

**“MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERU”**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial**

**“EVALUACIÓN DE LA POTENCIALIDAD DEL FRUTO DE HUITO  
(*Genipa americana*) COMO FUENTE DE COLORANTE NATURAL”**

**PRESENTADA POR:**

- **BACH. CARLA CLAUDIA MIRANDA PERLACIO**
- **BACH. GIULIANA DAMIZÚ CÁRDENAS ENRIQUEZ**

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE**

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**PUERTO MALDONADO - PERÚ**

**2015**

# *DEDICATORIA*

*Dedicamos esta tesis con mucho amor y de manera especial a Dios y a nuestros padres, por inculcarnos siempre la fe y por habernos preparado y abrirnos las puertas hacia un futuro de éxito, ya que gracias a sus esfuerzos y perseverancia nos han enseñado que nada es imposible y mucho menos perseguir nuestros sueños y cumplir todas nuestras metas.*

*Por ser los mejores padres del mundo les dedico esta tesis y todos mis éxitos..... todos y cada uno de ellos son más suyos que los nuestros.*

*Con amor*

*Giuliana Damizu Cardenas Enriquez*

*y*

*Carla Claudia Miranda Perlacio*

# **AGRADECIMIENTO**

*Agradecemos en primer lugar a Dios por regalarnos la bendición de encontrarlo en nuestras vida y contar con su compañía en cada paso, por brindarnos el amor de nuestras familia y el apoyo de los mismos, por hacer que su amor inunde nuestro corazón y nos motive a seguirlo por un camino que nos permita ser mejor hijas, hermana, nieta y persona.*

*A nuestras madres por darnos el mejor ejemplo sobre lo que es una mujer de éxito, por inculcarnos valores y principios de los que nos sentimos muy orgullosas, por su apoyo y amor incondicional.*

*A nuestros padres que siempre han estado ahí dándonos su amor y su apoyo para nuestro crecimiento, intelectual, espiritual y físico.*

*En general quisiéramos agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido con nosotras la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesitamos nombrar porque tanto ellas como nosotras sabemos que desde los más profundo de nuestros corazón les agradecemos el habernos brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.*

*Con Amor*

*Carla Claudia Miranda Perlacio*

*y*

*Giuliana Damizu Cárdenas Enríquez*

## PRESENTACION

En la actualidad los colorantes naturales vienen cobrando enorme importancia como insumo en la industria alimentaria, fundamentalmente porque en los últimos años se han descubierto que una gama de colorantes sintéticos presentan cierta toxicidad, especialmente aquellos productos con colores intensos y oscuros, incluso prohibiéndose su uso como insumo en la industria alimentaria en los países como Noruega y Suiza. Por otro lado, a los colorantes naturales también se les atribuye algunas propiedades farmacológicas y son fuente importante de sustancias antioxidantes y antimicrobiana, todo ello ha creado una mayor demanda en el mercado mundial, motivando la búsqueda de nuevas fuentes naturales, incentivos para la mejora de los procesos convencionales y exploración de nuevos procesos no convencionales ambientales amigable, que brinden mayor rendimiento y eficiencia en la extracción colorante natural de fuente vegetal como es el fruto de huito.

Así mismo, las industrias que producen colorantes sintéticos, cuestionan a los por una limitada aplicación, debido sobre todo a factores como una reducida estabilidad a la luz, estabilidad a un rango restringida de pH y temperatura, y baja uniformidad de tonalidad entre diferentes lotes al comprarlos con los tintes sintéticos; ello motiva a la búsqueda de fuentes naturales de color azul, muy importante, que junto con el amarillo y rojo que son considerados como colores primarios que permiten previa combinación la producción de diferentes tonalidades de colores, requerimiento insatisfecho en la industria alimentaria. Por consiguiente, la tesis evaluara al fruto de Huito como fuente de colorante natural de color azul, para el cual se determinara las condiciones más adecuadas de los procesos de extracción por percolación e inundación con solventes que permitan producir un colorante con mayor grado de estabilidad a la luz, pH y temperatura, así como determinar los componentes químicos cromóforos encargados de brindar la coloración característicos a los colorantes obtenidos del Genipapo.

## INDICE GENERAL

PRESENTACION  
RESUMEN  
ABSTRACT

	<b>PAG</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1 Antecedentes	3
2.2 Huito ( <i>Genipa americana</i> ).....	4
2.2.1 <i>Taxonomía</i> .....	4
2.2.2 <i>Caracterización Física y Química del Fruto de G. americana</i> .....	5
2.3.3 <i>Uso Común y Tradicional de las Especies</i> .....	7
2.2.4 <i>Vida Útil del Fruto de G. americana</i> .....	7
2.2.5 <i>Área de Distribución Natural y de Naturalización</i> .....	8
2.3 Descripción de Genipósido y Genipina.....	9
2.3.1 <i>Propiedades Fisicoquímicas de Genipósido y Genipina</i> .....	9
2.3.2 <i>Estabilidad Acuosa de la Genipina</i> .....	10
2.3.3 <i>Mecanismo de Reacción de da Genipina con un Grupo Amino Primario</i> ....	11
2.3.4 <i>Formación del Pigmento Azul por Reacción de Genipina con un grupo Amino Primario</i> .....	12
2.4 Colorantes Naturales.....	12
2.4.1 <i>Clasificación de los Colorantes Naturales</i> .....	13
2.4.1.1 Flavonoideos.....	13
2.4.1.2 Carotenoides.....	14
2.4.1.3 Colorantes tipo Quinona.....	14
2.4.1.4 Derivados de Indol.....	14
2.4.1.5 Derivados de Delfinidina.....	14
2.4.1.6 Derivados de Dihidropilano.....	14
2.4.1.7 Grupo Betaleina.....	15
2.4.1.8 Grupo Xantonas.....	15
2.4.1.9 Grupo Tanino-Pirogalloy Catecol.....	15
2.4.1.10 Grupo Clorofila.....	16
2.4.2 <i>Fuentes de Obtención de Colorantes Naturales</i> .....	17
2.4.3 <i>Métodos de Extracción de Colorantes Naturales</i> .....	17

2.4.4	<i>Métodos de Aplicación de Colorantes Naturales</i> .....	18
2.4.5	<i>Variables que Determinan la Calidad de un Colorante</i> .....	19
2.4.5.1	Afinidad.....	19
2.4.5.2	Igualación.....	19
2.4.5.3	Solidez.....	19
2.4.6	<i>Factores que afectan a la Solidez de los Colorantes</i> .....	20
2.4.6.1	Tipos de Ensayos de Solidez.....	20
2.5	Extracción Sólido – Líquido.....	21
2.5.1	<i>Extracción Discontinua Convencional</i> .....	22
2.5.2	<i>Influencia de los Parámetros de Funcionamiento - Cinética de Extracció...</i>	24
2.5.3	<i>Modelamiento Matemático de la Extracción Discontinua por Solvente</i> .....	26
2.5.3.1	La Ley de Fick.....	26
2.4.3.2	Transferencia de Masa en las Partículas Sólidas.....	28
2.4.3.3	Transferen. Masa en las Partíc. Sólidas y el Disolvente de Extracción.....	31
2.4.3.4	Transferencia de Masa con Variación de la Temperatura de Extracción....	32
2.4.3.5	Transferencia de Masa con Degradación de Compuestos Activos.....	32
2.4.3.6	Transferen. Masa con Resistencia a la Transferen. de Masa Externa.....	33
2.4.3.7	Ley Modificada de Fick .....	35
2.4.3.8	Ley de Velocidad.....	36
2.4.3.9	Ecuaciones Empíricas.....	37
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1	Materiales.....	38
3.1.1	<i>Materia Prima</i> .....	39
3.1.2	<i>Materiales</i> .....	39
3.1.3	<i>Reactivos</i> .....	39
3.1.4	<i>Equipos y Maquinas</i> .....	39
3.2	Metodología.....	40
3.2.1	<i>Reconocimiento Taxonómico del Huito</i> .....	40
3.2.2	<i>Pre-tratamiento de los Frutos de Huito</i> .....	40
3.2.3	<i>Caracterización Física y Química del Fruto de G. americana</i> .....	46
3.2.3.1	Análisis Proximal de Fruto de Huito.....	46
3.2.4	<i>Estrategia para el diseño y construcción del prototipo de extracción por Percolación e Inundación</i> .....	46
3.2.4.1	Estrategia para el Modelamiento Matemático del Proceso Propuesto.....	46
3.2.4.2	Métodos para Análisis Físico-químico de Colorantes Naturales.....	47
3.2.4.3	<i>Aislamiento de pigmentos</i> .....	48

3.2.4.3.1	<i>Extracción Soxhlet</i> .....	48
3.2.4.4	<i>Percolación</i> .....	49
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>50</b>
4.1	Caracterización Físico – Química del Fruto de <i>G. americana</i> .....	50
4.2	Pre-tratamiento de la Muestra de <i>G. americana</i> .....	50
4.3	Curva Patrón para Análisis de Concentración de Colorante.....	52
4.4	Extracción por Inundación de los Colorantes de la <i>G. americana</i> .....	54
4.4.1	<i>Rendimiento de Colorante Extraído</i> .....	56
4.4.2	<i>Concentración de Colorante Extraído</i> .....	61
4.5	Extracción por Percolación del Colorante de la <i>G. americana</i> .....	68
4.5.1	<i>Establecimiento de la Relación Altura Columna – Tamaño Partícula</i> .....	68
4.5.2	<i>Rendimiento de Colorante Extraído por Percolación</i> .....	70
4.5.3	<i>Evaluación de Concentra. Colorante Durante la Extracción – Percolación</i> ..	76
4.6	Evaluación de la Solubilidad de los Extractos de Colorantes.....	78
4.7	Análisis por Cromatografía de Capa Delgada.....	79
4.8	Evaluación de la Solidez de los Colorantes de <i>G. americana</i> .....	80
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>82</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS</b> .....	<b>84</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>85</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>91</b>

## INDICE DE FIGURA

		PAG
Fig. 01	Arbusto y Fruto de la G. Americana.....	2
Fig. 02	Áreas de Distribución Natural del Árbol de G. Americana L.....	5
Fig. 03	Reac. Revers. y Apertura de Anillo Propuest para Genipina en Sln Acuosa...	8
Fig. 04	El Grupo Touyama Propone un Mec. de Reacción de la Genipina.....	8
Fig. 05	Mecanismo de Reticulación Intermolecular e Intramolecular .....	9
Fig. 06	Curva Típica de Extracción Discontinua con Solvente de Componentes Activos desde Matrices Sólidas de Plantas.....	21
Fig. 07	Diagrama Esquemática De Sistema De Extracción Convencional.....	21
Fig. 08	Recolección de frutos verdes de Huito.....	3
Fig. 09	Diagrama de flujo de la Preparación de muestra del fruto fresco de G. americana para el proceso de extracción del tinte.....	9
Fig.10	Diagrama de proceso de extracción de colorante del fruto de G. americana por el método de percolación.....	40
Fig. 11	Diagrama de proceso de extracción de colorante del G. americana por el método de inundación.....	40
Fig. 12	Partes constitutivas del G. americana.....	46
Fig. 13	Muestras de G. americana, antes y después del proceso de secado....	47
Fig. 14	Solución Patrón de Indigo Blue y determinación de curva patrón.....	48
Fig. 15	Curva de Calibración.....	48
Fig. 16	Colorante de G. americana obtenido y evaporación de los solventes.....	50
Fig. 17	Diagrama de Pareto de los Efectos estandarizados para el rendimiento de colorante de G. americana extraído por inundación.....	54
Fig. 18	Valores observados y residuales (Statística).....	55
Fig. 19	Superficie respuesta del efecto del pH, tº y tiempo de operación, razón ms:mm, tamaño partícula sobre el rendimiento en colorante extraído.....	56
Fig. 20	Superficie respuesta a las condic. Óptimas, máx. el % rendimiento.....	57
Fig. 21	Diagrama de Pareto de los Efectos estandarizados en la Concentració colorante de G. americana extraído por inundación.....	60
Fig. 22	Superficie respuesta del efecto de pH, tº y tiempo de operaciones en la Concentración de Colorante de G. americana Extraído.....	61
Fig. 23	Superficie respuesta del efecto de pH, concentración de EtOH , tº y tiempo de operaciones en la Concentración de Colorante Extraído.....	61
Fig. 24	Superficie respuesta de la temperatura y tiempo de operaciones, concentración de EtOH y en la Concentración de Colorante Extraído.....	61



Fig. 25	Efecto de Superficie respuesta de la temperatura y razon de operaciones, concentración de EtOH y en la Concentración de Colorante Extraído.....	62
Fig. 26	Superficie respuesta del efecto de $z_1, z_2, z_3, z_4$ y $z_5$ en la Concentración de Colorante de G. americana Extraído.....	62
Fig. 27	Superficie de contorno de las condiciones óptimas, maximizando la concentración de Colorante extraído de la G. americana.....	63
Fig. 28	Equipo para extracción por percolación y muestras extraídas de colorante de G. americana en periodos de tiempo definidos.....	64
Fig. 29	Gráfica 3-D, peso de muestra en relación a la altura de relleno y tamaño de partícula.....	65
Fig. 30	Pareto para la Extracción por Percolación del Colorante de G. americana	70
Fig. 31	Superficie respuesta del efecto - Rendimiento de Colorante de G. americana Extraído por Percolación.....	71
Fig. 32	Superficie respuesta a las condiciones óptimas, maximizando el % rendimiento.....	72
Fig. 33	Variación de la concentración del colorante de G. americana en tres repeticiones a las condiciones de operación: Flujo solvente, 4.5 mL/min, altura de relleno, 15 cm, pH solución, 6, concentración solución, 60 % EtOH y tamaño partícula, malla # 20.....	73
Fig. 34	Variación de la solubilidad del colorante de G. americana por efecto de diferentes solventes clasificados por su polaridad.....	74
Fig. 35	Desarrollo Cromatográfico de colorante G. americana.(Fase estacionaria, sílica gel, y fase móvil: EtOH: H <sub>2</sub> O: MeOH).....	75
Fig. 36	Desarrollo Cromatográfico de colorante G. americana con revelador Solución H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y visto a luz en Visible y UV.....	76
Fig. 37	Evaluación de las Solideces de los Colorantes en Soluciones Oxidantes. Antes y después del tratamiento.....	77
Fig. 38	Evaluación - Solidez de solución de color al efecto de Luz incandescente.	77
Fig. 39	Identificación Taxonómica Del Genipa americana.....	88
Fig. 40	Procedimiento para la Extracción de Colorante de Huito.....	90
Fig. 41	Módulos de Extracción por Inundación y Percolación.....	91
Fig. 42	Equipo Espectrofotómetro UV/Vis.....	92
Fig. 43	Extracción Soxhlet .....	92
Fig. 44	Teñido de muestra de algodón.....	92

## INDICE DE CUADROS

		PAG
Cuad. 01	Composición química y valor nutritivo de la Pulpa de <i>G. americana</i> .....	3
Cuad. 02	Información Sobre Genipósido.....	6
Cuad. 03	Información Sobre Genipina.....	7
Cuad. 04	Clasificación de Colorantes Naturales según Composición Química.....	14
Cuad. 05	Análisis proximal del fruto fresco de la <i>G. americana</i> L.....	45
Cuad. 06	Distribución de Cáscara, semilla y pulpa en el fruto de <i>G. americana</i> ....	46
Cuad. 07	Concentración y % Absorbancia solución Patrón.....	48
Cuad. 08	Coeficiente de determinación y Coeficiente de Ajuste del Modelo Matemático para Concentración Vs % Absorbancia.....	49
Cuad. 09	Análisis de Varianza para el Ajuste de Curva Patrón.....	49
Cuad. 10	Matriz de Resultados para la Extracción por Inundación.....	50
Cuad. 11	ANOVA para evaluar el rendimiento de la extracción de colorante de la <i>G. americana</i> por inundación (Diseño compuesto central).....	52
Cuad. 12	Coeficiente de Regresión Ajustado para Rendimiento de Color Extraído..	53
Cuad. 13	Condiciones Óptim. Establecidas - Rendimient de Extrac. de Colorante.	57
Cuad. 14	ANOVA evaluar la Concentración de la extrac de coloran - inundación..	58
Cuad. 15	Coeficiente de Regresión Ajustado para la Concentración de Colorante Extraído por Inundación.....	59
Cuad. 16	Condiciones Ópti. Establecidas para la Concentra. Colorante Extraído...	63
Cuad. 17	Coeficientes de Regresión para Relación Altura Relleno (cm), Tamaño Partícula (# malla) y Peso Muestra (g).....	65
Cuad. 18	Valores ANOVA Establecidas para relacionar Altura Relleno (cm), Tamaño Partícula (# malla) y Peso Muestra (g).....	66
Cuad. 19	Matriz de Resul. para Extracción por Percolación Diseño Comp. Central.	67
Cuad. 20	ANOVA para evaluar el rendimiento de la extracción de colorante de la <i>G. americana</i> por Percolación (Diseño compuesto central).....	68
Cuad. 21	Coeficiente de Regresión Ajustado para el Rendimiento de Colorante Extraído de <i>G. americana</i> por Percolación.....	69
Cuad. 22	Condiciones Óptim. para Rendim. de Extrac. de Coloran por Percolación	74
Cuad. 23	Análisis Estadíst. De Datos de variación de concentración en la extracción de colorante de <i>G. americana</i> por percolación.....	76
Cuad. 24	Determinación de Humedad del fruto de huito ( <i>Genipa americana</i> ).....	89
Cuad. 25	Pruebas de Solubilidad de los Colorantes Extraídos por Percolación.....	93
Cuad. 26	Pruebas de Solubilidad de Colorantes Extraídos por Inundación.....	94

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el potencial de la fruta de Huito como fuente de colorante azul natural, considerándose aspectos como la factibilidad de extracción con solvente, identificación del disolvente adecuado para la extracción de los pigmentos, evaluación del efecto del pH y la temperatura en la producción de tinte, y para estudiar la estabilidad de los pigmentos obtenidos por diferentes disolventes. Para obtener el medio de contraste para el experimento fue conducido tres niveles de disolvente (agua, solución acuosa de etanol al 50% y etanol al 95%); seis niveles de pH (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 y 9,0); cinco niveles de temperatura (35, 45, 55, 65 y 75 ° C), el total de 90 tratamientos. Los tintes fueron evaluados por colorimetría como la desviación de la norma índigo sintético azul, siendo considerados los mejores que mostraron menor desviación. Visualmente se observó si un color azul era más oscuro, tirando a negro, cuando se aumentó la temperatura sin que, sin embargo, desfigurara el color. Las mejores condiciones se obtuvieron a pH 4,0 a 75 ° C.

