



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Programa de Posgrado en Ciencias Químicas

**CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE BIXINA SEGÚN
EL MÉTODO DE OBTENCIÓN A PARTIR DE LA SEMILLA
DE *Bixa orellana* Linn (ACHIOTE), Y ESTUDIOS DE SU
ESTABILIDAD FOTO Y SONOQUÍMICA**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

CÁRDENAS GONZÁLEZ OSWALDO ELIECER

DIRECTORES

DRA. DENISSE ATENEA DE LOERA CARRERA

DR. ANTONIO DE LEÓN RODRÍGUEZ



San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2023

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Fotoquímica y Síntesis de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí bajo la dirección de la Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera, y en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez. Parte de los estudios experimentales se realizaron en el Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP con el apoyo de la Dra. Lluvia Itzel López López y el Dr. Braulio Cervantes Paz, y en el Laboratorio de Fotocatálisis de la FCQ de la UASLP bajo la asesoría del Dr. Edgar Moctezuma Velázquez

El programa de Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), registro 00520. Durante el desarrollo del presente proyecto de investigación el autor de esta tesis de Doctorado recibió una beca académica del CONAHCyT con número (CVU) 945756.



Caracterización Del Extracto De Bixina Según El Método De Obtención A Partir De La Semilla De *Bixa Orellana Linn* (Achiote), y Estudios De Su Estabilidad Foto Y Sonoquímica by Oswaldo Eliecer Cárdenas González is licensed under a Creative Commons Reconocimiento- No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional License



Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 22 de mayo de 2023

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada “Caracterización del extracto de bixina según el método de obtención a partir de la semilla de *Bixa orellana* Linn (achiote), y estudios de su estabilidad foto y sonoquímica” presentada por el autor Oswaldo Eliecer Cárdenas González. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Químicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 13% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera

Coordinadora Académica del Posgrado en Ciencias Químicas

San Luis Potosí, SLP.

5 de junio de 2023

**Comité Académico del Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas de UASLP**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de Doctorado M.C. Oswaldo Eliecer Cárdenas González, titulada “Caracterización del extracto de bixina según el método de obtención a partir de la semilla de *Bixa orellana* Linn (achiote), y estudios de su estabilidad foto y sonoquímica”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación. El examen de grado tendrá lugar el próximo 26 de junio del presente año, a las 9 horas en la sala de exámenes profesionales de la UASLP.

Atentamente

Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera

Directora de tesis

Dr. Antonio de León Rodríguez

Co-Director de tesis

Dra. Elisa Leyva Ramos

Comité tutelar extendido



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Programa de Posgrado en Ciencias Químicas

**CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE BIXINA SEGÚN
EL MÉTODO DE OBTENCIÓN A PARTIR DE LA SEMILLA
DE *Bixa orellana* Linn (ACHIOTE), Y ESTUDIOS DE SU
ESTABILIDAD FOTO Y SONOQUÍMICA**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

**CÁRDENAS GONZÁLEZ OSWALDO ELIECER
SINODALES**

DRA. DENISSE ATENEA DE LOERA CARRERA

DR. ANTONIO DE LEON RODRÍGUEZ

DRA. ELISA LEYVA RAMOS

DR. RODOLFO GONZÁLEZ CHÁVEZ

DRA. LLUVIA ITZEL LÓPEZ LÓPEZ

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2023



CONTENIDO

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice.....	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	viii
Índice de esquemas	ix
Resumen	x
Summary.....	xii

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado a mi familia, especialmente a mis padres, el Sr. Oswaldo Cárdenas Castro y la Sra. Fanny Elvira González Olarte, a mi esposa Carolina Chinome Moreno, a mis hijos Michelle, Samir, Andreia, Jared y a mi chiquitica Skarlett.

A mis hermanas Fanny Elizabeth y Andrina Margarita.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología** (CONAHCYT), por la beca otorgada 945756 que me permitió desarrollar mis estudios de doctorado.

A la **Facultad de Ciencias Químicas** de la UASLP por permitirme ser parte de sus estudiantes de posgrado.

Al **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.**

A la **Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera** por sus enseñanzas, su apoyo y por permitirme trabajar en su grupo de investigación.

Al **Dr. Antonio de León Rodríguez** por su valiosa aportación al proyecto de investigación, sus enseñanzas y su confianza.

A la **Dra. Lluvia López López** por sus enseñanzas, su apoyo y sus valiosas aportaciones a este trabajo de investigación.

Al Dr. Edgar Moctezuma Velázquez por su confianza y apoyo.

A mis padres Oswaldo Cárdenas Castro y Fanny Elvira González Olarte por los valores que me inculcaron, sus enseñanzas y su esfuerzo durante toda mi vida para apoyarme.

A mi hermana Adriana, que siempre ha estado conmigo así este lejos

A mis compañeros de posgrado y de laboratorio: M.C Linda Patricia Monreal

Medrano, Dra. Carely del Socorro Arjona Ruiz, MC. Cesar Iván Corpus Mendoza, I.Q.

Diego Isidro Zapata, Dr. Saúl Eduardo Noriega Medellín,

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Bixa orellana</i> Linn (Achiote)	1
1.2. Bixina	4
1.2.1. Rutas de biosíntesis de bixina	8
1.3. Extracción de annatto y técnicas de purificación de bixina	10
1.3.1. Tecnologías clásicas para la obtención de annatto	10
1.3.1.1. Extracción por contacto directo	11
1.3.1.2. Extracción Soxhlet.....	12
1.3.2. Tecnologías verdes para la obtención del annatto.....	12
1.3.2.1. Extracción mecánica	14
1.3.2.2. Extracción asistida por ultrasonido.....	14
1.3.2.3. Extracción asistida por microondas.....	15
1.3.2.4. Extracción asistida por fluido supercrítico	15
1.3.3. Aislamiento y purificación de bixina	16
1.3.4. Degradación de componentes del annatto y de bixina	18
1.3.4.1. Degradación térmica	19
1.3.4.2. Degradación por energía radiante.....	20
1.3.4.3. Degradación por ambientes húmedos.....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
5.1. Objetivo general.....	26
5.2. Objetivos específicos	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. Material vegetal.....	27
6.2. Extracción annatto	27
6.2.1. Extracción asistida por microondas (MW).....	27
6.2.2. Extracción asistida por ultrasonido (US)	28
6.2.3. Extracción por contacto directo (CD).	28
6.2.4. Rendimiento de annatto por gravimetría.....	29
6.2.5. Identificación, cuantificación de Z-bixina y apocarotenoides por UHPLC	29
6.2.6. Análisis estadístico	30

6.3.	Efecto de la radiación sobre Z-bixina	30
6.3.1.	Irradiación de Z-bixina en solución de cloroformo.....	30
6.3.2.	Radiación Solar de Z-bixina en acetonitrilo.....	30
6.3.3.	Irradiación de Z-bixina en estado sólido	31
6.3.4.	Monitoreo de la reacción fotoquímica de Z-bixina.....	31
6.3.4.1.	Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	31
6.3.4.2.	Infrarrojo (IR)	31
6.3.4.3.	Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).....	31
6.3.4.4.	Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo, UPLC (Q-TOF) ...	31
6.3.4.5.	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	32
6.4.	Estudio de la radiación ultrasónica en la elaidinización y degradación de Z- bixina.....	32
6.4.1.	Estudio ultrasónico de Z-bixina con solventes orgánicos clorados	32
6.4.2.	Estudio ultrasónico de Z-bixina con acetonitrilo	33
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1.1.	Análisis gravimétrico del annatto	35
7.1.2.	Análisis por UHPLC del annatto.....	36
7.1.3.	% Z-bixina presente en el annatto	38
7.1.4.	% E-bixina presente en el annatto	41
7.2.	Estudio fotoquímico de Z-bixina	42
7.2.1.	Análisis UV-Vis	45
7.2.2.	Análisis UHPLC	46
7.2.3.	Espectroscopia FTIR.....	50
7.2.4.	Espectrometría de masas	51
7.2.5.	Espectroscopia de RMN.....	52
7.2.6.	Estudio teórico de la elaidinización de Z-bixina.....	55
7.2.7.	Estudio de la degradación de E-bixina.....	55
7.3.	Estudios sonoquímicos y cinéticos de elaidinización y degradación de bixina.....	61
7.3.1.	Efecto ultrasónico con solventes clorados	61
7.3.2.	Estudio cinético	66
7.3.2.1.	Energía de vida media	70
7.3.2.2.	Energía de activación para la degradación de Z-bixina.....	71
7.3.3.	Efecto ultrasónico con solvente no halogenado	74
7.3.4.	Estudio mecanístico de la degradación de Z-bixina por efecto ultrasónico.....	75
8.	CONCLUSIONES	79
9.	REFERENCIAS	82
	GLOSARIO	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de Z-bixina (a), E-bixina (b), Z-norbixina (c), E-norbixina (d), Z-diéster de bixina (e), E-diéster de bixina (f), 9'-13'-di-Z-diéster de bixina (g), metil E-bixina (h).	7
Figura 2. Biosíntesis de licopeno (Delgado-Vargas et al., 2000).	9
Figura 3. Biosíntesis de bixina (Raddatz-Mota et al., 2017)	10
Figura 4. Cromatogramas de iones totales (TICs) extraídos con: Hexano(A), Cloroformo (B) y Acetato de etilo (C), en ionización de modo positivo (de Oliveira Júnior et al., 2019).	13
Figura 5. Caracterización espectroscópica a) UV-Vis Bixina b) IR annatto y bixina (Rahmalia et al., 2015).	17
Figura 6. Caracterización de bixina. Cromatograma UPLC-DAD (A), UV-Vis (B), MS-ESI (C), 1H RMN (D) y COSY (E) de Z-bixina purificada a partir de B. orellana, (de Oliveira Júnior et al., 2019).	18
Figura 7. Degradación térmica de Z-bixina. (Scotter, 1995).	20
Figura 8. Monitoreo de la reacción fotoquímica de Z-bixina en aire a 20°C, 450 nm, a los 0 (a), 2 (b), 10 (c), y 150(d) min. HPLC (izquierda), y UV-Vis (derecha), . (Montenegro et al., 2004).	21
Figura 9. Mecanismo de reacción propuesto para la isomerización fotosensibilizada de bixina en soluciones tanto aireadas como no aireadas (Montenegro et al., 2004).	22
Figura 10. Espectros de absorción transitoria del estado triplete de bixina, obtenido después de 4 ns a 355 nm de excitación láser (Ríos et al., 2007).	23
Figura 11. % annatto extraído de B. orellana por contacto directo (CD), microondas (MW) y ultrasonido (US). En tiempos de exposición b=bajo, m=medio y a=alto.	35
Figura 12. Cromatograma característico del annatto.	37
Figura 13. % Cromatográfico en área de annatto a. Z-bixina b. E-bixina en UHPLC. CD= contacto directo, MW=microondas, US= ultrasonido, b=bajo, m=medio, a=alto.	39
Figura 14. Método de extracción, tiempo y solvente a. Z-bixina b. E-bixina. b=bajo, m=medio, a=alto.	40
Figura 15. Espectros de emisión de lámpara de luz artificial a. lámpara negra, b. lámpara blanca.	44
Figura 16. Distribución espectral de la radiación solar incidente en periodo de 12 pm a 3 pm.	45
Figura 17. Espectro UV-Vis de la irradiación de annatto en solución de cloroformo a. 356 nm, b. 410 nm, c. solar.	46
Figura 18. Espectro UV-Vis de Z-bixina y fotoproducto obtenido por UHPLC.	46

Figura 19. Cromatogramas UHPLC del seguimiento de la irradiación de Z-bixina (94% pureza) en disolución de CHCl ₃ con: a. 365 nm, b. 410 nm, c. solar..	48
Figura 20. Cromatograma UHPLC del seguimiento irradiación solar de Z-bixina (94% pureza) en estado sólido.	49
Figura 21. FTIR de Z-bixina y fotoproducto.	50
Figura 22. Espectro de masas a. Z-bixina b. Fotoproducto.	51
Figura 23. Espectro 1H RMN a. Z-bixina b. Fotoproducto.	52
Figura 24. 1H-1H COSY espectro RMN a. Z-bixina, b. Fotoproducto.	54
Figura 25. Análisis CG-MS de la degradación por irradiación solar de Z-bixina en atmosfera de oxígeno.	57
Figura 26. Estudio cromatográfico de la irradiación de Z-bixina en acetonitrilo.....	59
Figura 27. Análisis CG-MS de la degradación por irradiación solar de Z-bixina en atmosfera de argón.....	60
Figura 28. Efecto de sonicación en CH ₂ Cl ₂ para Z y Ebixina a. 1.35, b. 0.69, c. 0.34 mg/mL.....	63
Figura 29. Efecto de sonicación en CHCl ₃ para Z y E-bixina a. 1.34, b. 0.69, c. 0.36 mg/mL.....	64
Figura 30. Efecto de sonicación en CCl ₄ para Z y E-bixina a. 1.34, b. 0.69, c. 0.36 mg/mL.....	65
Figura 31. Cinética de degradación Z-bixina por sonoquímica en diferentes solventes a. CH ₂ Cl ₂ b. CHCl ₃ c. CCl ₄	69
Figura 32. Orden de reacción comparativa entre Modelo vs experimental de degradación en ppm de Z-bixina en CHCl ₃	70
Figura 33. Tiempo de vida media para Z-bixina en CHCl ₃ con cambio de temperatura en un proceso de sonicación.	71
Figura 34. Regresión lineal para degradación de Z-bixina en CHCl ₃ a diferentes temperaturas por proceso de sonicación.....	73
Figura 35. Correlación de ln K a 286, 291, 294 y 302 K, en la degradación de Z-bixina.	73
Figura 36. % área cromatográfica de Z y E-bixina en disolución de acetonitrilo en sonicación.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tiempos de retención, absorbancias UV-Vis y razón de banda III/II para la degradación de bixina por irradiación (Montenegro et al., 2004).	22
Tabla 2. Parámetros de extracción para la obtención de achiote por métodos de contacto directo, microondas y ultrasonido de semilla de <i>B. orellana</i>	28
Tabla 3. Condiciones experimentales para el estudio sonoquímico de Z-bixina.....	33
Tabla 4. Condiciones experimentales para el análisis del comportamiento de Z-bixina con sonoquímica en cloroformo y acetonitrilo.....	33
Tabla 5. Identificación de compuestos presentes en el annatto de semilla de <i>B. orellana</i> por UHPLC.....	37
Tabla 6. Concentración de los compuestos presentes en el annatto para CD, MW y US por UHPLC.	43
Tabla 7. Comparación del desplazamiento químico en RMN ¹³ C en el annatto y el fotoproducto con lo reportado en la literatura. ¹³ Ca. (de Oliveira Rios & Mercadante, 2004); ¹³ Cb (Costa, 2007); ¹³ Cc (Golin et al., 2013).	56
Tabla 8. % de área cromatográfica y área/gramo de annatto a tiempo 0.	62
Tabla 9. Constantes cinéticas para Z-bixina en solventes de diferente polaridad.....	68
Tabla 10. Constante de velocidad K a diferentes temperaturas para la degradación de Z-bixina en CHCl ₃	72
Tabla 11. a Energía, concentración de Z-bixina en solución de CH ₃ CN y correlaciones para establecer el orden de reacción al someter Z-bixina a energía ultrasónica, b. orden de reacción, ecuación y R ² de las regresiones lineales.	74

