



DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Niveles de tocotrienoles, tocoferoles y capacidad
antioxidante *in vitro* de diferentes accesiones de achiote
(*Bixa orellana* L.)

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A

M. en B.E. Denise Raddatz Mota

Comité Tutorial:

Director: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Asesora: Dra. Laura J. Pérez Flores

Asesor: Dr. Fernando Carrari

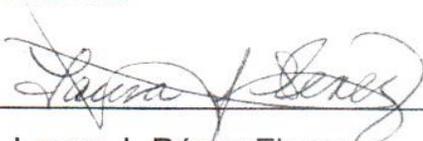
Diciembre, 2016

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 233317.

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (Edif. S-253) del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. También, este trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IB-INTA) en Argentina, así como en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, como parte de mi estancia de doctorado.

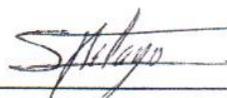
El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Niveles de tocotrienoles, tocoferoles y capacidad antioxidante *in vitro* de diferentes accesiones de achiote (*Bixa orellana* L.)", que presentó Denise Raddatz Mota el día 15 de Diciembre del año 2016.

Presidente:



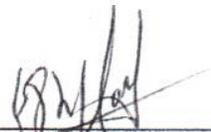
Dra. Laura J. Pérez Flores

Secretario:



Dra. Clara Pelayo Zaldivar

Vocal:



Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

Vocal:



Dra. Angélica Román Guerrero

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dr. Fernando Rivera Cabrera.
Profesor Titular "C" T.C.
Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas,
Edif. S-253
Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.
frc@xanum.uam.mx; ferivera2323@yahoo.com

Asesora:

Dra. Laura J. Pérez Flores.
Profesor Titular "C" T.C.
Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas,
Edif. S-253
Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.
ljpf@xanum.uam.mx

Asesor:

Dr. Fernando Carrari.
Profesor-Investigador Titular.
Laboratorio de Genómica Estructural y Funcional de Solanáceas, Instituto
de Biotecnología.
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.
fcarrari@cnia.inta.gov.ar

Dedicatoria

*A mis padres Alma Rosa Mota Sánchez y Luis Manuel Raddatz Flores
que adoro con toda mi fuerza, alma y corazón.*

*Agradezco infinitamente su amor, apoyo incondicional, sus consejos y esmero
para que sea una mejor persona cada día.*

Nunca terminaría de agradecerles todo lo que han hecho por mí.

Siempre están en mi mente y corazón.

Los amo y son mi vida.

*A mi amado hermano Luis Jorge Raddatz Mota por apoyarme y escucharme
siempre que lo necesité.*

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa por permitirme continuar con mis estudios y al CONACYT por el apoyo económico otorgado.

Al SNICS, a la red SINAREFI-Achiote, REMEFI que ha apoyado diversos proyectos de investigación con el fin de caracterizar, preservar y propagar el material genético de achiote (*Bixa orellana* L.). Al Instituto Tecnológico de Conkal y al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por el material biológico proporcionado.

Un especial agradecimiento al Dr. Fernando Rivera Cabrera y a la Dra. Laura J. Pérez Flores por su gran apoyo, asesoramiento, consejos para mi proyecto de investigación y realización de esta tesis. Además, por brindarme su cariño y amistad.

Agradezco al Dr. Fernando Carrari, a la Dra. Marina Insani y al Dr. Ramón Asis por el apoyo proporcionado durante mi estancia en Argentina y por sus recomendaciones en la parte de cromatografía.

Agradezco al Dr. Alberto Mendoza Espinoza y al Dr. Ángel Bañuelos Hernández por su tiempo, consejos, asesoramiento en la metodología y análisis de resultados de este proyecto. También, agradezco al Dr. Fernando Díaz de León Sánchez, a la Dra. Clara Pelayo Zaldivar y a la Dra. Angélica Román Guerrero por sus recomendaciones y consejos para el enriquecimiento de este trabajo.

Un infinito agradecimiento a mis queridos amigos del laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas: Rayn, Juan Manuel, Cristián, Dario, Jesús, Omar, Addy, David, Susana, Faby, Oscar y Gaby por su valiosa amistad, por alegrarme siempre el día, por apoyarme en las jornadas de trabajo y por escucharme. Los quiero mucho y ya los extraño.

Agradezco al amor de mi vida Ricardo Cerón Cardelas por su apoyo, amor incondicional y tiempo compartido. Gracias por existir y ser mi compañero de vida. Gracias por todos tus consejos, por animarme y estar ahí en todo momento.

Agradezco a mis niños hermosos Piter y Bango por darme felicidad y hacerme sonreír. Siempre están en mi corazón.

Abreviaturas

L*	Luminosidad
C*	Cromaticidad
H	Tono
A	Alfa
B	Beta
Γ	Gama
Δ	Delta
T3	Tocotrienol
Ts	Tocoferol
FRT3-Ts	Fracción rica en tocotrienoles y tocoferoles
ABTS	(2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico])
PSS	Peso seco de semilla
EAG	Equivalentes de ácido gálico
CFT	Compuestos fenólicos totales
CAET	Capacidad antioxidante equivalente a trolox
CA	Capacidad antioxidante

Resumen

El achiote (*Bixa orellana*) es una planta utilizada para obtener un colorante natural rico en carotenoides (principalmente bixina y norbixina); además, es la especie vegetal con el mayor contenido de tocotrienoles. En este trabajo, se determinó el rendimiento de pigmento obtenido de las semillas de siete accesiones mexicanas de *Bixa orellana*. También se evaluó el tamizaje fitoquímico, parámetros de color, norbixina, bixina, ácidos orgánicos, vitamina C, tocotrienoles, tocoferoles, compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante en extractos de achiote. El tamizaje fitoquímico mostró la presencia de alcaloides sin detectarse saponinas, taninos, cumarinas y antraquinonas. El mayor porcentaje de rendimiento de pigmento fue obtenido con KOH (4.84%). Las accesiones 43 ($L^* = 4.01 \pm 0.79$, $C^* = 7.33 \pm 1.07$, $h = 25.76 \pm 6.35$) y 50 ($L^* = 3.17 \pm 0.64$, $C^* = 6.81 \pm 0.53$, $h = 26.41 \pm 4.41$) presentaron los valores más bajos de los parámetros de color, lo que significa que estas accesiones tuvieron un color más oscuro y más rojo. Cuatro accesiones mostraron el mayor contenido de bixina: accesión 48 (3.1%), 45 (2.6%) 43 (2.4%) y 47 (2.2%). No se detectó ninguno de los ácidos orgánicos estudiados y se observaron cantidades traza de vitamina C. La accesión 50 mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y de tocotrienoles (T3), principalmente la isoforma δ -T3 ($5.03 \pm 0.64 \text{ mg g}^{-1}$ peso seco de semilla), así como también la mayor capacidad antioxidante.

Abstract

Achiote (*Bixa orellana*) is a plant used for obtaining a natural dye rich in carotenoids (mainly bixin and norbixin); it is also the plant species with the highest tocotrienols content in nature. In the present work, the pigment yield obtained from the seeds of seven Mexican accessions of *Bixa orellana* was quantified. Also phytochemical screening, color parameters, norbixin, bixin, organic acids, vitamin C, tocotrienols, tocopherols, total phenolic compounds and antioxidant capacity were evaluated in the corresponding annatto extracts. Phytochemical screening showed the presence of alkaloids without observing saponins, tannins, coumarins and anthraquinones. The highest percentage of pigment yield was obtained with KOH (4.84%). Accessions 43 ($L^* = 4.01 \pm 0.79$, $C^* = 7.33 \pm 1.07$, $h = 25.76 \pm 6.35$) and 50 ($L^* = 3.17 \pm 0.64$, $C^* = 6.81 \pm 0.53$, $h = 26.41 \pm 4.41$) had the lowest color values, meaning these accessions had a darker and redder color. Four accessions showed a higher content of bixin: accession 48 (3.1%), 45 (2.6%), 43 (2.4%) and 47 (2.2%). None of the studied organic acids were detected and trace amounts of vitamin C were observed. Accession 50 had showed the highest content of total phenolic compounds and of tocotrienols (T3), mainly the isoform δ -T3 ($5.03 \pm 0.64 \text{ mg g}^{-1}$ Seed Dry Weight), as well as the highest antioxidant capacity.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Origen y distribución del achiote.....	1
1.2 Clasificación taxonómica.....	1
1.3 Agroecología y botánica.....	2
1.4 Composición química de <i>Bixa orellana</i>	4
1.5 Potencial nutracéutico y efectos benéficos en la salud.	11
1.5.1 El achiote en la medicina tradicional.....	11
1.6 Producción y comercialización.....	12
1.6.1 Valor comercial de la semilla en mercados internacionales.....	14
1.7 Usos y aplicaciones industriales de los extractos de achiote (<i>Bixa orellana</i>).....	15
1.7.1 Tipos de extractos (formas comerciales del colorante).....	15
1.7.1.1 Extracto soluble en aceite.....	16
1.7.1.2 Suspensión en aceite.....	17
1.7.1.3 Extracto soluble en agua.....	17
1.7.1.4 Emulsión.....	18
1.7.2 Regulación de los extractos de achiote como colorante natural.....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos particulares.....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Obtención del material biológico.....	22
5.2 Tamizaje fitoquímico.....	23
5.2.1 Obtención de los extractos.....	23
5.2.2 Saponinas.....	24

5.2.3 Taninos.....	24
5.2.4 Cumarinas.....	25
5.2.5 Antraquinonas.....	25
5.2.6 Alcaloides.....	25
5.3 Cuantificación del rendimiento de pigmento de la semilla.....	26
5.3.1 Extracción con agua alcalina.....	26
5.3.2 Extracción con etanol absoluto.....	27
5.3.3 Extracción con agua.....	27
5.4 Determinación de los parámetros de color.....	28
5.5 Determinación del contenido de norbixina.....	29
5.6 Determinación del contenido de bixina.....	29
5.7 Determinación del contenido de ácidos orgánicos.....	31
5.8 Obtención de una fracción rica en tocotrienoles y tocoferoles (FRT3-Ts).....	32
5.8.1 Determinación del contenido de tocotrienoles y tocoferoles.....	32
5.9 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.....	33
5.9.1 Compuestos fenólicos totales.....	35
5.9.2 Capacidad antioxidante.....	35
5.10 Análisis estadístico.....	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
6.1 Tamizaje fitoquímico.....	36
6.2 Rendimiento de pigmento en la semilla.....	37
6.3 Parámetros de color.....	39
6.4 Contenido de norbixina.....	42
6.5 Contenido de bixina.....	42
6.6 Contenido de ácidos orgánicos y vitamina C.....	44
6.7 Contenido de tocotrienoles y tocoferoles.....	46
6.8 Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.....	49
7. CONCLUSIONES.....	53

8. PERSPECTIVAS.....	54
9. REFERENCIAS.....	55
ANEXO. Artículo científico publicado en la Revista Mexicana de Ingeniería Química.....	64

Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los pigmentos de achiote (bixina y norbixina).....	5
Tabla 2. Información sobre el origen de las semillas de las accesiones de achiote estudiadas (<i>Bixa orellana</i> L.).....	23
Tabla 3. Análisis cualitativo de fitoquímicos en semillas de achiote.....	37
Tabla 4. Porcentaje de rendimiento de pigmento de los extractos de achiote...	38
Tabla 5. Ácidos orgánicos y vitamina C presentes en semillas de achiote.....	46
Tabla 6. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en fracciones metanólicas de semillas de achiote.....	52

Índice de Figuras

Figura 1. Planta de achiote (<i>Bixa orellana</i> L.). A) planta completa, B) flor, C) racimo de frutos, D) dehiscencia del fruto, E) semillas y F) colorante en polvo obtenido de las semillas.....	3
Figura 2. Estructuras químicas de la <i>cis</i> -bixina, <i>trans</i> -bixina, <i>cis</i> -norbixina y <i>trans</i> -norbixina.....	7
Figura 3. Interconversión de los pigmentos de achiote por efecto de la temperatura, hidrólisis alcalina y acidificación.....	8
Figura 4. Estructuras químicas de los tocoferoles y tocotrienoles.....	10
Figura 5. Parámetros de color (L^* , C^* , h) de los extractos de semillas de achiote. Luminosidad (L^*) en: (a) extractos con KOH; (b) extractos con etanol; (c) extractos con agua; Cromaticidad (C^*) en: (d) extractos con KOH; (e) extractos con etanol; (f) extractos con agua; Tono (h) en: (g) extractos con KOH; (h) extractos con etanol; (i) extractos con agua.....	41
Figura 6. Contenido de carotenoides en semillas de accesiones de achiote (a) porcentaje de norbixina y (b) contenido de bixina.....	44
Figura 7. Cromatograma de ácidos orgánicos y vitamina C (estándares comerciales). Los números en los picos corresponden a: 1) oxálico, 2) tartárico, 3) vitamina C, 4) málico, 5) láctico y 6) cítrico.....	45
Figura 8. Contenido de tocotrienoles y tocoferoles en semillas de accesiones de achiote (a) δ -tocotrienol, (b) α -tocotrienol y (c) γ -tocoferol.....	48
Figura 9. Cromatograma representativo de una fracción obtenida de semillas de achiote a partir de la accesión 42. Los números en los picos corresponden a: 1) α -Ts, 2) α -T3, 3) β -Ts, 4) γ -Ts, 5) δ -Ts y 6) δ -T3.....	49

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen y distribución del achiote

El achiote (*Bixa orellana* L.) es una de las primeras plantas neotropicales cultivadas en la cuenca del Amazonas. Los americanos nativos de Sudamérica a lo largo del tiempo fueron dispersando la especie hacia el resto de América del Sur, Centroamérica y el Caribe. Desde los tiempos precolombinos, los americanos nativos han tenido conocimiento sobre los usos y el valor del achiote, principalmente como colorante para diferentes productos y como pintura corporal/facial. El achiote es conocido también con los nombres de achote, achote del monte, achioti, bixa, bija, bijol, bijo, urucú, onoto, orellana, orlean, pumacua, bicha, caituco, chacangaricua, entre otros (Janick, 2012). El nombre de achiote se deriva de la palabra náhuatl “achioti” (que significa semilla brillante) y el nombre de la especie fue asignado en honor al descubridor del Amazonas, Francisco Orellana (1490-1546) (Morton, 1960).

1.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del achiote es la siguiente:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malvales
Familia:	Bixaceae
Género:	<i>Bixa</i>
Especie:	<i>orellana</i>

(SINAREFI, 2010)

1.3 Agroecología y botánica

El achiote puede crecer en climas cálido húmedo, semicálido y templado, con una temperatura media anual de 20 a 26 °C. Puede prosperar en zonas tropicales y subtropicales donde la precipitación pluvial se distribuye uniformemente a lo largo del año, con una precipitación media anual de 1,250 a 2,000 mm. Se puede cultivar en casi todos los tipos de suelo (franco arenoso, franco y franco arcilloso), con una preferencia por los suelos bien drenados, neutros o ligeramente alcalinos. La planta de achiote es intolerante a la sombra y puede llegar a tener un tamaño grande cuando se siembra en suelos profundos, fértiles y ricos en materia orgánica (Lim, 2012).

El achiote es un arbusto perenne que puede llegar a medir desde dos hasta diez metros de altura, aunque en las plantaciones comerciales o de traspatio nunca rebasa los 4 metros. Las hojas son enteras, ovado-trianguulares, agudas a acuminadas o glabras en el envés. Las inflorescencias se presentan en panículas terminales con flores actinomorfas de aproximadamente 4 a 7 cm de ancho. Los pétalos son obovados, emarginados y sus colores pueden presentarse en un rango que va del blanco hasta el rosado dependiendo de la variedad. Los frutos son de tipo cápsula erecta, dehiscente, muy variable en tamaño, forma y color, pudiéndose observar formas oblongo ovoide a globosa, de 1.5 a 4.5 cm de largo, cubierta de espinas o a veces casi lisas, de color verde, amarillo, anaranjado, rojo o púrpura según la variedad (Blair y Madrigal, 2005). Cada cápsula contiene semillas en número variable (30-45, con relación al tamaño capsular). Las semillas tienen forma obovoide-angulares, miden aproximadamente de 2 a 5 mm de largo y se encuentran recubiertas de un tegumento aceitoso (arilo) de color rojo-anaranjado intenso (Arce, 1990). La planta de achiote,

muestra una gran variabilidad biológica, desde arbustos de tallos verdes o café, flores blancas y con cápsulas amarillas o verdes, hasta arbustos con tallos rojos, flores rosadas y con cápsulas púrpura o rojizas. Por otra parte, se ha reportado que las semillas que provienen de cápsulas amarillas o verdes contienen un menor porcentaje de pigmento (8.2%) en comparación con aquellas que provienen de cápsulas púrpuras o rojizas donde el porcentaje de pigmento puede ser de hasta el 10.4% (Devia y Saldarriaga, 2003) (Figura 1).

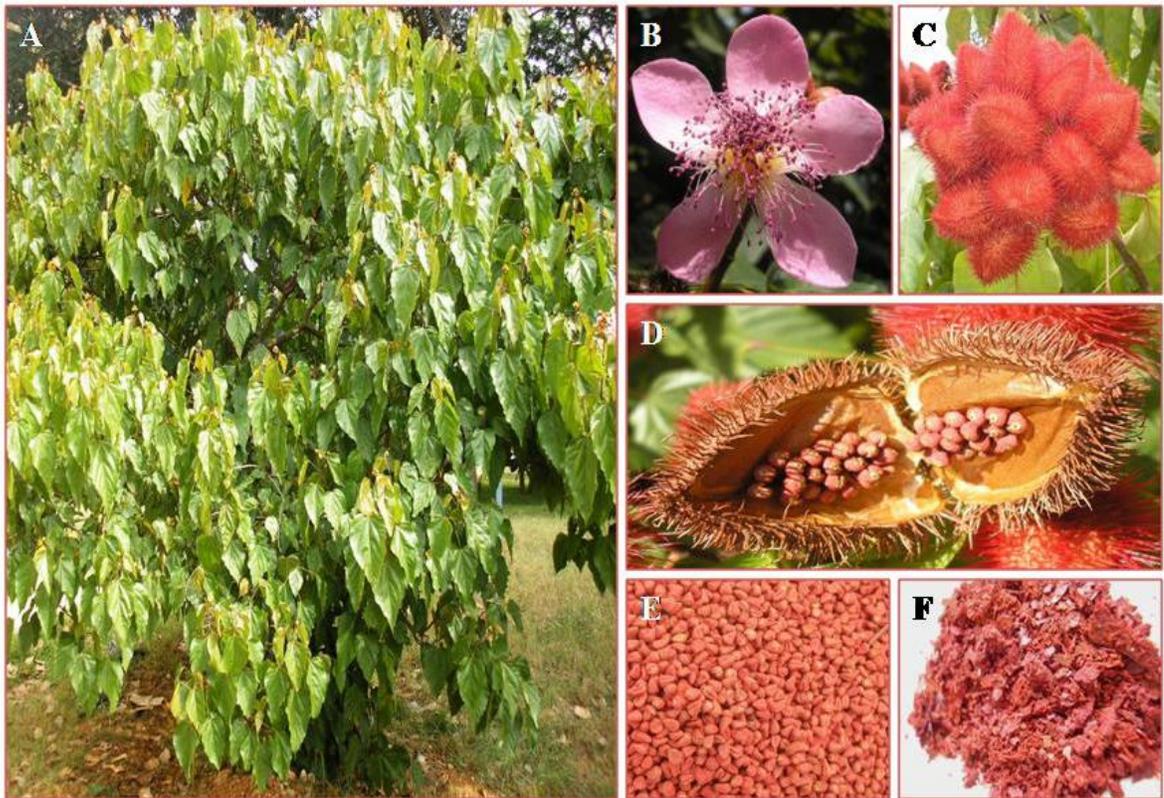


Figura 1. Planta de achote (*Bixa orellana* L.). A) planta completa, B) flor, C) racimo de frutos, D) dehiscencia del fruto, E) semillas y F) colorante en polvo obtenido de las semillas. (Venugopalan y col., 2011.).

1.4 Composición química de *Bixa orellana*

Uno de los colorantes naturales más conocido y de mayor aplicación en diferentes industrias es el annato (extracto crudo del colorante), que se obtiene a partir de las semillas de achiote, las cuales están cubiertas por una delgada capa o arilo viscoso de color rojo-anaranjado (Fonnegra y Jiménez, 2007). De la superficie de las semillas se extrae el colorante, el cual está compuesto principalmente por los carotenoides bixina (color anaranjado-rojizo) y norbixina u orellina (color amarillo-anaranjado) (Devia y Saldarriaga, 2003).

La bixina fue aislada por primera vez por Boussingault en el año 1825. Su fórmula molecular ($C_{25}H_{30}O_4$) fue establecida por Heiduschka y Panzer en 1917. Históricamente, la bixina fue el primer compuesto carotenoide en el cual se encontró isomería geométrica (Giridhar y col., 2014). El annato, es la denominación dada al extracto de colorante crudo (que contiene bixina, norbixina y otros carotenoides en diferentes proporciones), mientras que la bixina es la fracción liposoluble del colorante y la norbixina la fracción hidrosoluble. Posiblemente, lo que convierte al achiote en una de las plantas más interesantes como fuente vegetal para la extracción de colorantes, es la posibilidad de obtener tanto colorantes hidrosolubles como liposolubles, dependiendo del tipo de solvente, proceso de extracción y temperatura del proceso utilizado (Toledo y col., 2004). La descripción y características de estos carotenoides se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los pigmentos de achiote (bixina y norbixina).