El mismo valor se consideró la temperatura óptima para disolventes de etanol, pero es genial para el agua fue de 55 ° C. Para las pruebas de estabilidad extracciones con disolventes de etanol (50% y 95%) se realizaron, al igual que los que tienen mayor extractor de potencia visual, produciendo extractos con mayor intensidad del color azul. La elección de los disolventes alcohólicos en lugar de agua también se basó en la viabilidad económica de la obtención de colorantes, ya que la eliminación de agua se convierte en mucho tiempo y Proceso caro. Las extracciones se llevaron a cabo en condiciones óptimas determinadas en ensayos de extracción en el Capítulo 1: pH 4,0 y 75 ° C. Los parámetros evaluados fueron pH, el oxígeno y la luz. Los extractos se añadieron solución tampón y anti-hongos, colocados en recipientes de vidrio cerrados, y se almacena. Las muestras se dividieron en dos tampones de diferente pH (4,0 y 6,0) y las muestras se dividen a su vez en otros dos grupos, uno de las muestras que simplemente se cerraron herméticamente y recibieron distinto del nitrógeno antes de ser sellado. Antes de almacenamiento era evaluar una nueva división del parámetro de la luz, donde un grupo se ha protegido de la luz directa y cualquier otro se expone a la luz UV. A una solución de etanol al 50%, las condiciones de tratamiento de pH 4,0 / oxígeno / oscuridad fue el que mostró un mejor mantenimiento de color y una mayor

saturación. Para el disolvente etanol se observó 95% en una menor estabilidad en tratamientos de pH más altos (6.0), con el menor rendimiento cuando pH 6,0 se asoció con la presencia de oxígeno y la luz. Se observó saturación del color en el frente, con el mejor rendimiento de los tratamientos a pH 6,0 y destacando las condiciones de pH 6,0 / oxígeno / oscuro. Con este trabajo se observó que jenipapo es un potencial para la obtención de fuente de colorante azul natural, que tiene varias variaciones de color que se pueden obtener cambiando las condiciones de extracción, y operados de acuerdo con la aplicación prevista. La obtención de colorante azul complementa la disponibilidad de los colores primarios en forma de tintes naturales, que permiten obtener la combinación de otros colorantes de alimentos.

## ABSTRACT

This study aims to evaluate the potential Huito fruit as a source of natural blue dye, considering aspects such as the feasibility of solvent extraction, identification of suitable solvent for extraction of the pigments, evaluation of the effect of pH and temperature in the production of dye, and to study the stability of the pigments obtained by different solvents. For the dye to the experiment it was conducted three levels of solvent (water, aqueous solution of 50% ethanol and 95% ethanol); six levels of pH (4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0 and 9.0); five levels of temperature (35, 45, 55, 65 and 75 ° C), the total of 90 treatments. The dyes were evaluated by colorimetry as the deviation of the standard synthetic indigo blue, the best showing minor deviation being considered. Visually was observed whether a blue color was darker, tending to black, when the temperature was increased without, however, disfigure the color. The best conditions were obtained at pH 4.0 at 75 ° C.

The same value for the optimum temperature was considered ethanol solvent, but great for the water was 55 ° C. For stability testing extractions with solvents of ethanol (50% and 95%) were performed, like those have greater visual power extractor producing extracts with greater intensity of blue color. The choice of alcoholic solvents instead of water also based on the economic viability of the production of dyes, since the elimination of water becomes long and expensive process. The extractions were carried out under optimum conditions determined in extraction tests in Chapter 1: pH 4.0 and 75 ° C. The parameters evaluated were pH, oxygen and light. The extracts buffer and anti-fungal, placed in closed glass jars were added, and stored. The samples were divided into two different buffers pH (4.0 and 6.0) and samples were subdivided into two groups, one of the samples were sealed and just received than nitrogen before sealing . Before storing a new division it was to assess the parameter of light, where a group has been protected from direct sunlight and any other exposed to UV light. To a solution of 50% ethanol, the treatment conditions of pH 4.0 / oxygen / darkness was showed better maintenance of color and higher saturation. For ethanol solvent was observed in 95% less stability in treatment higher pH (6.0), with the lowest performance when pH 6.0 was associated with the presence of oxygen and light. color saturation was observed in the front, with the best performance of the treatment at pH 6.0 and pH conditions emphasizing 6.0 / oxygen / dark. This work

is noted that jenipapo a potential source for obtaining natural blue dye, which has several color variations can be obtained by changing the extraction conditions, and operated in accordance with the intended application. Obtaining blue dye complements the availability of the primary colors in the form of natural dyes, allowing to obtain the combination of other food dyes.

## I. INTRODUCCIÓN

En los diferentes ámbitos de nuestras vidas, las fuentes bioactivas naturales están ganando interés, sobre todo por los beneficios en la salud, las preocupaciones ecológicas y seguridad (*Chemat F. y Strube J, 2015*). Los colorantes naturales, obtenidos de plantas, insectos animales y minerales, son productos renovables y sostenibles con mínimo impacto ambiental y conocidos desde la antigüedad por su uso, no sólo en la tinción de textiles (*Kadolph, 2008*), sino también como ingredientes alimentarios (*Dweck, 2002*) y cosméticos (*Frick, 2003*). Sin embargo, la aplicación de una serie de colorantes sintéticos tiene efectos perjudiciales sobre el medio ambiente y la salud a través de respuestas alérgicas perjudiciales, llegando a producir problemas cancerígenos. En medio de las crecientes preocupaciones ambientales y de salud, los colorantes naturales han resurgido como una opción viable, considerándose como un “químico verde” con el medio ambiente, más aún cuando utilizamos solventes como el agua o el alcohol, que son considerados como ambientalmente amigable (*Yusuf et al. 2011; Mirjalili et al. 2011*). En la actualidad los colorantes naturales vienen cobrando enorme importancia como insumo en el industria alimentaria, fundamentalmente porque en los últimos años se han descubierto que una gama de colorantes sintéticos presentan cierta toxicidad, especialmente aquellos productos con colores intensos y oscuros, incluso prohibiéndose su uso como insumo en la industria alimentaria en los países como Noruega y Suiza. Por otro lado, a los colorantes naturales también se les atribuye algunas propiedades farmacológicas y son fuente importante de sustancias antioxidantes y antimicrobianas, todo ello ha creado una mayor demanda en el mercado mundial, motivando la búsqueda de nuevas fuentes naturales, incentivo para la mejora de los procesos convencionales y exploración de nuevos procesos no convencionales ambientalmente amigables, que brinden mayor rendimiento y eficiencia en la extracción de colorantes naturales de fuentes vegetales como es el fruto de Huito. (*Roquero A., 2006*)

Así mismo, las industrias que producen colorantes sintéticos, cuestionan a los colorantes naturales por una limitada aplicación, debido sobre todo a factores como una reducida estabilidad a la luz, estabilidad a un rango restringida de pH y temperatura, y baja uniformidad de tonalidades entre diferentes lotes al comprarlos con los tintes sintéticos; ello motiva a la búsqueda de fuentes naturales de color azul, muy importante, que junto con el amarillo y rojo son considerados como colores primarios que permiten previa combinación la producción de diferentes tonalidades

de colores, requerimiento insatisfecho en la industria alimentaria. Por consiguiente, la tesis evaluará al fruto de Huito como fuente de colorante natural de color azul, para el cual se determinarán las condiciones más adecuadas de los procesos de extracción por percolación e inundación con solventes que permitan producir un colorante con mayor grado de estabilidad a la luz, pH y temperatura, así como comparar sus concentraciones con el Índigo - Blue con el fin de caracterizar cromofóricamente. Por otro lado se ha separado los componentes a través de cromatografía de capa fina.

Para absolver este problema, se estudió el efecto simple y combinado de parámetros como pH de la solución, temperatura de operación (°C), tiempo de operación (min), relación de masa de solvente a masa de muestra (g:g), tamaño de partícula (# malla) y concentración de la solución de etanol (%), altura de relleno (cm), flujo de solvente a través de lecho (ml/min). Para el cual se planteó como:

- **Objetivo General:**

- ✓ Evaluar la potencialidad del fruto de Huito (*Genipa americana*) como fuente de colorante natural a través de la determinación de la concentración de etanol, los parámetros operacionales más influyentes y el rango de valores de las mismas en los procesos de extracción por percolación e inundación, que permitan obtener un colorante que tenga una buena estabilidad a la luz visible, al pH y temperatura.

- **Objetivos Específicos:**

- ✓ Identificar botánicamente el Huito.
- ✓ Evaluar el efecto simple y combinados de las condiciones de extracción de colorante del fruto de *G. americana* por inundación y percolación con diferentes concentraciones de etano, razón de flujo de alimentación del solvente, temperatura de operación, altura de relleno y tamaño de partícula; que permitan obtener un colorante que tenga una buena estabilidad a la luz visible, al pH y temperatura.
- ✓ Identificar a los componentes cromóforos encargados de brindar la coloración característica a los colorantes obtenidos del fruto de Huito (*Genipaamericana*).



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES

Referente a la identificación y caracterización de colorantes naturales de origen Amazónico, principalmente del Huito se tiene muy poca información científica, trabajos realizados por *Renhe I. R.T. et al., 2009*, extrajeron el colorante azul del Huito, así como se evaluaron la estabilidad, estableciéndose que el fruto verde triturada con agua, etanol al 95% y pH 4 a 75 °C de temperatura, son las condiciones más adecuadas con el cual se logra mayor estabilidad y una coloración parecida al Azul de Añil.

*SHIRLEY TENESACA C.*, desarrolló un estudio en el cual se propuso como hipótesis que el extracto de los frutos verdes de *Genipa americana L.* puede ser utilizado como colorante para la formulación de cosméticos decorativos, con el fin de darle un valor agregado a esta especie que crece en los bosques de la Amazonía. La fruta del árbol es utilizada para extraer colorante natural azul y negro. Puede ser utilizado potencialmente en la industria cosmética y en la alimenticia. Entre sus objetivos fue purificar el compuesto colorante, Genipósido, de los frutos de *Genipa americana L.* para realizar un análisis de eficiencia en extracción. Las variables de estudio fueron la condición de concentración y pH del solvente (etanol), la temperatura y la relación sólido-solvente; se escogieron estos parámetros con el fin de optimizar la extracción ya que se conoce que los colorantes naturales tienden a ser más caros que los sintéticos por las características tanto del proceso de obtención como por su concentración en la materia prima, esta última consideración no es preocupante ya que se ha reportado que la cantidad de Genipina es del 4-6% del fruto seco.

Por otro lado, en la UNAMAD, *Quispe Herrera, R., et al, 2012*, estudiaron la extracción y caracterización físico química del colorante de Huito (*Genipa americana L*) en el distrito de Tambopata, donde los extractos crudos obtenidos de muestras del fruto desengrasadas con bencina, por el método de percolación con muestras hidroalcohólicas del 90% y 70%, y por solubilidad en agua.

Según el Comité del CODEX Alimentarius, este colorante natural, que va desde el azul al negro, tiene muy buenas características de estabilidad frente a pH, temperatura y luz: ofrece una excelente alternativa a la industria frente a colorantes sintéticos, sin embargo, actualmente Perú exporta pequeñas cantidades como "extracto vegetal", en razón que no cuenta con una aprobación como aditivo por el

Codex Alimentarius, lo cual ampliaría considerablemente su demanda, que a su vez beneficiaría a las comunidades amazónicas dedicadas al cultivo.

La Conferencia sobre Comercio y Desarrollo de las Naciones Unidas (UNCTAD, 2005) ha elaborado un perfil de mercado del huitito para la Unión Europea, por ser un producto con potencial económico y biosostenible para la región amazónica, para su uso en la industria de alimentos y cosmética.

## **2.2 HUITO (*Genipa americana*)**

El huitito es un arbusto que pertenece a la familia de las rubiaceae, cuya clasificación taxonómica se indica en el siguiente ítem 1.1.1. Es una especie nativa bastante común en la región amazónica, Perú, Brasil, Venezuela y Colombia en la mayor parte de la cuenca de las Amazonas, los árboles florecen de mayo a septiembre y dan frutos entre septiembre y abril. Los frutos tardan hasta un año para madurar (*Mielke M.S. et al., 2003; Lorenzi, 1998*).

La *Genipa americana* (*G.americana*) es un árbol de tamaño pequeño a mediano, de 8 a 20 m de altura, sin embargo se encuentran especímenes de hasta 30 metros de altura. El diámetro del tronco es de 30 a 80 cm y tiene una corteza gruesa y suave. Cuenta con una copa densa y las ramas más bajas crecen más o menos en forma horizontal, con 10 a 35 hojas en los extremos. En la mayoría de los árboles, las abejas polinizan las flores. Su fruto es grande, tipo baya con alta tasa de germinación (*Tenesaca, S. 2011*).

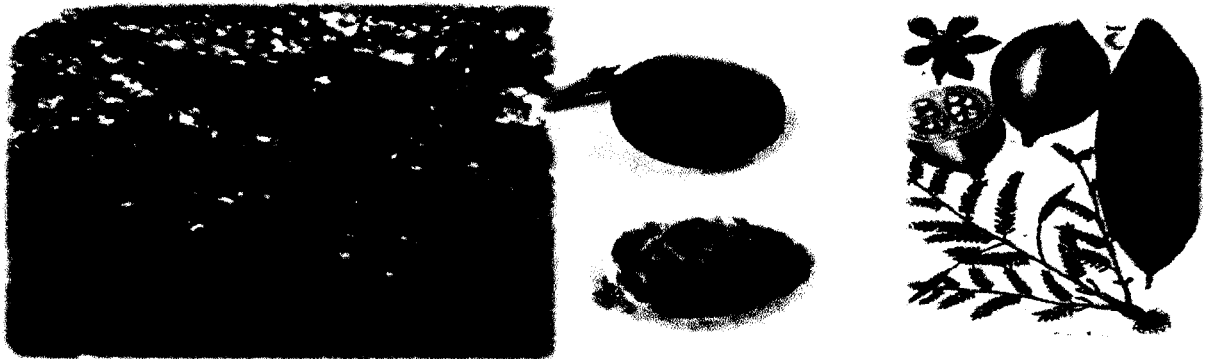
### **2.2.1 TAXONOMÍA**

Según Mielke M. S. et al., (2003), la división taxonómica del Huitito, es:

REINO Plantae  
 SUBREINO Tracheobionta  
 DIVISION Magnoliophyta  
 CLASE Magnoliopsida  
 SUBCLASE Asteridae  
 ORDEN Gentianales  
 FAMILIA Rubiaceae  
 GENERO *Genipa*  
 ESPECIES *Genipa americana* L.

Nombres comunes: Huito, yaguayagua (Perú); jenipapo, jenipapeiro (Brasil); bigrande (Bolivia); jagua (Colombia y Ecuador); caruto; xagua (Venezuela), genipap (inglés).

El árbol de Huito, tiene importancia ecológica para la repoblación de animales de la fauna amazónica, siendo muy útil para la siembra en las zonas pantanosas deterioradas, creciendo con mayor facilidad en los climas cálidos. Debido a las características de adaptación en entornos de riberas se utilizan en la recuperación de áreas degradadas. (Mielke M. S. et al., 2003; Lorenzi, 1998).



**Figura 01:** Arbusto y Fruto del Huito (*G. Americana*)

*Fuente:* (Mielke M. S. et al., 2003; Lorenzi, 1998).

### **2.2.2 Caracterización Física y Química del Fruto de *G. americana***

En la Amazonía peruana, se conoce como Huito, en Brasil como Jenipapo y en las Guayanas Francesas como Genipa, en Panamá como Guayatil, en Argentina como Jagua (Sandri, 1998). El fruto de Huito, cuando está verde es astringente. Contiene una buena cantidad de azúcar y acidez pronunciada, que varían con el tipo y dependiendo del clima y el suelo. Su corteza es suave y de color amarillo-marrón arrugada, de color marrón, oscuro o verdoso. La pulpa es vinosa aromático, suave e implica numerosas semillas duras y de consistencia fibrosa (Xavier X., 1976; Sandri, 1998; Epstein, 2001). Los colorantes de Huito, se obtienen de frutos verdes, y de ellas emanan un jugo verde color azulado; después de su maduran, estos frutos se pueden aprovechar como dulces. El jugo fermentado se convierte en vino y licores (Lorenzi, 1998).