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Planta, hojas, flores y fruto de <i>Bixa orellana</i>	4
Esquema 2. Representación esquemática del instrumento utilizado para la extracción mecánica (Barrozo et al., 2013).....	14
Esquema 3. Reacción general de la degradación de Z-bixina.....	61
Esquema 4. Representación general de degradación de Z-bixina.....	75
Esquema 5. Propuesta mecanística de la elaidinización de Z-bixina por efecto ultrasónico.....	76
Esquema 6. Mecanismo propuesto para la degradación de E-bixina.....	78

RESUMEN

Los productos químicos de origen natural siguen ofreciendo nuevas alternativas en áreas como nutrición, farmacología, generación de nuevas fuentes energéticas, control de plagas, como también en las industrias de textiles, colorantes, entre otras. Las características de dichas sustancias a nivel cualitativo y cuantitativo dependerán en gran medida del tipo de extracción y almacenamiento. Un producto con amplia aplicación industrial es el Achiote (*Bixa orellana* Linn), cuyo compuesto mayoritario del arilo de la semilla es un apocarotenoide llamado *Z*-bixina, el cual es susceptible a transformaciones isoméricas y degradaciones. En este trabajo de investigación se estudió la estabilidad del achiote durante su extracción y al ser expuesto a procesos foto y sonoquímicos. Estudios preliminares han demostrado que altas temperaturas de extracción generan transformaciones isoméricas de *Z* a *E* bixina y la degradación a productos tóxicos como *m*-xileno y tolueno. En el presente trabajo se analizó si esto ocurría con técnicas emergente de extracción y/o procesos foto y sonoquímicos. Se realizaron estudios con variación de la polaridad de solventes, a diferentes tiempos de exposición, estableciendo tanto el rendimiento del extracto (annatto) como el perfil fitoquímico de los pigmentos obtenidos. Los rendimientos de annatto en las técnicas emergentes fueron dependientes del solvente y tiempos de extracción. A tiempos de exposición altos (23 a 25 min)-medio (14 a 16 min) y con acetona y cloroformo los rendimientos fueron intermedios entre 14 y 10 %, comparados con metanol y tiempos bajos (7 a 8 min) donde los rendimientos disminuyeron a valores menores a 8% . El perfil fitoquímico arrojó 6 pigmentos de los cuales se identificaron *Z*-norbixina, *E*-norbixina, *Z*-bixina y *E*-bixina. El rendimiento de *Z*-bixina en la extracción para todos los métodos se determinó por cromatografía (UHPLC) y se correlacionó con el peso inicial de la semilla en mg/g. Para contacto directo se obtuvo un máximo de 163 mg/g en cloroformo, mientras en acetona y metanol fue de 98 y 39 mg/g, respectivamente. Con el uso de microondas el máximo fue de 79 mg/g de este mismo metabolito con cloroformo, mientras que con acetona y metanol fue de 17 y 15 mg/g, respectivamente. El ultrasonido presentó un comportamiento totalmente diferente ya que en cloroformo sólo se obtuvo 6 mg/g, mientras que para acetona y metanol se obtuvieron 60 y 63 mg/g en exposición a tiempos altos (23 a 25 min). Este bajo rendimiento se debió al

incremento del metabolito *E*-bixina, obteniéndose 48 mg/g en cloroformo. Para los solventes acetona y metanol no se presentó este comportamiento, obteniendo valores de *Z*-bixina cercanos a 62 mg/g de semilla.

También se evaluó el efecto fotoquímico de *Z*-bixina realizado con irradiación artificial en reactores con lámpara negra de 365 nm y lámpara blanca de 410 nm e irradiación solar. El análisis por UV-Vis mostró un cambio batocrómico y de igual manera se tuvo un cambio del perfil cromatográfico por UHPLC, esto se observó para todas las fuentes de irradiación. El análisis UHPLC del annatto no irradiado mostró una señal máxima de *Z*-bixina 94.4%, conforme la muestra fue sometida a irradiación este metabolito decreció e incrementó concomitantemente la *E*-bixina. La abundancia cromatográfica de *Z*-bixina decreció hasta 3.6%, mientras que el fotoproducto aumentó al 87.3% con tiempos de 540 minutos con irradiación artificial y 90 minutos con luz solar. El fotoproducto al continuar la irradiación decreció a 0% con periodos de 1200 min en luz artificial y de 120 min en solar. El seguimiento en la degradación del fotoproducto por CG-MS mostró que no se generan isoprenoides de menor magnitud como se esperaba, sino una degradación por cascada a moléculas pequeñas como CO, CO₂, H₂CO y HCl.

El efecto del solvente orgánico clorado en la extracción y degradación de *Z*-bixina se evaluó en radiación ultrasónica a diferentes concentraciones y temperaturas. Se determinaron los parámetros cinéticos: orden de reacción (n), constante de velocidad (k) y energía de activación (E_a). Para el modelo aplicado se logró establecer que la elaidinización y degradación de *Z*-bixina es de orden 1 en diclorometano y cloroformo, mientras que en tetracloruro de carbono presenta muy baja elaidinización y degradación a moléculas de menor magnitud. También se comparó el efecto en un solvente orgánico no clorado, acetonitrilo, determinando que no hay elaidinización ni degradación para los mismos tiempos de irradiación.

Palabras claves: elaidinización, irradiación, fotoproducto, annatto, ultrasonido

SUMMARY

Chemical products of natural origin continue to offer new alternatives in areas such as nutrition, pharmacology, generation of new energy sources, pest control, as well as in the textile and dye industries, among others. The characteristics of these substances at a qualitative and quantitative level will depend to a large extent on the type of extraction and storage. A product with wide industrial application is annatto (*Bixa orellana* Linn), whose major compound of the seed aril is an apocarotenoid called *Z*-bixin, which is susceptible to isomeric transformations and degradation. In this research work, the stability of the achiote during its extraction and when exposed to photo and sonochemical processes was studied. Preliminary studies have shown that high extraction temperatures generate isomeric transformations of *Z* to *E* bixin and degradation to toxic products such as *m*-xylene and toluene. In the present work, it was analyzed if this occurred with emergent extraction techniques and/or photo and sonochemical processes. Studies were carried out with variation of the polarity of solvents, at different exposure times, establishing both the yield of the extract (annatto) and the phytochemical profile of the pigments obtained. The annatto yields in the emerging techniques were dependent on the solvent and extraction times. At high exposure times (23 to 25 min), medium (14 to 16 min), and with acetone and chloroform, the yields were intermediate, between 14 and 10 %, compared to methanol and low times (7 to 8 min), where the yields decreased to values less than 8%. The phytochemical profile yielded 6 pigments of which *Z*-norbixin, *E*-norbixin, *Z*-bixin and *E*-bixin were identified. The *Z*-bixin yield in the extraction for all methods was determined by chromatography (UHPLC) and correlated with the initial seed weight in mg/g. For direct contact, a maximum of 163 mg/g was obtained in chloroform, while in acetone and methanol it was 98 and 39 mg/g, respectively. With the use of microwaves, the maximum was 79 mg/g of this same metabolite with chloroform, while with acetone and methanol it was 17 and 15 mg/g, respectively. The ultrasound presented a totally different behavior since in chloroform only 6 mg/g was obtained, while for acetone and methanol 60 and 63 mg/g were obtained in exposure at high times (23 to 25 min). This low yield was due to the increase in the metabolite *E*-bixin, obtaining 48 mg/g in

chloroform. For the acetone and methanol solvents, this behavior was different, obtaining Z-bixin values close to 62 mg/g of seed.

The photochemical effect of Z-bixin performed with artificial irradiation in reactors with 365 nm black lamp and 410 nm white lamp and solar irradiation was also evaluated. The UV-Vis analysis showed a bathochromic change and in the same way there was a change in the chromatographic profile by UHPLC, this was observed for all irradiation sources. UHPLC analysis of non-irradiated annatto showed a maximum signal of Z-bixin 94.4%, as the sample was subjected to irradiation this metabolite decreased and E-bixin increased concomitantly. The chromatographic abundance of Z-bixin decreased to 3.6%, while the photoproduct increased to 87.3% with times of 540 minutes with artificial irradiation and 90 minutes with sunlight. The photoproduct by continuing the irradiation decreased to 0% with periods of 1200 min in artificial light and 120 min in sunlight. Follow-up on the degradation of the photoproduct by CG-MS showed that isoprenoids of lesser magnitude are not generated as expected, but rather a cascading degradation to small molecules such as CO, CO₂, H₂CO and HCl was observed.

The effect of the chlorinated organic solvent on the extraction and degradation of Z-bixin was evaluated under ultrasonic radiation at different concentrations and temperatures. The kinetic parameters were determined: reaction order (n), rate constant (k) and activation energy (*E_a*). For the applied model, it was possible to establish that the elaidinization and degradation of Z-bixin is of order 1 in dichloromethane and chloroform, while in carbon tetrachloride it presents very low elaidinization and degradation to smaller molecules. The effect was also compared in a non-chlorinated organic solvent, acetonitrile, determining that there is no elaidinization or degradation for the same irradiation times.

Keywords: elaidinization, irradiation, photoproduct, annatto, ultrasound

1. INTRODUCCIÓN

El alto potencial tanto a nivel económico como científico que representa la planta conocida con el nombre de Achiote en países latinoamericanos y especialmente en México, por ser uno de los principales productores, hace necesario el incremento de investigaciones que contribuyan al desarrollo sustentable del cultivo, procesamiento y aplicación. La caracterización tanto cualitativa, cuantitativa, parámetros de su cinética de degradación, aislamiento y conservación de metabolitos secundarios, permitirán el aprovechamiento y le darán un valor agregado al sector dedicado a dicho cultivo.

A partir de la semilla del Achiote se fabrican colorantes utilizados en la industria alimentaria, alrededor del 70% de los colorantes a nivel mundial, y cuya característica es presentar una coloración que varía desde rojo intenso al amarillo brillante (García & Montalvo, 2011). Esta gama de colores se debe no solo por la variedad y región geográfica de la especie vegetal, sino también por la forma en la cual se extrae su principal componente. Dicho componente es conocido con el nombre de bixina y acorde al método de extracción puede sufrir degradaciones y/o cambios esteroisoméricos que alteran sus propiedades físico-químicas y sus actividades biológicas.

La bixina se encuentra en proporciones de 70 a 80% peso/peso con respecto al contenido total de colorantes presentes en el arilo de la semilla; pero la inestabilidad del mismo hace que condiciones como calor, luz, presencia de agua u oxígeno, afecten significativamente la concentración de la misma. Se ha reportado que la bixina aislada es más susceptible a degradación, por lo que se requieren condiciones adecuadas para su aislamiento y conservación (Payes, 2013).

1.1. *Bixa orellana* Linn (Achiote)

La *B. orellana*, es una planta de América tropical, utilizada por los nativos como tintura para tejidos, piel, así como para bebidas a base de cacao mezclada con vainillina (Giuliano *et al.*, 2003). Se tiene evidencia que se emplea en la medicina popular con actividades farmacológicas comprobadas, tales como antipirético, cardiotónico, antidiarréico (Bandoni & Rondina, 1973), hipoglicémico (Giron *et al.*, 1991),

antimalárico, para enfermedades hepáticas (Milliken, 1997), antiofídico (Otero *et al.*, 2000), antimicrobiano (Fleischer *et al.*, 2003), anticarcinogénico (Agner & Barbisan, 2004) y repelente (Giorgi *et al.*, 2013).

Su nombre popular deriva de la palabra en tupi "*ru-ku*" que significa "*rojo*". Se tiene evidencia de que su nombre deriva del náhuatl "*achiotl*"; "*bixa*" del taino que los indígenas pronunciaban "*bisha*" y Orellana por el conquistador Francisco Orellana que exploró el Amazonas en 1541 (Pittier 1978). Esta planta es originaria del Acre en la cuenca del Amazonas durante el paleolítico acorde a Smith en 2005, mientras que otro autor determinó que se originó en las Antillas menores en las islas de Guadalupe, Trinidad y Martinica (Cordoba 1987). En Colombia se conocen tres reportes arqueológicos asociado a los años 800 -100 a.C. según Morcote-Rios en 2006. El registro para México aparece en 1519 en el momento de la conquista (Schmidt-Hebbel, 1980); donde su uso estaba descrito para la elaboración de manuscritos, así como para la preparación de bebidas.

Su cultivo ha alcanzado diversas regiones del mundo, su sinonimia vulgar es bastante extensa: urucu, urucum, azafrán, azafán y azafrán de la tierra (Brasil), atole, achiote y bija (Perú, Colombia y Cuba), onotto y onotillo (Venezuela), uruku (Paraguay) y axiote en México, por mencionar algunos. En México se distribuye en el sureste, en la altitud de 0 a 1200 m, en los estados de Campeche, Chihuahua, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Payes, 2013).