Clasificación	Apocarotenoide
Número CAS	
- Bixina	39937-23-0 (<i>trans</i>) 39937-79-5 (<i>cis</i>)
- Norbixina	542-40-5 (<i>trans</i>) 626-76-6 (<i>cis</i>)
Nombres químicos	
- Bixina (<i>trans</i>)	6'-metil-hidrógeno-9'- <i>trans</i> -6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato
- Bixina (<i>cis</i>)	6'-metil-hidrógeno-9'- <i>cis</i> -6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato
- Norbixina (<i>trans</i>)	Ácido 9'- <i>trans</i> -6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioico
- Norbixina (<i>cis</i>)	Ácido 9'- <i>cis</i> -6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioico
Fórmula y peso molecular	
- Bixina	C ₂₅ H ₃₀ O ₄ (394.51 g mol ⁻¹)
- Norbixina	C ₂₄ H ₂₈ O ₄ (380.48 g mol ⁻¹)
Color del pigmento	Amarillo claro-anaranjado (norbixina) hasta el anaranjado claro-rojizo (bixina)
Solubilidad en:	
- Agua	La bixina es insoluble en agua. La norbixina es soluble en agua.
- Aceite	La bixina es ligeramente soluble en aceite a 20°C, pero cuando se aumenta la temperatura por encima de los 100°C, la bixina se disuelve de una mejor manera, con una solubilidad por encima del 1% (p/v). La norbixina es insoluble en aceite.
- Otros solventes	La bixina es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos polares (metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, diclorometano, cloroformo). La norbixina es ligeramente soluble en etanol.

Fuente: Emerton, 2008.

Las semillas de achiote contienen *cis*-bixina (principalmente en la configuración 9-*cis*), que representa el 80% del total de los carotenoides presentes, y el 20% restante conformado principalmente por *cis*-norbixina, pequeñas cantidades de *trans*-bixina y otros carotenoides derivados de la degradación del licopeno (Smith, 2006). La bixina y norbixina presentan un sistema de 9 enlaces dobles conjugados, lo que les confiere un efecto fotoprotector y propiedades de cromóforos (Figura 2) (Giridhar y col., 2014). La bixina es única entre los carotenoides que se encuentran en la naturaleza, no solo por su configuración 9-*cis* (estructura de un carotenoide oxigenado como la luteína que pertenece a la categoría de las xantofilas), sino también porque la molécula tiene 2 grupos carboxilo y uno de ellos se encuentra como éster de metilo. La hidrólisis alcalina (hidróxido de potasio o sodio) del éster metílico produce la sal de norbixina (norbixinato de sodio o potasio) la cual es soluble en agua proporcionando un buen poder colorante a formulaciones basadas en agua (Figura 2).

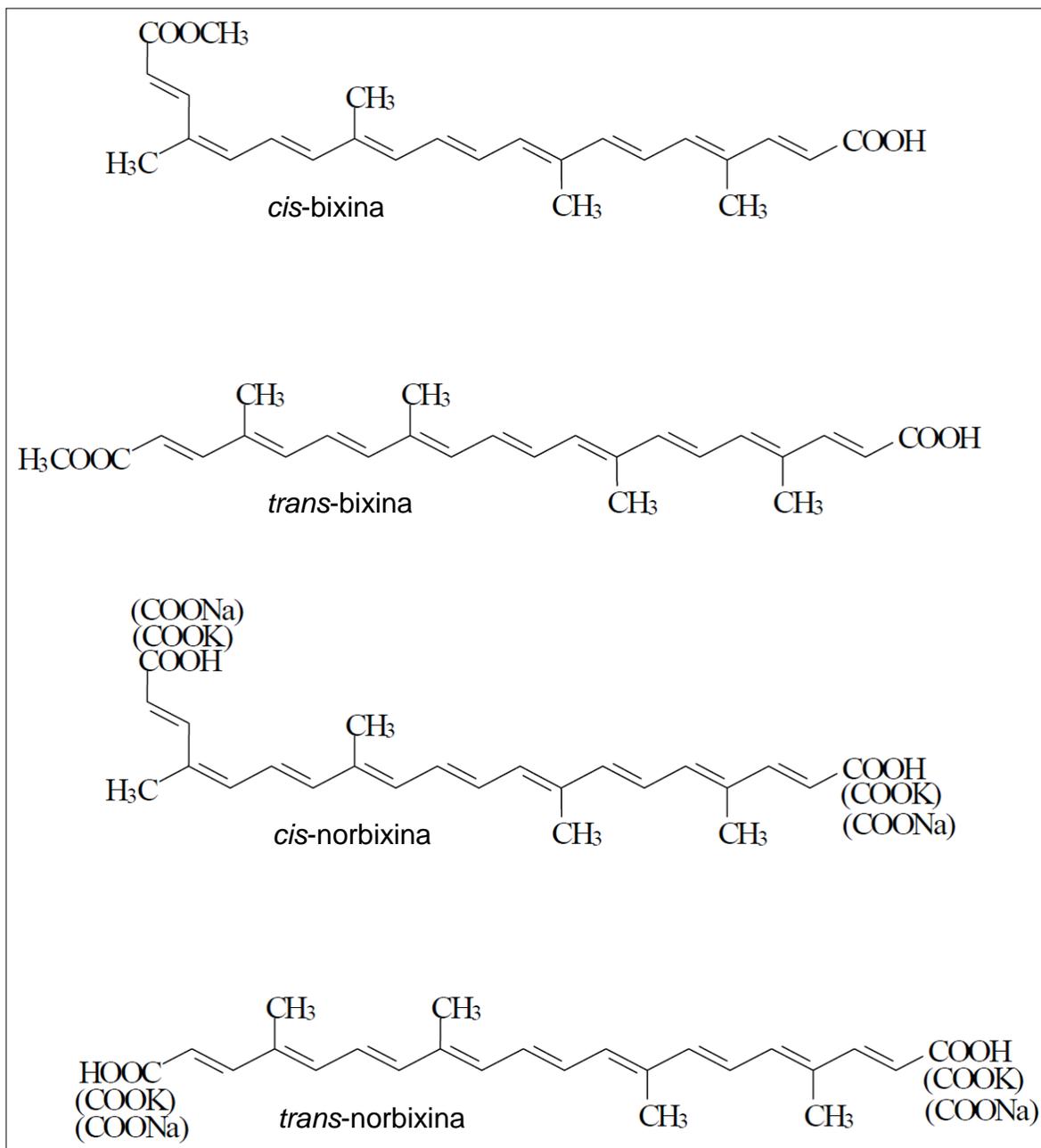


Figura 2. Estructuras químicas de la *cis*-bixina, *trans*-bixina, *cis*-norbixina y *trans*-norbixina (Modificado de Smith, 2006).

La bixina y norbixina comparados con otros carotenoides, presentan buena estabilidad frente al calor durante el procesamiento de los alimentos. Con el calentamiento, la *cis*-bixina es parcialmente convertida al isómero *trans*-bixina y subsecuentemente a productos de degradación térmica (Amarillo C-17). La degradación parcial o total de la bixina, tiene como consecuencia cambios en el balance de la coloración anaranjado-rojiza a un anaranjado-amarillo claro dependiendo de la temperatura y de la duración del procesamiento (Giridhar y col., 2014). La *cis*-bixina puede ser rápidamente convertida a *trans*-bixina debido a su inestabilidad en soluciones (Figura 3).

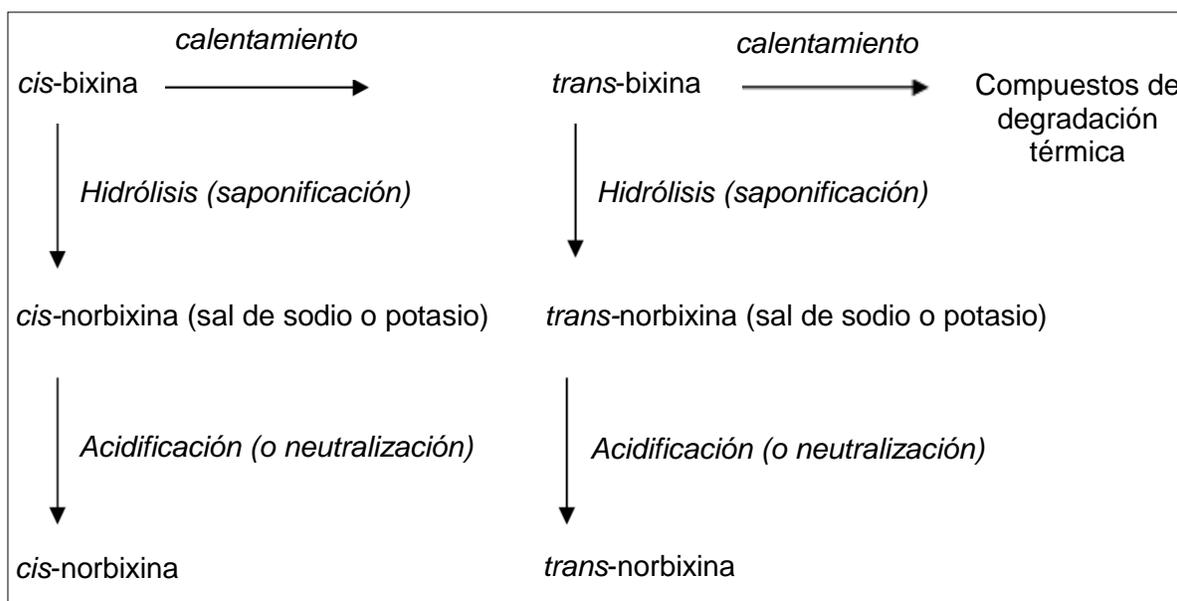


Figura 3. Interconversión de los pigmentos de achiote por efecto de la temperatura, hidrólisis alcalina y acidificación (Modificado de Smith, 2006).

La *trans*-bixina que es el isómero más estable de la bixina, tiene propiedades similares a las de la *cis*-bixina, excepto que la *trans*-bixina en solución presenta color rojo y es soluble en aceite vegetal. Aunque la presencia de *trans*-bixina se encuentra en

proporciones pequeñas en las semillas de achiote, puede obtenerse utilizando solventes para su extracción (Giridhar y col., 2014).

Además de la bixina y norbixina, se han reportado otros carotenoides presentes en menor cantidad en las semillas de achiote, que actúan de igual manera como pigmentos, entre los que destacan el β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, metilbixina, seis apocarotenoides (C30 y C32), ocho diapocarotenoides (C19, C22, C24 y C25) y un carotenoide derivativo (C14). Por otra parte, *Bixa orellana* también se ha reportado como la fuente vegetal más rica en terpenos, en particular las isoformas del *E*-geranilgeraniol, que están presentes en un 57% de semilla, base seca. Otros isoprenoides reportados son el farnesilacetona, geranilgeranilo octadecanoato y el geranil geranilo formato. Además, contiene lípidos (ácido linoleico y en menor cantidad el α -linolénico y el oleico), aminoácidos (glutamato, aspartato, leucina) y gran cantidad de fósforo, hierro y zinc (Lourido y Martínez, 2010).

En los análisis fitoquímicos de las hojas del achiote se ha reportado la presencia de bixaganeno, bixeina, bixol, crocetina, ácido elágico, isobixina, fenilalanina, ácido salicílico, treonina, ácido tomentósico, triptofano, bisulfatos de flavonoides, esteroides, taninos, saponinas y aceite esencial que contiene principalmente sesquiterpenos como el ishwarano como componente mayoritario. En raíces se ha reportado la presencia del triterpeno ácido tomentósico (Venugopalan et al., 2011).

Los tocotrienoles (T3) y tocoferoles (Ts) (α , β , γ , δ) son estereoisómeros de la vitamina E, la cual es liposoluble y funciona como un antioxidante. La vitamina E es reconocida por la actividad biológica del α -tocoferol, pero se ha observado que la familia de los tocotrienoles y tocoferoles presentan diferentes funciones a las del α -tocoferol. Los T3

y Ts presentan una estructura química similar, un anillo cromanol, con un hidroxilo que puede donar un átomo de hidrógeno para reducir radicales libres) (Figura 4). La diferencia entre T3 y Ts es la presencia de tres dobles enlaces en la cadena lateral hidrofóbica de los T3 (Srivastava y Gupta, 2006. Mientras que los Ts están presentes en las semillas y hojas de la mayoría de las plantas, los T3 solo están presentes en una pequeña porción de ellas (Patacsil y col., 2012). Algunas de las principales fuentes vegetales con la mayor proporción de T3/Ts son el salvado de arroz (50/50), el aceite de palma (75/25) y las semillas de achiote (99.9/0.1), siendo ésta última la fuente vegetal con el mayor contenido de tocotrienoles (Aggarwal y col., 2010; Shin-Kang y col., 2011).

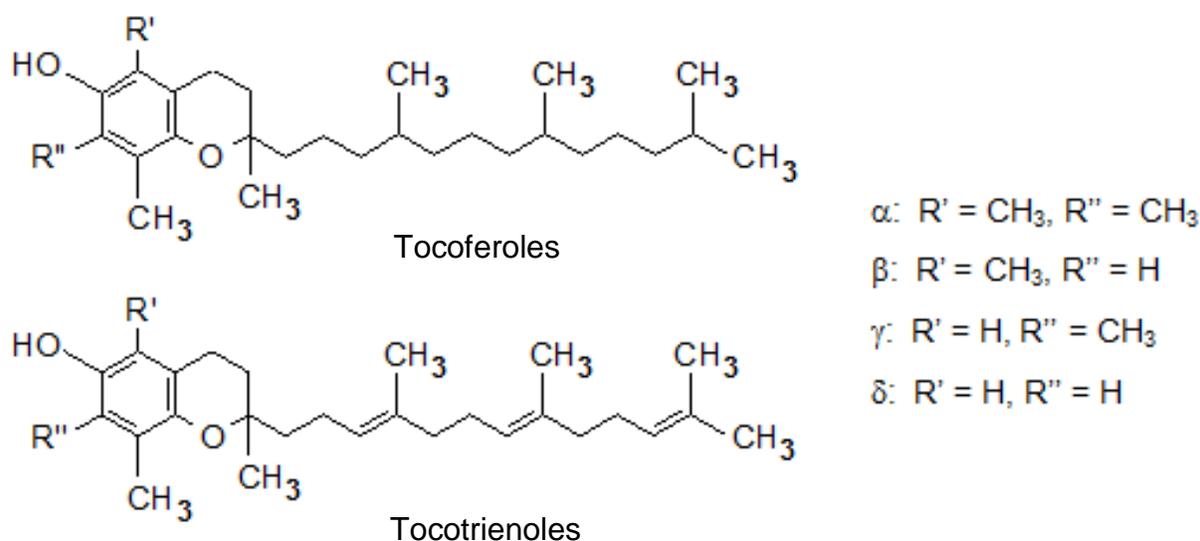


Figura 4. Estructuras químicas de los tocoferoles y tocotrienoles (Eitenmiller y Lee, 2004).

1.5 Potencial nutracéutico y efectos benéficos en la salud

Los T3 y Ts son reconocidos por sus efectos antioxidantes (Patacsil y col., 2012). Diversos autores han sugerido que estos compuestos actúan como antioxidantes protegiendo a los lípidos de membrana del daño oxidante (lipoperoxidación) (Aggarwal y col., 2010; Frank y col., 2012; Lee y col., 2012; Quadrana y col., 2013). Los Ts han sido estudiados ampliamente debido a sus propiedades antioxidantes; sin embargo, existen pocos estudios sobre los T3. Estudios recientes han reportado que los T3 presentan un mayor efecto anti-cancerígeno, neuroprotector, así como disminución de los niveles de colesterol, en comparación con los Ts (Sen y col., 2007; Aggarwal y col., 2010; Miyazawa y col., 2011; Wilankar y col., 2011). En este sentido, se ha propuesto que los mayores efectos benéficos de los T3 pudieran ser debidos a la insaturación de la cadena alifática, lo que facilita la penetración de los tejidos, y con esto, ejercen un mayor poder antioxidante (Samarjit et al. 2007) (Figura 4).

1.5.1 El achiote en la medicina tradicional

En sudamérica los extractos de achiote de las hojas, raíces y semillas se han usado tradicionalmente para propósitos medicinales, como tratamiento para la diarrea y asma (Lauro y Francis, 2000). El arilo que recubre a las semillas de achiote es ampliamente utilizado para tratar quemaduras, sangrados, disentería, gonorrea, constipación y fiebre. Se ha reportado que los extractos de hojas, corteza y raíces de *Bixa orellana* funcionan como antídotos para el envenenamiento con *Manihot esculenta* Crantz, *Jatropha curcas* L., y *Hura crepitans* L. En Brasil, los extractos de achiote son usados para el tratamiento de la acidez estomacal, como diurético y laxante. Además, la planta

entera es usada contra la fiebre y la disentería. La decocción de las hojas es usada para detener el vómito, las náuseas, acidez estomacal, enfermedades urinarias y de la próstata, hipertensión arterial, colesterol alto, cistitis, obesidad, insuficiencia renal, ácido úrico, así como diversos problemas estomacales. La tribu Piura del Amazonas prepara té a base de raíces jóvenes como afrodisiaco, astringente y para tratar problemas de la piel, fiebre, disentería y hepatitis. En Colombia, los extractos de achiote son utilizados como antídoto para mordeduras de serpientes y las semillas como expectorantes, así como para el tratamiento contra la gonorrea (Venugopalan y col., 2011).

Otras propiedades medicinales atribuidas a los extractos de achiote tanto de hojas como de semillas, son antitumoral (sobre todo en el cáncer bucal), antiinflamatorio, emoliente, antiséptico, antibacteriano, antioxidante, cicatrizante, hipoglucemiante, como fuente de vitaminas, tratamiento del acné, alopecia, condiloma, sarampión, viruela, infecciones bacterianas de forma general, conjuntivitis, dermatosis, diabetes, epilepsia, glaucoma, dolor de cabeza, hemorroides, trastornos hepáticos, malaria, nefrosis, dolor de estómago, estomatitis, tonsilitis y en la curación de heridas y quemaduras (Lourido y Martínez, 2010).

1.6 Producción y comercialización

El achiote se cultiva extensamente en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, principalmente en Perú, Brasil, Ecuador, México, Colombia, Bolivia, República Dominicana, Jamaica y Guatemala. El comercio de la producción de achiote comenzó en los años 1790's en Jamaica. En Europa y Estados Unidos, la comercialización de

extractos de achiote dio inicio antes de los años 1870's, principalmente para colorear mantequilla y queso (Smith, 2006). En la actualidad, la producción anual mundial de las semillas de achiote es aproximadamente de 14,500 toneladas métricas (peso seco), siendo Brasil, Perú y Ecuador los principales países productores de éstas. Se estima que aproximadamente 7,500 toneladas de semillas de achiote son usadas anualmente como colorante a nivel mundial, y si se asume que las semillas presentan un contenido de pigmento del 2% en promedio, esto correspondería a 150 toneladas de colorante (bixina) disponible para su extracción. Las 7,000 toneladas de semillas de achiote restantes son destinadas para su consumo local en Brasil, Perú y Ecuador primordialmente como condimento o especia (Smith, 2006).

Latinoamérica produce el 60% del total de la producción mundial, seguida por África (27%) y Asia (12%) (Giuliano y col., 2003; Smith, 2006; Giridhar y Parimalan, 2010; Janick, 2012). En México, los principales estados productores de achiote son Guerrero (9.6%), Chiapas (13%), Veracruz (16%), Oaxaca (17.5%) y Yucatán (18.3%), siendo estos dos últimos, los que mayor producción y diversidad biológica poseen (SINAREFI, 2010).

Actualmente, los principales importadores de semillas de achiote son India, Japón, Turquía, Rusia, Argentina, Canadá, Estados Unidos, Suiza y la Unión Europea. Para estos países y su mercado, la demanda más grande es en forma de extracto crudo del colorante (annato) destinado a la industria alimentaria. El extracto de semillas de achiote puede ser obtenido ya sea en fase acuosa u oleosa. El tipo de colorante de achiote más comercializado es el soluble en agua (norbixina), seguido por el extracto

en aceite y finalmente, el extracto que se obtiene con el uso de solventes grado alimenticio.

Tanto en países industrializados como en los menos desarrollados, la demanda e importación de semillas de achiote y sus colorantes, se han incrementado durante la última década, probablemente debido a que la población ha adoptado el uso de colorantes naturales.

1.6.1 Valor comercial de la semilla en mercados internacionales

En la actualidad, el contenido de pigmento (principalmente bixina) es un factor importante, pues se establece que la cantidad de bixina presente en las semillas no debe ser menor del 2.7% para su comercialización en mercados internacionales (Giridhar y Parimalan, 2010). Se ha reportado que el contenido de bixina presente en las semillas de achiote puede oscilar entre el 1 y 4%, dependiendo de la calidad de las semillas, los morfotipos, las condiciones geográficas y de cultivo, así como las prácticas poscosecha realizadas (Chuyen y col., 2012; Giridhar y col., 2014). Además, aunque el achiote es cultivado en diversos países del mundo, Perú produce semillas de achiote con el mayor contenido de pigmento, que varía entre el 3 y 4% de bixina (Giridhar y col., 2014). El precio de las semillas de achiote varía entre 1500 y 2000 USD (dólares) la tonelada, aunque el precio final dependerá del contenido de bixina presente en las semillas (Giuliano y col., 2003; Giridhar y Parimalan, 2010).

1.7 Usos y aplicaciones industriales de los extractos de achiote (*Bixa orellana*)

Las semillas y extractos de achiote han sido usados durante más de 200 años en América y Europa para proporcionar una coloración roja-anaranjada-amarilla a los alimentos (Smith, 2006). Actualmente, la bixina ocupa el segundo lugar entre los principales colorantes naturales utilizados en todo el mundo (Lauro y Francis, 2000; Giridhar y Parimalan, 2010; Chuyen y col., 2012).

Los extractos de achiote se encuentran disponibles en diversas formas (más que cualquier otro colorante natural) para su aplicación en las industrias farmacéutica (Hendry y Houghton, 1992) y alimentaria, ya que dependiendo de la naturaleza de los extractos, se deciden los productos alimenticios a colorear (Smith, 2006).