El fruto de Huito, se caracteriza por el sabor ácido y aroma afrutado. Borges y Rao (2000) detectaron los principales ácidos, como el octanoico (34,1%) 2-metilbutírico (9,1%), hexanoico (18,2%) y 2-metil-éster 2-(E)-butenoato de metilo (4,1%), octanoato (3,2%) y 2-propilfurano (2,5%) y ácidos butírico, ácido 2-metilbutírico y

hexanoico responsable de las notas amargas y el sabor a fruta característico se atribuyó a la presencia del éster de 2 - y 3-metilbutirato de etilo.

La pulpa en el fruto es una cantidad considerable en comparación a otros, siendo la relación corteza: fruto 12,05%, 47,81% y 40,61%. La pulpa de Huito tiene baja acidez, alto contenido de humedad, bajo porcentaje de proteínas y lípidos, alto contenido de azúcar, contenido de hierro normal, buena tasa de calcio y fósforo, alto contenido de taninos, y sólo trazas de vitamina C y la pectina.

**Cuadro 01:** Composición Química y Valor Nutritivo en 100 gr de a Pulpa de Huito (*G. Americana L.*)

Característica	100 g Pulpa
Energía	550 – 113.0 cal
Agua	77.06 – 83.9 g
Proteínas	1.20 – 1.26 g
Lípidos	0.10 – 0.20 g
Carbohidratos	14.00 – 25.70 g
Fibra	1.60 – 11.80 g
Ceniza	0.55 – 0.80 g
Calcio	69.0 mg
Fosforo	21.0 mg
Hierro	0.5 mg
Vitamina A (Retinol)	30.0 mg
Tiamina	0.30 – 0.63 mg
Riboflavina	0.33 mg
Niacina	0.50 – 0.54 mg
Vitamina C (A. ascorbico)	1.10 mg
<b>Otras características de la pulpa</b>	
Ph	3.5
Solidos totales	22.94
Acidez Titulables	0.16
Brix	14.20
<b>Azucares reductores</b>	
Maltosa	4.63 mg
Levulosa	3.35 mg
Glucosa	3.09 mg

*Fuente:* (Tenesaca, S. 2011).

Renhe I. R .T (2008) evaluaron las características físicas y químicas de la *G.americana* en diversas etapas de maduración. El contenido de proteína que se encuentra en la pulpa de la fruta verde fue más alto que los encontrados para la fruta madura, probablemente debido a las diferencias en el grado de reorganización de los sistemas celulares en el período climatérico. En contenido de almidón disminuyó

a medida que la fruta madura, probablemente debido a que muchos hidratos de carbono solubles, junto con el almidón, se metabolizan completamente con la maduración de la fruta. La pulpa de la fruta verde tiene cantidades mayores de calcio y fósforo, mientras madurastienen más alto contenido en hierro.

La composición química y el valor nutritivo de la pulpa del huito se indican en el Cuadro 01. El fruto contiene genipina, manitol, taninos, metilésteres, cateína, hidantoina y ácidos tánicos; la genipina en combinación con proteínas y aminoácidos, es responsable de la coloración negra en los tintes que produce.

### **2.2.3 Uso Común y Tradicional de las Especies**

Referencias etnobotánicas y etnofarmacológicas, manifiestan que el Huito tiene un uso medicinal y en la tintura de fibras textiles, así mismo en algunos lugares, se considera un afrodisíaco. Su pulpa se utiliza contra la ictericia, enfermedades del estómago, el bazo y el hígado. Hay referencias a la goma extraída de la *G. americana* tiene propiedades antigonorreicas. El té de la raíz se utiliza como purgante, las semillas trituradas como emético, las hojas de té como antidiarreico, la fruta verde se ralla para los asmáticos, y el zumo de la fruta madura es tónico estomacal y diurético (Epstein, 2001; Gottlieb y Mors, 1980).

En la nutrición humana, la fruta es el comestible natural y empleado en la preparación de mermelada, fruta confitadas, refrescos, zumo, pulpa, jarabe, licor, vino, alcohol, vinagre y el brandy. Ya en la industria de la madera, de madera blanca (marfil) es suave y elástico, flexible, se parte fácilmente, da la bienvenida a la laca y tiene larga duración. Se utiliza en la construcción naval y la construcción, en carpintería de lujo en grabados en madera, entre otros.

### **2.2.4 Vida Útil del Fruto de *G. americana***

Al igual que la mayoría de los frutos tropicales, el Huito es altamente perecible, y se deteriora en pocos días, un hecho que complica su comercialización, incrementando pérdidas. Se planteó por lo tanto, un sistema de deshidratación osmótica como un proceso que contribuya a conservar el producto así como de las características sensoriales de los mismos.

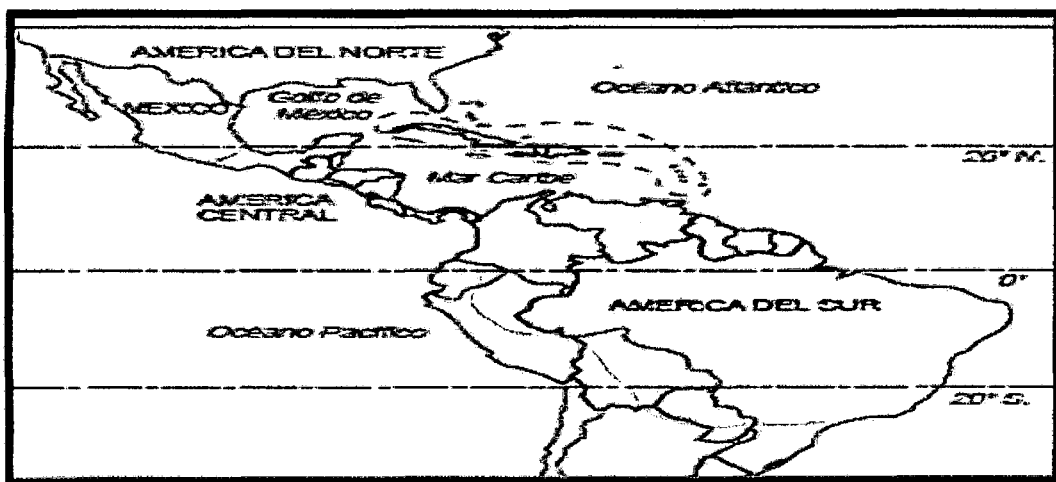
Las frutas pueden conservarse en refrigeración entre 10–15°C y se pueden mantener hasta 15 días, tiempo límite para su inmediato procesamiento.

Temperaturas inferiores a 10°C, ocasionan ennegrecimiento del fruto, por quemado del epicarpo (Attokaran M., (2011)).

Una evaluación de los diferentes métodos de conservación de néctares de Huito, emplean bajas temperaturas (congelación), alta temperatura (100 °C durante 15 minutos) y aditivos (benzoato de sodio y metabisulfito de sodio) química, la conservación a baja temperatura mostró mejor estabilidad durante 150 días de almacenamiento. Néctares que se han conservado con aditivos térmicos y químicos mostraron oscurecimiento gradual en comparación con los mismos productos conservados por congelación. Basándose en los resultados de los análisis microbiológicos, todos los métodos aplicados fueron eficaces. El néctar conservado por congelación reveló un mayor grado de aceptabilidad por parte de los panelistas, aunque, estadísticamente al nivel del 1% de significación, se detectó ninguna diferencia significativa entre los valores asignados al color y el sabor de diferentes tipos de tratamientos administrados a néctares (Francis K., 1993).

### 2.2.5 Área de Distribución Natural y de Naturalización

El árbol de Jagua se originó probablemente en la Cuenca Amazónica y fue esparcido a través de los Trópicos Americanos por los seres humanos en tiempos pre-históricos. Los límites originales de su distribución se desconocen. Hoy en día, los árboles de jagua crecen naturalmente a lo largo de ambas costas en México un poco al norte del Istmo de Tehuantepec y del istmo a través de la América Central y a través del norte de la América del Sur hasta Paraguay y el norte de Argentina (Fig. 02). Esta especie también se puede encontrar en las Antillas Mayores (a excepción de Jamaica) y en muchas de las islas de las Antillas Menores.



**Figura 02:** Áreas de Distribución Natural del Árbol Huito

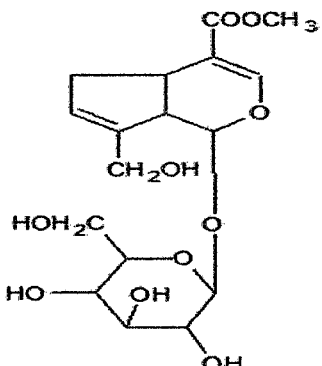
*Fuente:* Francis K. 1993

## 2.3 Descripción de Genipósido y Genipina

### 2.3.1 Propiedades Fisicoquímicas de Genipósido y Genipina

El Genipósido es un iridoide glicosilado que mediante hidrólisis con  $\beta$ -glucosidasa se descompone en Genipina y D-glucosa. La estructura de la Genipina fue descubierta en 1960 por Djerassi y col. a partir de la fruta madura de *Genipa americana* L. esta sustancia es responsable de la coloración azul violeta que se observa al reaccionar espontáneamente con aminoácidos, en general con aminas primarias. Existen amplios estudios sobre las propiedades antiangiogénico, antiinflamatoria y antioxidante de este iridoide, además se lo considera un potente reticulante no tóxico de proteínas, cuya aplicación inmediata es la elaboración de un biopolímero para sistemas de liberación controlada de fármacos. El LD50 i.v., i. p., y p.o. del Genipósido en ratones es de 3g/Kg, mientras que el LD50 de la genipina en ratones es de 190 mg/Kg i. p. y 237 mg/Kg p.o. La Genipina constituye el 4-6% en peso de fruto seco, presenta absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a una longitud de onda de 240 nm al igual que el Genipósido (Shirley M. Tenesaca 2012).

**Cuadro 02:** Información Sobre Genipósido

GENIPOSIDO	
	
Nombre UIPAC	Methyl 7-(hydroxymethyl)- 1-[3,4,4-trihydroxy-6-(hydroxymeyhyl)oxan-2-y1]oxy-1,4a,5,7a-tetrahydrocyclopenta [c] pyran-4-carboxylate
InChI:	InChI=1S/C17H24O10/cl-24-15(23)9-6-25-16(11-7(4-18)2-3-8(9)11)27-17-14(22)13(21)12(20)10(5-19)26-17/h2,6,8,10-14.16-22H,3-5H2,1H3
Peso Molecular	388.36646 [g/mol]
Formula	$C_{17}H_{24}O_{10}$

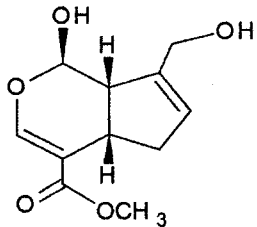
**Fuente:** UENG, T. et al 1997; DJERASSI et al, 1960

### 2.3.2 Estabilidad Acuosa de la Genipina

La degradación de la genipina en solución acuosa consiste con un mecanismo de reacción de primer orden, con un primer paso reversible; en esta reacción la genipina se convierte en un intermediario hipotético, el cual puede reformarla, o ser degradado a un segundo producto de manera irreversible (Shirley M. Tenesaca 2012).

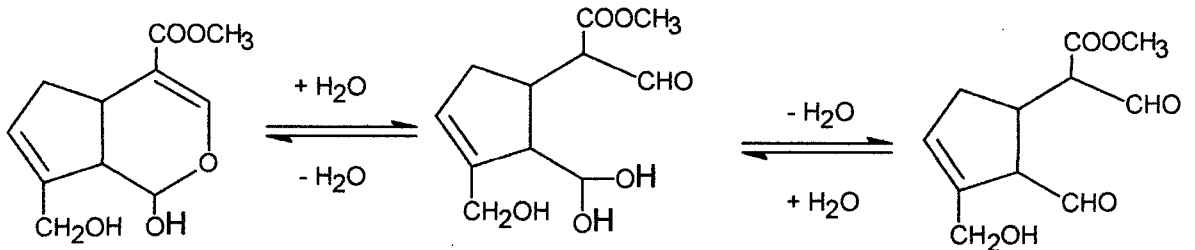
El pH de la solución influye drásticamente en la degradación de la genipina, es rápida bajo condiciones tanto alcalinas como ácidas, mientras que a pH 4-7 la molécula se mantiene inmutable por más tiempo. La degradación procede muy probablemente a través de la apertura del anillo reversible dihidropirano por agua seguida por la polimerización irreversible del intermedio (Fig.03).

**Cuadro 03:** Información Sobre Genipina

 <b>GENIPINA</b>	
Nombre IUPAC	(1R,2R,6S)-2-Hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo [4.3.0] nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metilo.
Otros nombres	Ester metilo de acidilicoo 1.4a-rboxalfa,5,7a-alfa-tetrahidro-1-hidroxi-7-(hidroximetil)-ciclopenta(c)pirano-4-carboxilico
<b>Identificadores</b>	
Numero CAS	6902-77-8
PubChem	442424
InChI	InChI=1/C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> /c1-15-10(13)8-5-16-11(14)9-6(4-12)2-3-7(8)9/h2,5,7,9,11-12,14H,3-4H2,1H3/t7-9-11-m/s1
<b>Propiedades</b>	
Formula molecular	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
Masa molar	226.226 g/mol
Apariencia	Cristales incoloros
Punto de Fusión	120-121 °C
Solubilidad en agua	Soluble
Solubilidades	Soluble en metanol, etanol y éterdietílico
Toxicidades	Baja toxicidad, (En ratón) LD50 i.p. 153mg/kg y LD50 p.o. 237mg/kg
Longitud de onda de absorción	La genipina absorbe en el ultravioleta a una longitud de onda de 240 nm

**Fuente:** UENG, T. et al 1997



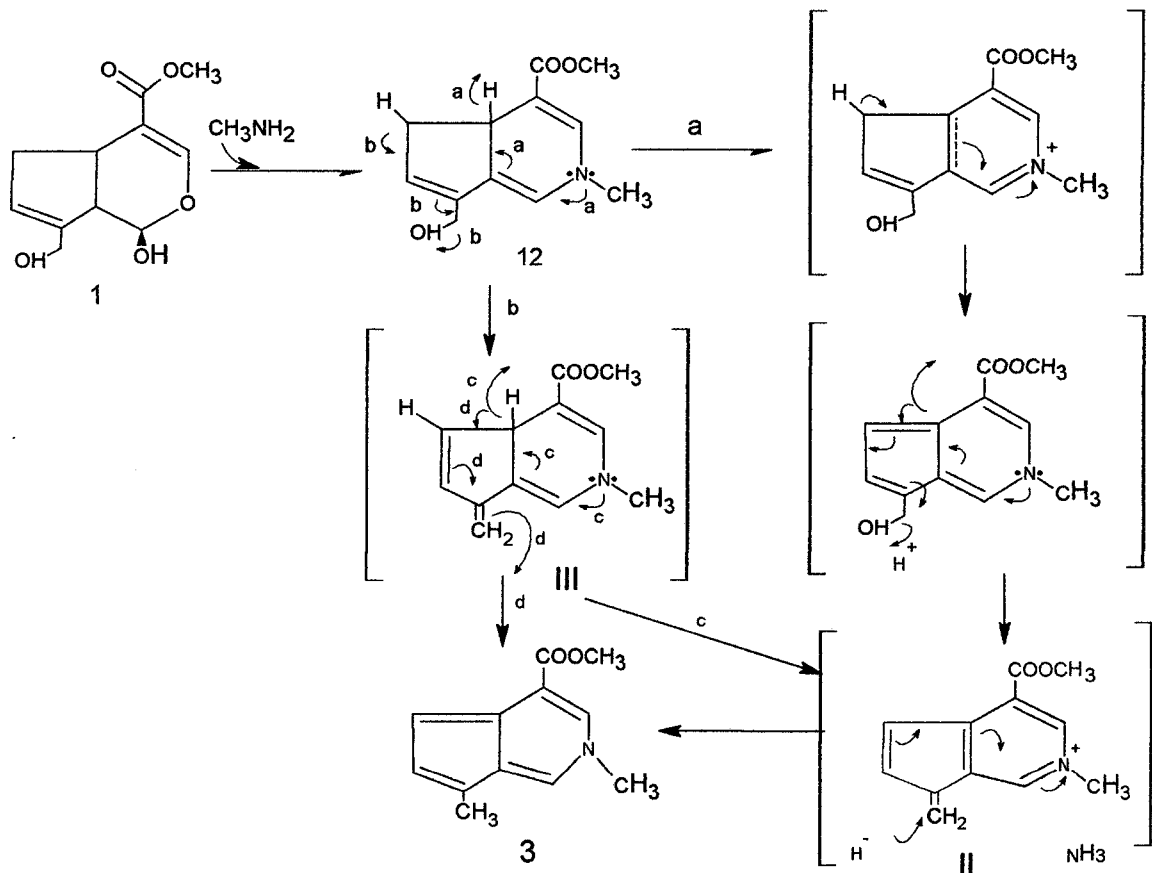


**Figura 03:** Reacciones Reversible y de Apertura de Anillo Propuestas para la Genipina en Solución Acuosa

*Fuente:* SLUSAREWICZ, P. et al. 2010

### 2.3.3 Mecanismo de Reacción de la Genipina con un Grupo Amino Primario

El grupo Touyama propuso un mecanismo para la reacción de genipina con metilamina. Su grupo prevé que la reacción se produjo a través de un ataque nucleofílico de la amina primaria en el carbono 3 de la genipina. Esta reacción se muestra en la Figura 03. Por otro lado la reacción de genipina con las proteínas de la piel como el colágeno se ilustra en la Figura 03 (Shirley M. Tenesaca 2012).