Esta planta pertenece a la familia *Bixaceae* y es representada por un único género *Bixa* y especie *B. orellana*, que es un árbol perene de rápido desarrollo que puede alcanzar alturas que van desde los 3.0 hasta 6.5 m en su hábitat natural, normalmente desarrollan ramas delgadas y leñosas de 2 a 6 m. Su tronco presenta un diámetro de 10 a 30 cm (Esquema 1). Con inflorescencias grandes y vistosas, actinomorfas, de sexualidad hermafrodita, cada rama presenta de 2 a 4 flores con un diámetro 4.0 a 5.5 cm. Acorde a su latitud varía la época de floración y madurez, y según la temperatura de la zona, siendo más temprana en las regiones cálidas y húmedas. La floración no es sincrónica y se ha establecido que, en Centroamérica generalmente dura de 3 a 4 meses, iniciando entre julio y septiembre con un máximo en agosto. La temperatura

ideal para la producción de achiote se encuentra entre los 20 y 38°C, el tiempo de luminosidad requerido es de 10 h diarias, la humedad relativa óptima varía entre el 60 y 80%. Las zonas de mayor producción se encuentran entre 300 y 600 msnm, pues a mayor altitud su crecimiento es lento o se limita la producción y tiene mayor incidencia de enfermedades. Se puede adaptar a diversas calidades de suelos, desde suelos franco-arenosos hasta arcillosos, e incluso en suelos pobres y ácidos. Se destaca que los mejores rendimientos se han obtenido en suelos aluviales, drenados y con altos contenidos de materia orgánica (Conabio, s.f.).

Sus frutos denominados cachopes con apéndices flexibles, pueden tener un color que cambia según la variedad desde verdes, roja, ocre y amarilla. Presenta dos lóbulos o segmentos, aunque debido a cruzamientos naturales hay también frutos de tres segmentos con mayor número de semillas. Se reporta que la posible polinización es entomófila, generando de 20 a 55 semillas, el fruto en el exterior posee protuberancias de forma triangular y en el interior hay una placenta donde están las semillas, de las cuales se extraen pigmentos y aceites de interés comercial, con los cuales se realizan diversos procesos tanto industriales como artesanales (Franco, 2008). La placenta es de color amarillo verdoso si la cápsula aún no ha madurado y cuando alcanza la madurez y se seca cambia a color café.

La semilla es ortodoxa dicotiledónea, con dimensión de 3.5 a 5.0 mm sostenida por un pedúnculo, con forma piramidal. En la parte más gruesa tienen una mancha circular, color negro, presenta una hendidura o fisura en un solo lado (Mejia, Kember, Rengifo, 2001).

La primera cosecha generalmente es a los 20 meses, la cual es escasa y la producción comercial se obtiene pasados los 3 años. Se han identificado que la producción es de una o dos veces al año, según la variedad, y la cosecha se debe hacer de 2 a 3 meses después de haber ocurrido la floración. Algunas variedades cambian de color cuando alcanzan la madurez comercial lo cual es un indicativo para su cosecha. Un pequeño árbol de *B. orellana* puede producir de 4.5 a 5.0 kg de frutos y 272 kg de semillas (Conabio, s.f.). Se cosechan las panículas y no las cápsulas individualmente, y el manejo poscosecha de las cápsulas y de las semillas es de fundamental importancia para mantener la integridad de sus metabolitos.



Esquema 1. Planta, hojas, flores y fruto de *Bixa orellana*.

Estudios fitoquímicos han encontrado presencia, tanto en semillas como en las hojas, de flavonoides, ácido gálico, ácido alfitólico, diterpenos, vestigios de alcaloides, carotenoides, apocarotenoides (Revilla, 2001). Además, se han reportado tocotrienoles y el delta tocotrienol (Frega *et al.*, 1998). Estas moléculas se han asociado con efectos hipocolesterolémicos y se cree que son útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Tan & Foley, 2002; Tan, 2005).

El compuesto de mayor concentración en el arilo de la semilla es la bixina, siendo responsable de la coloración roja que presenta dicho órgano (Galindo-Cuspinera & Rankin, 2005). Este pigmento naturalmente se encuentra como el isómero *Z*-bixina, sin embargo durante el proceso de extracción a altas temperaturas se isomeriza a la forma *E*-bixina, denominada isobixina, y a norbixina que es el derivado desmetilado de la bixina (Rahmalia *et al.*, 2015; Evans, 1992).

1.2. Bixina

La bixina es un apocarotenoide con 25 átomos de carbono que presenta dos grupos funcionales diferentes en los extremos (carboxilo y éster), con una fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$ y peso molecular de 394.50 (Gupta *et al.*, 2015). Se emplea como aditivo colorante en la industria alimentaria cuyo código es E-160b, según los códigos alimentarios de la Unión Europea corresponde a colorantes naturales aislados como la isobixina y la norbixina, todas ellas derivadas de la misma sustancia extraída del

árbol *B. orellana*, annatto o bija. El *annatto* es la denominación dada al extracto crudo, mientras que la bixina es la parte del colorante liposoluble y la norbixina la parte hidrosoluble (Ramamoorthy *et al.*, 2010).

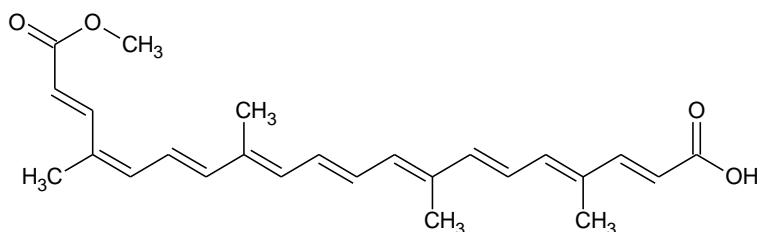
El principal componente del annatto, se confirma como el apocarotenoide 9-*Z*-bixina (Ácido (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*,10*E*,12*E*,14*E*,16*Z*,18*E*)-20-metoxi-4,8,13,17-tetrametil-20-oxoicosa-2,4,6,8,10,12,14,16,18-nonaenóico), Figura 1a. Este compuesto es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos polares, tiene un color naranja y es insoluble en aceite vegetal. Además, se determinó que puede convertirse fácilmente en su isómero *E* debido a su inestabilidad en solución. La *E*-bixina (Figura 1b), es el isómero más estable de la mezcla, presenta un color rojo en solución y es soluble en aceite vegetal. La isomerización se logra mediante el calentamiento de una suspensión del isómero *Z* en aceite a 130°C en vacío.

El análogo 9-*Z*-norbixina (C₂₄H₂₈O₄) (Figura 1c), es soluble en agua, se puede aislar de las semillas de *B. orellana* mediante la agitación en álcali acuoso a menos de 70°C, es decir por hidrólisis alcalina de *Z*-bixina. El ácido dicarboxílico es soluble en disolventes polares a los que imparte un color naranja. La 9-*Z*-norbixina es escasamente soluble en cloroformo e hidróxido de sodio 0.1 M (Preston & Rickard, 1980). En condiciones de extracción, la 9-*Z*-norbixina se isomeriza produciendo soluciones de aceite que contienen aproximadamente 0.2- 0.5% de pigmentación de una mezcla de todo 9-*Z*-norbixina y *E*-norbixina (Figura 1d). Los productos de degradación dependen de la temperatura y el tiempo de extracción. Otros compuestos presentes en el annatto son: *Z*-diéster de bixina (Figura 1e), *E*-diéster de bixina (Figura 1f), 9'-13'-di-*Z*-diéster de bixina (Figura 1g) y metil *E*-bixina (Figura 1h).

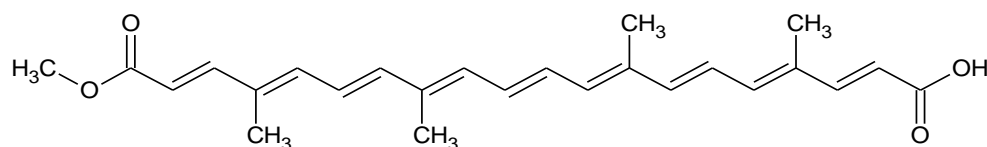
El 80% de los carotenoides en la capa de semilla de *B. orellana* son de *Z*-bixina (Preston & Rickard, 1980; Lauro 1991), encontrándose rastros de diésteres de bixina (Mercadante *et al.* 1997). También se confirmó la presencia de otros carotenoides secundarios como betacaroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina (Tirimanna, 1981). La presencia de un rango de análogos de licopenoato y otros carotenoides menores ha sido reportada en una serie de artículos de Mercadante *et al.* (1996, 1997a, 1997b, 1999, 2001). Se sintetizaron químicamente bixina y tres carotenoides de menor

importancia usando la reacción de Wittig seguido de la reacción de Horner Emmons (Haberli & Pfander 1999).

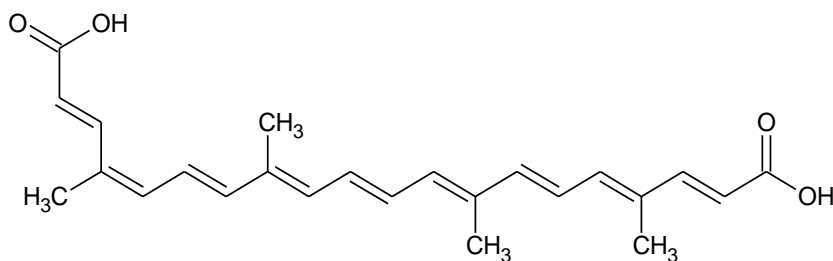
Las propiedades antioxidantes de la Z-bixina están asociadas con su capacidad para estabilizar los radicales libres, lo que puede reducir el daño y proteger los tejidos contra la toxicidad causada por medicamentos anticancerígenos.



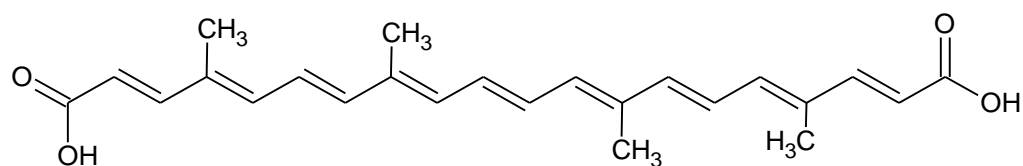
a. Bixina (*Z*-Bixina)



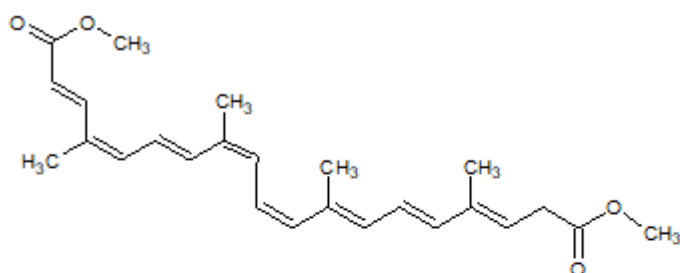
b. Isobixina (*E*-Bixina)



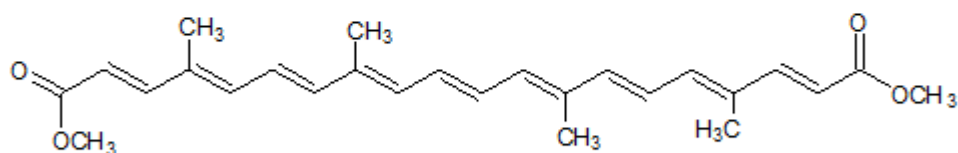
c. Norbixina (*Z*-Norbixina)



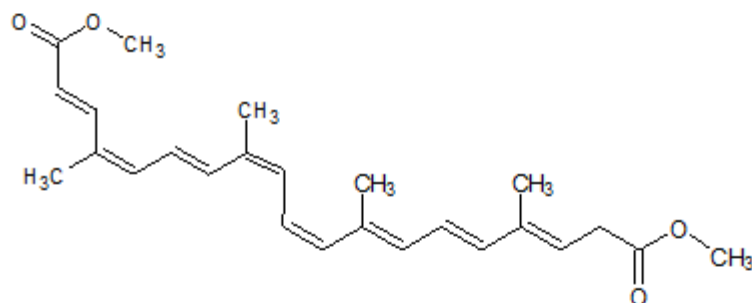
d. Norbixina (*E*-Norbixina)



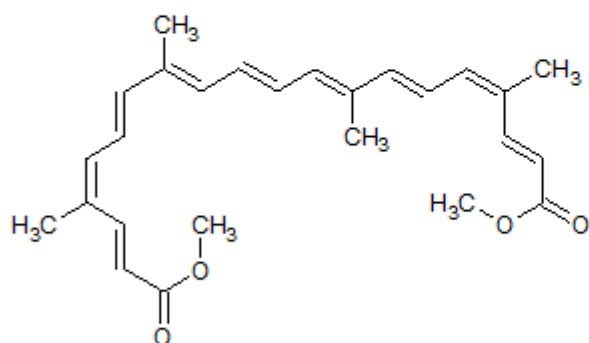
e. Diéster de bixina (Z- Diéster de bixina)



f. Diéster de bixin (*E*-Diéster de bixina)



g. 9',13'-di-Z- Diéster de bixina



h. metil *E*-bixina

Figura 1. Estructura química de Z-bixina (a), *E*-bixina (b), Z-norbixina (c), *E*-norbixina (d), Z-diéster de bixina (e), *E*-diéster de bixina (f), 9'-13'-di-Z-diéster de bixina (g), metil *E*-bixina (h).

1.2.1. Rutas de biosíntesis de bixina

Los carotenoides son pigmentos y precursores importantes para las moléculas de señalización central asociadas al desarrollo y la maduración de la fruta. Además, sirven como precursores de importantes productos de escisión de carotenoides llamados apocarotenoides, que incluyen al ácido abscísico (ABA), estrigolactonas,, bixina y norbixina entre otros (Mercadante *et al.*, 1996). La vía biosintética de la bixina y la norbixina, las cuales pertenecen a la familia de los terpenos, se origina en la biosíntesis de los carotenoides (Schmidt *et al.*, 2010). Esta biosíntesis inicia por la condensación del geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP) para producir *Z*-fitoeno. Este compuesto se desatura originando licopeno (Figura 2), el cual es una molécula lineal con 40 átomos de carbono, siendo el precursor de la mayoría de los carotenoides cíclicos, hidroxilados y oxidados (Delgado-Vargas *et al.* 2000).

La biosíntesis de la bixina se lleva a cabo en uno de los extremos de la cadena del licopeno y se ramifica para formar los distintos carotenoides (Castro & Murcia 2013). Hay evidencia de la biosíntesis de norbixina y bixina con la división de los enlaces dobles 5–6 y 5'–6' en los extremos de la cadena lineal del licopeno, por escisión de la enzima (di)-oxigenasa del licopeno formando la bixina dialdehído que posteriormente sufre la oxidación catalizada por aldehído deshidrogenasa para generar la norbixina. Finalmente, un grupo metilo se incorpora al grupo terminal carboxilo por la acción de la norbixina metil transferasa (Raddatz-Mota *et al.* 2017), Figura 3.