1.7.1 Tipos de extractos (formas comerciales del colorante)

En la mayoría de los países productores de achiote, la semilla molida se comercializa como condimento o colorante para alimentos; mientras que en los países desarrollados se utiliza principalmente en forma de extractos como colorante natural en la industria alimentaria. La comercialización internacional de estos extractos está regulada por los estándares de calidad de cada país donde se comercializa. Los extractos de annato pueden contener diferentes proporciones de bixina y norbixina, dependiendo del proceso de extracción y de la temperatura utilizada. Las diferentes proporciones de estos compuestos determinan el tono y matiz del producto alimenticio que es coloreado (Smith, 2006). Los extractos de annato son ampliamente utilizados en la industria, principalmente en productos lácteos y otros productos alimenticios como aves, pescado, surimi (imitación de carne de cangrejo), panadería, cereales para el

desayuno, diversos postres, mermeladas y jaleas, cerezas marrasquino, crema y betún para pasteles, salsas, condimentos, dulces y bebidas como aperitivos, refrescos y jugos.

1.7.1.1 Extracto soluble en aceite

Algunos de los aceites que pueden ser usados para extraer o disolver la bixina son el de soya, uva y girasol. El extracto soluble en aceite contiene principalmente *cis*-bixina. Este extracto muestra diferentes tonalidades de color, que va en un rango desde el amarillo hasta el anaranjado-rojizo. Si se extrae bixina con aceite vegetal caliente, se genera un cambio de coloración que va desde el anaranjado-rojizo hasta el anaranjado-amarillo (Smith, 2006) y además, la *cis*-bixina es transformada a *trans*-bixina, que es la forma más estable y soluble de la bixina (Hendry y Houghton, 1992). Si la solución de bixina permanece en calentamiento durante más tiempo, la *trans*-bixina es convertida a compuestos de degradación térmica llamados “Amarillo C-17”, debido a que el extracto presenta un color amarillo.

Los extractos de achiote en aceite por lo general contienen entre 0.05 y 1.0 % (p/v) de bixina, concentraciones más altas a éstas no son posibles, ya que la bixina es poco soluble en aceite (Smith, 2006). Sin embargo, aunque el poder tintóreo de estos extractos es bajo, pueden utilizarse para colorear productos lácteos (queso-crema, margarinas, queso amarillo tipo americano), aderezos para ensaladas y algunos aperitivos (Hendry y Houghton, 1992) debido a su alto contenido graso. También, estos extractos son utilizados para teñir maderas, pieles, lacas, telas y pinturas (Lourido y

Martínez, 2010) además de diversos productos de la industria cosmética (Giuliano y col., 2003).

1.7.1.2 Suspensión en aceite

A diferencia del extracto de achiote en aceite, el contenido de bixina en suspensión es de aproximadamente 4%, siendo la *cis*-bixina y la *trans*-bixina los principales compuestos en el extracto.

Para preparar la suspensión, el polvo del colorante de annato se suspende y/o disuelve en aceite vegetal. Las suspensiones de bixina en aceite muestran tonalidades color anaranjado, siempre y cuando la temperatura del producto no aumente por encima de los 100 °C; si la temperatura es mayor, el producto final será amarillo (Hendry y Houghton, 1992).

1.7.1.3 Extracto soluble en agua

El extracto de achiote soluble en agua tiene como componente principal la forma disociada de la norbixina en una solución alcalina, generalmente hidróxido de potasio o sodio la cual es acidificada con ácido clorhídrico para precipitar la norbixina. El precipitado se filtra, se seca y se muele para obtener un polvo granular que se comercializa como norbixina en polvo o en soluciones líquidas diluidas (Smith, 2006). La norbixina, particularmente en la forma *cis*, es altamente soluble en agua y por lo tanto, pueden obtenerse soluciones que contienen desde 0.1 hasta 5% (p/v) de pigmento. En el caso del pulverizado de norbixina obtenido por este proceso, generalmente contiene entre 1 y 15% de norbixina del total del pigmento presente en

la semilla. El uso del extracto de achiote soluble en agua se ha incrementado considerablemente, no solo en la industria de lácteos sino también en la elaboración de aperitivos y bebidas (Hendry y Houghton, 1992). Los productos lácteos representan una de las categorías más importantes de alimentos procesados con extractos de achiote. Tradicionalmente, el queso ha sido coloreado con soluciones de norbixina desde hace más de 200 años, debido a que uno de los factores más importantes en la coloración de los quesos, es la interacción y unión de las proteínas de la leche con el pigmento de achiote, asegurando una coloración permanente (Emerton, 2008). El extracto de achiote hidrosoluble tiene un alto poder tintóreo, debido a que se ha reportado que un litro de una solución de norbixina al 1% (p/v), es suficiente para colorear hasta 16 toneladas de queso (Giuliano y col., 2003).

1.7.1.4 Emulsión

El extracto de achiote emulsificado contiene bixina y/o norbixina asociado con un emulsionante o emulgente, como el propilenglicol o los polisorbatos (Hendry y Houghton, 1992). La adición de un emulgente al extracto de bixina y/o norbixina, puede hacer que sea miscible en productos alimenticios que contienen tanto fase acuosa como fase oleosa. Algunos de los ejemplos son el helado, la margarina, la mayonesa, las salsas cremosas, algunos dulces y una amplia gama de productos de panadería. El pigmento de achiote emulsificado es comercializado en líquido y contiene entre 1 a 2.5% (p/v) de bixina o norbixina (Smith, 2006).

1.7.2 Regulación de los extractos de achiote como colorante natural

La ingesta humana diaria de extractos de achiote es una consideración importante desde el punto de vista regulatorio. Basados en la cantidad de annato usado en la elaboración de diversos productos alimenticios, se han realizado cálculos para establecer la ingesta humana diaria estimada de bixina/norbixina. Las estimaciones varían desde 0.032 mg kg⁻¹ de bixina por peso corporal/día y 0.051 mg kg⁻¹ de norbixina por peso corporal/día para Estados Unidos, y hasta 0.065 mg kg⁻¹ de bixina por peso corporal/día para el Reino Unido. Utilizando estos datos, el cálculo para una persona de 60 kg de peso corporal en promedio, representa una ingesta promedio de bixina/norbixina de 1.9 mg y 3.1 mg respectivamente para Estados Unidos y de 3.9 mg de bixina para el Reino Unido (Lauro y Francis, 2000).

La ingesta máxima diaria aceptable establecida por la OMS/WHO (Organización Mundial de la Salud/Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios) es de 0.065 mg kg⁻¹ de bixina por peso corporal/día (FAO/WHO, 2006). Estos cálculos han tenido más importancia desde que se reportó que la bixina es absorbida rápidamente al torrente sanguíneo después de su ingesta. La ingesta humana de una única dosis de 16 mg de bixina alcanzó un nivel máximo de 144 µg L⁻¹ de bixina/norbixina en el plasma, el cual puede compararse con los rangos de otros carotenoides normalmente encontrados en el plasma humano (β-caroteno, 40-530 µg L⁻¹; luteína, 90-140 µg L⁻¹ y licopeno, 70-460 µg L⁻¹). La eliminación completa de bixina y norbixina en el plasma ocurre de 8 a 24 h después de su ingesta, respectivamente (Lauro y Francis, 2000).

El annato es considerado como un colorante no tóxico. En Estados Unidos el annato es un colorante natural exento de certificación. Su seguridad está basada en el uso del

achiote por más de 200 años como colorante grado alimenticio de manera tradicional y cotidiana por millones de personas en Sudamérica. Además, diversos autores han reportado estudios de genotoxicidad y toxicidad oral crónica en ratas y perros alimentados durante 1 año con annato obtenido en agua y/o solventes. Los investigadores concluyeron que altos niveles de bixina o norbixina en la dieta de los animales no causaba ningún efecto tóxico o carcinógeno y que 0.065 mg kg^{-1} de bixina por peso corporal/día es una ingesta aceptable para los humanos. Ocasionalmente, han sido reportados casos de reacciones alérgicas en los productos alimenticios que contienen annato, pero éstas han sido atribuidas a las trazas de proteínas de las semillas del achiote encontradas como impurezas en el colorante (Lauro y Francis, 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

En México, la red de achiote-SINAREFI conformada por IT-Conkal, CICY, INIFAP, UACH y UAM han realizado estudios sobre la conservación del achiote como recurso fitogenético. En la actualidad, se han colectado alrededor de 67 accesiones de achiote provenientes de la Península de Yucatán en México, con el fin de preservar y propagar el material genético de esta especie vegetal; pero, solamente algunas han sido caracterizadas. Por lo que resulta interesante profundizar en la caracterización química de diferentes accesiones de *Bixa orellana* L. cultivadas en México, con el fin de generar conocimientos y establecer recomendaciones que permitan adicionar valor agregado al producto comercializado del achiote, cuyo valor en el mercado depende solamente del contenido de bixina. Los resultados obtenidos de este trabajo podrían permitir la

diversificación del mercado, tanto por el contenido de bixina, como por la cantidad de tocotrienoles, los cuales se podrían utilizar como aditivos para la elaboración de diversos productos alimenticios o como una buena fuente de antioxidantes. Además, la caracterización química de las diferentes accesiones de achiote, permitirá la selección, conservación y resguardo de los recursos fitogenéticos de interés comercial y el posible establecimiento de plantaciones a gran escala de las accesiones seleccionadas.

3. HIPÓTESIS

La capacidad antioxidante *in vitro* de las fracciones metanólicas obtenidas de las semillas de diferentes accesiones de *Bixa orellana* L., dependerá principalmente de los compuestos polares y del contenido de tocotrienoles presentes en las semillas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar los niveles de pigmento, compuestos funcionales y su correlación con la capacidad antioxidante *in vitro* en las semillas de diferentes accesiones de achiote (*Bixa orellana* L.) colectadas en la Península de Yucatán.

4.2 Objetivos particulares

1. Aplicar un tamizaje fitoquímico (saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas y alcaloides) en las semillas de diferentes accesiones de achiote.
2. Cuantificar el rendimiento de pigmento de diferentes accesiones de achiote.

3. Determinar los parámetros de color (L^* , C^* , y h) en extractos obtenidos de diferentes accesiones de achiote.
4. Cuantificar el contenido de carotenoides (norbixina y bixina) en las semillas de diferentes accesiones de achiote.
5. Cuantificar el contenido de ácidos orgánicos y vitamina C en las semillas de diferentes accesiones de achiote.
6. Cuantificar los niveles de tocotrienoles y tocoferoles en las semillas de diferentes accesiones de achiote y su correlación con la capacidad antioxidante *in vitro*.
7. Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales y evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* en extractos de diferentes accesiones de achiote.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención del material biológico

Se colectaron semillas de achiote (*Bixa orellana* L.) en febrero de 2013 de cada una de las siete accesiones estudiadas, procedentes de diferentes localidades de Mérida, Yucatán (Tabla 2). Los especímenes voucher fueron autenticados y depositados en el herbario "U Najil Tikin Xiw" del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Yucatán, México. Las semillas se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Tabla 2. Información sobre el origen de las semillas de las accesiones de achiote estudiadas (*Bixa orellana* L.)

Accesión	Región	Sitio de colecta	Coordenadas GPS	Número voucher ^a
42	Yucatán, México	Akil, Akil	N 20°14'57.6"; W 89°20'57.6"	P-Simá-3141
43	Yucatán, México	Akil, Akil	N 20°15'35.7"; W 89°20'53.0"	P-Simá-3142
45	Yucatán, México	Tekax, Kankab	N 20°11'48.1"; W 89°20'55.5"	P-Simá-3143
46	Yucatán, México	Oxkutzcab, Xohuayán	N 20°11'20.0"; W 89°23'00.2"	P-Simá-3144
47	Yucatán, México	Oxkutzcab, Xohuayán	N 20°11'10.6"; W 89°23'00.3"	P-Simá-3145
48	Yucatán, México	Oxkutzcab, Xohuayán	N 20°11'09.3"; W 89°22'59.8"	P-Simá-3146
50	Yucatán, México	Mérida	N 21°00'09.6"; W 89°35'31.9"	G-Godoy-0001

^a Herbario "U Najil Tikin Xiw" del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Yucatán, México.

5.2 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico (saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas y alcaloides) en las semillas de achiote se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Coolborn y Bolatito (2010).

5.2.1 Obtención de los extractos

Se colocaron 5 g de semillas de achiote por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas en frascos de vidrio color ámbar y se les adicionaron 5 mL de metanol. Las muestras se almacenaron durante 7 días en oscuridad y a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, las semillas fueron removidas y los extractos fueron colectados en frascos de vidrio color ámbar.

5.2.2 Saponinas

Se pesaron 5 mg de extracto de achiote por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas, se colocaron en un tubo de ensayo y se le adicionaron 10 mL de agua destilada. Posteriormente, la muestra se incubó en un baño maría a 80 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se agitaron en un vórtex durante 10 s y se dejaron reposar durante 20 min. La presencia de espuma indicó la presencia de saponinas.

5.2.3 Taninos

Se pesaron 5 mg de extracto de achiote por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas, se colocaron en un tubo de ensayo y se le adicionaron 10 mL de agua destilada. Esta solución fue dividida en tres tubos de ensayo, en donde al tubo 1, se le agregaron 3 mL de una solución de grenetina al 1% (p/v, en agua destilada), al tubo 2, se agregaron 3 mL de una solución de grenetina al 1% (p/v, en agua destilada) y cloruro de sodio al 10% (p/v, en 100 mL de agua destilada) y al tubo 3, se agregaron 3 mL de una solución de cloruro de sodio al 10% (p/v, en agua destilada). Posteriormente, las muestras se agitaron en un vórtex durante 10 s. La presencia de un precipitado color blanco en los tubos 1 y 2, y la ausencia de este precipitado en el tubo 3 indicaron la presencia de taninos.

5.2.4 Cumarinas

Se pesaron 5 mg de extracto de achiote por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas, se colocaron en un tubo de ensayo y se le adicionaron 10 mL de agua destilada. El tubo fue tapado con un papel filtro previamente humedecido con una solución de hidróxido de sodio al 0.15% (p/v) y se colocó en un baño maría hasta alcanzar el punto de ebullición durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se retiró el papel filtro del tubo y se observó bajo una cámara de radiación UV (UVM-57) a 302 nm. La detección de puntos fluorescentes de color azul indicó la presencia de cumarinas.

5.2.5 Antraquinonas

La determinación de antraquinonas se llevó a cabo utilizando el método de cromatografía en capa fina. Se utilizaron placas de sílica gel (60F₂₅₄, 3 x 5 cm) (Merck Millipore, USA) en las que se colocó 0.1 mL de extracto de cada una de las accesiones estudiadas. El eluyente consistió de una mezcla de diclorometano y metanol 95:5 (v/v). Las placas se observaron bajo una cámara de radiación UV a 302 nm. La detección de puntos fluorescentes color amarillo o rojo indicó la presencia de antraquinonas.

5.2.6 Alcaloides

La determinación de alcaloides se llevó a cabo utilizando el método de cromatografía en capa fina. Se utilizaron placas de sílica gel (60F₂₅₄, 3 x 5 cm) (Merck Millipore, USA) en las que se colocó 0.1 mL de extracto de cada una de las accesiones estudiadas. Las placas fueron eluidas con una mezcla de diclorometano y metanol 95:5 (v/v) y se

revelaron con el reactivo de Dragendorff. Las placas fueron observadas bajo una cámara de radiación UV a 302 nm. La detección de puntos fluorescentes color rojo-café indicó la presencia de alcaloides.

5.3 Cuantificación del rendimiento de pigmento de la semilla

Para la cuantificación del rendimiento de extracción de pigmento, se utilizaron semillas de achiote de cada una de las accesiones estudiadas y se emplearon tres métodos de extracción: 1) una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 2% (p/v) (agua alcalina), 2) etanol absoluto y 3) agua, de acuerdo a las metodologías descritas por Devia y Saldarriaga (2003).

5.3.1 Extracción con agua alcalina

Se utilizaron 5 g de semillas de achiote por triplicado de cada una de las accesiones analizadas, se colocaron en frascos color ámbar y a cada uno se le adicionaron 15 mL de KOH al 2 % (p/v), manteniendo una relación 1:3 (g de semilla:mL de solvente). Las semillas fueron almacenadas durante 24 h en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las semillas se removieron y se obtuvo el extracto crudo. Posteriormente, a las semillas removidas se les agregaron 30 mL de KOH al 2% (p/v) y se mantuvieron en agitación utilizando un vórtex durante 1 min. Se obtuvo el extracto crudo el cual fue mezclado con el obtenido previamente. Al extracto crudo resultante se le adicionaron 3 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 10% (v/v) hasta obtener un pH de 2.5. El extracto acidificado se centrifugó a 3,000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se descartó y la pastilla obtenida se resuspendió con 5 mL

de agua desionizada, se agitó la mezcla y se evaluó el color (como se describe en el apartado 5.4). Después, la mezcla se colocó en una charola de plástico, se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente y se dejó secar al aire hasta peso constante. El pigmento seco obtenido fue pesado utilizando una balanza analítica.

5.3.2 Extracción con etanol absoluto

Se utilizaron 5 g de semillas de achiote por triplicado de cada una de las accesiones analizadas, se colocaron en frascos color ámbar y a cada uno se le adicionaron 15 mL de etanol absoluto, manteniendo una relación 1:3 (g de semilla:mL de solvente). Las semillas fueron almacenadas durante 24 h en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las semillas se removieron y se obtuvo el extracto crudo. Posteriormente, a las semillas removidas se les agregaron 30 mL de etanol absoluto y se mantuvieron en agitación utilizando un vórtex durante 1 min. Se obtuvo el extracto crudo el cual fue mezclado con el obtenido previamente. Al extracto crudo resultante se le midió el color (como se describe en el apartado 5.4), se colocó en una charola de plástico, se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente y se dejó secar al aire hasta peso constante. El pigmento seco obtenido fue pesado utilizando una balanza analítica.

5.3.3 Extracción con agua

Se utilizaron 5 g de semillas de achiote por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas, se colocaron en frascos color ámbar y a cada uno se le adicionaron 15 mL de agua desionizada, manteniendo una relación 1:3 (g de semilla:mL de solvente). Los

frascos fueron colocados en una parrilla de calentamiento a 60 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, las semillas se removieron y se obtuvo el extracto crudo. Posteriormente, a las semillas se les agregaron 30 mL de agua desionizada y se mantuvieron en agitación utilizando un vórtex durante 1 min. Se obtuvo el extracto crudo el cual fue mezclado con el obtenido previamente. Al extracto crudo resultante se le adicionaron 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 10% (v/v) hasta obtener un pH de 2.5. El extracto acidificado se centrifugó a 3,000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió con 5 mL de agua desionizada, se agitó la mezcla y se evaluó el color (como se describe en el apartado 5.4). Después, la mezcla se colocó en una charola de plástico, se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente y se dejó secar al aire hasta peso constante. El pigmento seco obtenido fue pesado utilizando una balanza analítica.

En todos los casos, la determinación del porcentaje de rendimiento de pigmento de achiote se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = (W2 / W1) (100)$$

Donde:

W2 = peso del pigmento de achiote obtenido.

W1 = peso de las semillas utilizadas.

5.4 Determinación de los parámetros de color

Los parámetros de color se midieron en los extractos obtenidos en el apartado 5.3, para ello se utilizaron 45 mL de cada extracto y determinaron los parámetros

cromáticos: luminosidad (L^*), cromaticidad o saturación (C^*) y ángulo hue o tono (h) usando un colorímetro Hunter Lab, EZ-45/0, Color Flex (Prüfer Comercial Mexico). La determinación de color de cada muestra se realizó por triplicado.

5.5 Determinación del contenido de norbixina

Para la cuantificación del porcentaje de norbixina en las semillas de achiote, se pesó 1 g de semillas por triplicado de cada una de las accesiones a estudiar y se colocaron en tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio. A cada uno de los tubos se les adicionaron 5 mL de hidróxido de sodio (0.1 N) y se homogeneizaron utilizando un vórtex durante 2 min. Transcurrido este tiempo, a cada tubo se les adicionaron 5 mL más de hidróxido de sodio (0.1 N) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos se agitaron en un vórtex durante 30 s, las semillas fueron removidas y se obtuvo el extracto. A partir de éste, se realizó una dilución 1:500 con hidróxido de sodio (0.1 N) y las muestras diluidas fueron leídas con un espectrofotómetro UV-Vis (Beckman DU-650, USA) a 482 nm utilizando hidróxido de sodio (0.1 N) como blanco. Para la cuantificación de norbixina, se utilizó el coeficiente de absorción al 1% ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$) de 2870 (FAO/WHO, 2006).

5.6 Determinación del contenido de bixina

La identificación y cuantificación de bixina se aplicó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), de acuerdo al método descrito por Fraser y col. (2000), con algunas modificaciones. Se pesaron 50 mg de semillas por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas y se colocaron en tubos de ensayo

cubiertos con papel aluminio. A cada uno de los tubos se le adicionaron 5 mL de acetato de etilo y se agitaron en un vórtex durante 2 min. Después, a cada tubo se les agregaron 5 mL de acetato de etilo y se colocaron en un vórtex durante 2 min. Posteriormente, los tubos se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las semillas fueron removidas y se obtuvo el extracto en tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio. Los extractos fueron aforados a 10 mL con acetato de etilo y posteriormente, se llevaron a sequedad con un flujo de nitrógeno gaseoso. Las muestras secas se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Las muestras secas se resuspendieron con metanol grado HPLC y fueron filtradas a través de una membrana de nylon de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts). Las muestras filtradas fueron inyectadas en un cromatógrafo de líquidos (Agilent Technologies 1260) equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, un automuestreador, un compartimiento con termostato para la columna analítica y un detector de longitud de onda múltiple (G1315B; Alltech Co. USA). Los análisis se llevaron a cabo utilizando una columna C18 Waters XTerra MS ($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ }\times\text{ }250\text{ mm}$) y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:metanol:diclorometano (43:43:14, v/v/v) en un modo de elución isocrática. Se inyectaron $20\text{ }\mu\text{L}$ de muestra con una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los resultados fueron registrados a 459 nm y utilizando una curva estándar de bixina ($0\text{-}100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, USA) se expresaron como mg de bixina g^{-1} de peso seco de semilla (PSS).