**Figura 04:** El Grupo Touyama Propone un Mecanismo de Reacción de la Genipina con Metilamina.

*Fuente:* TOUYAMA, R. et al. 1994

### 2.3.4 Formación del Pigmento Azul por Reacción de Genipina con un grupo Amino Primario

La formación del pigmento azul por reacción de Genipina con un grupo amino primario es óptimo a pH 7, el estudio de la absorbancia de una mezcla de Genipinay aminoácidos en el espectro ultravioleta-visible demuestra que la  $\lambda_{\text{max}}$  a 240 nm perteneciente a la Genipina desaparece, mientras que aparece una nueva  $\lambda_{\text{max}}$  a 290 nm que corresponde a un intermediario, y finalmente se establece una  $\lambda_{\text{max}}$  entre 570 – 600 nm generado por el polímero pigmento azul formado. Este pigmento es más estable en solución alcalina (pH 9) que en solución neutra (pH 7) o ácida (pH 5) y se mantiene estable después de permanecer 10 horas a temperaturas de entre 60 – 90°C (Shirley M. Tenesaca2012).

## 2.4 Colorantes Naturales

Los colorantes naturales son sustancias químicas que tienen la propiedad de transferir color a las fibras, principalmente provienen de plantas superiores como algas y hongos, líquenes; de algunos insectos, así como de algunos organismos marinos invertebrados (Attokaran M., 2011; Ojeda, A., 2012). Se caracterizan por tener grupos que dan color, llamados *cromóforos*. Los colorantes naturales requieren de la presencia de grupos *auxóchromos* mordientes que le otorgan afinidad con las fibras a teñirse. Algunos ejemplos de grupos cromóforos son, el carbonilo, azo, etileno y nitroso. Dentro de los grupos auxóchromos se encuentran el hidroxilo, amino, carboxílico, sulfuro y sulfónico (Dos Santos &Maier, 2008). Así mismo, los tintes naturales son en su mayoría no-sustantivas y su aplicación para teñido de textiles, deben de tener ayuda de mordientes, por lo general una sal metálica, con afinidad tanto con el colorante y la fibra. Los iones de metales de transición por lo general tienen un fuerte poder de coordinación capaz de formar atracción a través de fuerzas de interacción y por lo tanto puede actuar como material de relleno para crear sustentividad de los colorantes naturales cuando se impregna un material textil con dicha sal metálica (es decir, mordentado) sometiendo luego a teñido con diferentes colorantes naturales (AkçakocaKumbasar E. P., 2011).

Desde el punto de vista termodinámico y su aplicabilidad en la tinción de alimentos, los pigmentos deben de ser solubles en agua. La solubilidad es la diferencia fundamental entre colorante y pigmento. Para su aplicación tienen que ser dispersados en un vehículo líquido. Estos colorantes naturales existe en la

naturaleza, no hay que realizar ninguna síntesis ni procesos químicos para su obtención.

La materia coloreada se extrae por operaciones físicas como: secado, molienda, ebullición, evaporación, tamizado, etc.

Orgánicos de origen animal

- ❖ Cochinilla
- ❖ Purpura

Orgánicos de origen vegetal

- ❖ Índigo
- ❖ Palo Campeche
- ❖ Nogal
- ❖ Eucalipto
- ❖ Maíz morado
- ❖ Molle
- ❖ Muña
- ❖ Tara

Inorgánicos de origen mineral

- ❖ Cinabrio
- ❖ Plomo
- ❖ Cobalto

#### **2.4.1 Clasificación de los Colorantes Naturales**

Los colorantes se clasifican de dos modos distintos (Pedraza, 2011):

- ❖ La tintórea que los agrupa según su comportamiento frente a las fibras en colorantes ácidos, básicos, sustantivos a la tina, de complejo metálico y sobre mordiente, de dispersión y reactivos.
- ❖ La química los agrupa en: tetrapirroles, cartenoides, flavonoides, antocianinas, quinonas, derivados indigoides, índoles y pirimidias sustituidas.

##### **2.4.1.1 Flavonoideos**

El resto de los flavonoides no-antocianínicos, se caracterizan por su color amarillo, como se desprende de la etimología del nombre (del Latínflavus: amarillo). Los flavonoides en general se caracterizan por ser polifenoles solubles en agua,

algunos con una estructura de glucósidos (azúcares) y otros de polímeros naturales (Ojeda 2012).

A estos últimos pertenecen los taninos condensados, polímeros naturales formados por monómeros de antocianidina, presentes en semillas y tejidos vegetativos de ciertas forrajeras. Otro grupo de flavonoides importantes son las flavonas, colorantes amarillos presentes en pétalos de flores como la primula, o en la piel de frutos como las uvas, responsables del color amarillento de los vinos blancos.

Finalmente están las flavononas, presentes en altas concentraciones de los zumos de cítricos (naranja, mandarina y pomelo). Hasta hoy se conocen más de 9000 flavonoides y quedan más por identificar y aislar. (Ojeda 2012).

#### **2.4.1.2 Carotenoides**

Los carotenoides son estructuras isoprenoides, presentes en colorantes y pigmentos naturales en plantas superiores, algas, hongos y bacterias. La estructura química básica de estos compuestos poseen dobles enlaces insaturados y la mayoría son tetra-terpenos con 40 átomos de carbono. A los carotenoides que poseen átomos de oxígeno en sus moléculas se los conoce como xantofilas. Los restantes constituyen el grupo de los carotenos. Los colorantes y pigmentos de este grupo presentan una paleta de colores que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro. Ejemplos de ello son el licopeno (color rojo del tomate y la sandía) y el beta caroteno (color anaranjado de la zanahoria) (Ojeda 2012).

#### **2.4.1.3 Colorantes tipo Quinona**

Son dos grupos los colorantes naturales, de este tipo, siendo:

##### **2.4.1.4 Derivados de Indol**

Color azul proveniente del añil.

##### **2.4.1.5 Derivados de Delfinidina**

Color azul proveniente de la hierba de pollo.

##### **2.4.1.6 Derivados de Dihidropilano**

Color rojo y violeta proveniente del palo de Brasil.

#### **2.4.1.7 Grupo Betaleína**

Color rojo proveniente del Betabel. Las betalaínas son colorantes naturales constituidos por aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles con estructura de glucósidos y que se han clasificado en dos grupos importantes: las betacianinas y las betaxantinas.

Las betacianinas son unos cincuenta colorantes naturales identificados de color rojo o violeta que se encuentran en plantas como la remolacha (*Beta vulgaris*) y frutos de la tuna (*Opuntia sp*) y en algunos basidiomicetos. Tienen una absorción máxima en el espectro visible entre 534 y 552 nm. Las betaxantinas en cambio, cuentan con un grupo de casi 25 componentes de color amarillo encontradas en algunas variedades de hongos venenosos (*amanita muscaria*), y en las bayas de los cactus pitaya (*Hylocereus*). Tienen una absorción máxima en el espectro visible entre 260 y 320 nm.

#### **2.4.1.8 Grupo Xantonas**

Color amarillo proveniente de algunos líquenes.

#### **2.4.1.9 Grupo Tanino-Pirogallo y Catecol**

Color café proveniente del castaño. Los taninos son colorantes naturales extraídos de plantas superiores. Son compuestos fenólicos coloreados en una gama que va desde colores amarillos hasta el castaño oscuro. Los taninos tienen olor característico, sabor amargo y son muy astringentes. Se agrupan en: taninos hidrolizables y taninos condensados (vistos anteriormente en el grupo de Flavonoides). Los taninos hidrolizables son colorantes polímeros heterogéneos formados por fenoles y azúcares simples. Son más pequeños que los taninos condensados y se hidrolizan sin dificultad en medio ácido. El PM oscila entre los 600 y 3000.

Las plantas más empleadas para la obtención de taninos son: robles (*Quercusrobur*), castaños (*Castanea sativa*), paquió (*Hymenaeacourbaril*), verdolaga (*Terminalia amazonia*), quebracho colorado chaqueño (*Schinopsisbalansae*), entre mucho más. *ShirataYoshiko, (1996)*.

### 2.4.1.10 Grupo Clorofila

Color verde proveniente de las plantas verdes. Los compuestos clorofílicos constan de una porfirina que lleva incorporado un átomo de magnesio en el centro del núcleo tetrapirrólico. Son los pigmentos más abundantes en la naturaleza. Se encuentran en los cloroplastos de las células vegetales, orgánulos exclusivos de las plantas donde se lleva a cabo la fotosíntesis y se conocen dos tipos importantes: clorofila A y clorofila B, que son las responsables del color verde de las plantas. La clorofila A representa de manera aproximada, 75% de toda la clorofila de las plantas verdes, pero también se encuentra en las algas verde-azuladas.

La clorofila B es un pigmento que acompaña a la clorofila A. Absorbe luz de una longitud de onda diferente (más baja) y transfiere la energía a la clorofila A, que se encarga de convertirla en energía química.

**Cuadro 04:** Clasificación de Colorantes Naturales según Composición Química

Naturaleza Química	Ejemplo	Color Predominante
Tetrapirroleo	Ficobilinas Clorofila	Azul – verde Verde
Carotenoides	Caroteindes	Amarillo – naranja
Favonoides	Favonas Favonoides Chalconas Auronas Antocianinas	Blanco – crema Amarillo – blanco Amarillo Amarillo Rojo – Azul
Xantonas	Xantonas	Amarillo
Quinonas	Naftoquinonas	Rojo – Azul – Verde
Derivados indigoides e Indoles	Indigo Betalainas	Azul – Rosado Amarillo – Rojo
Pirimidinas Sustituidas	Pterinas Flavinas Fenoxanizinas Fenazinas	Blanco – Amarillo Amarillo Amarillo – Rojo Amarillo – Púrpura

**Fuente:** Susan J. Trujillo H. y Wendy M. Lopez R. (2010).

Otros tipos de clorofila como: C1, C2 y D, se hallan en algas y bacterias.

Los pigmentos clorofílicos son insolubles en agua, pero sí en solventes orgánicos como el alcohol etílico y la acetona (solventes extractivos) y en tetracloruro de carbono y éter de petróleo (solventes separadores) (ShirataYoshiko, 1996).

En el cuadro 03, se observan los grupos principales, color y procedencia de los colorantes naturales.

#### **2.4.2 Fuentes de Obtención de Colorantes Naturales**

Las fuentes naturales de obtención de colorantes, son principalmente las plantas superiores, también las algas, hongos y líquenes en el reino vegetal y ciertos tipos de insectos y algunos organismos marinos invertebrados dentro del reino animal.

Es importante tener conciencia de la función de los colorantes y pigmentos en la naturaleza. La gran diversidad de pigmentos cumple funciones específicas dentro de ella incluyendo a los animales superiores (como el ser humano), ya que algunos pueden actuar como inhibidores para la germinación de semillas u hormonas para el crecimiento, o como sustancias tóxicas para defensa o para guiar a los insectos a las flores para realizar la polinización o como factor de atracción entre géneros para la reproducción, etc. (Draelos. Z., 2010).

#### **2.4.3 Métodos de Extracción de Colorantes Naturales**

Cuando se ha seleccionado una fuente de colorante natural, el siguiente paso es aislar el mismo del resto de la estructura de la planta o animal que lo contiene. A este proceso se lo denomina extracción. El método a emplear para extraer un determinado pigmento o colorante, va a estar condicionado por una serie de factores que hace que cada extracción sea un proceso particular y específico para cada organismo portador y para cada tipo de material a extraer.

Lo que sí se puede establecer de entrada, es que algunos métodos de extracción resultan simples con un producto casi puro como es el caso de la extracción del pigmento antocianina del repollo morado, mientras que otros resultan más complejos, donde el producto a extraer aparece mezclado con otras sustancias, lo que obliga a realizar la extracción en varias etapas con procesos de separaciones posteriores. Como ejemplo tenemos la extracción de clorofila de plantas como la espinaca (*Spinaciaoleracea*) (Draelos Z., 2010).

Hay dos formas de realizar la extracción: la extracción artesanal y la extracción industrial. Esta última tiene nuevos aportes tecnológicos. Todos los casos anteriores serán vistos nuevamente en las siguientes secciones, cuando nos adentremos en el tema de fuentes de obtención y métodos de extracción de colorantes naturales.

#### **2.4.4 Métodos de Aplicación de Colorantes Naturales**

Estos son los pasos que se atraviesan al aplicar colorantes naturales sobre fibras textiles, en cualquier estado de transformación que ellas se encuentren:

- Selección o identificación de las fibras presentes.
- Preparación o pretratamiento del material textil.
- Proceso de teñido o tintura del material y/o.
- Proceso de estampación, si corresponde hacerlo.
- Fijación del colorante aplicado en etapas anteriores.

La selección de las fibras es factible cuando se empieza el proceso desde cero, es decir, cuando aún no se dispone del textil que se va a colorear, entonces se selecciona en función de las necesidades o de las posibilidades, cuál será la fibra o fibras que mejor se adaptan a las características buscadas. En el caso que se tenga un material textil ya elaborado, por ejemplo una prenda o una tela, se deberá comprobar que fibras contiene, ya que no todas las fibras son teñidas con los mismos colorantes, ni dan el mismo color con un determinado colorante.

Cuando ya conocemos las fibras que vamos a colorear, el siguiente paso es proceder a su limpieza y preparación para recibir el colorante lo más hidrófila posible, ya que ese será uno de los factores que influyen en el rendimiento (intensidad) del color final. (*Draelos Z., 2010*).

La operación que se realiza para la preparación de las fibras para el teñido o estampado recibe el nombre de pretratamiento, que ha sido tratada en detalle en las páginas del ennoblecimiento. Se describen los Métodos de Pretratamiento de Fibras Vegetales, y los Métodos de Pretratamiento de Fibras Animales en forma pormenorizada.

Además de los métodos descritos, en muchas comunidades de artesanos americanos para preparar las fibras las lavan con los frutos, hojas y raíces machacadas de plantas como la azucena, el nardo o la tuberosa, que desempeñan la función de jabones y detergentes.



Una vez que el material está listo para ser teñido, se seleccionan los colorantes y los métodos más adecuados de aplicación. Estos incluyen tanto los métodos de aplicación directa, donde se extrae el color y luego se tiñe en el mismo baño de extracción, con los métodos indirectos, más elaborados y con más posibilidades de variedad colorísticas y pos tratamientos, y que involucran la presencia de un mordiente, como una parte fundamental del método. (Draeos Z., 2010).

#### **2.4.5 Variables que Determinan la Calidad de un Colorante**

##### **2.4.5.1 Afinidad**

Es la característica de cada uno de los colorantes que define el verdadero comportamiento en el curso de la tintura. Su representación gráfica en forma de curva permite a una determinada duración y temperatura de la tintura ver la cantidad de colorante que ha subido sobre la fibra. La curva de afinidad permite apreciar el agotamiento del colorante, la influencia de la temperatura. (Shirley M. Tenesaca 2012).

##### **2.4.5.2 Igualación**

Es la obtención de tintura uniforme sobre el género teñido como una buena penetración del colorante a base de obtener una repartición homogénea del mismo.

En una tintura uniforme, las superficies contiguas no muestran diferencia alguna de intensidad de color. La igualación resulta de la concurrencia de determinadas propiedades del colorante, (poder de difusión), de la fibra (homogeneidad), propiedades recíprocas entre la fibra y el colorante (afinidad), así como las condiciones o factores externos como: PH. Contenido salino, temperatura, tiempo, espuma, igualantes. (Shirley M. Tenesaca 2012).

##### **2.4.5.3 Solidez**

Es la resistencia que presenta la fibra a variar o perder su color, al ser sometido a la acción de un determinado agente, pudiendo dar lugar a la degradación del color y / o la descarga sobre otros textiles.

Solides de una tintura o estampación es la resistencia que presenta a variar su color o perder intensidad al ser sometida a un agente externo, pudiendo dar lugar a la degradación del color o bien a la descarga sobre otros tejidos(MaríaSanchez P., 2010).