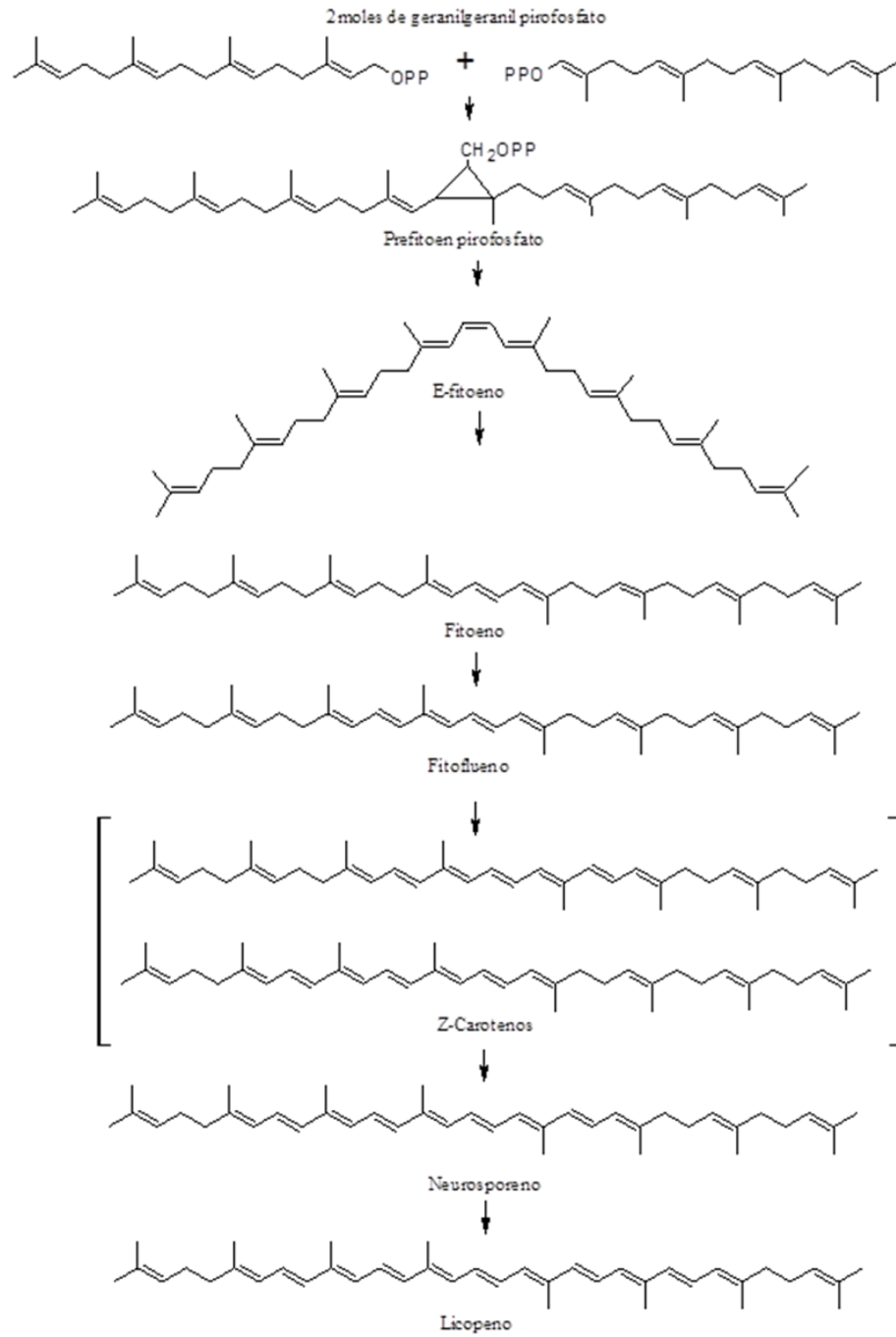


Figura 2. Biosíntesis de licopeno (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

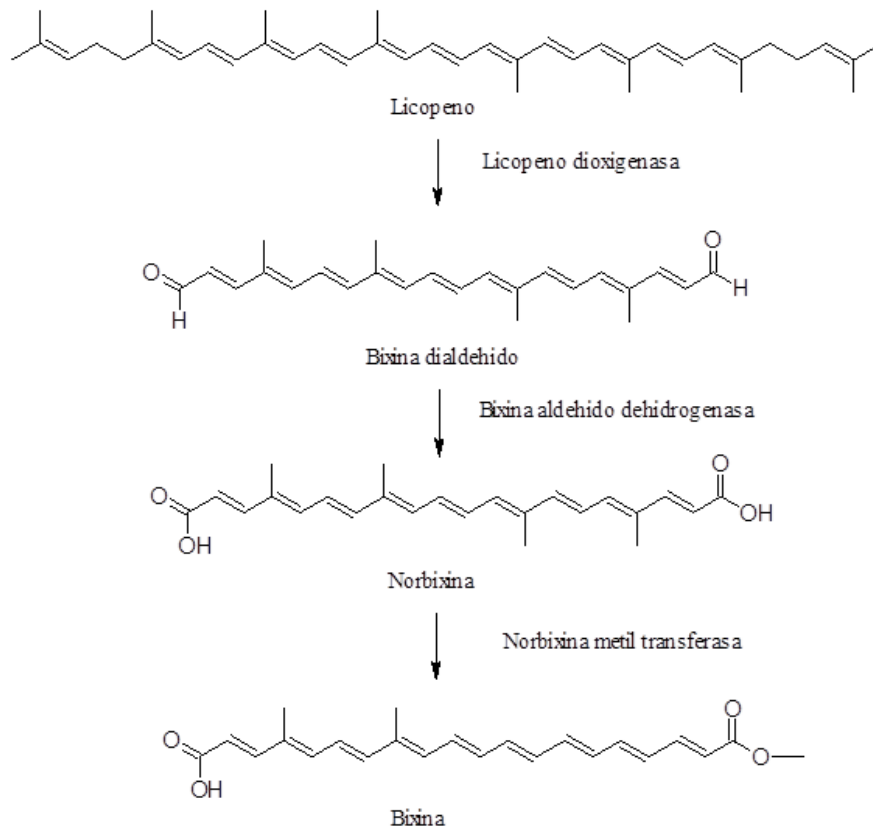


Figura 3. Biosíntesis de bixina (Raddatz-Mota *et al.*, 2017)

1.3. Extracción de annatto y técnicas de purificación de bixina

1.3.1. Tecnologías clásicas para la obtención de annatto

El annatto se puede obtener a partir de extractos hidrófilos e hidrófobos que a través de la historia han estado cambiando acorde a la necesidad de la cantidad y calidad requerida. Los métodos de extracción más comúnmente utilizados a nivel industrial son lixiviación, decocción, elución o extracción con solvente a baja presión, que no es otra cosa que una extracción sólido-líquido. En muchos casos estos procedimientos resultan en una mezcla compleja de metabolitos, a los cuales se les requiere realizar complicadas marchas cromatográficas para su aislamiento y purificación.

Los métodos que han prevalecido en el tiempo son tres: extracción por inmersión de semillas en aceite vegetal caliente, contacto con soluciones acuosas alcalinas diluidas y reflujo en disolventes orgánicos. El extracto con aceite vegetal se conoce como el

proceso de abrasión del exocarpio y el producto es una solución coloreada, con bajas concentraciones de bixina y varios subproductos (Carvalho *et al.*, 2010).

En la industria de los alimentos, el proceso más utilizado es la extracción con una solución alcalina, que puede ser de sodio o potasio, lo cual ha reportado la degradación a una sal diácida norbixina que es soluble en agua (Scotter, 2009b; Carvalho *et al.*, 2010). Este método genera grandes costos debido a la neutralización y eliminación de las soluciones básicas de la semilla y los productos de desecho, además de pérdidas de bixina que quedan en dichas soluciones (Meireles, Leal & Rosa, 2008).

Por último, el contacto con solventes orgánicos tales como: hexano, acetona, cloroformo, metanol, etanol, acetato de etilo y hexano, generan una buena extracción, pero muchos de estos solventes son considerados tóxicos y no son selectivos para bixina (Prentice-Hernández & Rusig, 1992; Albuquerque & Meireles, 2012). Además, se debe considerar que el obtener productos libres de trazas de estos solventes, implicarían gastos adicionales, además de la exposición prolongadas a temperaturas que puede ocasionar degradación.

1.3.1.1. Extracción por contacto directo

de Oliveira Júnior *et al.*, (2019) realizaron una extracción por maceración secuencial utilizando hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol en orden de polaridad creciente en agitación a 50°C, obteniendo extractos de 4.7, 1.9, 0.1 y 0.2% (p/p), acorde a la secuencia de solventes utilizados. La gran importancia de esta investigación fue la identificación de los compuestos mayoritarios por medio del análisis por UPLC-DAD-MS/MS.

Se lograron determinar tres compuestos mayoritarios: *Z*-bixina, el cual correspondió al compuesto principal en todos los extractos, norbixina y metil-bixina. Además, se identificaron flavonoides, tocotrienoles e isómeros de apocarotenoides. En la Figura 4 se muestran los perfiles cromatográficos, donde se observa la presencia de los siguientes compuestos: naringenina (1), ácido 6,8'-diapocarotene-6,8'-dioico (2), *E*-norbixina (3), ácido eicosatrienoico (4), ácido 6,7'-diapocarotene-6,7'-dioico (5), *Z*-norbixina (6), *E*-bixina (7), *Z*-bixina (8), geranilgeranoil (9), metil-bixina (10), ácido β -12'-apo-carotenioico (11), δ -tocotrienol (12), y γ -tocotrienol (13).

1.3.1.2. Extracción Soxhlet

Este método se ha realizado con diversos solventes orgánicos, entre los cuales se destaca el cloroformo, acetona, acetato de etilo, entre otros, por la gran solubilidad de la bixina en estos solventes. Esta técnica utiliza largos periodos de tiempo que oscila entre 4 y 24 horas, con temperaturas de 50-80°C. Los largos periodos de tiempo, la exposición a la luz y la temperatura provocan variación de la composición de los metabolitos presentes en el extracto (Silva *et al.*, 1994).

Los compuestos aislados a nivel industrial difieren en composición, esto se debe a que su gran demanda fomenta extracción que minimicen tiempo y dinero, requiriendo extracciones que utilizan altas temperaturas y en ocasiones la introducción de agua en el proceso, de tal manera que incrementan el rendimiento; pero estas condiciones generan degradaciones en el producto final.

1.3.2. Tecnologías verdes para la obtención del annatto

En los últimos años el comercio de este producto se ha venido limitando por la calidad del annatto, el cual debe cumplir con características tanto a nivel de seguridad alimentaria como de color para la industria de pigmentos (Devia Pineda & Saldarriaga Calderón, 2003). Por tanto, la investigación en términos de técnicas de extracción es requerida para minimizar la degradación y que de esta manera sus propiedades biológicas y estructurales permanezcan.

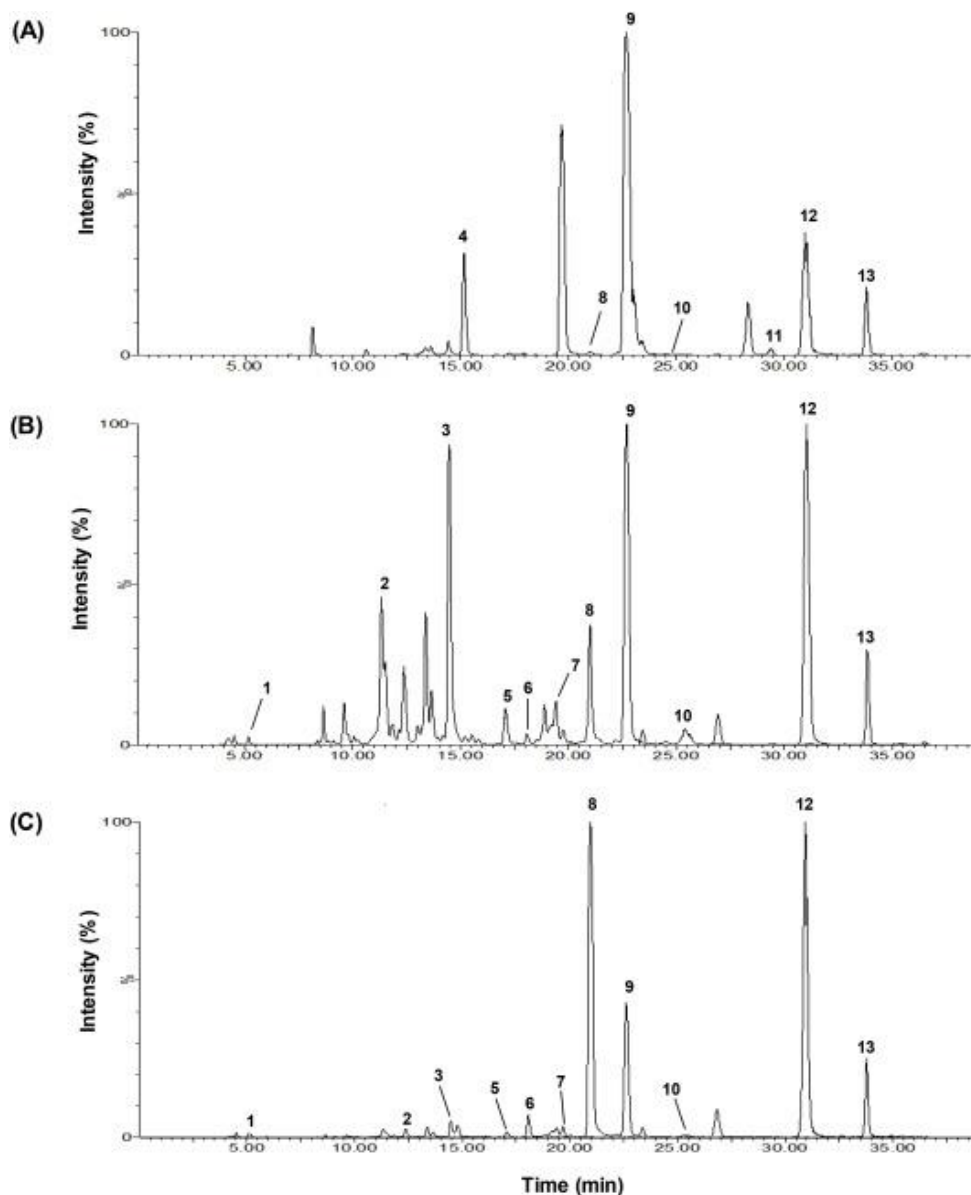


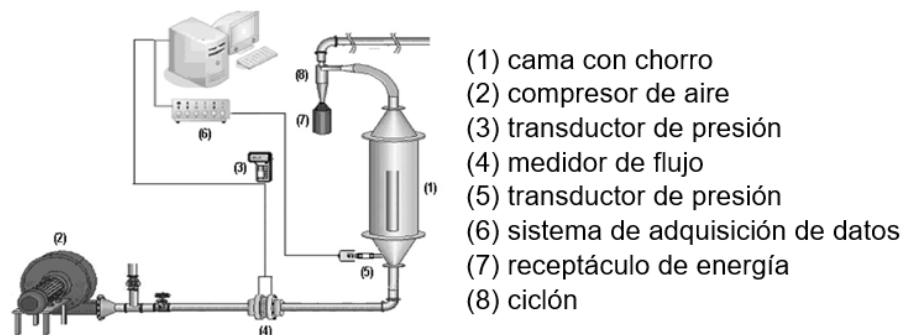
Figura 4. Cromatogramas de iones totales (TICs) extraídos con: Hexano(A), Cloroformo (B) y Acetato de etilo (C), en ionización de modo positivo (de Oliveira Júnior *et al.*, 2019).