5.7 Determinación del contenido de ácidos orgánicos

La identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos (oxálico, málico, tartárico, ascórbico, láctico y cítrico) y vitamina C en las semillas de achiote se llevó a cabo mediante HPLC de acuerdo al método descrito por Nour y col. (2010). Se pesó 1 g de semillas de achiote por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas y se colocaron en tubos de ensayo. Posteriormente, las semillas fueron molidas con 20 mL de metanol, utilizando un homogeneizador ultraturrax de alta velocidad (Omni International GLH modelo GLH-01, USA) a 3,000 rpm. La muestra fue filtrada con papel filtro (Whatman, No. 5) y se obtuvo el extracto. Los extractos fueron nuevamente filtrados a través de una membrana de nylon de 0.45 μm (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts). Para la determinación de los diferentes ácidos orgánicos (oxálico, málico, cítrico, tartárico y láctico) y vitamina C estudiados en las muestras se utilizó una dilución de 1:10 (v/v) con metanol y fueron inyectadas en el cromatógrafo Agilent Technologies 1260 descrito anteriormente en el apartado 5.6. Los análisis se llevaron a cabo utilizando una columna Hypersil GOLD aQ (5 μm , 4.6 x 250 mm) y como fase móvil una solución amortiguadora de KH_2PO_4 (50 mM) a pH 2.8 ajustado con H_3PO_4 (2 M), en un modo de elución isocrática. Se inyectaron 20 μL de muestra diluida y la velocidad de flujo fue de 0.7 mL min^{-1} con una temperatura de 22 $^{\circ}\text{C}$. Los resultados fueron registrados a 254 nm para la vitamina C y 214 nm para los ácidos oxálico, málico, tartárico, láctico y cítrico. En todos los casos se elaboraron curvas estándar de 0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, USA) y los resultados se expresaron como mg de ácidos orgánicos presentes por g^{-1} de peso seco de semilla (PSS).

5.8 Obtención de una fracción rica en tocotrienoles y tocoferoles (FRT3-Ts)

Para la extracción y obtención de los tocotrienoles y tocoferoles en las semillas de achiote, se pesaron 50 mg de semillas por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas y se colocaron en tubos de ensayo previamente etiquetados. Posteriormente, las semillas fueron molidas con 4 mL de metanol, utilizando un homogeneizador ultraturax de alta velocidad (Omni International GLH, modelo GLH-01, USA) a 3,000 rpm. Después, a cada tubo se le adicionaron 3.3 mL de cloroformo y las muestras nuevamente se agitaron en un vórtex durante 3 min. Transcurrido este tiempo, se agregaron 4 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y se homogeneizó en un vórtex durante 1 min. Las muestras se centrifugaron a 1,400 x g durante 5 min a 4 °C. Se colectó la fase clorofórmica (inferior) en tubos de ensayo, la fase superior fue desechada y se conservó la pastilla (fase intermedia). El proceso de extracción se repitió 2 veces más agregando 3.3 mL de cloroformo a la pastilla obtenida siguiendo los pasos anteriormente descritos. Finalmente, se mezclaron las 3 fases clorofórmicas obtenidas y se aforaron a 10 mL con cloroformo. Las muestras se almacenaron en oscuridad y a -70 °C hasta su uso (Mène-Saffrané y col., 2010).

5.8.1 Determinación del contenido de tocotrienoles y tocoferoles

La identificación y cuantificación de los tocotrienoles (α y δ) y tocoferoles (α , β , γ , δ) se realizó mediante HPLC) de acuerdo al método descrito por Mène-Saffrané y col. (2010). Se utilizaron 200 μ L de la FRT3-Ts (obtenida en la sección anterior) de cada una de las accesiones estudiadas y se llevaron a sequedad con una corriente constante de N₂ gaseoso. Las muestras se resuspendieron con 200 μ L de hexano:metil

terbutil éter (90:10, v/v) y se filtraron con microfibra de vidrio antes de ser inyectadas manualmente en un cromatógrafo (Agilent Technologies, Serie 1200) equipado con una bomba cuaternaria y un desgasificador (Hewlett Packard, Serie 1100). Se inyectaron manualmente 20 μL de muestra, todos los compuestos fueron separados en una columna LiChrospher 100 Diol (5 μm , 4.6 \times 250 mm) usando como fase móvil hexano:metil terbutil éter (90:10, v/v) en una condición isocrática con un flujo de 1 mL min^{-1} , a temperatura ambiente. Se utilizó un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 296 nm y una longitud de onda de emisión de 340 nm. Para la identificación y cuantificación de los tocotrienoles (α -T3, δ -T3) y tocoferoles (α -T, β -T, γ -T, δ -T) se construyeron curvas de calibración (0-5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0-4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) usando estándares comerciales (Sigma-Aldrich, USA). El contenido de tocotrienoles y tocoferoles se reportó en mg g^{-1} de peso seco de semilla (PSS).

5.9 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante se emplearon tres diferentes métodos de extracción, utilizando semillas enteras (extracciones A y B) y semillas molidas (extracción C) como se describe a continuación.

A) Se pesaron 10 g de semillas enteras por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas, se colocaron en papel filtro con un tamaño de poro de 25 μm (Whatman, Germany) y se formaron cartuchos de extracción que se colocaron en las cámaras de

extracción del equipo Soxhlet. Para eliminar la materia grasa de las muestras, se realizaron tres extracciones consecutivas utilizando 250 mL de hexano (primera extracción), acetato de etilo (segunda extracción) y metanol (tercera extracción), durante 3 h en cada caso. La fracción metanólica (polar) fue colectada y concentrada utilizando un rotaevaporador (Yamato Scientific America RE301) hasta obtener un volumen final de 25 mL.

B) Se pesaron 10 g de semillas enteras por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas, se colocaron en papel filtro con un tamaño de poro de 25 μm (Whatman, Germany) y se formaron cartuchos de extracción que se colocaron en las cámaras de extracción del equipo Soxhlet. Se realizó la extracción utilizando 250 mL de metanol durante 3 h. La fracción metanólica fue colectada y concentrada utilizando un rotaevaporador (Yamato Scientific America RE301) hasta obtener un volumen final de 25 mL.

C) Se pesó 1 g de semillas por triplicado de cada una de las accesiones estudiadas y se molieron con 25 mL de metanol utilizando un homogeneizador ultraturrax de alta velocidad (Omni International GLH modelo GLH-01, USA). Posteriormente, la muestra se centrifugó a 8,000 x g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se aforó a un volumen final de 25 mL con metanol.

En todos los casos, las fracciones metanólicas obtenidas se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar a -70 °C hasta su uso.

5.9.1 Compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó usando el reactivo de fenol Folin-Ciocalteu mediante la técnica descrita por Singleton y Rossi (1965). Una alícuota de 200 μL de la dilución adecuada [1:5 o 1:10 (v/v)] de cada una de las fracciones obtenidas anteriormente, se mezclaron con 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu [previamente diluido con agua a 1:10 (v/v)] y se incubó durante 1 min antes de adicionarle 0.8 mL de carbonato de sodio al 7.5% (p/v). Después, la mezcla de reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a 765 nm. Para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales, se elaboró una curva de calibración utilizando ácido gálico (0–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, USA). El contenido de compuestos fenólicos totales se reportó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de semilla (mg EAG g^{-1} PSS).

5.9.2 Capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó de acuerdo al método de ABTS reportado por Re y col. (1999) con algunas modificaciones. Para la preparación de la solución de ABTS, se mezclaron 96.2 mg de ABTS (2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato)) y 16.5 mg de persulfato de potasio en 100 mL de agua desionizada. La solución se incubó en la oscuridad durante 16 h antes de ser usada. Transcurrido este tiempo, la solución de ABTS fue diluida con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.4) hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.1 a 734 nm. Después, las fracciones metanólicas anteriormente descritas fueron diluidas utilizando PBS (1X). Una alícuota de 100 μL de la dilución adecuada [1:10 (v/v)] de

cada una de las muestras, se homogeneizaron con 1000 μL de la solución diluida de ABTS e incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 734 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Beckman DU-650, USA). La capacidad antioxidante se determinó utilizando una curva de calibración con trolox (0-20 μM) (Sigma-Aldrich, USA) y los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente a trolox por gramo de peso seco de semilla [CAET (mM g^{-1} PSS)].

5.10 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. El nivel de significancia estadística utilizado fue $P = 0.05$. Todos los resultados fueron procesados con el programa NCSS (versión 07.1.18; Kaysville, UT) (Hintze, 2007).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó para determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en las semillas de achiote, como: saponinas taninos, cumarinas, antraquinonas y alcaloides. Para poder cuantificar los grupos funcionales, determinados de manera cualitativa, se creó una escala para indicar la ausencia, presencia y abundancia relativa de cada uno de estos grupos en los extractos metanólicos de achiote. En este trabajo, se observó un contenido moderado de alcaloides presentes en las semillas de todas las accesiones de achiote estudiadas;

sin embargo, no se observó la presencia de saponinas, taninos, cumarinas y antraquinonas (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis cualitativo de fitoquímicos en semillas de achiote.

Accesión	Saponinas	Taninos	Cumarinas	Antraquinonas	Alcaloides
42	-	-	-	-	++
43	-	-	-	-	++
45	-	-	-	-	++
46	-	-	-	-	++
47	-	-	-	-	++
48	-	-	-	-	++
50	-	-	-	-	++

- No detectado; + Escaso; + + Moderado; + + + Abundante.

6.2 Rendimiento de pigmento en la semilla

En la actualidad, se conocen diversas formas de extraer el colorante del achiote. Uno de los métodos más antiguos y tradicionales es la extracción con agua (Devia y Saldarriaga, 2003; Taham y col., 2015). La eficiencia de extracción del pigmento depende del método utilizado (Giridhar y col., 2014). En este sentido, el análisis estadístico general mostró que el mayor porcentaje de rendimiento se obtuvo utilizando KOH (4.84%, en promedio) en comparación con etanol y agua (3.46% y 3.37%, respectivamente) de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de

Tukey. Además, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en el rendimiento de pigmento entre los extractos de achiote obtenidos con etanol y agua. Las accesiones 50, 43 y 48 mostraron el mayor rendimiento de extracción de pigmento al utilizar KOH; sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre las accesiones estudiadas cuando se utilizó etanol y agua (Tabla 4). Estos resultados coinciden con los reportados por Devia y Saldarriaga (2003) y Taham y col. (2015), quienes obtuvieron el mayor rendimiento de pigmento utilizando KOH, seguido por etanol y por último, con agua.

Tabla 4. Porcentaje de rendimiento de pigmento de los extractos de achiote.

Accesión	KOH (2% p/v)	Etanol	Agua
42	4.38 ± 0.08 ^{aA}	3.25 ± 0.72 ^{aA}	3.76 ± 1.23 ^{aA}
43	4.68 ± 0.20 ^{aB}	3.35 ± 0.69 ^{aAB}	2.55 ± 0.57 ^{aA}
45	4.48 ± 1.03 ^{aA}	3.38 ± 0.76 ^{aA}	3.46 ± 0.54 ^{aA}
46	4.22 ± 0.08 ^{aA}	3.13 ± 0.73 ^{aA}	3.34 ± 0.40 ^{aA}
47	4.63 ± 1.19 ^{aA}	3.02 ± 0.73 ^{aA}	2.64 ± 0.58 ^{aA}
48	4.85 ± 0.15 ^{aB}	3.27 ± 0.69 ^{aA}	4.11 ± 0.57 ^{aAB}
50	6.04 ± 0.93 ^{aB}	4.83 ± 0.62 ^{aAB}	3.74 ± 0.64 ^{aA}

Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes, minúsculas en las columnas y mayúsculas en los renglones, indican diferencias significativas ($p<0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey. Abreviaturas: KOH, hidróxido de potasio; p/v, peso/volumen.

6.3 Parámetros de color

El color es una característica importante de los alimentos. Dependiendo del color, la gente crea expectativas de si el alimento es seguro para comer o si tiene buen sabor o no. Basándose en esta idea, la adición de color a los alimentos está estrechamente asociado con estas expectativas (Mortensen, 2006). Por lo tanto, debido a la importancia del aspecto de los alimentos los colorantes grado alimenticio tienen un papel relevante entre los aditivos en la industria alimentaria.

En este trabajo, la determinación de los parámetros de color en las accesiones estudiadas, es importante ya que nos permite seleccionar el posible uso de las accesiones en la industria, así como el mejor método de extracción basado en los valores obtenidos de los parámetros de color L^* , C^* y h .

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los valores de luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y tono (h) entre los extractos de KOH y agua en las accesiones estudiadas (Figura 5). Sin embargo, los extractos etanólicos de las accesiones 43 ($L^* = 4.01 \pm 0.79$, $C^* = 7.33 \pm 1.07$, $h = 25.76 \pm 6.35$) y 50 ($L^* = 3.17 \pm 0.64$, $C^* = 6.81 \pm 0.53$, $h = 26.41 \pm 4.41$) presentaron los valores más bajos de L^* , C^* y h en comparación con las otras accesiones estudiadas, lo que significa que estas accesiones tuvieron un color más oscuro y rojo (Figs. 5b, 5e y 5h). Estos resultados son similares a los reportados por Cardarelli y col. (2008), quienes observaron que los parámetros de color en los extractos de achiote dependen de la polaridad del disolvente utilizado; soportando la idea de que a menor polaridad tienden a disminuir los valores de L^* , C^* y h . Alternativamente, este comportamiento podría explicarse también por la composición de los pigmentos presentes en los extractos de achiote en etanol

(accesiones 43 y 50), en donde otro tipo de carotenoides (además de la bixina y norbixina) pudieron ser extraídos, modificando los parámetros de color obtenidos (Kopjar y Piližota, 2009).

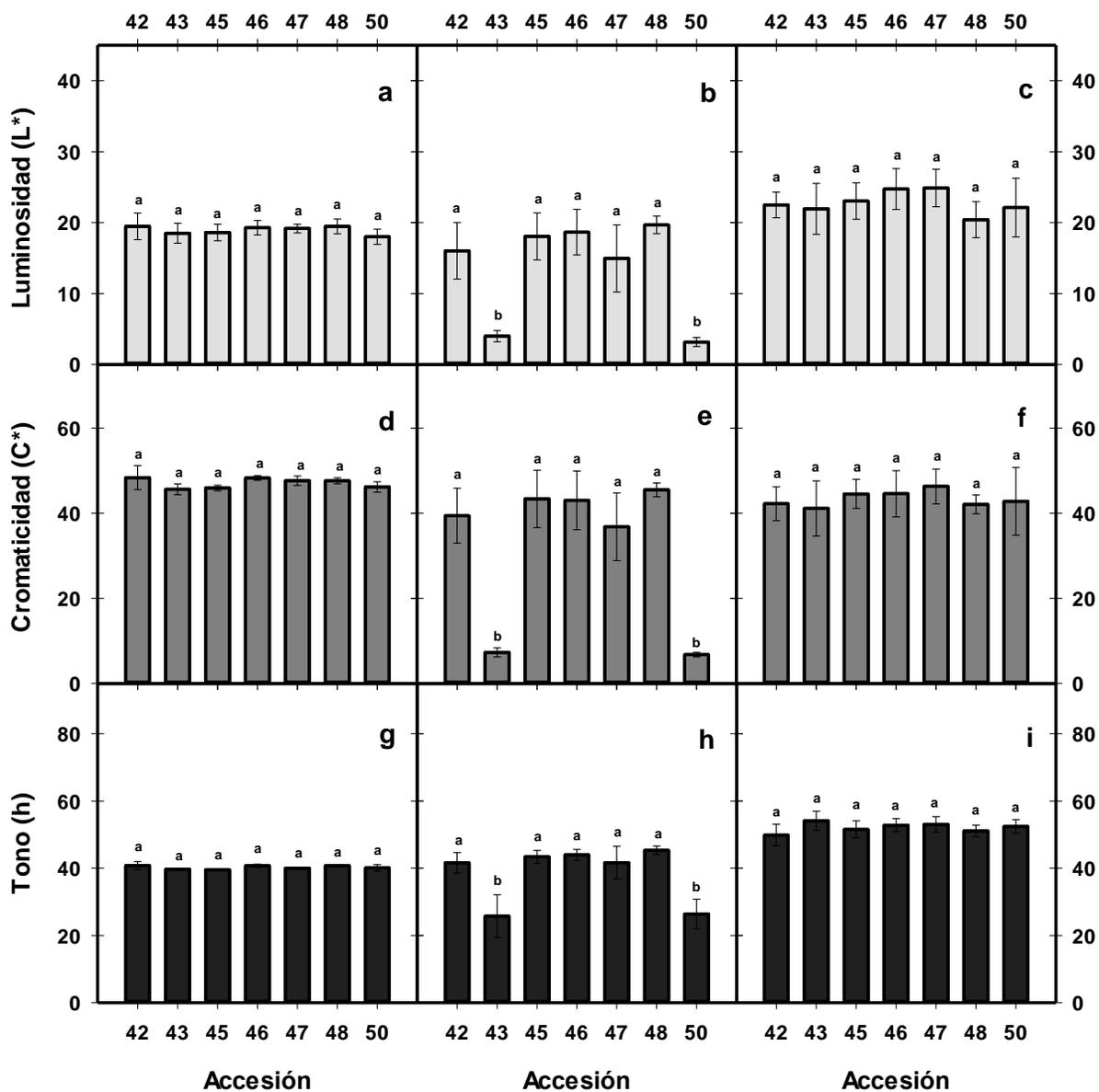


Figura 5. Parámetros de color (L^* , C^* , h) de los extractos de semillas de achiote. Luminosidad (L^*) en: (a) extractos con KOH; (b) extractos con etanol; (c) extractos con agua; Cromaticidad (C^*) en: (d) extractos con KOH; (e) extractos con etanol; (f) extractos con agua; Tono (h) en: (g) extractos con KOH; (h) extractos con etanol; (i) extractos con agua. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey.

6.4 Contenido de norbixina

Los carotenoides son pigmentos naturales importantes en la industria química, alimentaria, farmacéutica y cosmética. Además, estos pigmentos también presentan una capacidad antioxidante atribuida a su estructura química (Mata-Gómez y col., 2014). En este trabajo, se observó que el mayor porcentaje de norbixina lo presentó la accesión 45 ($0.150 \pm 0.008\%$), mientras que la accesión 42 ($0.060 \pm 0.005\%$) mostró el menor porcentaje. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las demás accesiones estudiadas (Figura 6a). Estos resultados son similares a los reportados por Smith (2006) y Alves y col. (2006), quienes reportaron que en extractos acuosos de *Bixa orellana* el porcentaje de norbixina osciló de 0.1 a 4.0%.

6.5 Contenido de bixina

El contenido de bixina determinado mediante HPLC mostró que la accesión 48 ($31.50 \pm 1.16 \text{ mg g}^{-1} \text{ PSS}$) presentó el mayor contenido, seguido por las accesiones 45, 43 y 47 (26.60 ± 2.40 , 24.80 ± 1.17 , $22.30 \pm 1.14 \text{ mg g}^{-1} \text{ PSS}$, respectivamente) sin diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellas. Por otra parte, las accesiones 46 y 50 presentaron el menor contenido de bixina (6.80 ± 0.15 y $6.50 \pm 1.74 \text{ mg g}^{-1} \text{ PSS}$, respectivamente) sin observarse diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellas (Figura 6b). Estos resultados coinciden con los reportados por diversos autores, que mostraron que el contenido de bixina presente en semillas de achiote puede oscilar de 0.26 a $311.00 \text{ mg g}^{-1} \text{ PSS}$ (Cardarelli y col., 2008; Chisté y col., 2011; Rodríguez-Ávila y col., 2011). El porcentaje de bixina es un factor importante, pues se establece que su contenido en las semillas no debe ser menor del 2.7% para su comercialización en

mercados internacionales (Giridhar y Parimalan, 2010). El contenido de bixina puede oscilar entre el 1 y 4%, dependiendo de la calidad de las semillas (Giridhar y col., 2014). En este trabajo, el porcentaje de bixina observado en las accesiones estudiadas osciló entre el 0.65 y 3.15% (Figura 6b), donde las accesiones 43, 45, 47 y 48 mostraron un contenido de bixina necesario para su consideración en el comercio internacional. Estos resultados coinciden con los reportados por Biego y col. (2013), quienes mostraron que el porcentaje de bixina en semillas de achiote puede oscilar de 2.42 a 2.79%.

Por otro lado, el hecho de que la accesión 50 haya mostrado el menor contenido de bixina y un color más oscuro y rojo en comparación con las otras accesiones (Figura 6b), podría ser explicado por el fenómeno de copigmentación, en el que existe una interacción molecular entre los pigmentos y otras moléculas orgánicas en solución (referidos como copigmentos o cofactores), causando una coloración más intensa de los pigmentos independientemente de su concentración (Boulton, 2001). Los copigmentos o cofactores pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos y metales (Kopjar y Piližota, 2009). En este sentido, Lancaster y col. (1994) reportó que la concentración de antocianinas combinado con la interacción de las clorofilas y carotenoides, son factores importantes que determinan el color rojo en la cáscara de la manzana.