## 2.4.6 Factores que afectan a la Solidez de los Colorantes

- a. El colorante.- la estructura química de un colorante es fundamental para las propiedades de solidez. Así, incluso dentro de una misma familia, los compuestos más insolubles son más sólidos a los tratamientos húmedos, los que están en forma más oxidada, resisten menos a los oxidantes; los que tienen átomos de cloro son sólidos a los tratamientos de blanqueo.
- b. La Fibra.- hay familias completas de colorantes que tienen mejor solidez sobre una determinada fibra que sobre otra. No solamente influye la diferencia de fibra, sino que dentro de una misma clase de fibras observamos diferencias de solidez, según los tratamientos a que ha sido sometida y que puede influir sobre el estado de la fibra. Así, en el caso de la lana, si se ha efectuado un tratamiento de clorado para conseguir un efecto inecogible, la fibra se modifica en mayor o menor grado consiguiéndose una mayor absorción de colorante y diferente solidez que en la lana original.
- c. El Proceso.- se debe tener en cuenta el método de tintura que se va a utilizar, ya que un mismo colorante puede ser aplicado por diferentes métodos. También se debe tomar en cuenta a las operaciones posteriores a la tintura, sobre todo las de mejorar las solidez, utilizando formaldehídos, jabones o resinas que mejoran o disminuyen la solidez. (*Shirley M. Tenesaca 2012*).
- d. La Intensidad de la Tintura.- ya que la variación del color que es la solidez, se debe o bien a la destrucción de las moléculas de colorante o bien, a la pérdida de las mismas, en uno u otro caso para la misma cantidad absoluta de colorante desaparecido de la fibra la proporción es mayor cuanto menos sea la intensidad inicial de la tintura. Por ello no se puede señalar un valor absoluto de solidez de un colorante a un determinado agente al ser ésta función de la concentración del mismo. (*Shirley M. Tenesaca 2012*).

### 2.4.6.1 Tipos de Ensayos de Solidez

- ✓ Solidez de las tinturas a la luz solar.
- ✓ Solidez de las tinturas a la intemperie: aire libre.
- ✓ Solidez de las tinturas a la limpieza en seco.
- ✓ Solidez de las tinturas a la acción de disolventes orgánicos con frotamiento.
- ✓ Solidez de las tinturas al agua.
- ✓ Solidez de las tinturas a la acción del agua caliente clorada (de las piscinas).

- ✓ Solidez de las tinturas a la acción del sudor.
- ✓ Solidez de las tinturas a los ácidos.
- ✓ Solidez a las tinturas a los álcalis.
- ✓ Solidez a las tinturas a la acción del agua caliente ligeramente acidulada.
- ✓ Solidez de las tinturas al agua en ebullición.
- ✓ Solidez de las tinturas al vaporizador a presión atmosférica.
- ✓ Solidez de las tinturas a los agentes oxidantes y reductores.
- ✓ Solidez de las tinturas al blanqueo con hipoclorito.
- ✓ Solidez de las tinturas a la acción del clorado ácido (lana).
- ✓ Solidez de las tinturas al mercerizado.
- ✓ Solidez de las tinturas al frotamiento.

## 2.5 Extracción Sólido – Líquido

La extracción Sólido–Líquido, es un proceso en el cual se separa un componente soluble contenido en una matriz sólida por medio de un disolvente. El proceso puede ser usado sea para la producción de una solución concentrada de un material sólido valioso (pigmento, alcaloide, flavonoide, terpenoide, etc), o con el fin de eliminar un sólido insoluble, a partir de un material soluble con el que está contaminado. El método utilizado para la extracción está determinado por la proporción de componente soluble en la actualidad, su distribución en todo el sólido, la naturaleza del sólido y el tamaño de partícula.

Si el soluto se dispersa de manera uniforme en el sólido, en primer lugar el material cerca de la superficie se disuelve, dejando una estructura porosa en el residuo sólido. El disolvente entonces tendrá que penetrar en esta capa externa antes de que pueda llegar a más soluto, y el proceso se convertirá en cada vez más difícil y la velocidad de extracción decaerá. Si el soluto forma una proporción muy alta en la matriz sólida, la estructura porosa puede descomponerse casi de inmediato para dar un buen depósito de residuo insoluble, y el acceso de disolvente para el soluto no será impedido. En general, el proceso puede considerarse en tres partes: en primer lugar el cambio de fase del soluto medida que se disuelve en el disolvente, en segundo lugar, su difusión a través del disolvente en los poros del sólido a la parte exterior de la partícula, y en tercer lugar la transferencia del soluto de la solución en contacto con las partículas a la masa principal de la solución. Cualquiera de estos tres procesos puede ser responsable de la limitación en la velocidad de extracción,

aunque el primer proceso por lo general se produce tan rápidamente que tiene un efecto insignificante en la velocidad global.

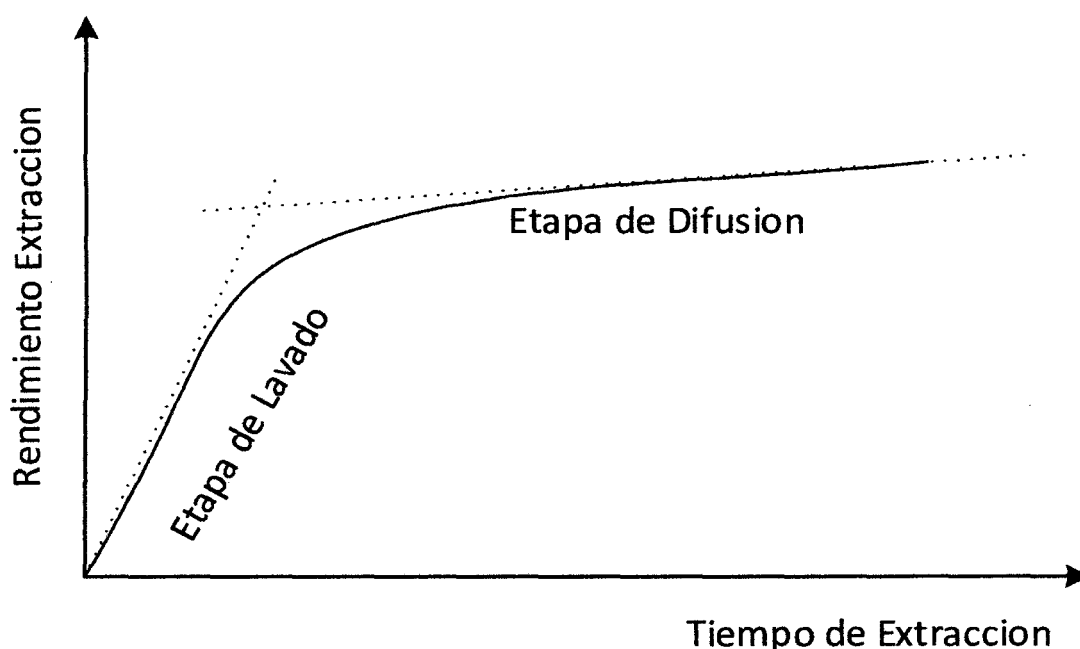
El enfoque fundamental para modelar la extracción sólido – líquido se lleva a cabo a través de la derivación de la ley de Fick (Chen y Chen, 2011; Cissé et al, 2012; Franco et al., 2007a, b; Herodez et al., 2003; Hojnik et al., 2008; Rakotondramasy-Rabesiaka et al, 2010; Tsibranska et al, 2011; Wongkittipong et al., 2004; Xu et al, 2008). Otros enfoques matemáticos empleados incluyen ley de velocidad (Pan et al., 2012; Qu et al., 2010; Rakotondramasy–Rabesiaka et al., 2007; Xiao et al., 2012), el modelo empírico de Peleg (Boussetta et al., 2011; Cárcel et al., 2010) y otros modelos empíricos de dos parámetros. Para tener una mejor comprensión de los modelos de extracción desarrollados, se han dilucidado las derivaciones de los modelos junto con sus supuestos y aplicaciones. La información y los datos se presentan en la tesis muy útil para los procesos específicos de extracción de los colorantes desde matrices vegetales.

### **2.5.1 Extracción Discontinua Convencional**

La curva de extracción con disolvente comprende típicamente un paso rápido de extracción (etapa de lavado) y una etapa de extracción lenta (etapa de difusión) como se muestra en la Figura 5 (Franco et al., 2007b; Perez et al., 2011; y Macdonald., 1986). El mecanismo de extracción se inicia cuando las moléculas del disolvente penetran en las matrices de la planta, provocando que la capa de citoplasma al ser *expuesto directamente al disolvente* (Crossley y Aguilera., 2001). Esto facilita la disolución de los compuestos activos en el disolvente. En el principio del proceso de extracción, el paso rápido corresponde a una velocidad de extracción constante (RakotondramasyRabesiaka et al., 2009). A una velocidad extremadamente rápido, el periodo en este paso de extracción es difícil de determinar (Franco et al., 2007b). Durante la etapa de extracción lenta, los compuestos activos se difunden desde el interior de las matrices de la planta y se disuelven en el disolvente. El rendimiento de la extracción durante este paso depende en gran medida de las células que permanecen intactos después de la etapa de lavado (Crossley y Aguilera, 2001). De hecho, las características de las etapas de lavado y de difusión, en la extracción se pueden determinar por la proporción de células rotas e intactas en la preparación de las muestras, por ejemplo, molienda (So y Macdonald, 1986). Las muestrasmolidas y remojadas en solvente se aplican comúnmente antes de la extracción con el fin de reducir el tamaño de las partículas de la muestra para mejorar el mecanismo de

difusión (Tsibranskaet *et al.*, 2011) y para mejorar la penetración del disolvente en la estructura de la planta (Gujar *et al.*, 2010). La mejora de la cinética de extracción también se puede lograr usando pretratamiento avanzada, como explosión de vapor y la caída instantánea de presión controlada (DIC). Estos métodos de pretratamiento fragmentan la muestra formando microporosya que se descomprime a través de la liberación repentina de la presión de vapor (Benamor y Allaf., 2009; Chen y Chen., 2011). Esto mejora la etapa de lavado en la extracción (Chen y Chen, 2011) y aumenta la difusión del soluto en el disolvente (BenamoryAllaf, 2009). Se dispone de varias configuraciones de sistemas de extracción convencionales. Por ejemplo, una configuración básica consiste en un recipiente agitado con un baño de agua para control de la temperatura, como se muestra en la Figura 5 Esta disposición se ha aplicado ampliamente en la industria para proporcionar un movimiento mayor convección en el disolvente. Esto reduce la barrera de transferencia de masa y mejora la extracción (Franco *et al.*, 2007a).

En algunas aplicaciones, un condensador está conectado a la parte superior del recipiente para evitar la evaporación del solvente debido a un sobrecalentamiento durante la extracción (Xu *et al.*, 2008). Los inconvenientes asociados con la técnica de extracción convencional en términos de tiempo de extracción y el alto consumo de disolvente, hace que se desarrollen nuevas técnicas de extracción de solventes con medios asistidos para superar estas limitaciones.



**Figura 05:** Curva Típica de Extracción Discontinua con Solvente de Componentes Activos desde Matrices Sólidas de Plantas.

Fuente: Chan Ch-H, Yusoff R., Ngoh G-Ch., 2014

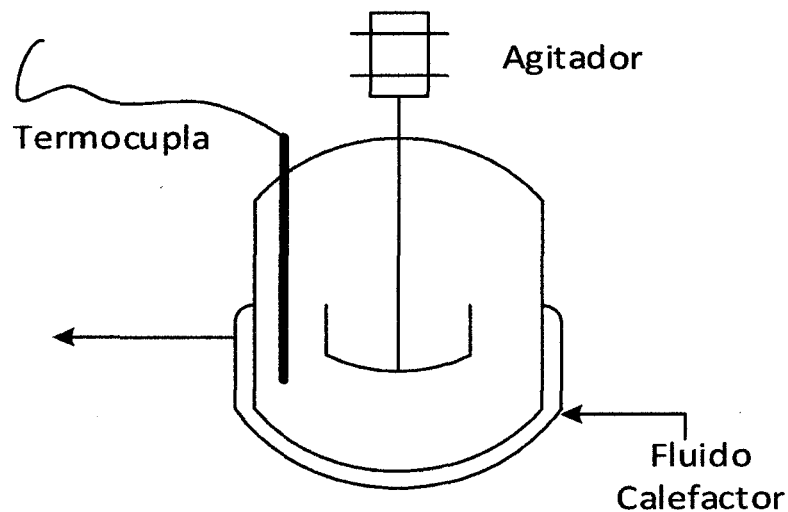


Figura 06: Diagrama Esquemática De Sistema de Extracción Convencional.

Fuente: Chan Ch-H, Yusoff R., Ngoh G-Ch., 2014

### 2.5.2 Influencia de los Parámetros de Funcionamiento en la Cinética de Extracción

La selección de los equipos para un proceso de extracción se ve influenciada por los factores que son responsables de limitar la velocidad de extracción. Por lo tanto, si la difusión del soluto a través de la estructura porosa de los sólidos residuales es el factor de control, el material debe ser de pequeño de manera que la distancia que el soluto tiene que viajar es pequeña. Por otro lado, si la difusión del soluto desde la superficie de las partículas a la mayor parte de la solución es el factor de control, un alto grado de agitación del fluido que se requiere. Por tanto, se describe el efecto de los parámetros generales de funcionamiento considerados como cruciales en las técnicas convencionales de extracción por lotes y de percolación:

El disolvente de extracción y su concentración desempeñan un papel importante en la extracción de compuestos activos de matrices sólidas de plantas. Diferentes disolventes de extracción tienen diferentes energías de activación para la extracción (Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007; Spigno y De Faveri, 2009). Se requiere esta energía para penetración del solvente en el interior de las células vegetales. Los disolventes orgánicos acuosos se emplean normalmente para la extracción. Por ejemplo se utiliza con frecuencia la mezcla de etanol y agua como un disolvente de extracción

en la extracción de compuestos activos de *Fumaria officinalis* L. (Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2010), madera de castaño (Gironi y Piemonte, 2011) y las semillas de uva (Bucic -Kojic et al., 2007). Un disolvente adecuado para la extracción puede mejorar la etapa de lavado y acortar el tiempo de extracción (Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007). También puede mejorar la difusividad del soluto en el disolvente y posteriormente maximizar el rendimiento de extracción de equilibrio (Xu et al., 2008).

Otro parámetro importante, es la relación de masa de solvente: masa muestra ( $m_s : m_m$ ), el cual cuando se aplica correctamente, puede disminuir la barrera de transferencia de masa durante la difusión de compuestos activos y, posteriormente, mejorar el rendimiento de la extracción (Franco et al, 2007a; Qu et al., 2010). Sin embargo, si la relación está más allá del óptimo, el exceso de disolvente no tiene un efecto significativo en los rendimientos de extracción de equilibrio, resultando en desperdicio de disolvente e incremento de los costos operativos. Se observa, que la velocidad inicial de extracción durante el período de lavado no se ve afectada significativamente por el ratio  $m_s : m_m$  (Herodez et al., 2003). Por otro lado, la extracción que se lleva a cabo a bajoratio  $m_s : m_m$ , tiende a alcanzar el equilibrio mucho más rápidamente que los que se llevan a cabo en ratios elevados, debido a rendimientos inferiores de equilibrio (Stanisavljevic et al., 2007).

La cinética de extracción también se ve muy afectada por el tamaño de las partículas de la muestra de matrices sólidas de la planta. Pequeños cambios en el tamaño de las partículas pueden afectar significativamente el resultado de la extracción. El rendimiento de la extracción durante la etapa de lavado se puede mejorar con tamaños más pequeño de partícula de muestras (Qu et al., 2010) pero se vuelve desfavorable cuando conduce a extracción de compuestos indeseables (Cissé et al., 2012). En cuanto a la cinética de extracción, un tamaño menor de partícula aumenta la difusividad y mejora el mecanismo de transferencia de masa en la etapa de difusión. Esto debido a mayor área de superficie de contacto en la trayectoria de difusión entre el soluto (compuesto activo) y el disolvente (Cissé et al, 2012; Herodez et al., 2003; Hojnik et al, 2008). Como resultado, se requiere menor tiempo de extracción. Para el caso de muestra de la *G. americana*, al tratarse de pulpa seca, el tamaño de partícula es determinante.

Convencionalmente, la temperatura de extracción es controla, ya que afecta a la estabilidad de los compuestos activos y el rendimiento de la extracción. Para la

extracción de compuestos térmicamente estables, el mejor rendimiento de la extracción a temperaturas elevadas, se logró en el más corto tiempo de extracción (Cissé et al., 2012). Esto puede explicarse porque la alta temperatura aumenta la difusividad del soluto y disminuye la barrera de energía de la extracción (Cissé et al., 2012; Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007). El poder de solvatación del disolvente en la extracción también se mejora permitiendo que los compuestos más activos se disuelvan en el disolvente (Cissé et al., 2012; Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007; Xu et al., 2008). Además, la velocidad de extracción en la etapa de lavado tiene a aumentar con la temperatura que probablemente podría ser debido al creciente poder de solvatación del disolvente (Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007, 2010). Por el contrario, para los compuestos sensibles al calor, una elevada temperatura de extracción ejerce efecto negativo sobre la extracción y debe evitarse a toda costa. La tendencia general exhibida por estos compuestos es que la estabilidad disminuye al aumentar la temperatura de extracción (Cissé et al., 2012). Esto también significa que la velocidad de degradación o descomposición de compuestos sensibles al calor depende de la temperatura de extracción (Xiao et al., 2012). Por lo tanto, los criterios de selección de una adecuada temperatura de extracción deben basarse tanto en la eficiencia de la extracción y la estabilidad térmica de los compuestos activos.

