio alcalino y su posterior determinación espectrofotométrica a una longitud de onda de 453 nm.

4. APARATOS

4.1 Espectrofotómetro, capaz de emitir longitudes de onda a 453 nm, 404 nm y 503 nm .

4.2 Balanza analítica de una precisión de 0,1 mg .

4.3 Agitador magnético con calentamiento controlado.

4.4 Termómetro con rango de 0 °C a 100 °C .

4.5 Matraces aforados de 50 ml, 100 ml y 200 ml de capacidad.

4.6 Pipetas de 0,1 ml, 1 ml y 10 ml de capacidad.

4.7 Vasos de precipitado de 500 ml y 1 000 ml .

4.8 Probetas de 50 ml y 100 ml .

5. REACTIVOS Y MATERIALES

5.1 Cloroformo (p.a.)

A
VI

5.2 Solución de hidróxido de potasio al 0,33 % m/v (KOH). Se pesan 0,33 g de KOH anhidro (p.a.) y se lleva a un volumen de 100 ml con agua destilada.

5.3 Solución de hidróxido de potasio al 45 % m/v (KOH). Se pesan 45 g de KOH anhidro (p.a.) y se lleva a un volumen de 100 ml con agua destilada.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

6.1 La muestra se lleva al ensayo tal cual se presenta.

7. PROCEDIMIENTO*

7.1 Determinación de bixina (método de cloroformo)

7.1.1 En semilla

7.1.1.1 Se pesan 10 g de muestra en una balanza analítica y se transfiere a un matraz volumétrico de 200 ml .

7.1.1.2 Se adiciona 100 ml de cloroformo.

7.1.1.3 Se procede a agitar el contenido del matraz con un agitador magnético por un tiempo aproximado de 40 min . Si se nota que transcurrido este tiempo la semilla aún contiene colorante, se continúa la extracción hasta que se observe que dicho colorante haya sido extraído completamente.

7.1.1.4 Luego se lleva a volumen con cloroformo y se homogeniza bien la mezcla.

* Se recomienda cubrir el matraz volumétrico con papel (ejemplo: papel aluminio) para protegerlo de la luz durante el ensayo tanto para la determinación de bixina como para la de norbixina.

7.1.1.5 Se toma 2 ml de la solución anterior y se lleva a un matraz volumétrico de 50 ml . Se enrasa a volumen con cloroformo.

7.1.1.6 Se lee la absorbancia a 503 nm y a 404 nm empleando cloroformo como blanco de referencia.

7.1.2 En bixina en cristales

7.1.2.1 Se pesan 100 mg de muestra en un matraz volumétrico de 100 ml .

7.1.2.2 Se adiciona 50 ml de cloroformo.

7.1.2.3 Luego se procede a agitar el contenido del matraz con un agitador magnético por un tiempo aproximado de 15 min .

7.1.2.4 Luego se lleva a volumen con cloroformo y se homogeniza bien la mezcla.

7.1.2.5 Se toma 4 ml de la solución anterior y se le lleva a un matraz volumétrico de 50 ml . Se enrasa con cloroformo y se agita.

7.1.2.6 Se toma 2 ml de la solución anterior y se le lleva a un matraz volumétrico de 50 ml . Se enrasa con cloroformo y se agita.

7.1.2.7 Se lee la absorbancia a 503 nm y a 404 nm empleando cloroformo como blanco de referencia.

7.1.3 En extracto de achiote en polvo.

7.1.3.1 Se pesan 1 g de muestra en un matraz volumétrico de 100 ml .

7.1.3.2 Se adiciona 50 ml de cloroformo.

7.1.3.3 Luego se procede a agitar el contenido del matraz con un agitador magnético por un tiempo aproximado de 15 min .

7.1.3.4 Luego se lleva a volumen con cloroformo y se homogeniza bien la mezcla.

7.1.3.5 Se toma 1 ml de la solución anterior y se lleva a un matraz volumétrico de 100 ml . Se enrasa con cloroformo y se agita.