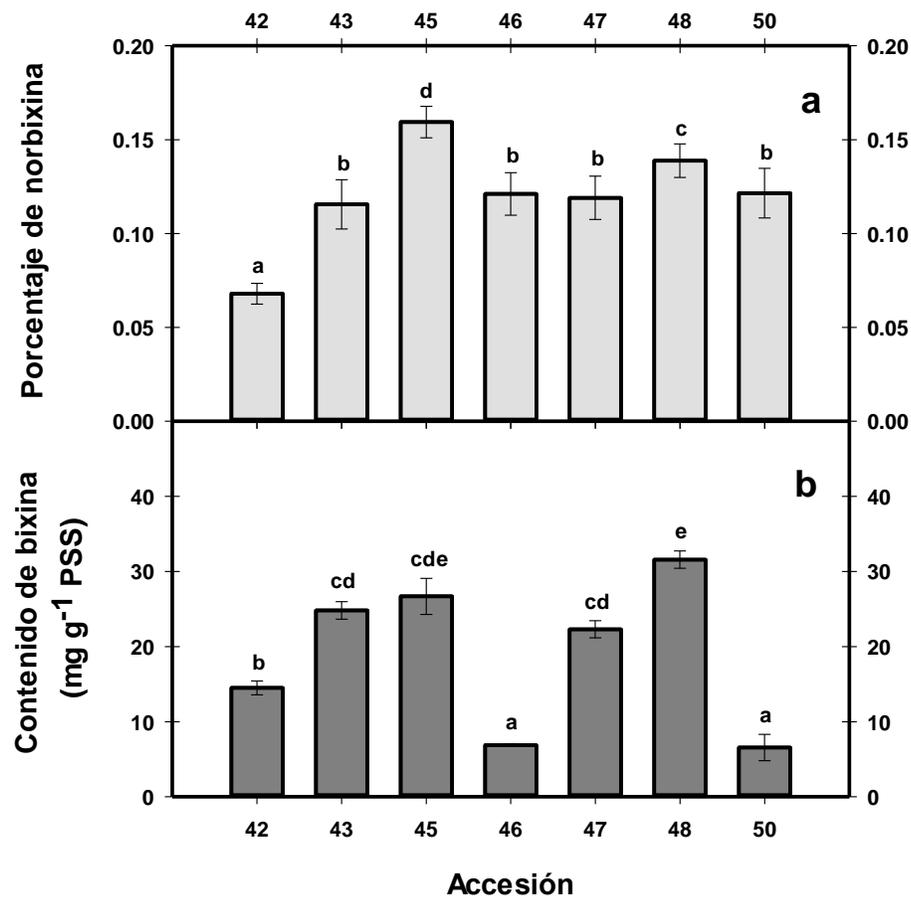


Figura 6. Contenido de carotenoides en semillas de accesiones de achote (a) porcentaje de norbixina y (b) contenido de bixina. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey.

6.6 Contenido de ácidos orgánicos y vitamina C

En la Figura 7, se muestra el cromatograma de los estándares comerciales de ácidos orgánicos y vitamina C cuantificados.

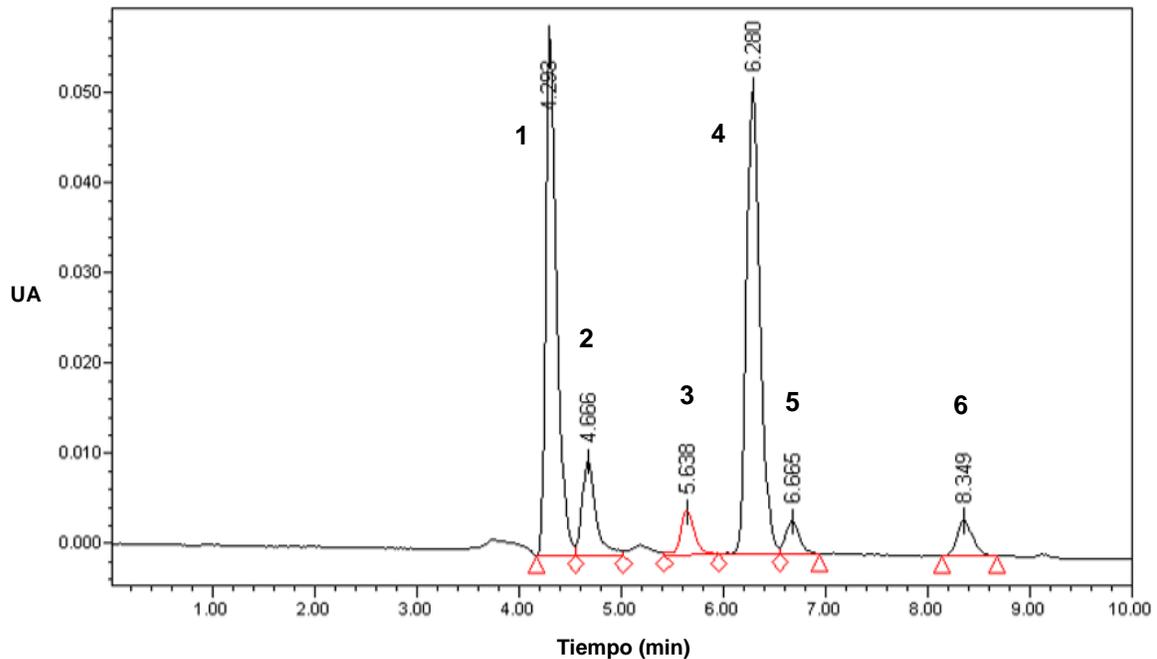


Figura 7. Cromatograma de ácidos orgánicos y vitamina C (estándares comerciales). Los números en los picos corresponden a: 1) oxálico, 2) tartárico, 3) vitamina C, 4) málico, 5) láctico y 6) cítrico. Abreviaturas: UA, unidades de absorbancia.

Sin embargo, en este trabajo no se detectaron los ácidos oxálico, málico, tartárico, láctico y cítrico, y sólo se pudieron encontrar cantidades traza de vitamina C en las semillas de las accesiones de achiote estudiadas (Tabla 5). La ausencia de estos ácidos orgánicos y particularmente de vitamina C en las semillas de achiote, apoya la idea de que la capacidad antioxidante está determinada principalmente por los compuestos fenólicos totales.

Tabla 5. Ácidos orgánicos y vitamina C presentes en semillas de achiote.

Accesión	Oxálico	Tartárico	Ascórbico	Málico	Láctico	Cítrico
42	-	-	Tr	-	-	-
43	-	-	Tr	-	-	-
45	-	-	Tr	-	-	-
46	-	-	Tr	-	-	-
47	-	-	Tr	-	-	-
48	-	-	Tr	-	-	-
50	-	-	Tr	-	-	-

- No detectado; Tr: cantidades traza.

6.7 Contenido de tocotrienoles y tocoferoles

Se observaron diferencias significativas en el contenido de δ -T3 entre las accesiones analizadas. La accesión 45 mostró los menores niveles de δ -T3 (1.72 ± 0.37 mg g⁻¹ PSS), mientras que las accesiones 42 (3.19 ± 0.38 mg g⁻¹ PSS), 43 (3.15 ± 0.36 mg g⁻¹ PSS) y 48 (3.60 ± 0.50 mg g⁻¹ PSS) mostraron niveles intermedios y la accesión 50 mostró el mayor contenido (5.03 ± 0.64 mg g⁻¹ PSS) (Figura 8a). Estos resultados son similares a los reportados por Frega y col. (1998), quienes reportaron contenidos de δ -T3 de 1.40-1.47 mg g⁻¹ PSS. Actualmente, no se conoce otra especie vegetal con un contenido similar de T3 (siendo el δ -T3, la isoforma predominante). Las fuentes vegetales más ricas en contenido de tocotrienoles, son los aceites de salvado de arroz, palma y achiote, mostrando una proporción de T3:Ts de 50:50, 75:25 y 99.9:0.1,

respectivamente (Aggarwal y col., 2010). No se observaron diferencias significativas en el contenido de α -T3 entre las accesiones estudiadas, excepto la accesión 50 que mostró el mayor contenido de α -T3 ($0.115 \pm 0.010 \text{ mg g}^{-1} \text{ PSS}$) (Figura 8b).

En cuanto al contenido de Ts, el γ -Ts fue la única isoforma detectada en todas las accesiones estudiadas y cuantificada por encima del límite de sensibilidad del equipo (Figura 8c). Las isoformas α -Ts, β -Ts and δ -Ts se encontraron en cantidades traza. La accesión 50 mostró el menor contenido de γ -Ts y fue significativamente diferente a las accesiones 43 y 47. No se observaron diferencias significativas entre las accesiones 42, 43, 45, 46, 47 y 48 (Figura 8c). Estos resultados coinciden con los reportados por Frega y col. (1998) y Zou y Akoh (2015), los cuales observaron trazas de Ts y consideran a *Bixa orellana* virtualmente libre de tocoferoles. En este sentido, la Figura 9 muestra un cromatograma representativo de la composición química de T3 y Ts de una muestra de semillas de achiote (accesión 42), en donde se observa una menor cantidad de Ts en comparación con el contenido de T3.

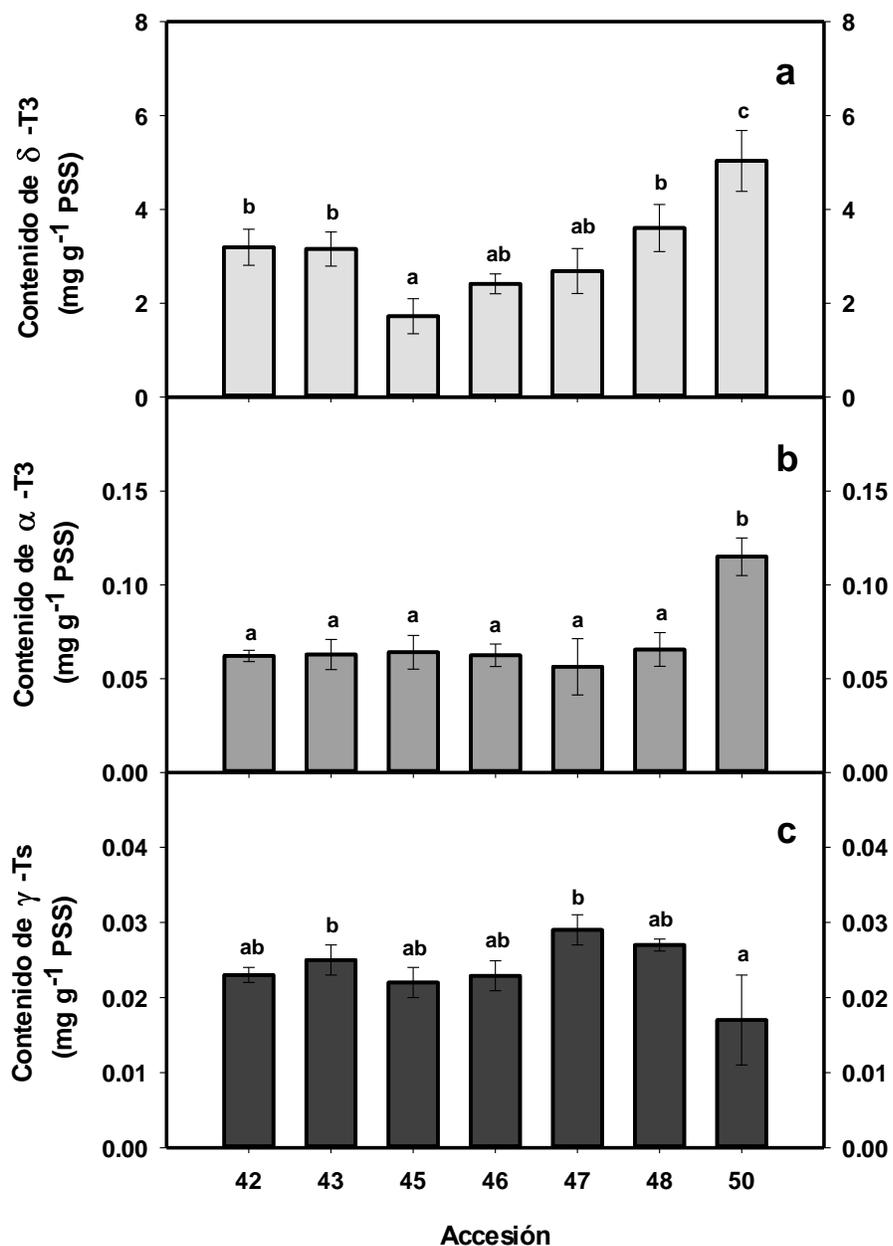


Figura 8. Contenido de tocotrienoles y tocoferoles en semillas de accesiones de achiote (a) δ-tocotrienol, (b) α-tocotrienol y (c) γ-tocoferol. Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05) de acuerdo a la prueba de Tukey. Abreviaturas: PSS, peso seco de semilla; T3, tocotrienoles; Ts, tocoferoles.

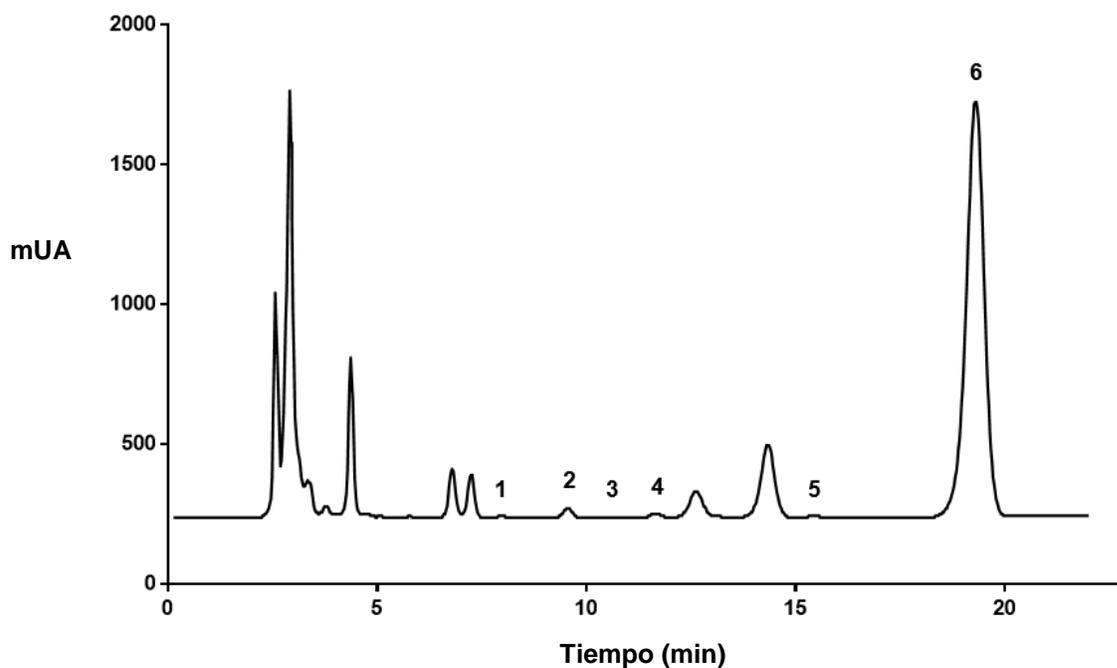


Figura 9. Cromatograma representativo de una fracción obtenida de semillas de achiote a partir de la accesión 42. Los números en los picos corresponden a: 1) α -Ts, 2) α -T3, 3) β -Ts, 4) γ -Ts, 5) δ -Ts y 6) δ -T3. Abreviaturas: mUA, mili unidades de absorbancia.

6.8 Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos totales (CFT) y la capacidad antioxidante (CA) son parámetros determinados generalmente como parte del perfil fitoquímico de los tejidos de la planta.

Existe un gran número de moléculas presentes en los productos naturales derivados de plantas que funcionan como antioxidantes: carotenoides, compuestos fenólicos, derivados del ácido benzoico, flavonoides, proantocianidinas, estilbenos, cumarinas, lignanos y ligninas (Pisoschi y Negulescu, 2011). Los compuestos fenólicos, se encuentran de manera ubicua en las plantas y son una parte esencial de la dieta

humana, debido a sus propiedades antioxidantes (Balasundram y col., 2006; Hernández-Carrillo y col., 2015).

En cuanto a las fracciones metanólicas A, B y C obtenidas con semillas enteras y molidas, las fracciones B mostraron el mayor contenido ($P < 0.05$) de CFT en comparación con las fracciones A y C. En general, las fracciones B obtenidas con extractor Soxhlet fueron más ricas en CFT, ya que se observó un aumento significativo de 4.0 y 3.3 veces más, en comparación con la fracción C obtenida con Ultra Turrax y la fracción A (extracción consecutiva), respectivamente. El contenido del CFT en las fracciones B y C mostró un comportamiento similar en todas las accesiones analizadas. La accesión 50 mostró el mayor contenido de CFT en las fracciones B y C (12.06 ± 0.18 ; 3.01 ± 0.04 , respectivamente); seguido por las accesiones 43, 45, 46 y 47. Por último, las accesiones 42 y 48 mostraron el menor contenido de CFT (Tabla 6). Estos resultados coinciden con los reportados por Cardarelli y col. (2008) y Giorgi y col. (2013), quienes observaron que los CFT oscilaron desde 0.30 a 4.67 mg g^{-1} PSS en extractos metanólicos de *Bixa orellana*.

Por otra parte, la evaluación de la CA puede ser una herramienta adecuada para determinar las propiedades antioxidantes de productos naturales derivados de plantas. El ABTS es un método rápido, simple, exacto, de bajo costo y ampliamente utilizado para medir la capacidad de los compuestos que actúan como captadores de radicales libres o donantes de hidrógeno y para evaluar la capacidad antioxidante de los alimentos. Sin embargo, la CA por ABTS tiene algunas limitaciones, ya que el método validado está dirigido a compuestos polares. Durante los últimos años, se ha incrementado el interés por evaluar el potencial antioxidante de plantas, extractos de

semillas, compuestos bioactivos y su posible aplicación como alimentos funcionales y nutraceuticos (Morales-Delgado y col., 2014; Martínez-Palma y col., 2015; Gómez-Sampedro y Zapata-Montoya, 2016).

La CA en las fracciones metanólicas mostró una tendencia similar a la observada en los CFT. Las fracciones B mostraron la mayor CA en todas las accesiones estudiadas, seguido por las fracciones C y la menor CA se observó en las fracciones A. La CA en las fracciones B mostraron un incremento significativo de 1.79 y 6.32 veces más, en comparación con las fracciones C y A, respectivamente (Tabla 6). Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Cardarelli y col. (2008) que observaron una CA similar en extractos de achiote obtenidos con solventes polares.

Tabla 6. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en fracciones metanólicas de semillas de achiote.

Accesión	SEMILLA ENTERA				SEMILLA MOLIDA	
	A Fracción		B Fracción		C Fracción	
	CFT (mg EAG g ⁻¹ PSS)	CA [CAET (mM g ⁻¹ PSS)]	CFT (mg EAG g ⁻¹ PSS)	CA [CAET (mM g ⁻¹ PSS)]	CFT (mg EAG g ⁻¹ PSS)	CA [CAET (mM g ⁻¹ PSS)]
42	1.99 ± 0.22 ^{bcA}	1.88 ± 0.09 ^{ca}	8.36 ± 0.20 ^{aB}	5.78 ± 0.22 ^{aC}	2.09 ± 0.05 ^{aA}	4.31 ± 0.15 ^{aB}
43	1.60 ± 0.20 ^{abA}	0.75 ± 0.03 ^{aA}	10.05 ± 0.19 ^{cc}	7.53 ± 0.12 ^{bc}	2.51 ± 0.04 ^{cb}	6.28 ± 0.05 ^{cb}
45	4.47 ± 0.44 ^{deB}	1.33 ± 0.09 ^{ba}	9.64 ± 0.11 ^{cc}	16.09 ± 0.18 ^{dc}	2.41 ± 0.02 ^{ca}	6.21 ± 0.08 ^{cb}
46	4.65 ± 0.41 ^{eB}	1.33 ± 0.04 ^{ba}	9.10 ± 0.21 ^{bc}	8.46 ± 0.10 ^{cc}	2.27 ± 0.05 ^{ba}	5.84 ± 0.07 ^{bb}
47	1.52 ± 0.02 ^{aA}	1.45 ± 0.07 ^{ba}	9.67 ± 0.12 ^{cc}	7.16 ± 0.19 ^{bc}	2.41 ± 0.03 ^{cb}	5.55 ± 0.09 ^{bb}
48	4.20 ± 0.08 ^{dB}	1.25 ± 0.02 ^{ba}	8.19 ± 0.24 ^{aC}	8.34 ± 0.05 ^{cc}	2.04 ± 0.06 ^{aA}	6.31 ± 0.20 ^{cb}
50	2.40 ± 0.09 ^{ca}	3.12 ± 0.04 ^{da}	12.06 ± 0.18 ^{dc}	16.68 ± 0.24 ^{ec}	3.01 ± 0.04 ^{dB}	4.54 ± 0.03 ^{aB}

^A Extracción consecutiva de una fracción metanólica usando el equipo Soxhlet (comenzando con hexano (3 h), seguido con acetato de etilo (3 h) y finalmente con metanol (3 h)).

^B Extracción dirigida de una fracción metanólica, usando el equipo Soxhlet con metanol (3 h).

^C Extracción dirigida de una fracción metanólica, usando un homogeneizador ultra turrax de alta velocidad con metanol.

Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes, minúsculas en columnas y mayúsculas en renglones, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey. Abreviaturas: CFT, compuestos fenólicos totales; EAG, equivalentes de ácido gálico; CAET, capacidad antioxidante equivalente a trolox; CA, capacidad antioxidante; PSS, peso seco de semilla.