La agitación del disolvente es importante porque esto aumenta la difusión turbulenta y por lo tanto la transferencia de material de la superficie de las partículas a la mayor parte de la solución, como se discute en la siguiente sección. Además, la agitación de suspensiones de partículas finas impide la sedimentación y el uso más eficaz posible de la superficie interfacial.

### **2.5.3 Modelamiento Matemático de la Extracción Discontinua por Solvente**

Muchos enfoques matemáticos se pueden utilizar para modelar el proceso de extracción. Las ecuaciones para el modelamiento, se derivan teóricamente o empíricamente formulados. Ampliamente se utiliza la Ley de difusión de Fick, ecuaciones cinéticas químicas y otras dos ecuaciones empíricas paramétricas. Por lo tanto, esta sección se centra en la derivación y aplicaciones del modelamiento matemático de la extracción por solvente del lote.

#### **2.5.3.1 La Ley de Fick**

La etapa de difusión en la extracción por lote depende de dos mecanismos de extracción; *difusión interna* y la *difusión externa*. La difusión interna de compuestos



activos, es explicada por Ley de Fick, generada por la diferencia de concentración entre la matriz de la planta y el disolvente, de la siguiente manera (Bird et al., 2006):

$$N = -D \frac{dC}{dx} \quad (1.1)$$

donde N es el flujo de masa del soluto, C es la concentración del soluto en la partícula sólida, D es conocida como la difusividad o coeficiente de difusión para el soluto en el disolvente, y x es la distancia en la dirección de la transferencia. Para la *difusión externa*, los compuestos activos se difunden desde la superficie externa del sólido al líquido que lo rodea. La determinación del mecanismo limitante de velocidad en la etapa de difusión es importante para la cinética de extracción, ya que determina un enfoque matemático adecuado para modelar la extracción. Para asegurar una eficaz extracción, la resistencia de transferencia de masa externa tiene que minimizarse de manera que la velocidad de extracción sólo dependa de la difusión interna de los compuestos activos. La difusividad en la Ley de Fick, Ec. (1.1) es una propiedad importante que indica la velocidad de transferencia de masa y es útil para el diseño del equipo (Pérez et al., 2011). En la mayor parte del modelamiento cinética en la literatura, se investiga la difusividad u otros coeficientes de transferencia de masa para la extracción con disolventes. La caracterización de la extracción, se puede realizar a través de la derivación de la Ley de Fick con condiciones iniciales y de contorno. La solución del problema de transferencia de masa puede obtenerse analíticamente o numéricamente dependiendo de la complejidad de las ecuaciones involucradas. Algunos supuestos básicos (Crank, 1975) que pueden utilizarse para simplificar las áreas de problemas de transferencia de masa son:

- Muestras de partículas simétricas y porosas. La geometría esférica de las partículas sólidas con radio R, ó placa delgada con espesor medio de L.
- La partícula sólida como un medio pseudo-homogénea. La concentración de los compuestos activos en la partícula sólida depende del tiempo y el radio, r o espesor, x.
- La distribución uniforme de los compuestos activos en la matriz de la muestra.
- Mezcla homogénea entre el solvente y las muestras particuladas de la planta.
- La concentración del soluto en el disolvente sólo depende del tiempo.
- La transferencia de masa de compuestos activos desde el sólido es un fenómeno de difusión en el que el coeficiente de difusión es independiente del tiempo.

- La difusión del soluto y otros compuestos están en paralelo y no hay interacción entre ellos.
- La resistencia a la transferencia de masa externa es despreciable. La concentración del soluto en el disolvente en el interior de la partícula sólida es igual a la concentración del soluto en el disolvente que lo rodea.

### 2.5.3.2 Transferencia de Masa en las Partículas Sólidas

Uno de los supuestos de la transferencia de masa, es para tratar la resistencia externa de transferencia de masa sea despreciable, el cual es crucial y depende de la naturaleza de la extracción. Este supuesto simplifica la mayor parte de los problemas de extracción. El modelo de proceso de extracción puede ser desarrollado considerando sólo el balance de masa en una partícula sólida esférica como se muestra:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla(-D \nabla C) \quad (1.2)$$

donde  $t$ , es el tiempo de extracción. Teniendo en cuenta únicamente la geometría esférica de las partículas con radio  $r$ , las respectivas condiciones iniciales y de contorno se pueden escribir como sigue:

$$t=0, \quad C=C_o \quad \forall r \quad (1.3)$$

$$t>0, \quad C=C_i=0 \quad r=R \quad (1.4)$$

$$t>0, \quad \frac{\partial C}{\partial r}=0 \quad r=0 \quad (1.5)$$

donde,  $C_o$  es la concentración inicial de soluto en la partícula de la muestra,  $C_i$  es la concentración de soluto en la interfase de la partícula de la muestra. Con la suposición de la resistencia a la transferencia de masa externa insignificante, la concentración en la interfaz de partícula se convertirá en cero como se describe en la Ec. (1.4). La ecuación diferencial ordinaria (ODE) tanto para la geometría esférica y placa de la muestra puede entonces expresarse, según las Ecs. (1.6) y (1.7), respectivamente (Crank, 1975):

Esférico:

$$\frac{C-C_o}{C_i-C_o} = 1 + \left[ \frac{2R}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \operatorname{sen} \frac{\pi n r}{R} \exp \left\{ -\frac{D n^2 \pi^2 t}{R^2} \right\} \right] \quad (1.6)$$

Placa:

$$\frac{C - C_o}{C_i - C_o} = 1 - \left[ \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2L} \exp \left\{ -\frac{(2n+1)^2 \pi^2 Dt}{4L^2} \right\} \right] \quad (1.7)$$

La masa de soluto transferido de la partícula de la muestra en cualquier momento,  $M$  puede ser calculado mediante la integración de la concentración de soluto sobre el radio o el espesor de las partículas en las Ecs. (6) y (7) para obtener las ecuaciones. (8) y (9), respectivamente.

Esférico:

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left\{ -\frac{Dn^2\pi^2 t}{R^2} \right\} \quad (1.8)$$

Placa:

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 + \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left\{ -\frac{(2n+1)^2 \pi^2 Dt}{4L^2} \right\} \quad (1.9)$$

Donde  $M_{\infty}$  es la cantidad total de soluto transferido en un tiempo infinito. Después de un cierto lapso de tiempo, o por lo general después de la etapa de lavado, sólo el primer término de la serie sigue siendo significativa (Spiro, 1988). Ambas Ecs, (1.8) y (1.9), entonces se puede reducir a la siguiente forma (Pérez et al., 2011):

$$\frac{M(t)}{M_{\infty}} = 1 - A e^{-Bt} \quad (1.10)$$

Donde  $A$  es la constante del modelo, y  $B$  es la constante de velocidad de difusión. Teóricamente,  $B = \pi^2 D/r^2$  es para partículas esféricas y  $B = \pi^2 D/4L^2$  es para partículas tipo placas. La constante  $B$  podría no ser aplicable bajo ciertas condiciones cuando su valor tiene a depender de la geometría de muestras de las plantas. La expresión en la Ec. (1.10) puede ser modificada basada en la fracción no-extraída del soluto en la partícula de la muestra,  $E$ . Reordenando, la versión simplificada se muestra a continuación (Chen y Chen, 2011):

$$E = 1 - \frac{M(t)}{M_{\infty}} = A \exp(-Bt) \quad (1.11)$$

$$\ln E = \ln A - Bt \quad (1.12)$$

Alternativamente, la concentración de soluto en el disolvente de extracción en cualquier momento,  $C$  puede expresarse considerando sólo el primer término de las Ecs. (1.8) y (1.9) (Spiro 1988) con las formas simplificadas se muestran como sigue:

Esférico:

$$\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty}-C}\right) = 0.498 + \frac{9.87Dt}{R^2} \quad (1.13)$$

Placa:

$$\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty}-C}\right) = 0.21 + \frac{9.87Dt}{4L^2} \quad (1.14)$$

Donde  $C_{\infty}$  es la concentración de soluto en el disolvente de extracción después de un tiempo infinito. Al graficar la Ec. (1.13) o la Ec. (1.14) utilizando la curva experimental de extracción, de la intersección de las dos líneas rectas se pueden extraer la pendiente, siendo de la primera la más pronunciada que la segunda. La intersección entre las líneas es el punto de transición. Esta denota el punto donde la extracción cambia su fase de la etapa de lavado a la etapa de difusión (KandiahandSpiro, 1990; Spiro et al., 1989). Para lograr mejores resultados de los modelos, Osburn y Katz (1944) sugirieron que el modelado del proceso de extracción debe tener en cuenta tanto las etapas de lavado y de difusión, expresadas a través de las siguientes ecuaciones:

Esférico:

$$\frac{C_{\infty}-C}{C_{\infty}} = \frac{6}{\pi^2} \left[ f_1 \exp\left\{-\frac{\pi^2 D_1 t}{R^2}\right\} + f_2 \exp\left\{-\frac{\pi^2 D_2 t}{R^2}\right\} \right] \quad (1.15)$$

Placa:

$$\frac{C_{\infty}-C}{C_{\infty}} = \frac{8}{\pi^2} \left[ f_1 \exp\left\{-\frac{\pi^2 D_1 t}{4L^2}\right\} + f_2 \exp\left\{-\frac{\pi^2 D_2 t}{4L^2}\right\} \right] \quad (1.16)$$

donde  $f_1$  y  $f_2$  son las fracciones de soluto extraído de las etapas de lavado y de difusión con coeficiente de difusión de  $D_1$  y  $D_2$ , respectivamente. Los parámetros  $D_1$  y  $f_2$  se pueden determinarse a partir de la pendiente y los puntos de intersección de la Ec. (1.13) o la Ec. (1.14) como el segundo término exponencial

es significativo para la segunda etapa de la extracción. En la primera etapa de extracción, el segundo término exponencial es cercano a la unidad por lo tanto se puede determinar  $D_1$  y  $f_1$ .

### 2.5.3.3 Transferencia de Masa en las Partículas Sólidas y el Disolvente de Extracción

Los modelos desarrollados en la sección anterior pueden ser teóricamente obtenidos resolviendo la transferencia de masa en partículas sólidas. Para hacer que los modelos sean más realistas, se debe tener en cuenta el balance de masa del solvente. Desde el balance de masa en las partículas sólidas mostradas en la Ec. (1.2), el balance de masa en el disolvente se puede expresar según:

$$V_L \frac{dC}{dt} = J(t) \quad (1.17)$$

Donde,  $V_L$  es el volumen de disolvente utilizado en la extracción. Las condiciones iniciales y de contorno en la extracción se presentan en las Ecs. (2.18) y (2.19) y las Ecs. (2.20) - (2.22), respectivamente:

$$t=0, \quad C=C_o \quad \forall r \quad (1.18)$$

$$t=0, \quad C=0 \quad (1.19)$$

En el centro,  $r = 0$

$$r=0, \quad \frac{\partial C}{\partial r} = 0 \quad (1.20)$$

En la interfaz,  $r = R$

- i. El flux difusivo de la partícula sólida (*Cissé et al, 2012; Wongkittipong et al, 2004; Xu et al., 2008*):

$$J(t) = -D A_s \frac{\partial C}{\partial r} \quad (1.21)$$

- ii. El flux entrante en el disolvente (*Tsibranska et al, 2011; Wongkittipong et al., 2004*):

$$J(t) = V_s \frac{dC}{dt} \quad (1.22)$$

donde  $A_s$  es el área específica de la partícula sólida y  $V_s$  es el volumen de muestra de la planta. Hay dos condiciones de contorno diferentes en la interfase sólido que deben tenerse en cuenta; a saber, el flux difusivo para la mezcla binaria en la Ec.

(1.21) y el flux de entrada del disolvente en la Ec. (1.22). La misma hipótesis de la resistencia a la transferencia de masa externa insignificante se aplica tanto para la Ec. (1.21) y la Ec. (1.22). Estas ecuaciones se pueden utilizar indistintamente o conjuntamente, dependiendo del número de variables independientes que necesitan ser resueltos (Wongkittipong et al., 2004). Por ejemplo, en el modelado de proceso de extracción por Wongkittipong et al. (2004), las Ecs. (1.21) y (1.22) se utilizaron para resolver el problema de transferencia de masa que involucró partículas sólidas con geometrías tanto cilíndricas como de placas. Este enfoque de modelado también es aplicable para otra geometría cuando se conoce el factor de forma de geometría (Wongkittipong et al., 2004).

#### 2.5.3.4 Transferencia de Masa con Variación de la Temperatura de Extracción

El enfoque de modelos presentados hasta ahora se limita a la temperatura de extracción específica. Para investigar la influencia de la temperatura sobre el proceso de extracción, la ecuación de Arrhenius se muestra en la Ec. (1.23), utilizada para describir el efecto de la temperatura en la difusividad del sistema.

$$D = A' \exp\left[\frac{-E_a}{RT}\right] \quad (1.23)$$

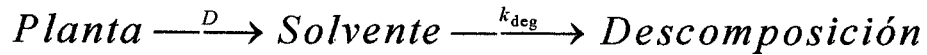
donde, A 'es el factor pre-exponencial y  $E_a$  es la energía de activación del modelo de Arrhenius. Al comparar el valor de difusividad de referencia,  $D_{ref}$  a la temperatura de referencia,  $T_{ref}$ , la difusividad D en la temperatura de extracción T se puede expresar como sigue:

$$\frac{D}{D_{ref}} = \frac{A' \exp(-E_a/RT)}{A' \exp(-E_a/RT_{ref})} = \exp\left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T}\right)\right] \quad (1.24)$$

Sustituyendo esta expresión relacionada con la temperatura en el sistema de modelado discutido previamente, se puede determinar la influencia de la temperatura sobre el proceso de extracción (Xuet al., 2008).

#### 2.5.3.5 Transferencia de Masa con Degradación de Compuestos Activos

Cuando la extracción implica compuestos térmicamente sensibles tales como las vitaminas, el perfil de extracción está impulsado por dos procesos a saber; la difusión de compuestos activos a partir de muestras de plantas y la degradación térmica de los compuestos activos en el disolvente de extracción (Xiao et al, 2012.):



Para mejorar la precisión en el modelamiento, los términos de degradación se pueden añadir como primer orden en la ecuación de velocidad en las expresiones de balance de masa para partículas sólidas y disolvente, como se muestra en las Ecs. (1.25) y (1.26), respectivamente (Cissé *et al.*, 2012).

Balance de masa en las partículas sólidas con término de degradación:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla(-D \nabla C) - k_{\text{deg}} C \quad (1.25)$$

Balance de masa en el solvente con término de degradación:

$$V_L \frac{dC}{dt} = J(t) - k_{\text{deg}} C V_L \quad (1.26)$$

donde,  $k_{\text{deg}}$  describe la constante de degradación de la extracción que se puede relacionar a las ecuaciones de Arrhenius como se muestra en la Ec. (2.27):

$$k_{\text{deg}} = k_{\infty} \exp\left[\frac{-E_a}{RT}\right] \quad (1.27)$$

donde,  $k_{\infty}$  es la constante de velocidad de degradación para componente activo.

Los parámetros de la Ec. (1.27), es decir  $k_{\infty}$  y  $E_a$ , y las condiciones iniciales y de contorno en Ecs. (1.18) – (1.22) están obligados a resolver la degradación térmica asociada con el problema de la transferencia de masa.

### 2.5.3.6 Transferencia de Masa con la Resistencia a la Transferencia de Masa Externa

Cuando la resistencia de transferencia de masa externa en el sistema de extracción se vuelve significativa, se considera el coeficiente de transferencia de masa por convección. Se requiere una forma adimensional de la Ec. (1.2) para modelar esta condición particular (Franco *et al.*, 2007b).

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial \bar{r}^2} = \left(\frac{\partial Y}{\partial \bar{t}}\right) \quad (1.28)$$

donde los grupos adimensionales para el radio, el tiempo de extracción y el rendimiento pueden ser definidos, según:

i. radio adimensional

$$\bar{r} = \frac{r}{R} \quad (1.29)$$

ii. tiempo de extracción adimensional

$$\bar{t} = \frac{D t}{R^2} \quad (1.30)$$

iii. rendimiento adimensional

$$Y = \frac{(C - C_e)}{(C_o - C_e)} \quad (1.31)$$

Donde  $C_e$  se define como la concentración de soluto que permanece en la partícula de la muestra después de tiempo de extracción infinito. Las condiciones iniciales y de contorno son similares a las Ecs. (1.3) y (1.5), sólo las condiciones de contorno en la interfaz son diferentes y se define como:

$$t > 0, \quad \frac{\partial Y}{\partial \bar{r}} = \frac{k_c R}{D} Y = \frac{k_c R}{D} \left( \frac{C_o - C}{C_o} \right) \quad (1.32)$$

donde,  $k_c$  es el coeficiente de transferencia de masa por convección. Este problema de transferencia de masa se informó por *Walas (1991)* y la solución analítica sugerida se muestra a continuación:

$$Y(\bar{r}, \bar{t}) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{B_n}{r} \sin(\lambda_n^2 \bar{t}) \quad (1.33)$$

Mientras que  $B_n$  se puede determinarse a partir de la Ec. (1.34):

$$B_n = \left( \frac{4}{\lambda_n} \right) \frac{\sin(\lambda_n) - \lambda_n \cos(\lambda_n) + \lambda_n}{2\lambda_n - [\sin(\lambda_n)]^2} \quad (1.34)$$

Dónde  $\lambda_n$  son los valores propios de la función dada en la Ec. (1.35):

$$\lambda \cot g(\lambda) + \frac{k_c R}{D} = 1 \quad (1.35)$$

La fracción media no extraída del soluto en la partícula de la muestra puede obtenerse a partir de la Ec. (1.33) como sigue:



$$\bar{Y} = \int_0^1 Y(\hat{r}, \hat{t}) d\hat{r} \quad (1.36)$$

$$\hat{Y}(t) = \sum_{n=1}^{\infty} B_n (0.8415\lambda_n) \exp(-\lambda_n^2 \hat{t}) \quad (1.37)$$

Estas series se trunca a los primeros cinco términos para estimar la fracción no extraída de aceite con menor error.