Diferentes institutos de investigación están apostando por las tecnologías verdes para mejorar la extracción y mantener la identidad de los componentes que se quieren aislar. Las técnicas que se han estudiado son extracción mecánica, asistida por ultrasonido (Pingret *et al.*, 2012; Plaza *et al.*, 2012), microondas (Asma *et al.*, 2010), extracción con fluido supercrítico (CO₂) o con co-elución (Hatami *et al.*, 2012; Prado *et*

al., 2012), extracción de solventes acelerada (Braga & Meireles, 2007; Plaza *et al.*, 2012; Santos & Meireles, 2011), y en los últimos años técnicas combinadas.

1.3.2.1. Extracción mecánica

Barrozo *et al.* (2013) estudiaron la extracción mecánica de las semillas de bixina con un lecho de salida y observaron los efectos del flujo de aire y la masa de la semilla en la cama, así como el efecto de insertar un tubo de succión en la bixina rica en polvo (esquema 2). En promedio, el rendimiento de estas extracciones fue aproximadamente tres veces mayor cuando se usaba la tubería de succión, obteniendo hasta 8.7 g/kg/h. Los autores concluyeron que un aumento del 10% en el flujo de aire causó un aumento promedio del 30% en la masa extraída, mientras que un aumento del 25% en el lecho de siembra causó un aumento promedio del 33% en la masa extraída. En este trabajo no se determinaron los metabolitos presentes en el extracto.



Esquema 2. Representación esquemática del instrumento utilizado para la extracción mecánica (Barrozo *et al.*, 2013).

1.3.2.2. Extracción asistida por ultrasonido

Esta técnica de extracción se basa en la cavitación que se produce en el solvente por el paso de las ondas sónicas del solvente a los analitos (Pingret *et al.*, 2013; Rostagno *et al.*, 2009). Se han encontrado publicaciones que hacen referencia a la aplicación de esta técnica y que utilizan solventes orgánicos y acuosos; en donde se señala que la semilla, posterior al tratamiento, pierde su coloración rojiza en su totalidad. Esto es un

claro indicativo de la extracción total de los pigmentos adheridos al arilo, no obstante, no es selectivo a bixina y lo obtenido es una mezcla de aceites, terpenos, bixina y norbixina.

Yolmhe *et al.* (2014) utilizaron la metodología de superficie de respuesta (RSM), con respecto al efecto de las variables en la extracción asistida por ultrasonido (UAE). Ellos utilizaron una frecuencia de trabajo y potencia a 20 KHz y 200 W respectivamente, tomaron cuatro variables independientes, temperatura (20–80 °C), tiempo (2–10 min), el ciclo de trabajo (0.2–0.8 s) y relación semillas/solvente (5–20%). Obtuvieron máximos valores a 72.7°C, 7.25 min, 14% relación semilla/solvente y un ciclo de trabajo de 0.8 s, con un rendimiento de 6.35% de annatto y establecieron que era un proceso más eficiente en comparación con la extracción convencional.

1.3.2.3. Extracción asistida por microondas

Sinha *et al.* (2013), utilizaron una extracción asistida por microondas con una potencia de 900 W y una frecuencia de 2450 MHz, en semillas secas, las cuales se sometieron a extracción adicionando agua destilada y con una matriz de pH y tiempo. El efecto de la radiación de microondas conduce al corte de las células parenquimatosas (Bagherian *et al.*, 2011), esto permite la acción del solvente sobre las moléculas que se encuentran en este tejido y el material fuente en el proceso de extracción. Ellos observaron que, bajo condiciones alcalinas, la permeación del agente de extracción aumenta y lograron obtener 6% de annatto de semilla seca.

1.3.2.4. Extracción asistida por fluido supercrítico

Los fluidos supercríticos (FSC) utilizan sustancias que se encuentren en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico, de tal manera que se comporte como un híbrido entre un líquido y un gas, es decir, que se difunda como un gas (efusión) y que disuelva sustancias como un líquido (solvente). Los FSC se caracterizan por el amplio rango de densidades que pueden adoptar. Por encima de las condiciones críticas, pequeños cambios en la presión y la temperatura producen grandes cambios en la densidad (Taham *et al.*, 2015).

Hay diversas sustancias que son empleadas para esta técnica dentro de las cuales están: CO₂, H₂O, CH₄, C₂H₆, C₃H₈, CH₃OH, C₂H₅OH, C₃H₈, C₂H₄, C₃H₆O. Rodrigues *et al* (2014), encontraron que la extracción con FSC utilizando CO₂ no extraía la bixina, pero resolvía el problema de desgrasados de la semilla, y en un segundo proceso utilizando agua, etanol o ambos solventes (1:1), se favorecían la extracción de bixina. Taham *et al.* (2015), llegaron a la misma conclusión, en donde se utilizó un pretratamiento de las semillas con FSC en condiciones de temperatura de 50°C, 400 bar, 1.5 L/min durante 300 min. Esto dio como resultado la obtención de un aceite rico en vitamina E. Este proceso no eliminó la bixina presente en las semillas del achiote, la cual se extrajo posteriormente usando presiones bajas y como solvente etanol. Dichas condiciones dieron como resultado valores altos en la obtención de bixina, cuantificada por UV-Vis (487 nm), y con un alto nivel de pureza.

Alcázar *et al.* (2017) estudiaron el desengrase por FSC seguido de un proceso de fraccionamiento mecánico, el cual permitió obtener una fracción de partículas finas con una cantidad significativa de bixina, hasta 7.6 g de bixina/100g de materia prima. Los resultados indicaron que la extracción de bixina se vio afectada principalmente por la temperatura de extracción, siendo la óptima 40°C. Ellos concluyeron que a temperaturas más altas aumenta la solubilidad de otras sustancias en etanol reduciendo el contenido de bixina.

Silva *et al.* (2018), realizaron un proceso similar con FSC y etanol. El proceso de FSC se llevó a cabo a 40°C y 20 MPa, el rendimiento de extracción fue de 2.06 ± 0.01 g /100 g de semillas del cual se obtuvieron tocotrienoles y geranilgeraniol a los que se les denominó pseudo residuos. Posterior al desgrasado, las semillas se colocaron en un dispositivo de agitación a 60°C en etanol en donde se extrajo la bixina, con un rendimiento de 3.4 ± 0.3 g /100 g de semillas desgrasadas.

1.3.3. Aislamiento y purificación de bixina

Rios *et al.* (2007) realizaron el aislamiento y purificación de la bixina a través de la extracción con acetato de etilo, en donde las semillas sufrieron un acondicionamiento con hexano y metanol para el desengrase. Los cristales fueron purificados por recristalización en diclorometano/etanol (1:4). Obtuvieron bixina con un

97% de pureza (determinada por HPLC). Rahmalia *et al.* (2015) y de Oliveira Júnior *et al.*, 2019, acondicionaron el método descrito por FAO / WHO19, a partir de semilla por contacto directo hasta decoloración total. Realizaron cromatografía ultrarrápida de silica gel (malla 250 a 400), usando como fase móvil hexano y acetona. El annato y la bixina fueron caracterizados por UV-Vis e IR (Figura 5).

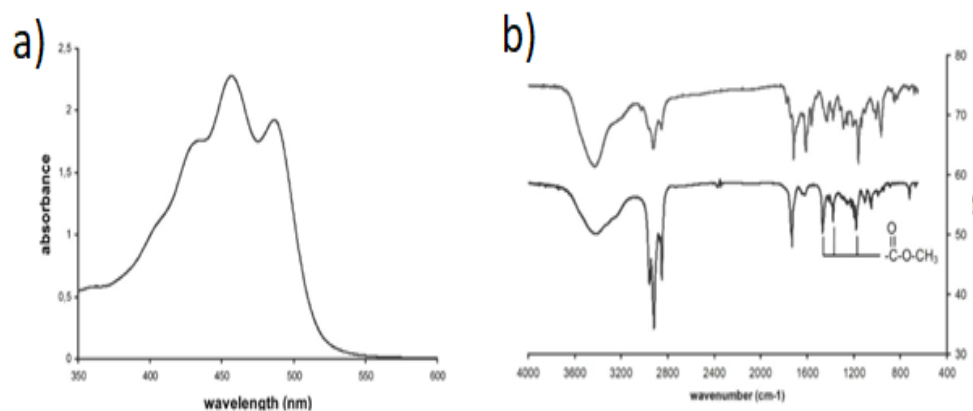


Figura 5. Caracterización espectroscópica a) UV-Vis Bixina b) IR annatto y bixina (Rahmalia *et al.*, 2015).

de Oliveira Júnior *et al.* (2019) aislaron y caracterizaron la bixina posterior al desengrase con hexano, en donde se obtuvo un precipitado rojo, el cual fue lavado con metanol, dando un rendimiento de 2.5 % (p/p). La bixina se obtuvo con una pureza de 91%, además la razón de banda 461 y 490 III / II% (ecuación 1) fue de 33%, acorde a lo reportado por Chisté *et al* (2011). La caracterización se llevó a cabo espectroscópicamente por RMN ^1H , ^1H - ^1H COSY y espectrometría de masas (Figura 6).

$$\%III/II = \frac{\text{altura mas alta-pico de longitud de onda (III)}}{\text{pico de absorción media(II)}} \times 100 \quad (1)$$

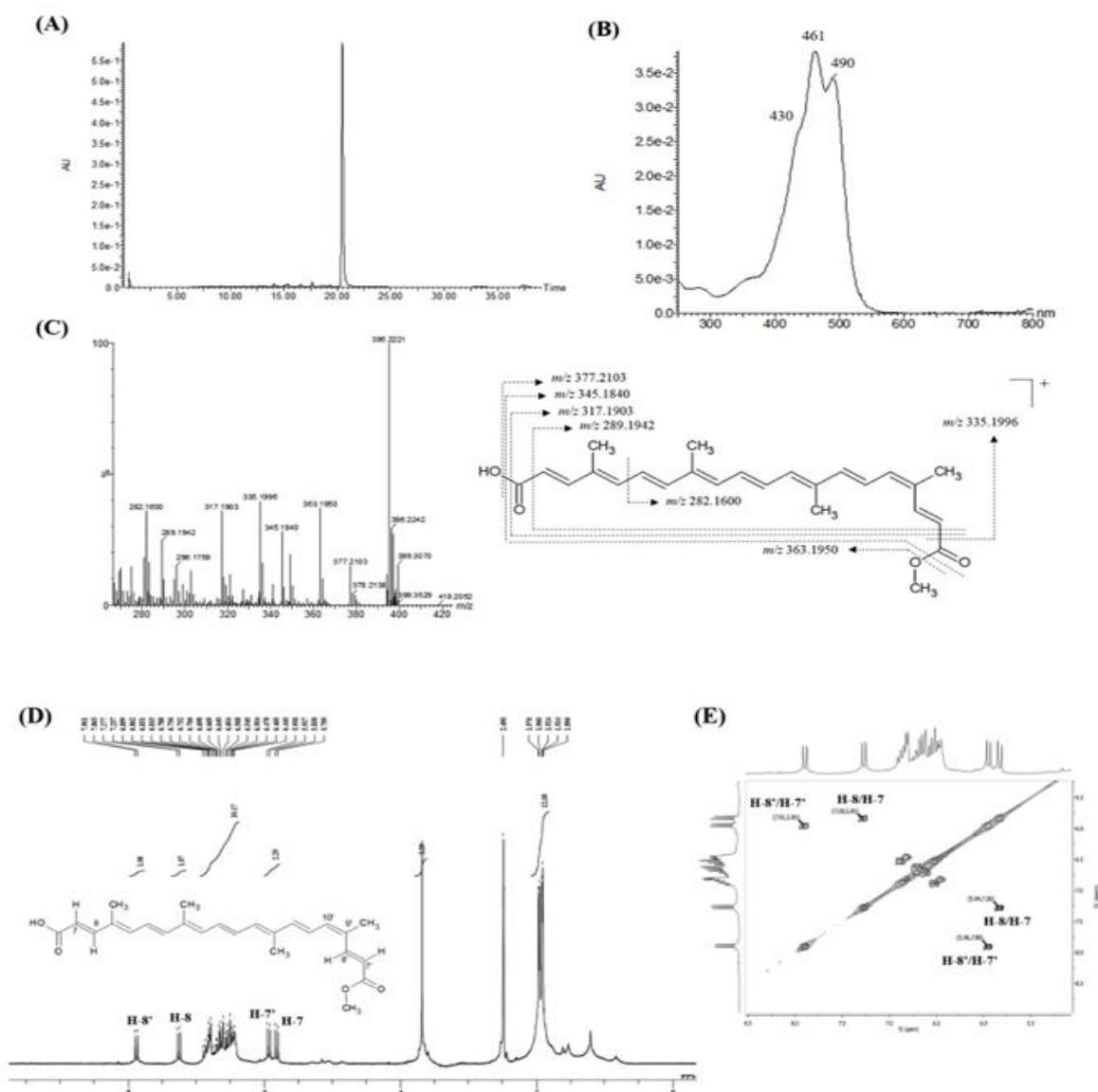


Figura 6. Caracterización de bixina. Cromatograma UPLC-DAD (A), UV-Vis (B), MS-ESI (C), ^1H RMN (D) y COSY (E) de Z-bixina purificada a partir de *B. orellana*, (de Oliveira Júnior *et al.*, 2019).