7. CONCLUSIONES

La caracterización química de las accesiones de achiote mostró que cuatro de las siete accesiones estudiadas tienen el potencial para competir en mercados internacionales debido a su contenido de bixina. Por otra parte, la caracterización química de las diferentes accesiones permitirá la selección de los recursos fitogenéticos de interés comercial y el posible establecimiento de plantaciones a gran escala de las accesiones seleccionadas. Los resultados de este trabajo demostraron que el mayor contenido de un metabolito de valor comercial (por ejemplo, la bixina) no se correlaciona necesariamente con el mayor contenido de otros metabolitos importantes (tocotrienoles). En este sentido, la accesión 50, que mostró el menor contenido de bixina ($6.50 \pm 1.74 \text{ mg g}^{-1} \text{ PSS}$), presentó el mayor contenido de tocotrienoles (principalmente δ -T3) ($5.035 \pm 0.640 \text{ mg g}^{-1} \text{ PSS}$), debido a que estos dos metabolitos comparten un intermediario común en su ruta biosintética (difosfato de geranylgeranilo) y existe una regulación diferencial para la síntesis de uno u otro metabolito. También, es importante tener en cuenta que la accesión 50 tuvo el mayor contenido de CFT y CA, además del mayor contenido de T3, principalmente en la isoforma δ -T3. Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo deben ser considerados con el fin de determinar el uso en la industria farmacéutica o alimentaria de los recursos fitogenéticos caracterizados.

8. PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad biológica *in vivo* de la fracción rica en tocotrienoles obtenida de las semillas de achiote, en términos de tolerancia al estrés térmico en un modelo de *Caenorhabditis elegans*.
- Determinar y estandarizar un método específico para evaluar la capacidad antioxidante en la fracción liposoluble rica en tocotrienoles.
- Evaluar la fracción rica en tocotrienoles en 3 matrices cárnicas y su efecto en los atributos sensoriales.
- Realizar la caracterización farmacológica de hoja y aprovechamiento integral de la planta de achiote.
- Desarrollar y optimizar el proceso de obtención de colorante de achiote y la reutilización de los subproductos (semillas) para la elaboración de diversos productos alimenticios.

9. REFERENCIAS

- Aggarwal B. B., Sundaram C., Prasad S. y Kannappan R. (2010). Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochemical Pharmacology*. 80, 1613-1631.
- Alexander A. G., Marfil V. y Li C. (2014). Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in Genetics*. 5, 1-21.
- Alves R. W., Ulson de Souza A. A., Ulson de Souza S. M. A. G. y Jauregi P. (2006). Recovery of norbixin from a raw extraction solution of annatto pigments using colloidal gas aphrons (CGAs). *Separation and Purification Technology*. 48, 208-213.
- Arce P. J. (1990). Breve reseña histórica. En: Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE). Programa mejoramiento de cultivos tropicales. Recomendaciones para el cultivo del achiote (*Bixa orellana*). Editorial Bib. Orton IICA / CATIE. Costa Rica. pp. 2-4.
- Balasundram N., Sundram K. y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99, 191-203.
- Biego G. H. M., Yao K. D., Koffi K. M., Ezoua P. y Kouadio L. P. (2013). Influence of the storage conditions on moisture and bixin levels in the seeds of *Bixa orellana* L. *African Journal of Agricultural Research*. 8, 5342-5347.

- Blair S. y Madrigal B. (2005). Achiote, *Bixa orellana*. En: Plantas antimaláricas de Tumaco. Costa Pacífica colombiana. Edit. Universidad de Antioquia. 1ª Ed., Colombia. pp. 94-96.
- Boulton R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 67-87.
- Cardarelli C. R., Benassi M. T. y Mercadante A. Z. (2008). Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT-Food Science and Technology*. 41, 1689-1693.
- Chisté R. C., Mercadante A. Z., Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. y Bragagnolo, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*. 127, 419-426.
- Chuyen H. V., Hoi N. T. y Eun J. B. (2012). Improvement of bixin extraction yield and extraction quality from annatto seed by modification and combination of different extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*. 47, 1333-1338.
- Coolborn A. F. y Bolatito B. (2010). Antibacterial and phytochemical evaluation of three medicinal plants. *Journal of Natural Products*. 3, 27-34.
- Devia P. J. E. y Saldarriaga C. L. (2003). Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*). *Revista Univesidad EAFIT*. 39 (131). Colombia. 8-22.
- Eitenmiller R. R. y Lee J. (2004). *Vitamin E, Food Chemistry, Composition, and Analysis*. Marcel Dekker Inc., New York, NY. 540 pp.
- Emerton V. (2008). Annatto. En: *Food Colours*. Edit. Leatherhead Food International. 1a. ed. Ucrania. pp. 3-8.

- FAO/WHO. (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Combined Compendium of Food Additive Specifications. Vol. 4—Analytical Methods, Test Procedures and Laboratory Solutions used by and Referenced in the Food Additive Specifications, Rome, Italy, p. 200.
- Fonnegra G. R. y Jiménez R. S. (2007). Achiote. En: Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2ª ed. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. pp. 15-16.
- Frank J., Dawn C. X. W., Schrader C., Eckert G. P. y Rimbach G. (2012). Do tocotrienols have potential as neuroprotective dietary factors?. *Ageing Research Reviews*. 11, 163-180.
- Fraser P. D., Pinto M. E. S., Holloway D. E. y Bramley P. M. (2000). Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *The Plant Journal*. 24, 551-558.
- Frega N., Mozzon M. y 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, 1723-1727.
- Giorgi A., Marinis P. D., Granelli G., Chiesa L. M. y Panseri S. (2013). Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repellent activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon region. *Journal of Chemistry*. 2013, 1-10.
- Giridhar P. y Parimalan R. (2010). A biotechnological perspective towards improvement of annatto color production for value addition – the influence of biotic elicitors. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 18, 77-79.

- Giridhar P., Venugopalan A. y Parimalan R. (2014). A Review on Annatto Dye Extraction, Analysis and Processing – A Food Technology Perspective. *Science Research Reporter*. 3, 327-348.
- Giuliano G., Rosati C. y Bramley P. M. (2003). To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *TRENDS in Biotechnology*. 21, 513-516.
- Gómez-Sampedro L. J. y Zapata-Montoya J. E. (2016). Obtaining of antioxidant peptide from bovine plasma hydrolysates and effect of the degree of hydrolysis on antioxidant capacity. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15, 101-109.
- Hendry G. y Houghton J. (1992). Annatto. En: *Natural Food Colorants*. Edit. AVI. 1a. ed. Estados Unidos. pp. 47-51.
- Hernández-Carrillo J. G., Valdez-Fragoso A., Welti-Chanes J. y Mujíca-Paz H. (2015). Tracing phenolic compounds through manufacturing of edible films from orange and grapefruit peels. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14, 567-578.
- Hintze J. (2007). *NCSS 2007*. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.
- Janick J. (2012). Annatto: Botany and Horticulture. En: *Horticultural Reviews*. Volume 39, First edition. Edit. Wiley-Blackwell. pp. 389-419.
- Kopjar M. y Piližota V. (2009). Copigmentation effect of phenolic compounds on red currant juice anthocyanins during storage. *Croatian Journal of Food Science and Technology*. 1, 16-20.
- Lancaster J. E., Grant J. E., Lister C. E. y Taylor M. C. (1994). Skin color in apples- Influence of copigmentation and plastid pigments on shade and darkness of red color in five genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 119, 63-69.

- Lauro G. y Francis J. (2000). Annatto. En: Natural Food Colorants: Science and Technology. Marcel Dekker, Inc. Estados Unidos. pp. 115-142.
- Lee Y. Y, Park H. M, Lee C. K, Kim S. L, Hwang T. Y, Choi M. S, Kwon Y. U, Kim W. H, Kim S. J, Lee S. C y Kim Y. H. (2012). Comparing extraction methods for the determination of tocopherols and tocotrienols in seeds and germinating seeds of soybean transformed with OsHGGT. Journal of Food Composition and Analysis. 27, 70-80.
- Lim T. K. (2012). *Bixa orellana*. En: Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Volume 1, Fruits. Edit. Springer Netherlands. pp. 515-526.
- Lourido P. H. y Martínez S. G. (2010). The *Bixa orellana* L. in treatment of stomatology affections: a subject that hasn't studied yet. Revista Cubana de Farmacia. 44, 231-244.
- Martínez-Palma N., Martínez-Ayala A. y Dávila-Ortíz G. (2015). Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina (*Arthrospira maxima*) obtained by Simulated gastrointestinal digestion. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 14, 25-34.
- Mata-Gómez L. C., Montañez J. C., Méndez-Zavala A. y Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microbial Cell Factories. 13, 1-12.
- Mène-Saffrané L., Jones D. y DellaPenna D. (2010). Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 107, 17815-17820.

- Miyazawa T., Nakagawa K. y Sookwong P. (2011). Health benefits of vitamin E in grains, cereals and green vegetables. *Trends in Food Science & Technology*. 22, 651-654.
- Morales-Delgado D. Y., Téllez-Medina D. I., Rivero-Ramírez N. L., Arellano-Cárdenas S., López-Cortez S., Hernández-Sánchez H., Gutiérrez-López G. y Cornejo-Mazón M. (2014). Effect of convective drying on total anthocyanin content, antioxidant activity and cell morphometric parameters of strawberry parenchymal tissue (*Fragaria x ananassa* Dutch). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 13, 179-187.
- Mortensen A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*. 78, 1477-1491.
- Morton J. (1960). Can annatto (*Bixa orellana* L.), an old source of food color, meet new needs for safe dye. *Florida State Horticultural Society*. 301-309.
- Nour V., Trandafir I. y Ionica M. E. (2010). HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 38, 44-48.
- Patacsil D., Tran A. T., Cho S. Y., Suy S., Saenz F., Malyukova I., Resson H., Collins S. P., Clarke R. y Kumar D. (2012). Gamma-tocotrienol induced apoptosis is associated with unfolded protein response in human breast cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 23, 93-100.
- Pisoschi A. M. y Negulescu G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 1, 106.

- Quadrana L., Almeida J., Otaiza S. N., Duffy T., Corr3a da Silva J. V., Godoy F., As3s R., Berm3dez L., Fernie A. R, Carrari F. y Rossi M. (2013). Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. *Plant Molecular Biology*. 81, 309-325.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
- Rodr3guez-3vila N. L., Narv3ez-Zapata J. A., Ram3rez-Ben3tez J. E., Aguilar-Espinosa M. L. y Rivera-Madrid R. (2011). Identification and expression pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*. *Journal of Experimental Botany*. 62, 5385-5395.
- Samarjit D., Kalanithi N. y Dipak K. D. (2007). Tocotrienols in cardioprotection. *Vitamins and Hormones*. 75, 285-299.
- Sen C. K., Khanna S. y Roy S. (2007). Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. *Molecular Aspects of Medicine*. 28, 692-728.
- Shin-Kang S., Ramsauer V. P., Lightner J., Chakraborty K., Stone W., Campbell S., Shrikanth A. G. y Krishnan K. (2011). Tocotrienols inhibit AKT and ERK activation and suppress pancreatic cancer cell proliferation by suppressing the ErbB2 pathway. *Free Radical Biology & Medicine*. 51, 1164-1174.
- SINAREFI (Sistema Nacional de Recursos Fitogen3ticos para la Alimentaci3n y la Agricultura). (2010). Estudio y conservaci3n del recurso achiote (*Bixa orellana* L.) en M3xico. Red Achiote SINAREFI.

- Singlenton V. L. y Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-58.
- Smith J. (2006). Annatto extracts. Chemical and Technical Assessment (CTA). JECFA.
- Srivastava J. K. y Gupta S. (2006). Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 346, 447-453.
- Taham T., Cabral F. A. y Barrozo M. A. S. (2015). Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *Journal of Supercritical Fluids*. 100, 175-183.
- Toledo de Oliveira T., Nagem T. J., Rocha da Costa M., Marciano da Costa L., Magalhães N. M., Stringheta P. C., Queiroga de Lima E., Kling de Moraes G. H. y Da Silva Vieira H. (2004). Propiedades biológicas de los tintes naturales. *Ars Pharmaceutica*. 45, 5-20.
- Venugopalan A., Giridhar P. y Ravishankar A. (2011). Food, ethnobotanical and diversified applications of *Bixa orellana* L.: a scope for its improvement through biotechnological mediation. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 1, 9-31.
- Wilankar C., Sharma D., Checker R., Khan N. M., Patwardhan R., Patil A., Sandur K. S., Devasagayam T. P. A. (2011). Role of immunoregulatory transcription factors in differential immunomodulatory effects of tocotrienoles. *Free Radical Biology and Medicine*. 51, 129-143.

Zou L. y Akoh C. C. (2015). Antioxidant activities of annatto and palm tocotrienol-rich fractions in fish oil and structured lipid-based infant formula emulsion. *Food Chemistry*. 168, 504-511.



CHEMICAL CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF THE PIGMENT EXTRACTION YIELD OF SEVEN MEXICAN ACCESSIONS OF *Bixa orellana*
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y CUANTIFICACIÓN DEL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PIGMENTO EN SIETE ACESIONES MEXICANAS DE *Bixa orellana*

D. Raddatz-Mota¹, L.J. Pérez-Flores¹, F. Carrari², M. Insani², R. Asis³, J.A. Mendoza-Espinoza⁴, F. Díaz de León-Sánchez¹, F. Rivera-Cabrera^{1*}

¹Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina, C.P. 09340, México D.F.

²Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IB-INTA). PO Box 25, B1712WAA Castelar, Argentina.

³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Av. Haya de la Torre s/n.

⁴Departamento de Biología Humana, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Calzada Ermita Iztapalapa 4163, Col. Lomas de Zaragoza, Del. Iztapalapa, C.P. 09620, México D.F.

Received March 19, 2016; Accepted June 30, 2016

Abstract

Achiote (*Bixa orellana*) is a plant used for obtaining a natural dye rich on carotenoids (mainly bixin and norbixin); it is also the plant species with the highest content of tocotrienols in nature. In the present work, the pigment extraction yield of seven Mexican accessions of *Bixa orellana* was quantified. Also color parameters and content of tocotrienols, tocopherols, norbixin, bixin, total phenolic compounds and antioxidant capacity were evaluated in the corresponding annatto extracts. The highest percentage of pigment extraction yield was obtained with KOH (4.84%). Accessions 43 ($L^* = 4.01 \pm 0.79$, $C^* = 7.33 \pm 1.07$, $h = 25.76 \pm 6.35$) and 50 ($L^* = 3.17 \pm 0.64$, $C^* = 6.81 \pm 0.53$, $h = 26.41 \pm 4.41$) had the lowest color values, meaning these accessions had a darker and redder color. Four accessions showed the highest content of bixin: accession 48 (3.1%), 45 (2.6%) 43 (2.4%) and 47 (2.2%). Accession 50 had showed the highest content of total phenolic compounds and of tocotrienols (T3), mainly the isoform δ -T3 ($5.03 \pm 0.64 \text{ mg g}^{-1}$ Seed Dry Weight), as well as the highest antioxidant capacity.

Keywords: annatto extracts, pigment yield, norbixin, bixin, phenolic compounds.

Resumen

El achiote (*Bixa orellana*) es una planta utilizada para obtener un colorante natural rico en carotenoides (principalmente bixina y norbixina); además, es la especie vegetal con el mayor contenido de tocotrienoles. En este trabajo, se determinó el rendimiento de extracción de pigmento de siete accesiones mexicanas de *Bixa orellana*. También se evaluaron los parámetros de color y el contenido de tocotrienoles, tocoferoles, norbixina, bixina, compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante en extractos de annato. El mayor porcentaje de rendimiento de extracción de pigmento fue obtenido con KOH (4.847905%). Las accesiones 43 ($L^* = 4.01 \pm 0.79$, $C^* = 7.33 \pm 1.07$, $h = 25.76 \pm 6.35$) y 50 ($L^* = 3.17 \pm 0.64$, $C^* = 6.81 \pm 0.53$, $h = 26.41 \pm 4.41$) presentaron los valores más bajos de los parámetros de color, lo que significa que estas accesiones tuvieron un color más oscuro y más rojo. Cuatro accesiones mostraron el mayor contenido de bixina: accesión 48 (3.1%), 45 (2.6%) 43 (2.4%) and 47 (2.2%). La accesión 50 mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y de tocotrienoles (T3), principalmente la isoforma δ -T3 ($5.03 \pm 0.64 \text{ mg g}^{-1}$ Peso Seco), así como también la mayor capacidad antioxidante.

Palabras clave: extractos de annato, rendimiento de pigmento, norbixina, bixina, compuestos fenólicos.

* Autora para la correspondencia. E-mail: frc@xanum.uam.mx; ferivera2323@yahoo.com
 Tel. +52 (55) 55 58 04 46 00 ex. 3656, Fax: (52) 55 58 04 47 27.

1 Introduction

Achiote (*Bixa orellana* L.) or annatto is a plant native to tropical America. It is a perennial tree that can reach nine meters in height with white or pink flowers and fruits with the form of globular ovoid capsules. Each capsule may contain from 30 to 45 ovoid or cone-shaped seeds covered by a thin red-orange layer or viscous aril (Fonnegra and Jiménez, 2007). Natural dyes obtained from the seeds of achiote plant have been used since pre-Hispanic times. Annual world production of achiote seeds is approximately 14, 500 tons (dry weight). Latin America produces 60% of the total world production. The main producers are Peru, Brazil and Mexico. At present, at least 67 accessions have been collected from the Yucatan Peninsula in Mexico in order to preserve and propagate the genetic material of this plant species, although only a few of them have been characterized. An accession is a sample of a distinct germplasm, where germplasm is defined as the set of genes expressed in the distinctive phenotype; therefore, collection of different accessions and its preservation in germplasm banks is very important for conservation of genetic diversity and its potential commercial usage.

Annatto is the name given to the crude pigment extract obtained from achiote, which contains bixin, norbixin and other carotenoids in varying proportions. While bixin is liposoluble, norbixin is hydrosoluble, and the possibility of obtaining both water-soluble and oil-soluble colorants depending on the type of extraction used as well as the solvent and temperature applied has converted achiote into one of the most interesting sources of plant colorants (Toledo de Oliveira et al., 2004).

Currently, the use of artificial colorants such as tartrazine (E102), allura red (E129) or sunset yellow FCF (E110) in food products have been severely questioned in developed countries, since there are reports showing that indiscriminate consumption of these colorants is associated to the development of degenerative illnesses such as some types of cancer (Salinas et al., 2005). As a consequence, the use of some artificial food colors such as carmoisine (E122) and Ponceau 4R (E124) have been banned in the USA and Europe, while the use of natural colorants such as the dye that is extracted from the surfaces of *Bixa orellana* L. (E 160b, annatto extract) have been recommended as alternatives (Toledo de Oliveira et al., 2004; McCann, 2007). The annatto extract has therefore accrued great economic importance worldwide as it is one of the natural dyes most

widely used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries as it does not alter flavor and it is practically non-toxic (Michelangeli et al., 2002; Smith 2006; Lourido and Martínez, 2010).

The natural dye obtained from *Bixa orellana* is rich on the carotenoids bixin (dark red color) and norbixin or orelline (yellow color) which are mainly used to develop attractive colors in dairy products (cheeses, margarine, and butter), meats, ice creams, cosmetics, condiments, ceramic, paint, hair colors, soaps, nail polish, varnish, lacquer, fabric colors, among others (Devia and Saldarriaga, 2003). Bixin represents approximately 80% of the total carotenoids content present in the dye obtained from achiote (mainly in its 9-*cis* configuration with low amounts of *trans*-bixin) (Smith, 2006). Other apocarotenoids present in lower amounts are norbixin, bixin dimethyl ester and byproducts of lycopene degradation (Cardarelli et al., 2008). On another hand, it has been documented that achiote (*Bixa orellana* L.) contains important amounts of tocotrienols, tocopherols, terpenes and flavonoids both in the seeds and in the leaves (Rodrigues et al., 2007; Chisté et al., 2011).

Vitamin E is an essential micronutrient in human and animals diets due to its biological activity and its powerful antioxidant capacity (Cano-Sarmiento et al., 2014). Vitamin E is the generic name given to all compounds that exerts the biological functions of α -tocopherol (Frank et al., 2012). However, vitamin E is a family of lipophilic compounds which includes four tocotrienols (T3) and four tocopherols (Ts) (α , β , γ , δ) (Aggarwal et al., 2010). The structure of these two types of compounds is very similar; but, while tocopherols have a saturated phytol tail, tocotrienols possess an isoprenoid tail with three unsaturated residues (Das et al., 2007; Almeida et al., 2011).

While Ts are present in seeds and leaves of most plants, T3 are only present in a small fraction of them (Patacsil et al., 2012). In this sense, annatto seeds are the plant source in nature with the highest content of T3 (Aggarwal et al., 2010). Ts and T3 are recognized by its antioxidant effects (Patacsil et al., 2012). It has been suggested that these compounds act as antioxidants by protecting the lipid membrane from oxidative damage (Aggarwal et al., 2010; Frank et al., 2012; Lee et al., 2012; Quadrana et al., 2013). While Ts have been widely studied for their antioxidant properties, there are few studies of T3 on this sense. Several authors have been reported that T3 have an anticancer effect in different kinds of cancer and neuroprotective effect due to its ability to suppress glutamate-induced activation of c-*Src* kinase, as well

as reducing cholesterol levels (Aggarwal *et al.*, 2010). It has been proposed that these beneficial effects might be due to the unsaturation of their aliphatic tail which makes easier their penetration to tissues and confers them a higher antioxidant power (Samarjit *et al.*, 2007). In this sense, the characterization of different Mexican accessions of *Bixa orellana* will permit the conservation of the phylogenetic resources, its propagation and the possible establishment of commercial plantations with selected material. The aim of this study was the chemical characterization and quantification of the pigment extraction yield of seven Mexican accessions of *Bixa orellana* and physical color parameters, tocotrienols, tocopherols, norbixin, bixin, total phenolic compounds content and antioxidant capacity in annatto extracts.

2 Materials and methods

2.1 Achiote seeds samples

Achiote (*Bixa orellana* L.) seeds were harvested on February 2013 from each of the seven studied accessions from different locations of Merida, Yucatan, Mexico (Table 1). Voucher specimens were authenticated and deposited in Herbarium "U Najil Tikin Xiw" of The Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Yucatán, Mexico. Seeds were stored in dark at room temperature until their analysis.