### 2.5.3.7 Ley Modificada de Fick

Los modelos presentados anteriormente son adecuados para ser utilizados en estudios de escalamiento y diseño de los equipos, cuando los parámetros que intervienen en las ecuaciones tienen significados físicos reales. Los modelos más simplificados, como la teoría de la película (*Stankovic et al., 1994; Veljković y Milenovic, 2002*) y difusión en estado estacionario a través de material vegetal (*Ponomariov, 1976; Velickovic et al, 2006*) se pueden adoptar para describir la etapa de lavado y la etapa de difusión en el proceso de extracción. Estas ecuaciones de dos parámetros se derivan de la ley de Fick y se expresan en las Ecs. (1.38) y (1.39), respectivamente:

Teoría de película:

$$\frac{C}{C_{\infty}} = 1 - (1 - b) e^{-kt} \quad (1.38)$$

Inestable teoría de difusión estatal:

$$\frac{C}{C_{\infty}} = (1 - b') e^{-k't} \quad (1.39)$$

donde,  $b$  y  $b'$  denotan los coeficientes para la cinética de extracción en la etapa de lavado, mientras  $k$  y  $k'$  son los coeficientes para la etapa de difusión. Para expresar la Ec. (1.39) sobre la base de la cantidad de soluto extraído en el disolvente de extracción, la ecuación se puede modificar en la Ec. (1.40):

$$\frac{C_o - C}{C_o} = (1 - b') e^{-k't} \quad (1.40)$$

donde  $(C_o - C)$  indica la cantidad de soluto disuelto en el disolvente de extracción.

Las ecuaciones de modelado que implican la Ley de Fick se utilizan comúnmente

en el modelado de la extracción con disolvente ya que representan la teoría fundamental para la transferencia de masa.

### 2.5.3.8 Ley de Velocidad

Además de las expresiones derivadas de la ley de Fick, ley de velocidad también se adapta en el modelado de extracción con disolventes de compuestos activos de varias plantas, además de ser empleado para investigar la velocidad de degradación de compuestos activos en la solución como se ha discutido previamente (Xiao et al., 2012). Los modelos de extracción basado en una ley de velocidad de segundo orden se aplican normalmente en extracciones convencionales y no convencionales (Pan et al, 2012; Qu et al., 2010; Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007, 2009). La velocidad de disolución de los compuestos activos de una planta en el disolvente de extracción se da como sigue:

$$\frac{dC}{dt} = k_1 (C - C_\infty)^2 \quad (1.41)$$

donde  $k_1$  es la constante de velocidad de extracción de segundo orden. Tomando las condiciones iniciales y de contorno como  $t=0$  a  $t_y$   $C=0$  a  $C$ , la ley de velocidad integrada puede obtenerse:

$$C = \frac{C_\infty^2 k_1 t}{1 + C_\infty k_1 t} \quad (1.42)$$

Por transformación lineal de la Ec. (1.42), se determina la constante de velocidad  $k_1$  ajustando la Ec. (1.43) con los datos experimentales. Posteriormente la Ec. (2.44) se puede obtener de la Ec. (1.43)

$$\frac{t}{C} = \frac{1}{k_1 C_\infty^2} + \frac{t}{C_\infty} \quad (1.43)$$

$$\frac{C}{t} = \frac{1}{(1/k_1 C_\infty^2) + (t/C_\infty)} \quad (1.44)$$

$C/t$  en la Ec. (1.44) indica la velocidad de extracción inicial, que también puede ser denotado por  $h$ , y se puede definir por la Ec. (1.45) cuando el tiempo de extracción  $t$  se aproxima a cero.

$$h = k_1 C_\infty^2 \quad (1.45)$$

$$C = \frac{t}{(1/h) + (t/C_\infty)} \quad (1.46)$$

### 2.5.3.9 Ecuaciones Empíricas

En el modelado de extracción con disolvente, se han empleado varios modelos empíricos, ya sea desarrollado a partir de los modelos fundamentales o modelos adaptados como se discutió anteriormente. Los modelos empíricos son más adecuados para los procesos de extracción que implican medios asistidos, tales como microondas, ultrasonidos y eléctrica, ya que no pueden ser descritos teóricamente. El modelo empírico más comúnmente utilizado fue propuesto por lo tanto y *Macdonald (1986)* y *Patricelli et al. (1979)*, que tiene la siguiente forma:

$$C = C_w [1 - \exp(-k_w t)] + C_d [1 - \exp(-k_d t)] \quad (1.47)$$

donde,  $C_w$  y  $C_d$  son las cantidades de soluto extraído en el disolvente durante la etapa de lavado y la etapa de difusión, respectivamente. La cantidad de soluto extraído puede ser expresada por masa de muestra utilizada, o se expresa en la fracción mediante la comparación con el rendimiento de equilibrio.  $k_w$  y  $k_d$  representa los coeficientes de cinética de extracción durante la etapa de lavado y la etapa de difusión, respectivamente. La ecuación empírica (1.47) se asemeja al modelo propuesto por *Osburn y Katz (1944)* que se mostró en las Ecs. (1.15) y (1.16).

El modelo de *Peleg (Peleg, 1988)*, que se utiliza para describir las curvas de sorción, se adapta para el modelado de proceso de extracción de disolvente como se muestra en la Ec. (1.48):

$$C = C_o + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (1.48)$$

Donde  $K_1$  es la constante de velocidad de modelo,  $K_2$  es la constante de capacidad del modelo y  $C_o$  es generalmente igual a cero. Tanto el modelo de la *Peleg* y la ley de velocidad de segundo orden integrado en la ecuación (1.42) son ecuaciones hiperbólicas. Otros modelos empíricos propuestos para la extracción con disolventes incluyen ecuación *Ponomariov (Ponomariov, 1976; Velickovic et al, 2006)*.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 MATERIA PRIMA

El fruto de Huito utilizada en la tesis fue colectada del Centro Poblado de Madama ubicado en el Km 8 carretera Puerto Maldonado–Iñapari. La recolección se ha realizado en los meses de enero – febrero del 2014, cuando los frutos estuvieron aún verdes, tal como se muestra en la Figura 07.

Los frutos colectados, previamente fueron identificados taxonómicamente con la ayuda de un Botánico de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, para los cuales se han tomado fotografías de todo el arbusto, partes de ella, como hojas, ramas y frutos. Con los resultados se corroboró la especie con el que se ha trabajado.



**Figura 07:** Recolección de frutos verdes de Huito.

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

### 3.1.2 Materiales

- ✓ 02 Papeles Whatman # 4
- ✓ 04 Fiolas de 200ml
- ✓ 06 Vasos precipitados de pírex 500 ml. y 2L.
- ✓ 02 Baguetas
- ✓ 01 Termómetro (0 – 100°C)
- ✓ 07 Tubos de centrifuga de 50 ml
- ✓ 02 Matraz Erlenmeyer de 250ml
- ✓ 20 Portaobjetos
- ✓ 20 Cubreobjetos
- ✓ 04 Campana de Desecación
- ✓ Placas cromatográficas de sílica gel 60. 107734 (0,063-0,200 mm)

### 3.1.3 Reactivos

- ✓ Etanol anhidro.
- ✓ Agua bidestilada. Obtenida a través de la destilación fraccionada de agua en una columna de destilación.
- ✓ Metanol Grado Analítico.
- ✓ n- Hexano, Fórmula química  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ .
- ✓ 4 L. Agua destilada y desionizada.
- ✓ 200 ml NaOH 3%, 0.45N, 0.5N, 1N y 2N.
- ✓ 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N
- ✓ 100 ml HCl 0.1N, 0.5 N, 0.2N

### 3.1.4 Equipos y Maquinas

- ✓ Balanza Analítica, Serie HR - 200, Cap. 210000x0.1 mg, Div. mín. en porcentaje 0.01%, 0.1% (auto indicación), Repetibilidad/Desviación Std.  $\pm 0.0003$  mg, Desviación de sensib. (10°C-30°C)  $\pm 2\text{ppm}/^\circ\text{C}$  (sin usar auto-calibración automática).
- ✓ pH-metro (marca: Gehaka, modelo: PG 2000- Brasil).
- ✓ Planchas de calentamiento (marca: Thermo Fisher Scientific - USA, T°=30-550°C).
- ✓ Estufa (marca: Thomos, modelo: ODHG-905A-Brasil, T°: 0-200°C. precisión  $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

- ✓ Agitadores de turbina ejecutada en acero inoxidable C-316. Con eje movido a través de un motor de corriente continua y velocidad variable (rango de agitación: 10 a 250 rpm).
- ✓ Molino mecánico manual (marca: Corona, modelo: UJ-3329- Peru).
- ✓ Balanza semianalítica (marca: Mettler Toledo, modelo: MT-SICS – Peruprecision  $\pm 0.001$ ).
- ✓ Microscopio óptico con cámara incorporada (marca: Leica modelo: DM-500-Suiza).
  - ✓ Módulo de extracción por inundación con calentamiento y agitación controlados. Ver Anexo, Fig. 40.
  - ✓ Módulo de extracción por percolación con sistema de flujo de alimentación controlada. Ver Anexo, Fig. 41.
  - ✓ Equipo soxhleth de 1L, con calentamiento través de plancha eléctricas.
  - ✓ Equipo de determinación de humedad por destilación ejecutado en vidrio borosilicatado.
  - ✓ Espectrofotómetro UV-Vis. Mod. DR 500, HACH. Anexo, Fig. 42.

## **3.2 Metodología.**

### **3.2.1 Reconocimiento Taxonómico del Huito**

Una de los elementos importantes a la hora de trabajar con muestras vegetales es la corroboración de la taxonomía de la muestra recolectada, la misma se ha llevado a cabo con el apoyo de un Biólogo especializado en taxonomía de plantas de la Amazonía peruana. Así mismo el Boucher se ha registrado en el herbario de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios. En la Fig. 38, se visualiza la certificación correspondiente, de las muestras colectadas del Km 8 carretera Puerto Maldonado–Iñapari.

### **3.2.2 Pre-tratamiento de los Frutos de Huito**

La pulpa del fruto de la *Genipa americana* L. se ha obtenido de frutos frescos cuya superficie externa tienen una coloración verde y sin deterioro alguno por efectos físicos y biológicos. En la figura 08, se muestra el flujograma del procedimiento seguido, que ha consistido en:

- **Selección:** consiste en seleccionar los frutos en estado verde que se encuentren en buen estado. Ver figura 39 A.
- **Lavado:** se realiza con chorros fuertes de agua y frotamientos para retirar componentes sólidos adheridos en el fruto. Ver figura 39 B.
- **Pelado:** se retira la cascara del fruto.
- **Cortado:** se extrae la pepa del fruto y se corta en trozos muy pequeños y se esparce uniformemente en bandejas de aluminio.
- **Secado:** una vez esparcido las muestras del fruto se llevan al horno a una temperatura de 60°C por 24 horas. Ver fig. 39 C y D.
- **Molienda:** una vez retiradas del horno se procede al molido de la muestra seca del fruto del huito; obteniendo gránulos de diferentes tamaños. Ver fig. 39 E.
- **Tamizado:** ya que obtuvimos gránulos de diferentes tamaños, realizamos el tamizado con diferentes número de mallas (malla N°12,16, 20, 30, 40, 50). Ver fig. 39 F.
- **Producto final:** obtuvimos harinas con diferentes tamaños de partículas, según el método de extracción que se utilice. Ver fig. 39 G.

Después de obtener las distintas muestras, se procede a la extracción del colorante de la *Genipa americana*, según los métodos de percolación e inundación, tal como se muestra en la Fig. 09 se puede observar el procedimiento del método de extracción por percolación del fruto de la *G. americana* L. y en la Fig. 10 se observar el procedimiento del método de extracción por inundación del fruto de la *G. americana* L. a continuación se explicara el proceso de cada método:

**a. Proceso de extracción de colorante del fruto de *G. americana* por el método de percolación. Ver figura 41.**

- **Pesado de la muestra:** se realiza según el cuadro N°19 (Matriz de Resultados para la Extracción por Percolación según Diseño Compuesto Central).
- **Mezcla de riego por goteo:** consiste en el goteo de una solución de alcohol a diferentes grados donde se controla las diferentes velocidades y tiempo de caída de la solución; que cae en la materia prima de diferente n° de malla, donde arrastra todo el colorante. ver Fig. 41.
- **Sustracción del tinte:** una vez que empiece el goteo y caiga la primera gota en el matraz, se extrae muestras de la extracción a diferentes tiempos y se almacena en tubos capilares a diferentes tiempos asta que ya no arrastre color

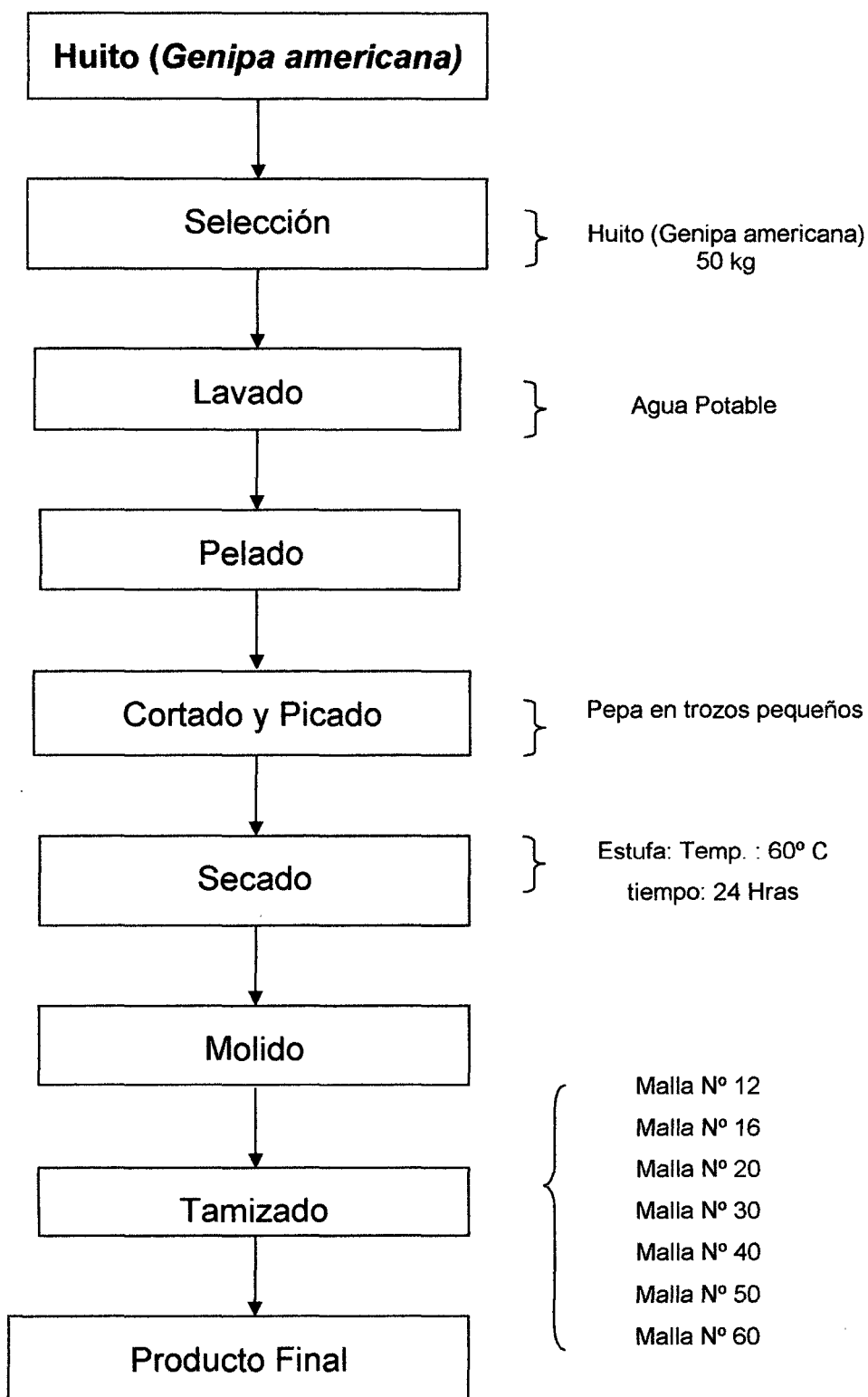
el solvente y se almacena a una temperatura de 10°C; el resto del tinte se pone en un pírex para ser llevado al horno. Como se muestra en Fig. 27.