1.3.4. Degradación de componentes del annatto y de bixina

La estructura poliénica de este apocarotenoide lo hacen reactivo, en particular susceptibles a sufrir oxidaciones, degradaciones por calor, luz o presencia de ambientes acuosos. De esta forma, las condiciones de extracción y almacenamiento son factores determinantes en la composición fitoquímica de estas mezclas.

1.3.4.1. Degradación térmica

Kanjilal y Singh (1996) monitorearon la concentración de bixina en semillas a diferentes temperaturas de almacenamiento, determinando que a temperatura ambiente presentaban una reducción significativa de hasta 50% comparada con un 25% en congelador. Además, establecieron que la bixina purificada, se degradaba con mayor facilidad cuando se encontraba en ambientes húmedos y se reducía su degradación cuando se mantenía en una suspensión de aceite vegetal, tanto cuando se almacena en congelador como a temperatura ambiente.

El principal producto de descomposición de la *Z*-bixina es el éster monometílico del ácido 4,8-dimetil-tetradecahexanenedioico, el cual fue denominado C₁₇. La Figura 7 muestra el esquema de la probable ruta de degradación de la *Z*-bixina a *m*-xileno y el compuesto C₁₇. Según Scotter (1995) el tolueno es un producto de degradación junto con otros posibles hidrocarburos aromáticos que se encuentran en menor proporción. En el año 2000 Scotter et al. determinaron los productos de degradación de la bixina, monitoreándolos por cromatografía de gases al someter los annattos a cambios térmicos progresivos. Se reportó la presencia de tolueno, *m*-xileno y dihidronaftaleno, cabe resaltar que estos compuestos de degradación aromática presentan un riesgo para la seguridad alimentaria y afectan significativamente al producto. Se encontraron niveles de 30–88 ppm de *m*-xileno y en otras muestras comerciales llegaron a 160 y 200 ppm del mismo compuesto. Los resultados fueron evidencia de la degradación térmica durante la extracción y el procesamiento de este colorante. Además, se logró establecer la presencia de fragmentos C₁₇, C₁₈ y C₁₃. En otra investigación Scotter et al. (2001) establecieron la cinética de degradación térmica de la *Z* y *E*-bixina, monitoreando los productos de degradación. Ellos estudiaron no solo a diferentes temperaturas sino el medio en el cual se encontraban estos compuestos; en primer lugar, se sometió al efecto térmico directo, seguido de una serie de experimentos en disoluciones de aceite mineral y propano-1,2-diol en reflujo.

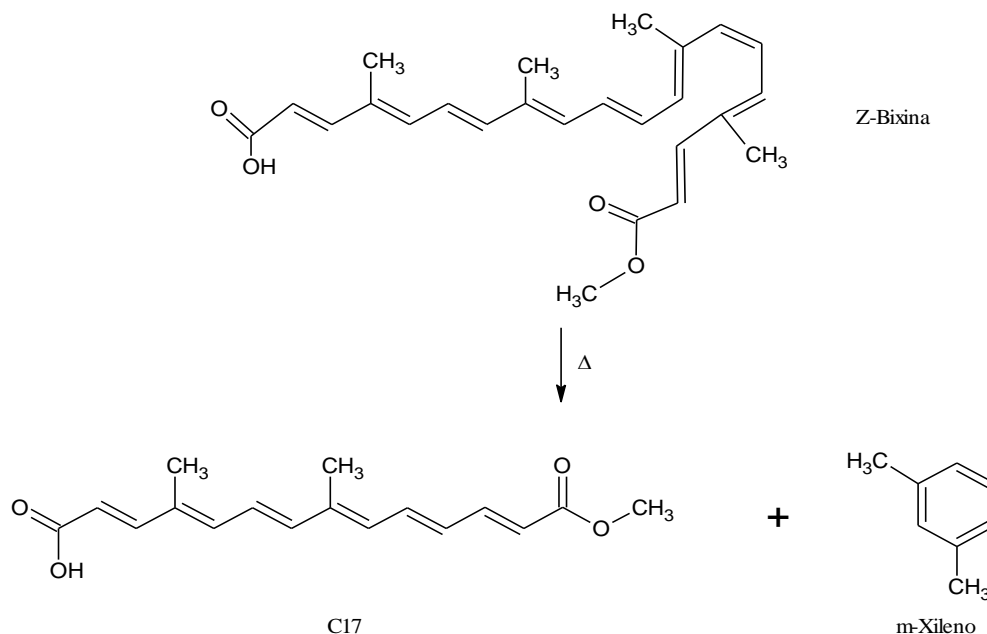


Figura 7. Degradación térmica de Z-bixina. (Scotter, 1995).

Además, se monitoreó la presencia de estos componentes aromáticos en alimentos comerciales que contenía annatto. El resultado estableció que al calentar en aceite vegetal a 140°C se formó considerablemente más *m*-xileno en comparación con el tolueno y el rendimiento de Z-bixina fue aproximadamente 10 veces mayor que la *E*-bixina. Adicionalmente, en propano-1,2-diol a 140°C durante 2 horas se encontró la mayor formación de tolueno y *m*-xileno a partir de Z-bixina y C₁₇. De esta manera demostraron que existe degradación térmica del annatto y la Z-bixina y que la degradación se lleva a cabo por reacciones de isomerización competitivas a diferentes velocidades. También se demostró con este estudio que hay formación simultánea e irreversible de C₁₇, el cual también es precursor de *m*-xileno y tolueno. Ortega et al. (2005) estudiaron los efectos en cambios térmicos, presencia de oxígeno, entre otros, sobre la Z-bixina obteniendo degradaciones de la misma.

1.3.4.2. Degradación por energía radiante

El estudio de Montenegro *et al.* (2004) demostraron que, en procesos fotosensibilizados, la Z-bixina se isomeriza a *E*-bixina, independientemente de la

presencia de oxígeno, a través de un mecanismo basado en la transferencia de energía, donde el precursor es el estado triplete de la bixina, $3Bix^*$.

Los productos de isomerización se degradaron lentamente, dando como resultado pequeños cambios de color en la solución. Además, se observó que la señal de bixina iba desapareciendo a los 10 minutos de la fotosensibilización, produciéndose ligeros cambios en los espectros UV-Vis (figura 8). Además, el consumo de bixina estuvo acompañado por la formación simultánea de nuevos compuestos que se numeraron como 1, 2, 3 y 4 con absorbancias y razón de banda %III/II mostradas en la Tabla 1. Por otro lado, no se observó degradación de bixina en condiciones de oscuridad, tanto en ausencia como en presencia del sensibilizador, lo que indicó que la bixina no se degradó y sólo se isomerizó. En la figura 9 se muestra el mecanismo propuesto en la isomerización de bixina.

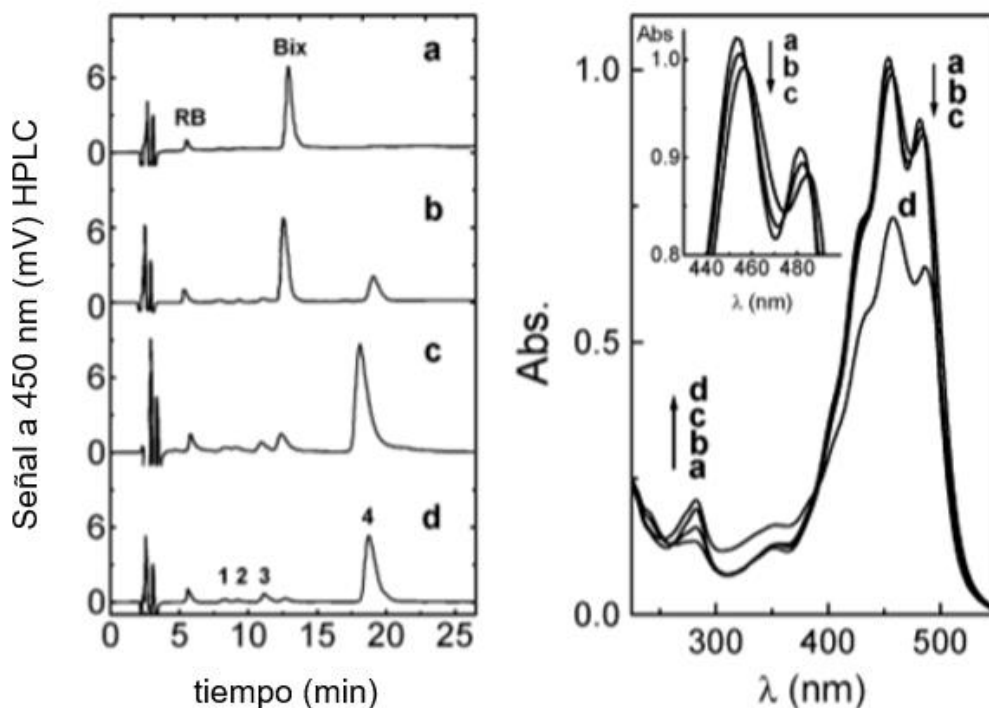


Figura 8. Monitoreo de la reacción fotoquímica de Z-bixina en aire a 20°C, 450 nm, a los 0 (a), 2 (b), 10 (c), y 150 (d) min. HPLC (izquierda), y UV-Vis (derecha), . (Montenegro *et al.*, 2004).

Tabla 1. Tiempos de retención, absorbancias UV-Vis y razón de banda III/II para la degradación de bixina por irradiación (Montenegro *et al.*, 2004).

Número de señal	t_R (min)	I (nm)	%III/II
1	8.0 ± 0.5	290, 352, 420, 455, 482	10
2	9.3 ± 0.3	285, 420, 457, 483	28
3	11.0 ± 0.9	285, 354, 422, 459, 483	21
Bixina	12.7 ± 1.0	355, 425, 461, 489	39
4	19.2 ± 1.4	285, 430, 466, 495	40

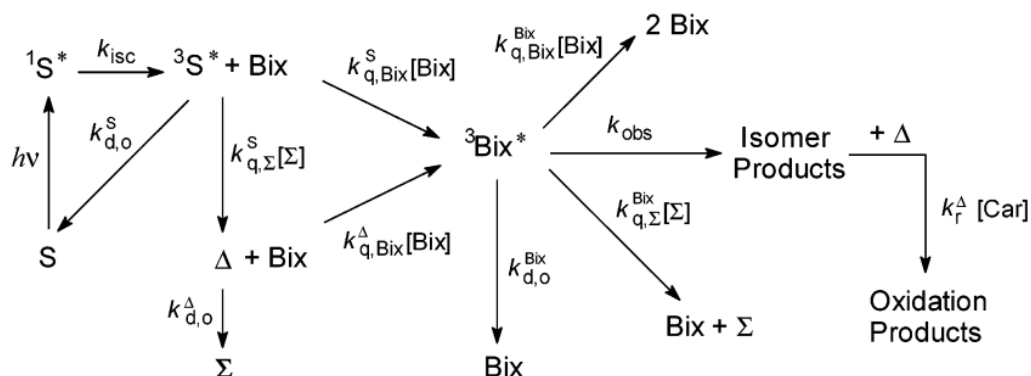


Figura 9. Mecanismo de reacción propuesto para la isomerización fotosensibilizada de bixina en soluciones tanto aireadas como no aireadas (Montenegro *et al.*, 2004).

Se demostró que los carotenoides con conformación *Z* pueden conservar su color durante las reacciones de oxidación fotosensibilizadas, debido a que el producto principal formado es el correspondiente *trans*, lo que genera un cambio batocrómico de 2-5 nm. Por otro lado, para *E*-carotenoides bajo las mismas condiciones fotosensibilizadas se formaron productos de oxidación con una cadena de enlace conjugada más corta y el color se desvaneció.

Estudios posteriores establecieron el nivel de energía en estado triplete de la *Z*-bixina y carotenoides naturales (Rios *et al.*, 2007), donde utilizaron la calorimetría fotoacústica (PAC) inducida por láser en acetonitrilo/metanol (1:1) y antraceno como sensibilizador en solución saturada de O₂.

Ellos determinaron la capacidad de extinción de oxígeno molecular singlete y de isomerización *Z*→*E*, con rendimiento cuántico de $\Phi=0.69$. En presencia de bixina,

$O_2(^1\Delta_g)$ se enfría de manera eficiente mediante un proceso de transferencia de energía con velocidad controlada por difusión constante.

La formación fotosensibilizada de $^3Bix^*$ en soluciones ACN:MeOH (1:1) saturadas de O_2 se probó mediante espectroscopía de absorción transitoria, Figura 10. Los espectros transitorios observados a 4 μs después del pulso del láser mostraron la banda de absorción típica a 520 nm asignada al estado triplete del carotenoide.

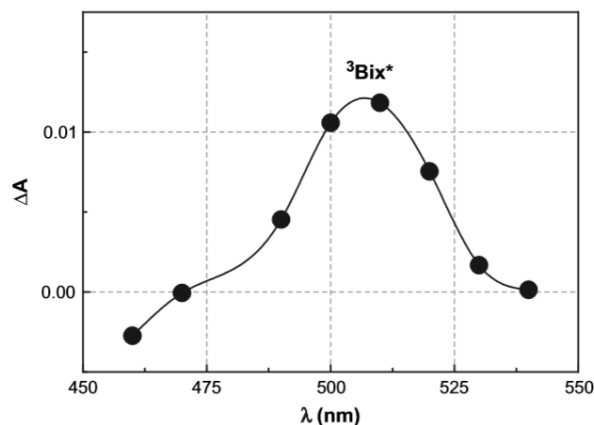


Figura 10. Espectros de absorción transitoria del estado triplete de bixina, obtenido después de 4 μs a 355 nm de excitación láser (Ríos *et al.*, 2007).