2.2 Quantification of the pigment extraction yield

The pigment extraction yield of annatto was evaluated using three different extraction methods with: 1) a 2% KOH solution (w/v) (alkaline water), 2) absolute ethanol and 3) water, according to the methodologies described by Devia and Saldarriaga (2003). For quantifying the pigment extraction yield (%), 5 g of achiote seeds from each of the studied accessions were used. Color of the crude extracts of 45 mL obtained by the methods mentioned above was measured as described in the following section; then, the extract was placed in a tray and left to stand in the dark at room temperature for 48 h until all liquid evaporated.

The dry pigment was weighted in an analytical weighing scale and the percentage of pigment extraction yield was determined by the following equation:

$$\text{Pigment extraction yield (\%)} = (W2/W1)(100) \quad (1)$$

Where: W2= weight of the obtained achiote pigment and W1= weight of the seeds.

2.3 Determination of color parameters

Forty-five milliliters of each extract above described were used to determine the color parameters luminosity (L*), chromaticity or saturation (C*) and hue (h) using a colorimeter (Hunter Lab, Color Flex, Prufer Comercial Mexico). Each sample was measured in triplicate.

Table 1. Main information on the studied seeds of achiote (*Bixa orellana* L.) Mexican accessions.

Accession Number	Region	Collection site	GPS coordinates	Voucher number ^a
42	Yucatán, Mexico	Akil, Akil	N 20°14'57.6"; W 89°20'57.6"	P-Simá-3141
43	Yucatán, Mexico	Akil, Akil	N 20°15'35.7"; W 89°20'53.0"	P-Simá-3142
45	Yucatán, Mexico	Tekax, Kankab	N 20°11'48.1"; W 89°20'55.5"	P-Simá-3143
46	Yucatán, Mexico	Oxkutzcab, Xohuayán	N 20°11'20.0"; W 89°23'00.2"	P-Simá-3144
47	Yucatán, Mexico	Oxkutzcab, Xohuayán	N 20°11'10.6"; W 89°23'00.3"	P-Simá-3145
48	Yucatán, Mexico	Oxkutzcab, Xohuayán	N 20°11'09.3"; W 89°22'59.8"	P-Simá-3146
50	Yucatán, Mexico	Mérida	N 21°00'09.6"; W 89°35'31.9"	G-Godoy-0001

^a Herbarium "U Najil Tikin Xiw" of The Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Yucatán, Mexico.

2.4 Preparation of the tocopherols and tocotrienols rich fraction (Ts-T3-RF)

For extracting and purifying tocotrienols and tocopherols from the achiote seeds, 50 mg of seeds from each of the accession were weighted and placed in separate test tubes. Then, the seeds were ground with 4 mL of methanol using an Ultra Turrax high speed homogenizer at 5,000 rpm (Omni International GLH-01, USA) and the obtained samples were vortexed for 1 min. Afterwards, 3.3 mL of chloroform were added to each tube and samples were mixed for 3 min using a vortex; then, 4 mL of Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5) were added and the sample was mixed again for 1 min using a vortex. Samples were centrifuged at 1,400 g at 4 °C for 5 min, the organic phase (lower) was recovered in another test tube, the upper phase was discarded and the pellet (intermediate phase) was also recovered for repeating twice the extraction process adding 3.3 mL of chloroform to the pellet. The combined chloroformic phases were diluted to 10 mL with chloroform. Samples were stored in dark at -70 °C until their use (Mène-Saffrané *et al.*, 2010). Ts-T3-RF was obtained in triplicate for each studied accession.

2.5 Determination of tocotrienols and tocopherols levels by HPLC

T3 (α and δ) and Ts (α , β , γ , δ) identification and quantification were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method described by Mène-Saffrané *et al.*, (2010). A 200 μ L aliquot of the Ts-T3-RF from each of the studied accessions was taken to dryness under a stream of N_2 . The dry samples were resuspended with 200 μ L of hexane:methyl tert-butyl ether (90:10 v/v) HPLC grade and filtered through 0.7 μ m glass microfiber (Millipore, USA). The filtered samples were injected into an HPLC system (Agilent Technologies, 1200) consisting of a vacuum degasser, a quaternary pump, an autosampler, a thermostatted column compartment and a fluorescence detector. The analyses were carried out on an Agilent Technologies LiChrospher 100 Diol column (5 μ m, 4.6 \times 250 mm) using hexane:methyl tert-butyl ether (90:10 v/v) mixture as the mobile phase in an isocratic elution mode. The flow rate was 1 mL min^{-1} and the column temperature was set at 25 °C. Results were recorded at detector wavelengths for excitation 296 nm and for emission 340 nm. In order to determine the concentration of T3 (α -T3 and δ -T3) and Ts (α -T, β -T, γ -T and δ -T), standard curves

(0-5 μ g mL^{-1} ; and 0-4 μ g mL^{-1} respectively) were prepared using commercial standards (Sigma-Aldrich, USA). Results were expressed as mg g^{-1} seed dry weight (SDW).

2.6 Determination of norbixin content

For quantifying the percentage of norbixin present in achiote seeds, 1g of seeds from each accession was placed in test tubes covered with aluminum foil, 5 mL 0.1 N NaOH were added to each tube and the samples were mixed with a vortex for 2 min. Subsequently, another 5 mL of 0.1 N NaOH were added to each tube and the sample was left to stand for 10 min at room temperature, after which, tubes were shaken for 30 sec using a vortex, the liquid extract was recovered and the seeds were removed. The extract was diluted 1:500 with 0.1 N NaOH and absorbance at 482 nm was measured with a UV-Vis spectrophotometer using 0.1 N NaOH as blank. For norbixin quantification, the specific absorption coefficient ($E_{1cm}^{1\%} = 2870$) was used (Joint FAO/WHO, 2006). Samples were obtained in triplicate for each studied accession.

2.7 Determination of bixin content by HPLC

Bixin identification and quantification was performed by the method described by Fraser *et al.*, (2000) with some modifications. From each of the accession, 50 mg of seeds (in triplicate) were placed in tubes covered with aluminum foil, 5 mL of ethyl acetate were added to each tube and the sample was homogenized with a vortex for 2 min; then, another 5 mL of ethyl acetate were added and the samples were mixed again with a vortex for 2 min. Afterwards, tubes were incubated for 24 h at room temperature and then the liquid extract was obtained and the seeds were removed. All extract were diluted to 10 mL with ethyl acetate and then taken to dryness with a stream of N_2 . Dry samples were stored at -20 °C until their use.

The dry samples were resuspended with methanol HPLC grade and filtered through 0.45 μ m nylon filters (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts). The filtered samples were injected into an HPLC system (Agilent Technologies 1260) consisting of a vacuum degasser, a quaternary pump, an autosampler, a thermostatted column compartment and a MWD (G1315B; Alltech Co. USA). The analyses were carried out on a Waters XTerra MS C18 column (5 μ m, 4.6 \times 250 mm) using acetonitrile:methanol:dichloromethane (43:43:14,

v/v) mixture as the mobile phase in an isocratic elution mode. The flow rate was 1 mL min^{-1} and the column temperature was set at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Results were recorded at 459 nm with a standard curve of bixin ($0 - 100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, USA). Results are expressed as $\text{mg of bixin g}^{-1}$ seed dry weight (SDW).

2.8 Determination of total phenolic compounds and antioxidant capacity

Three different methods of extraction were used in order to obtain methanolic fractions that could be used to determine the total phenolic compounds and antioxidant capacity in the samples, using whole seeds (A and B extractions) and ground seeds (C extraction) as described below:

A) From each of the accessions, 10 g of whole seeds (in triplicate) were placed in filter paper with a pore size of $25 \text{ } \mu\text{m}$ (Whatman, Germany), extraction cartridges were prepared and placed in the chamber of the Soxhlet equipment. In order to eliminate the oily and fatty material from the samples, three consecutive extractions were performed using 250 mL of hexane (first extraction), ethyl acetate (second extraction) and methanol (third extraction), for 3 h for each extraction. Methanolic fraction (polar) was collected and concentrated to a final volume of 25 mL using a rotary evaporator.

B) A directed extraction with methanol was performed using 10 g of whole seeds (in triplicate) collected from each accession. The samples were placed in filter paper with a pore size of $25 \text{ } \mu\text{m}$ (Whatman, Germany); extraction cartridges were prepared and subsequently placed in the Soxhlet equipment chamber. The extraction was carried out for 3 h (for each sample) using 250 mL of methanol. The polar fraction was collected and concentrated to a final volume of 25 mL using a rotary evaporator.

C) A directed extraction with methanol was performed using 1 g of seeds from each of the accessions (in triplicate). Achiote seeds (1 g) were ground with 25 mL of methanol using an Ultra Turrax high speed homogenizer (Omni International GLH-01, USA). The homogenate was centrifuged at $8,000 \text{ g}$ for 10 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and the supernatant mixed with methanol to a final volume of 25 mL .

All polar fractions were stored in amber flasks at $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ until use.

Total phenolic compounds (TPC) were determined with the Folin-Ciocalteu phenol reagent using the technique described by Singleton and Rossi (1965). An aliquot of $200 \text{ } \mu\text{L}$ of the adequate dilution (1:5

or 1:10) of each of the polar fractions were mixed with 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent [previously diluted 1:10 (v/v) with water] and incubated for 1 min before adding 0.8 mL of 7.5% (w/v) sodium carbonate; then, the reaction mix was incubated for 1 h at room temperature and afterwards, absorbance at 765 nm was measured. In order to determine the concentration of total phenols, a standard curve was prepared using gallic acid ($0-100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, USA). Total phenolic compounds were reported as $\text{mg gallic acid equivalents per gram of dry seed (mg GAE g}^{-1}$ SDW).

Antioxidant capacity (AC) was determined using the ABTS method as reported by Re et al., (1999) with some modifications. For preparing the ABTS solution, 96.2 mg of ABTS [2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] were mixed with 16.5 mg of sodium persulfate in 100 mL of deionized water and the solution was incubated for 16 h in the dark before its use. The ABTS solution was diluted with phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4) until an absorbance of 0.7 ± 0.1 at 734 nm was obtained.

Polar fractions obtained as described above were diluted with PBS (1X); $100 \text{ } \mu\text{L}$ of the sample dilution (1:10) were homogenized with $1000 \text{ } \mu\text{L}$ of the diluted ABTS solution and incubated for 10 min at room temperature; afterwards, absorbance at 734 nm was measured using a UV/Visible spectrophotometer. The antioxidant capacity was calculated using a calibration curve with trolox ($0-20 \text{ } \mu\text{M}$) (Sigma-Aldrich, USA). Results were expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity per gram of dry seed [TEAC (mM g^{-1} SDW)].

2.9 Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's multiple means comparison test was performed. The level of statistical significance was $P= 0.05$. All data were analyzed using the NCSS software (Hintze, 2007).

3 Results and discussion

3.1 Pigment extraction yield

Currently, there are several ways for extracting the colorant from *Bixa orellana*. One of the oldest and most traditional methods is the extraction with water (Devia and Saldarriaga, 2003; Taham et al., 2015). The efficiency of the pigment extraction

depends on the method (Giridhar *et al.*, 2014). In this sense, the general statistical analysis showed that the highest percentage of pigment extraction yields were obtained using KOH (4.84%, in average) as opposed to extractions using ethanol or water (3.46% and 3.37% respectively) according to the Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test. Furthermore, no significant differences ($P > 0.05$) in the pigment extraction yield were observed between annatto extracts where ethanol or water had been used. Accessions 50, 43 and 48 showed the highest pigment extraction yields when KOH was used, while no significant differences ($P > 0.05$) were observed among these accessions when ethanol or water were used (Table 2). These results are in agreement with those reported by Devia and Saldarriaga (2003) and Taham *et al.* (2015) where the highest pigment extraction yield was obtained with KOH followed by ethanol and subsequently with water.

3.2 Color parameters

Color is an important characteristic of food. Based on the color of the food, people create expectations whether the food is safe to eat or taste good or not. Based in this idea, the addition of color to food is closely associated with these expectations (Mortensen, 2006). The determination of color parameters in the accessions studied in this work, is important because it allow us to select the possible use of accessions in the industry based in the values obtained from L^* , C^* and h color parameters as well as the best method of extraction.

In the KOH and water extracts, there were no significant differences ($P > 0.05$) in the values of luminosity (L^*), chromaticity (C^*) and tone (h) among the accessions (Fig. 1). However, when ethanol was used as solvent, accessions 43 ($L^* = 4.01 \pm 0.79$, $C^* = 7.33 \pm 1.07$, $h = 25.76 \pm 6.35$) and 50 ($L^* = 3.17 \pm 0.64$, $C^* = 6.81 \pm 0.53$, $h = 26.41 \pm 4.41$) presented lower values of these parameters compared to the other accessions, which means that these accessions had a darker and redder color (Figs. 1b, 1e and 1h). These results are similar to those reported by Cardarelli *et al.*, (2008) who observed that color parameters in annatto extracts depend on the polarity of the solvent used in the extraction procedure; supporting the idea that a lower polarity tend to diminish the values of L^*C^*h . Alternatively, this behavior could also be explained by the composition of the pigments themselves present in the annatto extracts in ethanol (accessions 43 and 50) where others carotenoids (besides bixin and norbixin) could be extracted, modifying the color parameters obtained (Kopjar and Piližota, 2009).

3.3 Content of tocotrienols and tocopherols

There were significant differences in the content of δ -T3 among the different accessions. Accession 45 showed the lowest levels of δ -T3 (1.72 ± 0.37 mg g^{-1} SDW), while accessions 42 (3.19 ± 0.38 mg g^{-1} SDW), 43 (3.15 ± 0.36 mg g^{-1} SDW) and 48 (3.60 ± 0.50 mg g^{-1} SDW) showed intermediate levels and accession 50 (5.03 ± 0.64 mg g^{-1} SDW) showed the highest level (Fig. 2a).

Table 2. Percentage of pigment extraction yield from annatto extracts.

Accession Number	KOH (2% w/v)	Ethanol	Water
42	4.38 ± 0.08^{AA}	3.25 ± 0.72^{AA}	3.76 ± 1.23^{AA}
43	4.68 ± 0.20^{AB}	3.35 ± 0.69^{AB}	2.55 ± 0.57^{AA}
45	4.48 ± 1.03^{AA}	3.38 ± 0.76^{AA}	3.46 ± 0.54^{AA}
46	4.22 ± 0.08^{AA}	3.13 ± 0.73^{AA}	3.34 ± 0.40^{AA}
47	4.63 ± 1.19^{AA}	3.02 ± 0.73^{AA}	2.64 ± 0.58^{AA}
48	4.85 ± 0.15^{AB}	3.27 ± 0.69^{AA}	4.11 ± 0.57^{AB}
50	6.04 ± 0.93^{AB}	4.83 ± 0.62^{AB}	3.74 ± 0.64^{AA}

Values are the mean of three replicates \pm standard deviation. Same letters, lower case in columns and upper case in rows, do not differ significantly ($p < 0.05$) according to Tukey's test. Abbreviations: KOH, potassium hydroxide; w/v, weight/volume.

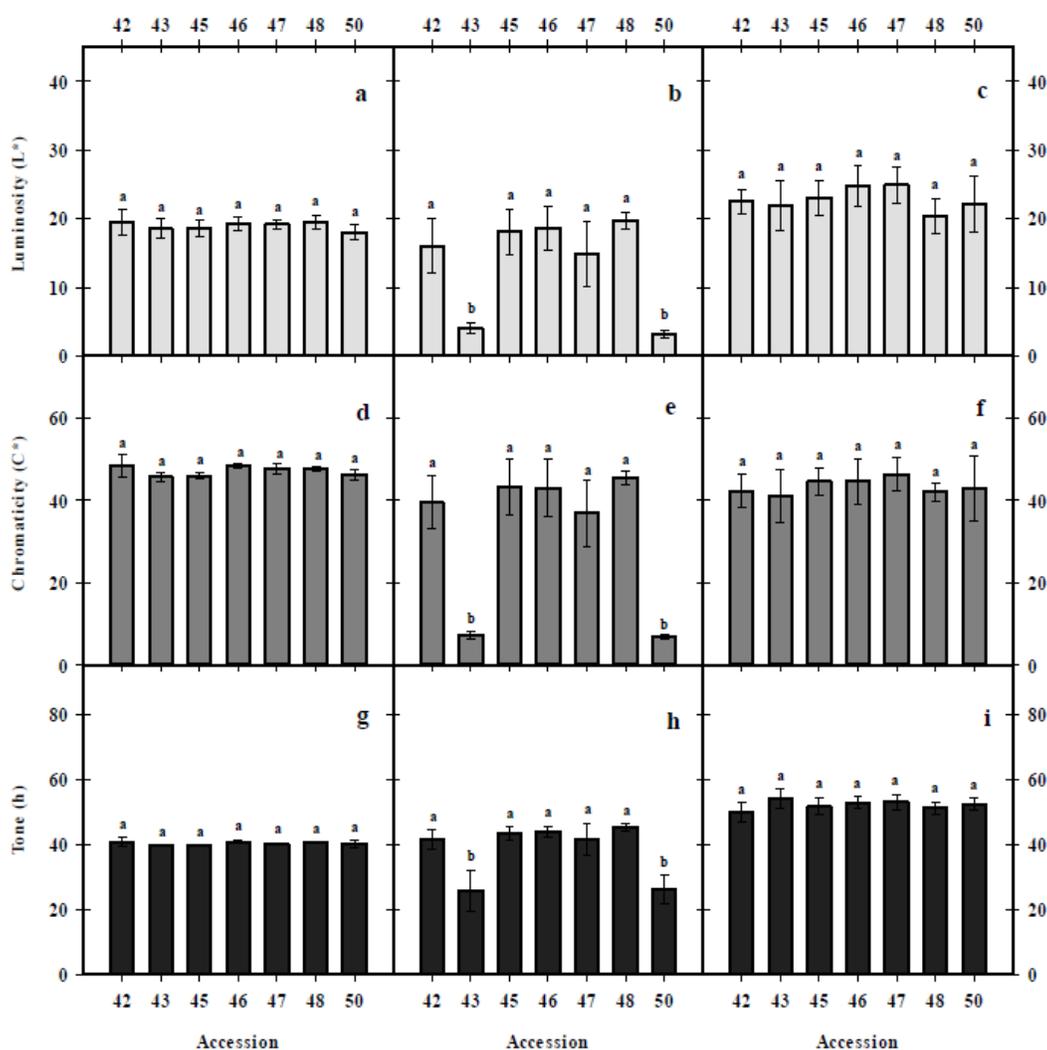


Fig. 1 Color parameters (L^* , C^* , h) of achioté seeds extracts. Luminosity (L^*) in: (a) KOH extracts; (b) ethanolic extracts; (c) water extracts; Chromaticity (C^*) in: (d) KOH extracts; (e) ethanolic extracts; (f) water extracts; Tone (h) in: (g) KOH extracts; (h) ethanolic extracts (i) water extracts. Values are the mean of three replicates \pm standard deviation. Columns not sharing the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's test.

These results are similar to those found by Frega *et al.*, (1998) in achioté seeds who reported values of δ -T3 content of 1.40 - 1.47 mg g^{-1} SDW. Currently, it is not known any other plant species with a similar content of T3 (δ -T3, constitutes more than 90%). Plant sources with the highest content of tocotrienols are oils

from rice bran, palm and annatto with a T3:Ts ratio of 50:50, 75:25 and 99.9:0.1, respectively (Aggarwal *et al.*, 2010). There were not significant differences in the content of α -T3 among the different accessions except for accession 50, which showed the highest α -T3 content ($0.115 \pm 0.01 \text{ mg g}^{-1}$ SDW) (Fig. 2b).

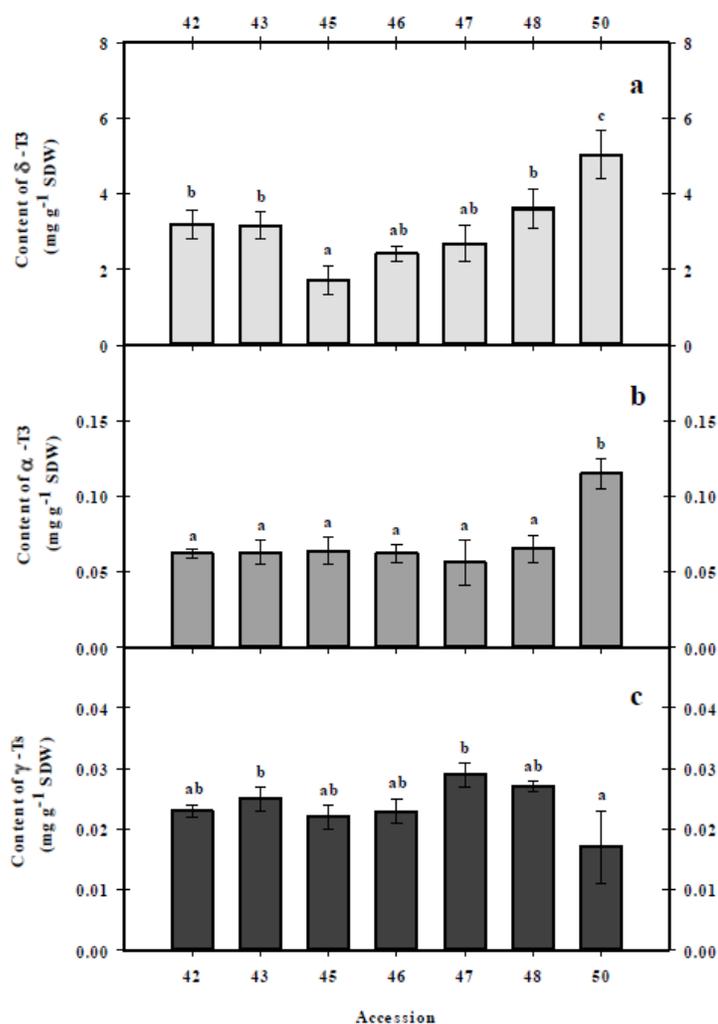


Fig. 2 Content of tocotrienols and tocopherols in seeds of Mexican accessions of achiote (a) δ -tocotrienol, (b) α -tocotrienol and (c) γ -tocopherol. Values are the mean of three replicates \pm standard deviation. Columns not sharing the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's test. Abbreviations: SDW, Seed Dry Weight; T3, Tocotrienols; Ts, Tocopherols.