7.1.3.6 Se toma 5 ml de la solución anterior y se lleva a un matraz volumétrico de 100 ml . Se enrasa con cloroformo y se agita.

7.1.3.7 Se lee la absorbancia a 503 nm y a 404 nm empleando cloroformo como blanco de referencia.

7.2 Determinación de norbixina (método de Hansen)

7.2.1 Se pesan 5 g de muestra en un matraz volumétrico de 1 L de capacidad.

7.2.2 Se agrega 30 ml de solución de hidróxido de potasio (KOH) a 45 % .

7.2.3 Se agrega aproximadamente 400 ml de agua destilada.

7.2.4 Se cubre la boca del matraz con papel aluminio.

7.2.5 Se calienta la solución con continuo movimiento hasta 90 °C – 92 °C .

7.2.6 Se enfría hasta temperatura ambiente en forma rápida (se recomienda enfriar en un baño de agua con hielo).

7.2.7 Se lleva a volumen de 1 L con agua destilada.

7.2.8 Se toma 1 ml de la solución anterior (apartado 7.2.7) y se le lleva a un matraz volumétrico de 1 000 ml . Luego se enrasa, a volumen, con solución de hidróxido de potasio (KOH) 0,33 % .

7.2.9 Se lee la absorbancia a 453 nm empleando solución de KOH 0,33 % como blanco de referencia.

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1 Método de cálculo y fórmula

8.1.1 Para calcular el porcentaje total de carotenoides expresado como bixina se aplica la fórmula siguiente:

$$\frac{|(A_{503} + A_{404}) - 0,256(A_{503})| \times 100}{cbk}$$

Donde:

- A = es la absorbancia medida a longitudes de onda de 404 nm y 503 nm
- b = es el diámetro del tubo en cm (1 ml)
- *c = es la concentración en g/l de la solución mencionada, según el caso, (ejemplo en: 7.1.1.5 - c = 2 g/l - en 7.1.2.6 - c = 0,0032 g/l - en 7.1.3.6 - c = 0,005 g/l)
- k = es el coeficiente de extinción en l/g . cm (282,6)