Calcularon el valor de E_T^{Bix} , y obtuvieron 18 ± 2 kcal/mol, que es similar a lo reportado para β -caroteno de 19.5 kcal/mol, bajo los mismos parámetros. Sin embargo, hay poca o ninguna información sobre la degradación fotosensibilizada de bixina ya sea en sistemas modelo o en alimentos.

1.3.4.3. Degradación por ambientes húmedos

Estudios revelaron la estabilidad de bixina con ambientes ricos en humedad, asociando parámetros como luz y aire (Gloria *et al.* 1995). Carvalho *et al.* (1993), evaluaron la estabilidad de bixina en recipientes con diferentes niveles de permeabilidad al oxígeno, determinando que en recipientes con permeabilidad al oxígeno, durante un año a 30 °C a 90% de humedad relativa y en ausencia de luz. De esta manera se concluyó que la actividad de agua no es significativa en la degradación de bixina cuando hay ausencia de radiación lumínica.

Los diferentes ambientes expuestos anteriormente pueden favorecer a Z-bixina para su preservación o transformarlo irreversiblemente en forma estructural o de degradación.

Esta investigación ahondará en estos elementos que puedan estar presentes desde el momento de la extracción hasta su exposición en el almacenamiento. Por ende, el conocimiento de los mismos favorecerá a este compuesto natural autóctono que es utilizado como tinte natural útil en la industria alimentaria y farmacológica, además de en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, control de parásitos y de plagas. Destacando su biodegradabilidad, baja toxicidad para los mamíferos y cualidades respetuosas con el medio ambiente.

Siendo América Latina una de las regiones con mayor biodiversidad del mundo y que proporciona un reservorio de moléculas nuevas y potencialmente útiles anteriormente insospechadas (Gallegos Zurita, 2016), requiere impulsar estos tipos de investigaciones que fortalezcan nuestro desarrollo y sostenibilidad..

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia a nivel mundial del compuesto de origen natural Z-bixina radica en su amplio uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, así como por su aplicación en biotecnología ambiental con la producción de celdas fotovoltaicas, entre otras. Por lo que se requiere el estudio de su posible degradación por ambientes externos de irradiación en los procesos de extracción y almacenamiento.

3. JUSTIFICACIÓN

El componente más abundante de la semilla *Bixa orellana* Linn es la Z-bixina, la cual puede sufrir degradación, isomerizaciones o generación de análogos al ser sometida a irradiación lumínica o sónica. Al ser un producto natural utilizado en la industria alimentaria, esto puede generar posibles afecciones a la salud de los consumidores. Además, los cambios en sus propiedades fisicoquímicas limitan su utilización en otros campos de la industria.

4. HIPÓTESIS

La irradiación lumínica y sónica en procesos de extracción y/o almacenamiento de Z-bixina producirá elaidinización y/o subproductos de forma irreversible.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar el extracto del arilo de la semilla de *Bixa orellana* Linn (Achiote) por métodos analíticos espectroscópicos y cromatográficos al utilizar microondas y ultrasonido comparándolas con extracción directa en solventes y estudiar la degradación de Z-bixina.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar los compuestos presentes en el extracto de la semilla *Bixa orellana* Linn (Achiote) obtenidos por microondas, ultrasonido y contacto directo.
- Estudiar la estabilidad fotoquímica de la Z-bixina por medio de irradiación solar y artificial (365 - 410 nm).
- Determinar el efecto sonoquímico para Z-bixina en soluciones halogenadas y no halogenadas.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó las condiciones de obtención para el compuesto mayoritario de la *B. orellana* y su isómero geométrico, considerando el método de extracción, así como su estabilidad a diferentes irradiaciones. Es de suma importancia el estudio de la estabilidad de estos compuestos debido a su aplicación en la industria farmacéutica, cosmética, alimenticia, energética, entre otras. Se puso en evidencia que las propiedades químicas inherentes a estos compuestos son afectadas no solo por el ambiente externo de irradiación sino también por el medio en solución donde se encuentran.

Se reporta por primera vez que la tecnología emergente utilizada en química verde de extracción ultrasónica, afecta sustancialmente la identidad de *Z*-bixina y deja de manifiesto que debe considerarse dar seguimiento a estos tipos de extracciones o irradiaciones en compuestos susceptibles a cambios isoméricos.

El objetivo general del proyecto se cumplió ya que se pudieron identificar los metabolitos presentes en el extracto *B. orellana* y como se altera su composición según el método de extracción. Además, se estudió la degradación de estos compuestos al someterlos a diferentes ambientes de irradiación.

Los análisis de los resultados nos permitieron concluir lo siguiente en cuanto a los métodos de extracción:

- Se observa 6 metabolitos presentes en el extracto de *B. orellana*. De los cuales se identifican cuatro: bixina y norbixina en ambos isómeros. El metabolito mayoritario *Z*-bixina, seguido de *Z*-norbixina y en menor proporción *E*-bixina. Siendo consistente en cloroformo, diclorometano y metanol, así como en los diferentes tiempos de exposición (alto, medio y bajo).
- Los mejores rendimientos de extracción (cantidad de annatto y contenido de *Z*-bixina) se obtuvo en contacto directo utilizando cloroformo o diclorometano como disolvente, a una temperatura igual o menor a 7°C y en oscuridad, a exposiciones de tiempos altos y medios.

- El uso de la irradiación de microondas no mejoró el rendimiento de annatto, pero si el porcentaje de *Z*-bixina contenido en el annatto.
- Para la extracción con ultrasonido en cloroformo el rendimiento de annatto es similar al obtenido por contacto directo, pero el contenido de *Z*-bixina es menor por la elaidinización a *E*-bixina debido al efecto de sonicación. Mientras que en los solventes acetona y metanol no presenta esta transformación.

Para el estudio fotoquímico de *Z*-bixina se concluye lo siguiente:

- La irradiación solar presenta menores tiempos de irradiación en comparación con el uso de las lámparas de luz artificial negra y blanca en la degradación de *Z*-bixina. Para ambas irradiaciones se observa la presencia de un fotoproducto el cual se degrada totalmente sin aparición de otros subproductos.
- El análisis espectroscópico del fotoproducto formado indica que corresponde al isómero *E*-bixina, generado por un proceso de elaidinización.
- Los productos de degradación posterior a la elaidinización no son isoprenoides de menor magnitud que las moléculas originales, sino moléculas pequeñas que indican que esta reacción de degradación es en cascada, originando dióxido de carbono, monóxido de carbono, formaldehído y ácido clorhídrico. Este último se genera únicamente cuando el solvente utilizado es cloroformo.
- La degradación de *Z*-bixina en acetonitrilo es más lenta que lo observado en cloroformo, acompañada de la formación de su isómero *E* sin llegar a la degradación total como se observa en CHCl_3 , lo cual se puede deber a que el acetonitrilo no juega un papel sinérgico como el CHCl_3 y no presenta la salida de agentes secuestradores de H.
- La reacción fotoquímica de *Z*-bixina en estado sólido presenta bajos niveles de elaidinización a *E*-bixina con respecto a lo observado en solución y con periodos cortos de degradación.

El estudio del efecto ultrasónico en la elaidinización y degradación de *Z*-bixina indica lo siguiente:

- Las soluciones de *Z*-bixina en CH_2Cl_2 y CHCl_3 presento similitud con lo observado en la reacción fotoquímica, donde el paso limitante era la elaidinización seguido de una degradación total.
- La degradación en solución de CCl_4 es inmediata, con baja interconversión al isómero, esto se debe a la ausencia del H en el carbono halogenado del solvente que es imprescindible en el paso de la generación radicalaria por ultrasonido.
- Se calculó la energía de activación para la elaidinización, que es el paso determinante.
- La cinética de reacción es de orden uno para diclorometano y cloroformo y de orden cero para tetracloruro de carbono, lo cual nos permite concluir que se requiere una solución halogenada con momento dipolar y constante dieléctrica cercanas a la *Z*-bixina para favorecer la elaidinización.

Se propone el mecanismo de degradación de la *E*-bixina, así como las condiciones a las cuales se generan los diferentes productos, a través de estudios experimentales y teóricos estableciendo que esta reacción es radicalaria tanto en fotoquímica como en sonoquímica. Además, es necesaria la presencia de hidrógenos en el solvente halogenado para la formación del radical en la caja del solvente para posteriormente generar la ruptura del doble enlace en la posición 9' de la *Z*-bixina en forma homolítica, y de esta manera se pueda llevar a cabo la elaidinización del compuesto y posteriormente la eliminación en cascada para la formación de las moléculas pequeñas.

En conclusión, general la degradación de *Z*-bixina se lleva a cabo en cualquier fuente de irradiación, luminosa o ultrasónica, y que la elaidinización está limitada por el solvente utilizado. Por ende, para la extracción, aislamiento o utilización de *Z*-bixina como colorante, componente de celdas fotovoltaicas o fármaco con actividad biológica se requiere seleccionar el método de extracción, ambientes de almacenamiento y transporte adecuado para evitar ya sea la elaidinización y degradación que cambien sus propiedades químicas y mermen su acción.

9. REFERENCIAS

- Agner, A. R., & Barbisan, L. F. (2004). Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *42*, 1687–1693. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.06.005>
- Arroyo, J., & Jaime, C. (2001). Degradación ultrasónica de contaminates organicos. *Rev. Per. Quim. Ing. Quim*, *4*(2), 3–14.
- Albuquerque, C.L. & Meireles, M.A. (2012). Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: experimental, modeling and economic evaluation of the process, *Journal of Supercritical Fluids* *66*: 86–95.
- Alcázar, S. C., Osorio, J. F., Forster, T., Meireles, M. A. (2017). Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. *Food Research International*. *99*. 393-402.
- Asma, F., Mehrez, R., & Farid, C. (2010). An original microwave steam diffusion for extraction of essential oil from oranges peels - Experimental and theoretical study. *Acta Horticulturae*, *853*, 251–262. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.853.29>
- Bachtler, S., & Bart, H. (2020). Food and Bioproducts Processing Increase the yield of bioactive compounds from elder bark and annatto seeds using ultrasound and microwave assisted extraction technologies. *Food and Bioproducts Processing*, *125*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.009>
- Bagherian, H., Ashtiani, F. Z., Fouladitajar, A., & Mohtashamy, M. (2011). Chemical Engineering and Processing: Process Intensification Comparisons between conventional , microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, *50*(11–12), 1237–1243. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.08.002>
- Bandoni, A. L., & Rondina, R. V. D. (1973). *Survey of Argentine Medicinal Plants -- Folklore and Phytochemical- Screening. II.* *3*, 161–185.

- Barrozo, M. A. S., Santos, K. G., & Cunha, F. G. (2013). Mechanical extraction of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds in spouted bed. *Industrial Crops and Products*, 45, 279–282. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.052>
- Braga, M. E. M., & Meireles, M. A. A. (2007). Accelerated solvent extraction and fractioned extraction to obtain the curcuma longa volatile oil and oleoresin. *Journal of Food Process Engineering*, 30(4), 501–521. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00133.x>
- Carvalho, P. R. N. Silva, M. G., Moreira, CGC. (1993). Avaliação dos Métodos Espectrofotométricos de Análise de Sementes de Urucum (*Bixa orellana* L.), Coletânea ITAL, Campinas, 23 (2): 181-188.
- Carvalho, P.R. Silva, M.G. Fabri, E.G. Tavares, P. Martins, A.L.M. Spatti, L.R. (2010). Bixin and lipids content in annatto seeds from collection of the Instituto Agrônômico (IAC), *Bragantia* 69: 519–524.
- Campos, R., Yamashita, F., Cesar, F., & Zerlotti, A. (2011). *Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds*. 1218, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.094>
- Cárdenas, O., Vega Rodríguez, S., Cárdenas Chaparro, A., De Leon Rodriguez, A., & de Loera, D. (2022). Effect of Solar and Artificial Radiation on Elaidinization and Degradation of Z-Bixin Extracted from *Bixa orellana* Seeds. *ChemistrySelect*, 7(27), 4–11. <https://doi.org/10.1002/slct.202201336>
- Castro, C.V., & Murcia, S.C.L. (2013) Licopeno y Salud Humana. *Rev Reciteia* 12:42–79
- Chisté, R. C., Mercadante, A. Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. D. C., & Bragagnolo, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127(2), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.139>
- Conabio (sin fecha). *Bixa orellana*. Recuperado de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/13-bixac1m.PDF

- Cordoba, V.J.A. (1987). El Achiote: Cultivo, Beneficio y pPosibilidad de exortación. *Revista Esso Agrcola*. 44(1), 3-7.
- Costa, C. K. (2007). Estudio fitoquimico de *Bixa orellana* L., Tesis de Mestria Universidad Federal de Panamá.
- de Oliveira Júnior, R. G., Bonnet, A., Braconnier, E., Groult, H., Prunier, G., Beaugeard, L., Grougnet, R., da Silva Almeida, J. R. G., Ferraz, C. A. A., & Picot, L. (2019). Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 125(January), 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.013>
- de Oliveira Rios, A., & Mercadante, A. Z. (2004). Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. *Food Additives and Contaminants*, 21(2), 125–133. <https://doi.org/10.1080/02652030310001642771>
- Delgado-Vargas, F. Jimenez, A.R. Paredes-López, O. (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40:173–289
- Devia Pineda, J. E., & Saldarriaga Calderón, L. (2003). Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*). *Revista Universidad EAFIT*, 39(131), 8–22. <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/899>
- Erdawati, E., Allanas, E., & Wesnina, W. (2021). Extraction of bixin from annatto seeds with microwave. *Journal of Physics: Conference Series*, 1869(012016). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1869/1/012016>
- Evans, W. C. (1992). Trease and Evans Pharmacognosy. 13.ed. London: BeillièreTindall
- Fleischer, T. C., Ameade, E. P. K., Mensah, M. L. K., & Sawyer, I. K. (2003). *Antimicrobial activity of the leaves and seeds of Bixa orellana*. 74(02), 136–138. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00289-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00289-7)
- Frega, N., Mozzon, M., & Bocci, F. (1998). Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal*