Regarding the Ts content, γ -Ts was the only isoform that was detected in all accessions studied and quantified above the sensitivity limit of the equipment (Fig. 2c). α -Ts, β -Ts and δ -Ts isoforms were found in trace quantities. The lowest content of γ -Ts was observed in accession 50 and was significantly different to accessions 43 and 47. There were not significant differences among accessions 42, 43, 45,

46, 47 and 48 (Fig. 2c). These results agree with those reported by Frega *et al.*, (1998) and Zou and Akoh (2015) who mentioned traces of Ts and consider *Bixa orellana* virtually free of tocopherols. In this sense, figure 3 shows a typical chromatogram of chemical composition of T3 and Ts of a Mexican achiote seeds sample (accession 42). Where Ts were detected in minor amounts compared to the content of T3.

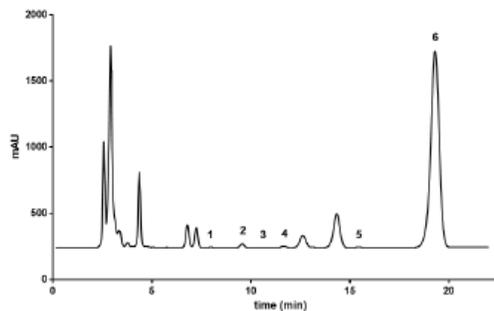


Fig. 3 Representative chromatogram of a fraction of seeds of Mexican achiote from accession 42. The number indicated above a peak represent a compound: 1) α -Ts, 2) α -T3, 3) β -Ts, 4) γ -Ts, 5) δ -Ts, 6) δ -T3. Abbreviations: mAU, milli absorption units.

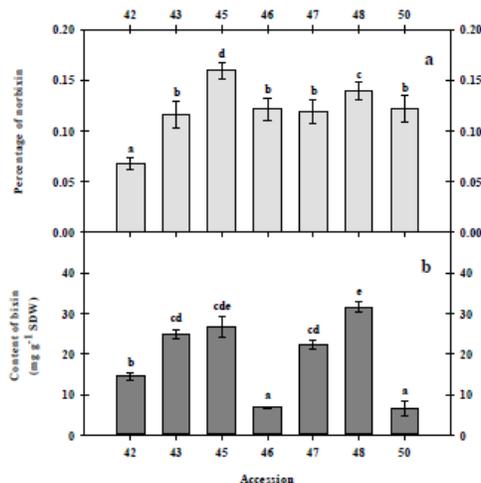


Fig. 4 Content of carotenoids in seeds of Mexican accessions of achiote (a) percentage of norbixin and (b) content of bixin. Values are the mean of three replicates \pm standard deviation. Columns not sharing the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's test.

3.4 Norbixin content

Carotenoids are natural pigments important for the chemical, food, pharmaceutical and cosmetic industry. These pigments also present an antioxidant capacity attributed to their chemical structure (Mata-Gómez et al., 2014). Accession 45 presented the highest levels of norbixin ($0.15 \pm 0.008\%$), while accession 42 showed the lowest levels ($0.06 \pm 0.005\%$). There

were not significant differences ($P > 0.05$) among the other accessions studied (Fig. 4a). These results are similar with those reported by Smith (2006) and Alves et al., (2006), who described that norbixin content in *Bixa orellana* aqueous extracts, ranged from 0.1 - 4% and 0 - 3.26% respectively.

3.5 Bixin content determined by HPLC

The content of bixin determined by HPLC showed the highest levels of bixin in accession 48 ($31.5 \pm 1.16 \text{ mg g}^{-1} \text{ SDW}$), followed by accessions 45, 43, and 47 (26.6 ± 2.4 , 24.8 ± 1.17 , $22.3 \pm 1.14 \text{ mg g}^{-1} \text{ SDW}$, respectively) among which there were no significant differences. On the other hand, accessions 46 and 50 had the lowest content of bixin (6.8 ± 0.15 and $6.5 \pm 1.74 \text{ mg g}^{-1} \text{ SDW}$, respectively) with no significant differences between them (Fig. 4b). These results agree with data reported by several authors showing that bixin content in achiote seeds varies from 0.26 to $311 \text{ mg g}^{-1} \text{ SDW}$ (Cardarelli et al., 2008; Chisté et al., 2011; Rodríguez-Ávila et al., 2011). The percentage of bixin is an important factor since it has been established that bixin content on achiote seeds should not be lower than 2.7% for their commercialization in international markets (Giridhar and Parimalan, 2010). Bixin content in annatto seeds may vary between 1 and 4%, depending on the seeds quality (Giridhar et al., 2014). In the accession analyzed in the present work, bixin percentage ranged between 0.65 and 3.15% (Fig. 4b). As described above, accessions 48 (3.1%), 45 (2.6%) 43 (2.4%) and 47 (2.2%) showed the highest content of bixin. These results coincide with those reported by Biego et al., (2013) who obtained similar bixin percentages in *Bixa orellana* seeds.

On another hand, the fact that accession 50 has shown the lowest content of bixin and a darker and redder color compared to the other accessions might be explained by the copigmentation phenomenon in which there is a molecular interaction between pigments and other organic molecules in solution (referred as copigments or cofactors) causing a more intense coloring of the pigments independently of their concentration (Boulton, 2001). Copigments or cofactors may be flavonoids, alkaloids, amino acids, organic acids, nucleotides, polysaccharides, metals and anthocyanins (Kopjar and Piližota, 2009). In this regards, Lancaster et al., (1994) reported that anthocyanins concentration combined with the interaction of chlorophylls and carotenoids are important factors that determine the red color in apple skin.

Table 3. Total phenolic compounds and antioxidant capacity in polar fractions of achiote seeds.

Accession Number	WHOLE SEED				GROUND SEED	
	A		B		C	
	Polar fraction		Polar fraction		Polar fraction	
	TPC (mg GAE g ⁻¹ SDW)	AC [TEAC (mM g ⁻¹ SDW)]	TPC (mg GAE g ⁻¹ SDW)	AC [TEAC (mM g ⁻¹ SDW)]	TPC (mg GAE g ⁻¹ SDW)	AC [TEAC (mM g ⁻¹ SDW)]
42	1.99 ± 0.22 ^{bcA}	1.88 ± 0.09 ^{cA}	8.36 ± 0.20 ^{ab}	5.78 ± 0.22 ^{ac}	2.09 ± 0.05 ^{AA}	4.31 ± 0.15 ^{ab}
43	1.60 ± 0.20 ^{abA}	0.75 ± 0.03 ^{AA}	10.05 ± 0.19 ^{cC}	7.53 ± 0.12 ^{bc}	2.51 ± 0.04 ^{cB}	6.28 ± 0.05 ^{cB}
45	4.47 ± 0.44 ^{daB}	1.33 ± 0.09 ^{bA}	9.64 ± 0.11 ^{cC}	16.09 ± 0.18 ^{dC}	2.41 ± 0.02 ^{cA}	6.21 ± 0.08 ^{cB}
46	4.65 ± 0.41 ^{dB}	1.33 ± 0.04 ^{bA}	9.10 ± 0.21 ^{bc}	8.46 ± 0.10 ^{cC}	2.27 ± 0.05 ^{bA}	5.84 ± 0.07 ^{bB}
47	1.52 ± 0.02 ^{aA}	1.45 ± 0.07 ^{bA}	9.67 ± 0.12 ^{cC}	7.16 ± 0.19 ^{bc}	2.41 ± 0.03 ^{cB}	5.55 ± 0.09 ^{bB}
48	4.20 ± 0.08 ^{dB}	1.25 ± 0.02 ^{bA}	8.19 ± 0.24 ^{cC}	8.34 ± 0.05 ^{cC}	2.04 ± 0.06 ^{AA}	6.31 ± 0.20 ^{cB}
50	2.40 ± 0.09 ^{cA}	3.12 ± 0.04 ^{dA}	12.06 ± 0.18 ^{dC}	16.68 ± 0.24 ^{eC}	3.01 ± 0.04 ^{dB}	4.54 ± 0.03 ^{ab}

^A Consecutive extraction of polar fraction using soxhlet equipment (starting with hexane (3 h), followed with ethyl acetate (3 h) and finally with metanol (3 h)).

^B Directed extraction of polar fraction, using soxhlet equipment with metanol (3 h).

^C Directed extraction of polar fraction, using an ultra turrax high speed homogenizer with methanol.

Values are the mean of three replicates ± standard deviation. Same letters, lower case in columns and upper case in rows, do not differ significantly ($p < 0.05$) according to Tukey's test. Abbreviations: TPC, total phenolic compounds; GAE, gallic acid equivalent; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; AC, antioxidant capacity; SDW, seed dry weight.

3.6 Total phenolic compounds and antioxidant capacity

Total phenolic compounds (TPC) and antioxidant capacity (AC) are parameters generally determined as part of the phytochemical profile of plant tissues.

There are numerous molecules present in plant-derived natural products that function as antioxidants: carotenoids, phenolic compounds, benzoic acid derivatives, flavonoids, proanthocyanidins, stilbenes, coumarins, lignans and lignins (Pisoschi and Negulescu, 2011). Phenolic compounds, ubiquitous in plants are an essential part of the human diet, and are of considerable interest due to their antioxidant properties (Balasundram *et al.*, 2006; Hernández-Carrillo *et al.*, 2015).

Concerning the methanolic fractions A, B and C obtained with whole and ground seeds, the polar fractions B showed the highest ($P < 0.05$) content of TPC in comparison with polar fractions A and C. However, the methanolic fractions B obtained with soxhlet extractor were more efficient in general, producing a significant increase of 4.0 and 3.3 fold the extraction of TPC, in comparison with methanolic fraction C obtained with ultra turrax and polar fraction A (consecutive extraction), respectively. The TPC content in the methanolic fractions B and C showed

a similar behavior in all the accessions analyzed. Accession 50 showed the highest content of TPC in both polar fractions B and C (12.06 ± 0.18 ; 3.01 ± 0.04 , respectively); followed by accession 43, 45, 46 and 47. Finally, the lowest TPC was observed in accessions 42 and 48 (Table 3). The results obtained in the present work regarding the TPC in the polar fractions analyzed agree with those reported by Cardarelli *et al.*, (2008) and Giorgi *et al.*, (2013), who observed that TPC in *Bixa orellana* extracts ranged from 0.30 to 4.67 mg g⁻¹ SDW.

On other hand, the evaluation of the AC may be an appropriate tool to determine the additive antioxidant properties of plant-derived natural products. The ABTS is a rapid, simple, accurate, inexpensive and widely used method to measure the ability of compounds to act as free radical scavengers or hydrogen donors and to evaluate the antioxidant capacity of foods. However, AC by ABTS has some limitations, because the validated method is directed to polar compounds. In recent years there has been increased the interest in evaluate the antioxidant potential of plants, seed extracts and bioactive compounds and their possible application as functional foods and nutraceuticals (Morales-Delgado, 2014; Martínez-Palma *et al.*, 2015; Gómez-Sampedro and Zapata-Montoya, 2016).

The AC in the polar fractions showed a similar trend to the one observed for TPC. The polar fractions B showed the highest AC in all the accessions studied, followed by polar fractions C and the lowest AC in polar fractions A. The AC (TEAC mM g⁻¹ SDW) in polar fractions B showed a significant increase of 1.79 and 6.32 fold, in comparison with the polar fractions C and A, respectively (Table 3). The results obtained are similar to those reported by Cardarelli *et al.*, (2008) who observed a similar AC in achiote extracts obtained with polar solvents.

Conclusions

The chemical characterization of Mexican accessions of achiote showed that four of the seven studied accessions have the potential to compete in international markets due to their bixin content. Furthermore, chemical characterization of different accessions will permit the selection of commercially relevant phylogenetic resources, and the possible establishment of large-scale plantations with selected accessions. The results of this study demonstrated that the highest content of a commercially valuable metabolite (such as bixin) does not necessarily correlate with the highest content of other important metabolites (tocotrienols). In this sense, accession 50 which had a lower content of bixin (6.5 ± 1.74 mg g⁻¹ SDW) showed the highest content of tocotrienols δ -T3 (5.035 ± 0.64 mg g⁻¹ SDW), since these two metabolites share a common intermediate (geranyl geranyl diphosphate) in their biosynthetic pathway and there is a differential regulation for the synthesis of one or the other metabolite. Also, it is important to note that the accession 50 exhibited the highest TPC and AC, in addition to the highest content of T3, mainly in the isoform δ -T3. The results presented here should therefore be considered in order to determine the most adequate use of the characterized phylogenetic resources.

Acknowledgments

This work has been partially supported by Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, SINAREFI - RED ACHIOTE, and PRODEP, "Red de Cuerpos Académicos Ciencia y Tecnología Pre y Postcosecha", who have supported several research projects to characterize, preserve and propagate the genetic material of achiote (*Bixa orellana* L.). We also thank CONACYT for its financial support (No. 233307) to

Denise Raddatz Mota during her PhD studies. This work is a part of D. Raddatz PhD dissertation. We thank IT Conkal and CICY for assistance with achiote seed sampling.

Notation

L*	luminosity
C*	chromaticity
h	tone
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
T3	tocotrienol
Ts	tocopherol
Ts-T3-RF	tocopherols and tocotrienols rich fraction
ABTS	2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
SDW	seed dry weight
GAE	gallic acid equivalents
TPC	total phenolic compounds
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
AC	antioxidant capacity

References

- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Prasad, S. and Kannappan, R. (2010). Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its' potential against cancer and other chronic diseases. *Biochemical Pharmacology* 80, 1613-1631.
- Almeida, J., Quadrana, L., Asís, R., Setta, N., Godoy, F., Bermúdez, L., Otaiza, N.S., Corrêa da Silva, J.V., Fernie, A.R., Carrari, F. and Rossi, M. (2011). Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. *Journal of Experimental Botany* 62, 3781-3798.
- Alves, R.W., Ulson de Souza, A.A., Ulson de Souza, S.M.A.G. and Jauregi, P. (2006). Recovery of norbixin from a raw extraction solution of annatto pigments using colloidal gas aphrons (CGAs). *Separation and Purification Technology* 48, 208-213.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 191-203.

- Biego, G.H.M., Yao, K.D., Koffi, K.M., Ezoua, P. and Kouadio, L.P. (2013). Influence of the storage conditions on moisture and bixin levels in the seeds of *Bixa orellana* L. *African Journal of Agricultural Research* 8, 5342-5347.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 67-87.
- Cano-Sarmiento, C., Monroy-Villagrana, A., Alamilla-Beltran, L., Hernandez-Sánchez, H., Cornejo-Mazon, M., Tellez-Medina, D.I., Jimenez-Martínez, C. and Gutierrez-López, G.F. (2014). Micromorphometric characteristics of α -tocopherol emulsions obtained by microfluidization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 201-212.
- Cardarelli, C.R., Benassi, M.T. and Mercadante, A.Z. (2008). Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT-Food Science and Technology* 41, 1689-1693.
- Chisté, R.C., Mercadante, A.Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C. and Bragagnolo, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry* 127, 419-426.
- Das, S., Kalanithi, N. and Dipak, D. (2007). Tocotrienols in cardioprotection. *Vitamins and Hormones* 75, 285-299.
- Devia, P.J.E. and Saldarriaga, C.L. (2003). Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*). *Revista Universidad EAFIT* 39, 8-22.
- Fonnegra, G. R. and Jiménez, R. S. L. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Medellín, Colombia.
- Frank, J., Dawn, C.X.W., Schrader, C., Eckert, G.P. and Rimbach, G. (2012). Do tocotrienols have potential as neuroprotective dietary factors? *Ageing Research Reviews* 11, 163-180.
- Fraser, P.D., Pinto, M.E.S., Holloway, D.E. and Bramley, P.M. (2000). Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *The Plant Journal* 24, 551-558.
- Frega, N., Mozzon, M. and 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, 1723-1727.
- Giorgi, A., Marinis, P.D., Granelli, G., Chiesa, L.M. and Panseri, S. (2013). Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repellent activity of *Bixa orellana* from Brazilian amazon region. *Journal of Chemistry* 2013, 1-10.
- Giridhar, P. and Parimalan, R.A. (2010). A biotechnological perspective towards improvement of annatto color production for value addition - the influence of biotic elicitors. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 18, 77-79.
- Giridhar, P., Venugopalan, A. and Parimalan, R. (2014). A review on annatto dye extraction, analysis and processing-a food technology perspective. *Journal of Scientific Research and Reports* 3, 327-348.
- Gómez-Sampedro, L.J. and Zapata-Montoya, J.E. (2016). Obtaining of antioxidant peptide from bovine plasma hydrolysates and effect of the degree of hydrolysis on antioxidant capacity. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 101-109.
- Hernández-Carrillo, J.G., Valdez-Fragoso, A., Welti-Chanes, J. and Mujica-Paz, H. (2015). Tracing phenolic compounds through manufacturing of edible films from orange and grapefruit peels. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 567-578.
- Hintze, J. (2007). NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.
- Joint FAO/WHO (2006). Expert committee on food additives (Meeting 67th: 2006, Rome, Italy), Compendium of food additive specifications. *WHO Technical Report Series no. 3*, 1-85.
- Kopjar, M. and Piližota, V. (2009). Copigmentation effect of phenolic compounds on red currant juice anthocyanins during storage. *Croatian*

- Journal of Food Science and Technology* 1, 16-20.
- Lancaster, J.E., Grant, J.E., Lister, C.E. and Taylor, M.C. (1994). Skin color in apples-Influence of copigmentation and plastid pigments on shade and darkness of red color in five genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119, 63-69.
- Lee, Y.Y., Park, H.M., Lee, C.K., Kim, S.L., Hwang, T.Y., Choi, M.S., Kwon, Y.U., Kim, W.H., Kim, S.J., Lee, S.C. and Kim, Y.H. (2012). Comparing extraction methods for the determination of tocopherols and tocotrienols in seeds and germinating seeds of soybean transformed with OsHGGT. *Journal of Food Composition and Analysis* 27, 70-80.
- Lourido, P.H. and Martínez, S.G. (2010). The *Bixa orellana* L. in treatment of stomatology affections: a subject that hasn't studied yet. *Revista Cubana de Farmacia* 44, 231-244.
- Martínez-Palma, N., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortiz G. (2015). Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina (*Arthrospira maxima*) obtained by Simulated gastrointestinal digestion. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 25-34.
- Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C., Méndez-Zavala, A. and Aguilar, C.N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* 13, 1-12.
- McCann, D. (2007). Los aditivos alimentarios y el comportamiento hiperactivo en 3 años y 9.8 años de edad, niños de la comunidad: un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. *Lancet* 370, 1560-1567.
- Mène-Saffrané, L., Jones, D. and DellaPenna, D. (2010). Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 17815-17820.
- Morales-Delgado, D.Y., Téllez-Medina, D.I., Rivero-Ramírez, N. L., Arellano-Cárdenas S., López-Cortez, S., Hernández-Sánchez H., Gutiérrez-López G. and Cornejo-Mazón M. (2014). Effect of convective drying on total anthocyanin content, antioxidant activity and cell morphometric parameters of strawberry parenchymal tissue (*Fragaria x ananassa* Dutch). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 179-187.
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry* 78, 1477-1491.
- Michelangeli, C., Maureen, A., Artioli, P. and Mata, J. (2002). Microsporogénesis y microgametogénesis de onoto (*Bixa orellana* L.). *Acta Científica Venezolana* 53, 171-175.
- Patacsil, D., Tran, A.T., Cho, S.Y., Suy, S., Saenz, F., Malyukova, I., Ressom, H., Collins, S.P., Clarke, R. and Kumar, D. (2012). Gamma-tocotrienol induced apoptosis is associated with unfolded protein response in human breast cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 93-100.
- Pisoschi, A.M. and Negulescu, G.P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* 1, 106.
- Quadrana, L., Almeida, J., Otaiza, S.N., Duffy, T., Corrêa da Silva, J.V., Godoy, F., Asís, R., Bermúdez, L., Fernie, A.R., Carrari, F. and Rossi, M. (2013). Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. *Plant Molecular Biology* 81, 309-325.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- Rodrigues, S.M., Soares, V.L.F., Oliveira, T.M., Gesteira, A.S., Otoni, W.C. and Costa, M.G.C. (2007). Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). *Molecular Biotechnology* 37, 220-224.
- Rodríguez-Ávila, N.L., Narváez-Zapata, J.A., Ramírez-Benítez, J.E., Aguilar-Espinosa, M.L. and Rivera-Madrid, R. (2011). Identification and expression pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*. *Journal of Experimental Botany* 62, 5385-5395.

- Salinas, Y., Rubio, D. and Díaz, A. (2005). Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (*Zea mays*) como colorantes en yogur. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55, 293-298.
- Samarjit, D., Kalanithi, N. and Dipak, K.D. (2007). Tocotrienols in cardioprotection. *Vitamins and Hormones* 75, 285-299.
- Singlenton, V.L. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-58.
- Smith, J. (2006). Annatto extracts. Chemical and Technical Assessment. *JECFA*. 1-21.
- Taham, T., Cabral, F.A. and Barrozo, M.A.S. (2015). Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *Journal of Supercritical Fluids* 100, 175-183.
- Toledo de Oliveira, T., Nagem, T.J., Rocha da Costa, M., Marciano da Costa, L., Magalhães, N.M., Stringheta, P.C., Queiroga de Lima, E., Kling de Moraes, G.H. and Da Silva Vieira, H. (2004). Propiedades biológicas de los tintes naturales. *Ars Pharmaceutica* 45, 5-20.
- Zou, L. and Akoh, C.C. (2015). Antioxidant activities of annatto and palm tocotrienol-rich fractions in fish oil and structured lipid-based infant formula emulsion. *Food Chemistry* 168, 504-511.