8.1.2 Para calcular el porcentaje total de carotenoides expresado como norbixina se aplica la fórmula siguiente:

$$\frac{(A_{453})(100)}{bck}$$

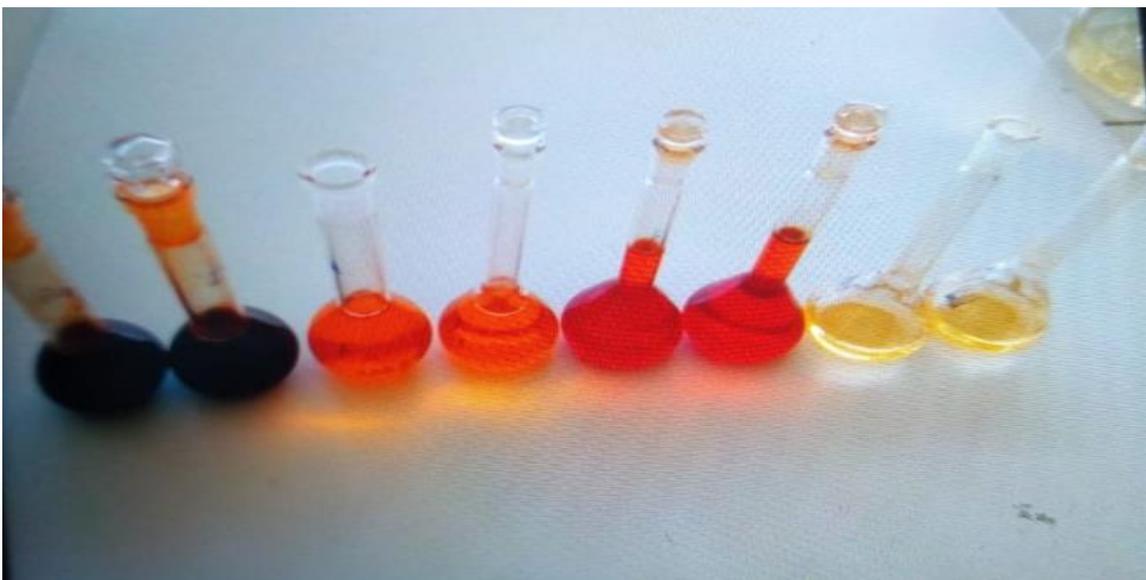
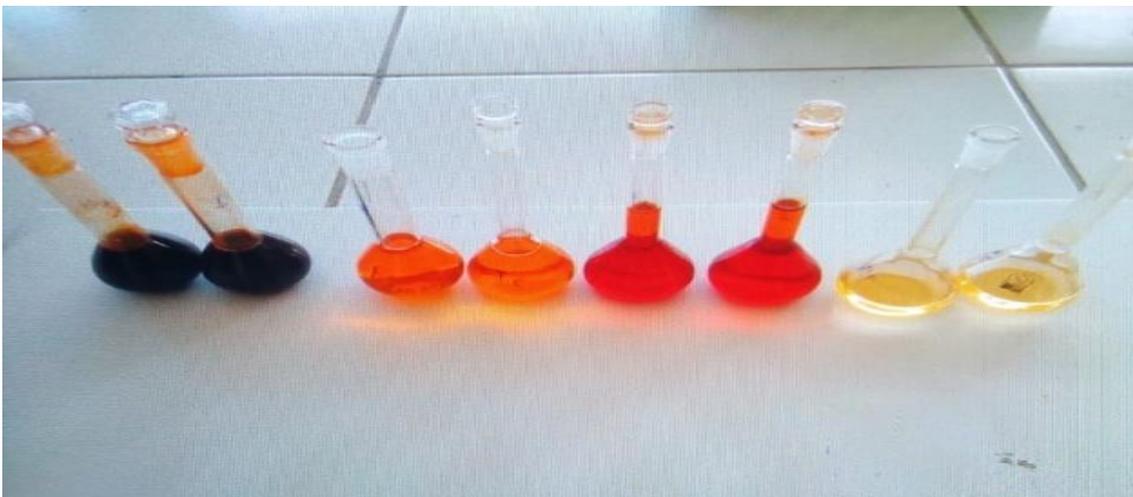
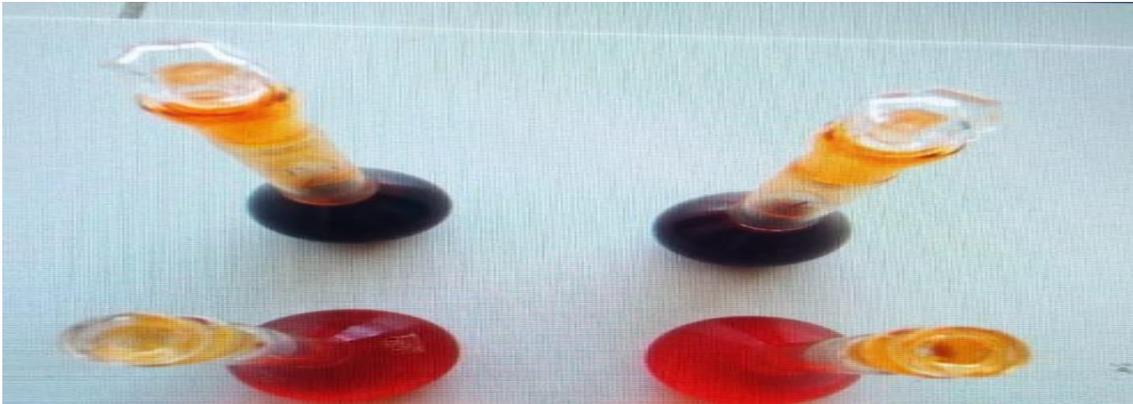
Donde:

- A = es la absorbancia medida a una longitud de onda de 453 nm
- b = es el diámetro del tubo en cm (1 cm)
- *c = es la concentración en g/l de la solución mencionada en apartado 7.2.8 (ejemplo: 0,05 g/l)
- k = es el coeficiente de extinción en l/g . cm (347,3)

Anexo 10. Fotografías del extracto de achiote obtenido



Anexo 11. Fotografías de soluciones con pigmento para obtención de índice de color (IC)



Anexo 12. Matriz de consistencia

	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	DEFINICIÓN DE OPERACIONES			RECOLECCIÓN DE DATOS	
				VARIABLES	INDICADOR	DISEÑO DE MÉTODO	TÉCNICA	INSTRUMENTO
G	-¿Cuál es el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU)(min), temperatura en ultrasonido (TU) (°C) y concentración de etanol (°GL), para la máxima extracción de pigmentos de la semilla de achiote (<i>Bixa Orellana</i>) por ultrasonido de potencia?	Establecer los parámetros óptimos para la extracción de pigmento de la semilla achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia	La temperatura en ultrasonido, tiempo de residencia en ultrasonido y la Concentración de etanol permite optimizar el, rendimiento, intensidad de color y contenido de bixina de las semilla de achiote asistido por ultrasonido.	Tiempo de residencia en ultrasonido	5 min y 9 min	Experimental Y Optimización	Instrumental	Cronometro
				Temperatura en ultrasonido	30 °C Y 40 °C		Instrumental	Termómetro
				Concentración de etanol	80 °GL y 90 °GL		Instrumental	Alcoholímetro

E1	<p>Problemas Específicos</p> <p>¿Cuál es el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) (min), temperatura en ultrasonido (TU) (°C) y concentración de etanol (°GL) para la máxima extracción expresado en rendimiento de pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia?</p>	<p>Objetivos específicos</p> <p>Determinar el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU)(min), temperatura en ultrasonido (TU) (°C) y concentración de etanol (°GL) para la máxima extracción expresado en rendimiento de pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia.</p>	<p>Hipótesis específicos</p> <p>-Los valores óptimos de rendimiento en la extracción de pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia, se dan a mayores concentraciones de etanol, temperatura en ultrasonido y tiempo de residencia en ultrasonido.</p>	Rendimiento	Porcentaje (%)	Experimental y Optimización	Pesado	Balanza analítica
E2	<p>¿Cuál es el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) (min), temperatura en ultrasonido (TU)(°C) y concentración de etanol (°GL) que presente extracción de pigmento en espectrofotometría del pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia?</p>	<p>Determinar el tiempo de residencia en ultrasonido (TRU) (min), temperatura en ultrasonido (TU) (°C) y concentración de etanol (°GL) que presente mejor intensidad de color en espectrofotometría del pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia.</p>	<p>Los valores óptimos de intensidad de color en espectrofotometría en la extracción de pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia, se dan a mayores concentraciones de etanol, temperatura en ultrasonido y tiempo de residencia en ultrasonido.</p>	Intensidad de Color	Δa^* Absorbancia	Experimental Y Optimización	Instrumental	Espectrofotómetro

E3	¿Cuál es el contenido de bixina del tratamiento que presente mejor color y mayor rendimiento de pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa Orellana</i>) por ultrasonido de potencia?	Determinar el contenido de bixina del tratamiento que presente mejor color y mayor rendimiento de pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia.	Los valores óptimos de contenido de bixina en la extracción de pigmento de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana</i>) por ultrasonido de potencia. Se dan a mayores concentraciones de etanol, temperatura en ultrasonido y tiempo de residencia en ultrasonido.	Contenido de Bixina	Δa^* Absorbancia	Experimental Y Optimización	Instrumental	Espectrofotómetro
----	---	---	--	---------------------	--------------------------	-----------------------------------	--------------	-------------------