- of the American Oil Chemists' Society, 75(12), 1723–1727.
<https://doi.org/10.1007/s11746-998-0323-1>
- Franco, C. F. De O. (2008). Urucum: sistema de produção para o Brasil, João Pessoa: EMEPA-PB.
- Galindo-Cuspinera, V., & Rankin, S. A. (2005). Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound(s) in commercial water-soluble annatto extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2524–2529.
<https://doi.org/10.1021/jf048056q>
- Gallegos Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac Med.*, 77(4)(10.15381), 327–332. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- García, M., & Montalvo, A. M. (2011). *Effect of Bixa orellana against Leishmania amazonensis*. 601, 351–353. <https://doi.org/10.1159/000335280>
- Giorgi, A., Marinis, P. De, Granelli, G., Chiesa, L. M., & Panseri, S. (2013). *Secondary Metabolite Profile , Antioxidant Capacity , and Mosquito Repellent Activity of Bixa orellana from Brazilian Amazon Region*.
- Giron, L., Freire, V., Alonzo, A., & Armando, C. (1991). *Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of*. 34(1959), 173–187.
- Giuliano, G., Rosati, C., & Bramley, P. M. (2003). *To dye or not to dye : biochemistry of annatto unveiled*. 21(12), 513–516.
- Gloria M. B.A., Vale S. R., Bobbio P. A. (1995). Effect of Water Activity of Bixin in an Annatto Extract-Microcrystalline Cellulose Model System. *Food Chemistry*, 52, (4):389- 391.
- Golin, s. D., Rocha Garcia, C. E., barreira, s. M. W., Bednarczuk, V. O., strapasson, G. C., Zuchetto, M., & Miguel, O. G. (2013). Concentration of bixin in two varieties of bixa orellana I. Cultured in parana. *Visão Acadêmica*, 14(4).
<https://doi.org/10.5380/acd.v14i4.34795>
- Gómez-Ortíz, N. M., Vázquez-Maldonado, I. A., Pérez-Espadas, A. R., Mena-Rejón, G. J., Azamar-Barrios, J. A., & Oskam, G. (2010). Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 94(1), 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2009.05.013>

- Gupta, P., Sreelakshmi, Y., & Sharma, R. (2015). A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0051-0>
- Gutiérrez Valencia, T. M., Hoyos Saavedra, O. L., & Cuervo Ochoa, G. (2016). ESTUDIO CINÉTICO DE LA DEGRADACIÓN TÉRMICA DE TRANS-x-CAROTENO EN UCHUVA. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 126. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)126-134](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)126-134)
- Häberli, A., & Pfander, H. (1999). Synthesis of Bixin and Three Minor Carotenoids from Annatto (*Bixa orellana*). *Helvetica Chimica Acta*, 82(5), 696–706. [doi:10.1002/\(sici\)1522-2675\(19990505\)82:5<696::aid-hlca696>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/(sici)1522-2675(19990505)82:5<696::aid-hlca696>3.0.co;2-x)
- Hatami, T., Cavalcanti, R. N., Takeuchi, T. M., & Meireles, M. A. A. (2012). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) flowers: Kinetic, experiments and modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, 65, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.03.001>
- Kanjilal, P.B & Singh, R.S. (1996) Agronomic Evaluation of Annatto (*Bixa orellana* L.), *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 3:3, 13-17. http://dx.doi.org/10.1300/J044v03n03_03
- Kieffer, L. A., De la Sierra, P. M., Claret, M., Martín, C., & Leiz, E. (2020). Synergic sonochemical decoloration of methyl orange using trichloromethane in two ultrasonic reactors. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 36(1), 7–20. <https://doi.org/10.20937/RICA.2020.36.53034>
- Kuehnle, M. (2007). *Original Paper Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR*. 2382–2390. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700089>
- Konovalova, T. A., Kispert, L. D., & Konovalov, V. V. (1997). Photoinduced electron transfer between carotenoids and solvent molecules. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(39), 7858–7862. <https://doi.org/10.1021/jp9708761>
- Lauro, G. J. (1991). A primer on natural colors. *Cereal Foods World*, 36, 949–953.
- Lóránd, T., Molnár, P., Deli, J., & Tóth, G. (2002). FT-IR study of some seco- and apocarotenoids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53(1–3), 251–258. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00113-6](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00113-6)

- Mckeown, G.G & Mark, E. (1962). The Composition of Oil-Soluble Annatto Food Colors, *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 45,(3, 1), 761–766, <https://doi.org/10.1093/jaoac/45.3.761>
- Meireles, M.A., Leal, . P.F., & Rosa, P.T.V. (2008) Extraction process and purification pro-cess in series of active compounds and colorants from solid matrices usingsupercritical CO₂: bixin from annatto, Patent BRPI0605425.
- Mejia, Kember. Rengifo, E. (2001). Plantas medicinales de Uso Popular en la Amazonia Peruana. *Libro, Tarea Asoc*, 286.
- Mercadante, A. Z., Steck, A., Rodriguez-Amaya, D., Pfander, H., & Britton, G. (1996). Isolation of methyl 9'Z-APO-6'-lycopenoate from Bixa Orellana. *Phytochemistry*, 41(4), 1201–1203. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00784-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00784-9)
- Mercadante, A. Z., Steck, A., & Pfander, H. (1997a). Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochemistry*, 46(8), 1379–1383. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00462-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00462-7)
- Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. (1997b). Isolation and Identification of New Apocarotenoids from Annatto (*Bixa orellana*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1050–1054. doi:10.1021/jf960412k
- Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. (1999). Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. , 52(1), 135–139. doi:10.1016/s0031-9422(98)00761-4
- Mercadante, A. Z (2001). Composition of carotenoids from annatto. In *Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants*; ACS Symposium Series 775; Ames, J. M., Hofmann, T. F., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC,; pp 92-101.
- Milliken, W. (1997). *Plants for malaria for fever, medicinal species in Latin America* . London: The Royal Botanical Garden.
- Montenegro, M. A., Rios, Al. D. O., Mercadante, A. Z., Nazareno, M. A., & Borsarelli, C. D. (2004). *Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin*. 367–373.
- Morcote-Rios, G. (2006). Tumbas y plantas antiguas del suroccidente colombiano. *Boletin Museo de Oro*, 54. 46-71.

- Najar, S. V, Bobbio, F. O., & Bobbio, P. A. (1988). *Annatto Extracts (Bixa orellana)*. 29, 283–289.
- Ortega, S. M., Passos, M., & Fontana, J. D. (2005). Bixin and -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. v. 40. p. 865-872.
- Otero, R., Fonnegra, R., Jime, S. L., Valderrama, R., Duque, A., & Ve, H. N. (2000). *Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants*. 71, 493–504.
- Payes, E. (2013). OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO COLORANTE DEL ACHIOTE (Bixa orellana L.) A NIVEL LABORATORIO. *Tesis, UNIVERSIDA*.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Bourvellec, C. Le, Renard, C. M. G. C., & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.026>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Farid, C. (2013). Natural Product Extraction: Principles and Applications - The Royal Society of Chemistry. *Chapter 3 - Ultrasound-Assisted Extraction*, 21, 89–112. <https://doi.org/10.2212/spr.2009.5.1>
- Pittier, H (1978). *Plantas usuales de Costa Rica*, Editorial, Costa Rica, p330
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., García-Blairsy Reina, G., Señoráns, F. J., & Ibáñez, E. (2012). Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.024>
- Prado, J. M., Dalmolin, I., Carareto, N. D. D., Basso, R. C., Meirelles, A. J. A., Oliveira, J. V., Batista, E. A. C., & Meireles, M. A. A. (2012). Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, 109(2), 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.007>
- Prentice-Hernández, C. Rusig, O. (1992). Bixin extract from annatto (Bixaorellana L.)obtained using ethanol as solvent, *Biology and Technology* 35-1: 63–74.

- Preston, H. D., & Rickard, M. D. (1980). *Extraction and chemistry of annatto*. 5, 47–56. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(80\)90063-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(80)90063-1)
- Qadariyah, L., Gala, S., Widoretno, D. R., Kunhermanti, D., Bhuana, D. S., & Mahfud, M. (2017). *Jackfruit (Artocarpus heterophyllus lamk) Wood Waste as a Textile Natural Dye by Microwave-assisted Extraction Method*. 100007. <https://doi.org/10.1063/1.4982324>
- Quiroz, J. Q., Torres, A. C., Ramirez, L. M., Garcia, M. S., Gomez, G. C., & Rojas, J. (2019). Optimization of the microwave-assisted extraction process of bioactive compounds from annatto seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*, 8(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antiox8020037>
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., Godoy-Hernández, G., & Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2579-7>
- Rahmalia, W., Fabre, J.-F., & Mouloungui, Z. (2015). Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. *Procedia Chemistry*, 14, 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.061>
- Ramamoorthy, S., Prabhu, F., Kundu, K., Satyanarayana, V. S. V., & Kumar, V. (2010). Molecular characterization of bixin — An important industrial product. *Industrial Crops & Products*, 32(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.03.001>
- Rehbein, J., Dietrich, B., Grynbaum, M. D., Hentschel, P., Holtin, K., Kuehnle, M., Schuler, P., Bayer, M., & Albert, K. (2007). Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR. *Journal of Separation Science*, 30(15), 2382–2390. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700089>
- Revilla, J. (2001) *Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis*. 1.ed. Manaus: Sebrae/ INPA,. 405p.
- Rios, A. D. O., Borsarelli, C. D., & Mercadante, A. Z. (2005). Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2307–2311. <https://doi.org/10.1021/jf0481655>

- Rios, A. de O., Mercadante, A. Z., & Borsarelli, C. D. (2007). Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes and Pigments*, 74(3), 561–565. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.03.018>
- Rodrigues, L. M., Alcázar-Alay, S. C., Petenate, A. J., & Meireles, M. A. A. (2014). Bixin extraction from defatted annatto seeds. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.10.010>
- Rostagno, M. A., Villares, A., Guillamón, E., García-Lafuente, A., & Martínez, J. A. (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2–29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.035>
- Ruiz-anchondo, T., Flores-holguín, N., & Glossman-mitnik, D. (2010). *Natural Carotenoids as Nanomaterial Precursors for Molecular Photovoltaics: A Computational DFT Study*. 4490–4510. <https://doi.org/10.3390/molecules15074490>
- Santos, D. T., & Meireles, A. A. (2011). *Micronization and encapsulation of functional*. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2011.00651.x>
- Schmidt-Hebbel, H. (1980). Las Especies (Condimentos Vegetales) su Importancia en Quimica Tecnologica de Alimentos y en el Arte Culinario. Editorial Universitaria Santiago Chile, pp. 146
- Schmidt, A. Wachtler, B. Temp, U. Krekling, T. Seguin, A. & Gershenzon J.A. (2010) Bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies*. *Plant Physiol* 152:639–655.
- Scotter, M. J., Wilson, L. A., Appleton, G. P., & Castle, L. (2000). Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 2. Determination of aromatic hydrocarbon thermal degradation products by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 484–488. <https://doi.org/10.1021/jf9901845>
- Scotter, M. J., Castle, L., & Appleton, G. P. (2001). Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. *Food Chemistry*, 74(3), 365–375. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00135-2)

- Scotter, M. (2009a). Food Additives & Contaminants : Part A The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *January 2014*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/02652030902942873>
- Scotter, M. (2009b). The chemistry and analysis of annatto food colouring: A review. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(8), 1123–1145. <https://doi.org/10.1080/02652030902942873>
- Scotter, M. J. (1995). Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. *53*, 177–185.
- Silva, G. F., Cavalcanti, S.A., Sobral, M. C. (1994) Extracción de colorantes annatto II, *Actas de la Asociación Brasileña de Química*. 4 (2) , 58 – 64.
- Silva, E. K., Martelli, M., Vardanega, R., Nogueira, G. C., Zobot, G. L., & Meireles, M. A. (2018). Technological characterization of biomass obtained from the turmeric and annatto processing by using green technologies. 189, 231-239.
- Sinha, K., Chowdhury, S., Saha, P. Das, & Datta, S. (2013). Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). *Industrial Crops and Products*, 41(1), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.004>
- Taham, T., Cabral, F. A., & Barrozo, M. A. S. (2015). The Journal of Supercritical Fluids Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *The Journal of Supercritical Fluids*, 100, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.006>
- Tan, B. Foley, J. (2002). Tocotrienols and geranylgeraniol from *Bixa orellana* by products patent US6350453.
- Tan, B.(2005). Appropriate spectrum vitamin E and new perspectives on desmethyl tocopherols and tocotrienols. *American Nutraceutical Association* 8: 35-42.
- Tay-Agbozo, S. S., Krzyaniak, M. D., Bowman, M. K., Street, S., & Kispert, L. D. (2015). DFT and ENDOR study of bixin radical cations and neutral radicals on silica-alumina. *Journal of Physical Chemistry B*, 119(24), 7170–7179. <https://doi.org/10.1021/jp506806n>

- Tirimanna, A. S. L. (1981). Study of the carotenoid pigments of *Bixa orellana* L. Seeds by thin layer chromatography. *Mikrochimica Acta*, 76(1–2), 11–16. <https://doi.org/10.1007/BF01197299>
- Yolmeh, M., Habibi Najafi, M. B., & Farhoosh, R. (2014). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 155, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.059>

GLOSARIO

Actinomorfas:	Dicho de un verticilo o de la flor a la que pertenece: Que tiene sus partes, especialmente sépalos, pétalos o tépalos, dispuestas regularmente, con simetría radiada en torno al eje del pedúnculo floral,
Árbol perene	Son aquellas plantas que pueden vivir por más de dos años. Por otro lado, el término perenne se usa para hacer referencia al follaje de una planta que no se renueva cada año, sino que conserva su verde en todas las estaciones, y proporciona frutos en las estaciones propicias.
Arilo:	Envoltura, casi siempre carnosa y de colores vivos, que tienen algunas semillas.
Entomófila:	Que es polinizada por los insectos.
Exocarpio:	Es la parte más externa de los frutos y suele protegerlo del exterior
Hermafrodita:	Son aquellas plantas que poseen los órganos masculinos (estambres) y femeninos (pistilo) en la misma flor.
Inflorescencias:	Disposición que toman y orden en que aparecen y se desarrollan las flores en una planta cuyos brotes florales se ramifican. Conjunto de flores que nacen agrupadas de un mismo tallo.
Ortodoxa:	Son las semillas que sobreviven a los periodos de desecación y congelación durante su conservación ex situ
Panícula:	Inflorescencia racimosa compuesta de racimos que van decreciendo de tamaño hacia el ápice
Pedúnculo:	Tallo de una hoja, fruto o flor por el cual se une al tallo de la planta.
Sincrónica:	Es la coincidencia en la producción de flores en un tiempo determinado