- **Secado en el horno:** una vez en el horno se pone a una temperatura de 50 – 50 - 60°C por 12 horas. Se obtiene el tinte en consistencia viscosa.
- **Envasado:** sustraemos de los pírex el tinte de consistencia viscosa con ayuda de paletas y cucharitas.
- **Almacenado:** lo colocamos en frascos color caramelos, los etiquetamos y los guardamos en refrigerador a temperaturas de 10°C.

**b. Proceso de extracción de colorante del fruto de *G. americana* por el método de inundación. Ver figura 40.**

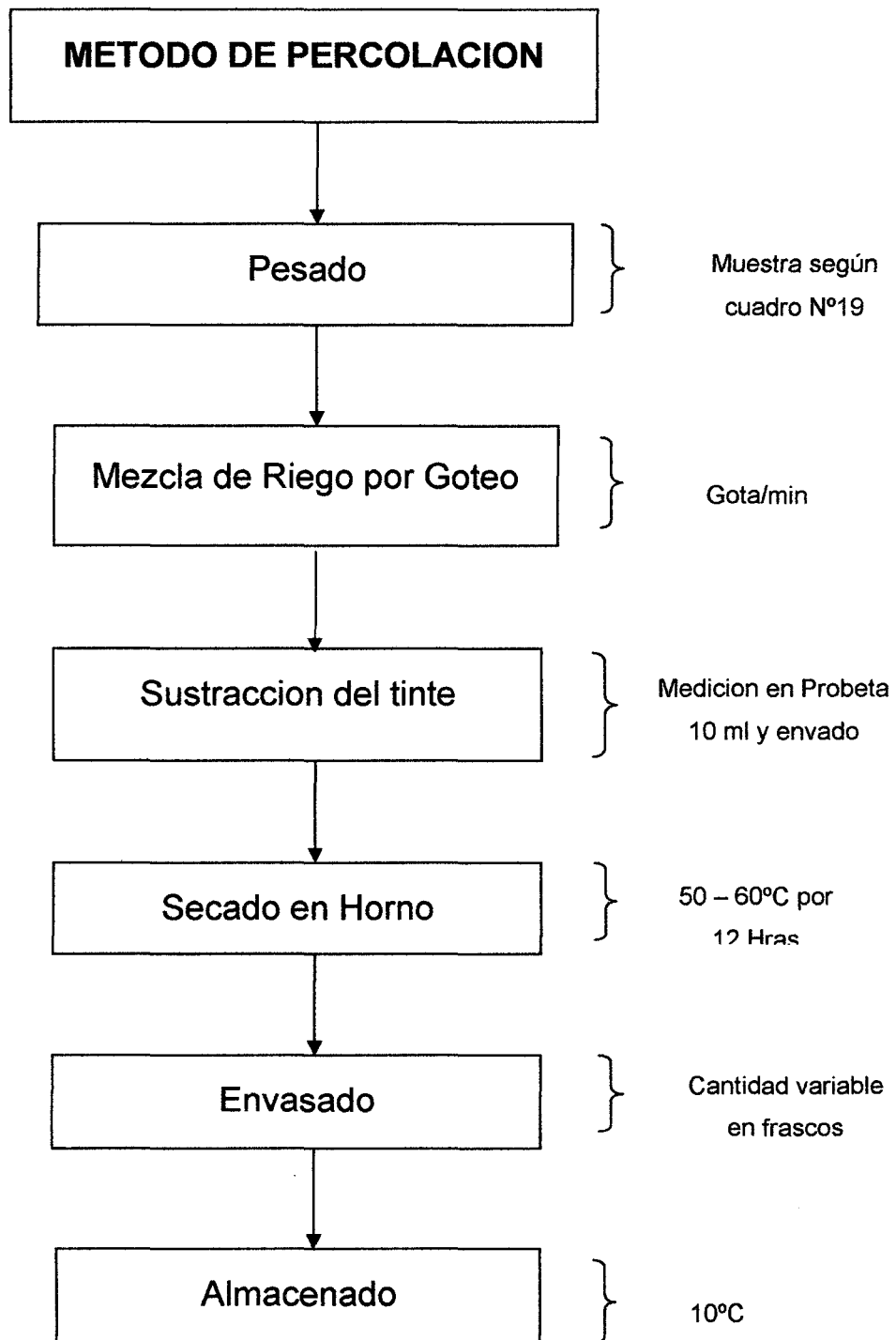
- **Pesado:** se realiza el pesado y medición de la muestra: solvente según el cuadro N°10 (Matriz de Resultados para la Extracción por inundación según Diseño Compuesto Central)
- **Mezclado solvente: muestra:** se mezcla en un vaso de presipitado de 1lt la materia prima (harina de huito), con la solución de alcohol a diferentes grados, según el cuadro N° 10 y se bate con una cucharilla hasta obtener una mezcla. Luego se coloca en baño María a diferentes temperaturas y se le acondiciona como parte del equipo un agitador que funciona durante un periodo determinado de tiempo según cuadro N°10. Ver Fig.40
- **Envasado:** una vez retirado del baño María, se separa 10ml de tinte líquido y se almacena en un frasco color caramelo a 10°C de temperatura, el resto se cierce para separar la torta( restos solidos) del tinte liquido; luego se coloca el tinte liquido en un pírex para llevarlo al horno.
- **Secado:** una vez en el horno se pone a una temperatura de 60°C por 12 horas. Se obtiene el tinte en consistencia viscosa.
- **Embasado:** Una vez que la muestra esta viscosa se sustrae de los pírex el tinte de consistencia viscosa con ayuda de paletas y cucharitas, para colocarlo en frascos de color caramelo con sus respectivos etiquetas.
- **Almacenado:** después se guarda en refrigerador a temperaturas de 10°C.



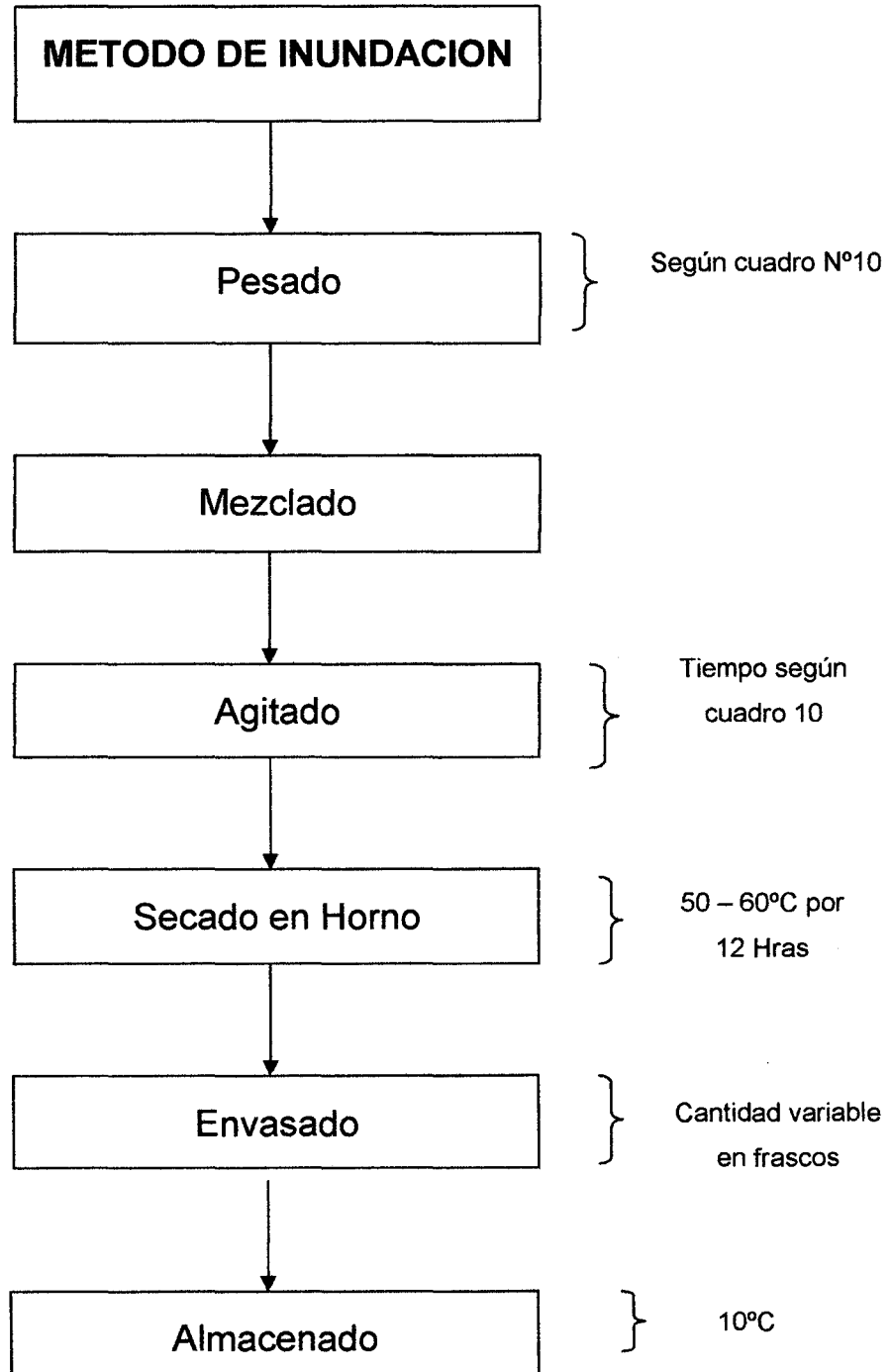


**Figura 08:** Diagrama de flujo de la Preparación de muestra del fruto fresco de *G. americana* para el proceso de extracción del tinte

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).



**Figura 09.** Diagrama de proceso de extracción de colorante del fruto de *G. americana* por el método de percolación.  
**Fuente:** Elaboración propia, (2014).



**Figura 10.** Diagrama de proceso de extracción de colorante del fruto de *G. americana* por el método de inundación.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

### 3.2.3 Caracterización Física y Química del Fruto de *G. americana*

Las metodologías de análisis física y químicas del fruto se presentadas a continuación.

#### 3.2.3.1 Análisis Proximal de Fruto de Huito

**Humedad:** método gravimétrico según AOAC 20014 y NTP-ISO 6496-20025. Fundamento: Pérdida de Peso de la muestra en la estufa a 110°C hasta peso constante.

**Proteínas:** Método de Kjeldahl (AOAC, 2001) Digestión de proteínas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Q.P. y catalizadores transformándose el nitrógeno orgánico en amoníaco que se destila y se titula con una solución ácida normalizada.

**Carbohidratos:** Método: Matemático (AOAC, 2001) Aplicado por Torres y Zeballos. Fundamento: se obtiene por diferencia al restar al total 100% la suma de los cuatro macronutrientes restantes (proteína, extracto etéreo, cenizas, humedad) utilizando la fórmula.

#### 3.2.4 Estrategia para el Montaje del prototipo de extracción por Percolación e Inundación.

- ❖ Desarrollo del diseño a escala banco del módulo UAE.
- ❖ Montaje y puesta en marcha.

##### 3.2.4.1 Estrategia para el Modelamiento Matemático del Proceso Propuesto

- ❖ Transferencia de los pigmentos contenidos en la matriz vegetal a la fase líquida (solvente), se considera tres fases: i) Difusión del solvente en la matriz sólida; ii) Difusión y convección de solutos al medio; y iii) Transferencia de masa de la interfase a la corriente de solvente.
- ❖ Desarrollo de los modelos matemáticos basado en el método de Diseños experimentales de superficie respuesta.
- ❖ Análisis del modelo utilizando el programa computacional StatSoft STATISTICA Ver. 10.0. La matriz de diseño para la extracción por percolación e inundación se muestran en las tablas 10 y 18 respectivamente.

### 3.2.4.2 Métodos para Análisis Físico-químico de Colorantes Naturales

1. Determinación de Humedad: Método basado en la co-distilación del material en un aparato modificado tipo Clevenger utilizando solventes orgánicos. Así mismo se utilizará el Método oficial de la AOAC, Da 2b-42, para determinar humedad en productos conteniendo sustancias volátiles.
2. Mediciones de densidad de según la norma NF T 75-111. Utilizando el densímetro Anton Para Modelo DMA23N y con Método picnométrico, vol. 5 ml a una temperatura de 20 ° C
3. Medición de índice de refracción según la norma NF T 75-112. El uso de un refractómetro de Abbe Prisma - CETI convexo.
4. Medición miscibilidad con etanol por la norma NF T 75-101. La miscibilidad de los aceites esenciales de *Lippia alba*, determinado con etanol puro al 70 - 90%. Las soluciones de etanol se preparan a partir de etanol absoluto, el 99% de pureza.
5. Identificación de Componentes por Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Después de la obtención de los extractos se realizará la cromatografía de capa fina para la observación comparativa de la composición total de extractos observados con la ayuda de una luz indicadora visible y la presencia de ultravioleta:

*a. a la luz visible:*

- Silica gel 60 placa (20 × 20 cm, 1 mm de altura, Merck)
- Fase móvil que consiste en 80% de hexano (96% de pureza, PA, Merck) y acetato de etilo 20% (99,5% de pureza, PA, Merck)
- Desarrollador: solución de anisaldehído (10% de ácido acético glacial, ácido sulfúrico, 5%, 85% de metanol y 0,5% anisaldehído) y se calienta en plancha eléctrica a 100 ° C para la revelación de las sustancias.

*b. a la luz ultravioleta:*

- Silica gel 60 F254 placa (20 × 20 cm, 1 mm de altura, Merck)
- Fase móvil compuesta de cloroformo 94% (99,4% de pureza, PA, Merck), 5% de etanol (99,8% de pureza, PA, Merck) y acetato de etilo etilo 1% (99,5% de pureza, PA, Merck) (Wagner et al, 1983).

- Fase móvil compuesta de cloroformo 89% (99,4% de pureza, PA, Merck,) y acetato de etilo 11% (99,5% de pureza, PA, Merck) (Harborne et al, 1975).
- Desarrollador: 1% de 2-aminoetil difenilborinato (Sigma, lote 123k2512) en metanol (Socaciu C., (2008)).

#### 6. Cuantificación de Genipapo por espectrofotometría UV-visible.

Para la cuantificación de la mezcla de Genipapo utilizando espectrofotómetro UV/Visible (Hitachi modelo U-3010, Tokio, Japón) y una curva de calibración se construye con genipina como patrón: genipin ( $\geq 98\%$  (HPLC), poder, Sigma Aldrich, CAS-No.: 6902-77-8, Formula Química: Methyl (1S,2R,6S)-2-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-diene-5-carboxylate) concentraciones de 0,13 a 1,44 mg/ml de solución.

Se lleva a cabo el escaneo de una solución de etanol (etanol - 99,8% de pureza, PA, Merck) estándar de concentración de 1,44 mg/ml en la región de 400 a 500 nm, con el fin de elegir la longitud de onda de máxima absorbancia. Por lo tanto, se estable las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 426 nm. El contenido de Genipina se calcula por interpolación de la curva estándar de Genipapo, con datos de las lecturas de absorbancia obtenidos para el extracto diluido en etanol.

### 3.2.4.3 Aislamiento de pigmentos

#### 3.2.4.3.1 Extracción Soxhlet

- Aparato: Equipo Soxhlet de 500 mL, (Anexo, Fig. 43)
- Solvente: etanol 50%, 90 %, Hexano, Benceno.
- Repeticiones: 03 para cada muestra.
- Peso de muestra en cada replicación: 10 g de fruto previamente secado y particulado de Huito.

El extracto se prepara por extracción de 10 g de la cúrcuma en polvo con 70% de etanol (30 ml) usando un aparato de Soxhlet hasta que el agente de extracción era incoloro. El extracto se filtra y el filtrado se concentra y se evapora bajo la misma condición como se ha descrito antes y se almacena para inyección para HPLC. El experimento se realizó por triplicado. Se determina el rendimiento.

### **3.2.4.3.2 Percolación**

- Aparato: Extractor tipo tanque percolado, cap. 250 mL.
- Solvente: etanol 50%, 90 %.
- Repeticiones: 03 para cada muestra.
- Peso de muestra en cada replicación: 10 g defruto previamente secado y particulado de Huito.

El polvo seco (10 g) se extrae con 70% de etanol a temperatura ambiente según el diseño experimental. El extracto se filtra a través de Whatman no. Un papel de filtro. Otras porciones del disolvente se añadieron a los sólidos y se repite la extracción hasta que el agente de extracción quede incoloro. Los extractos se combinan y filtran. Los filtrados son concentrados bajo presión reducida a 50 °C usando un evaporador rotatorio. El extracto en bruto se calenta entonces en un baño de agua hirviendo hasta obtener peso constante y se almacena para análisis por espectroscopía UV-Vis. El experimento se replica tres veces. Se determina el rendimiento total en genipina obtenida.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Caracterización Físico – Química del Fruto de *G. americana*

En el Anexo, Fig. 38, se presenta la identificación botánica del árbol de Huito, corroborándose que se trata de la *Genipa americana* L., familia de la Rubiaceae. Las muestras han provenido del Bosque Terraza Alta, Santa Teresa Km 8 Carretera Puerto Maldonado – Iberia, tal como se muestra en la Fig. 07.

Así mismo, en el Cuadro 05 y 06, se presentan los resultados del análisis proximal del fruto fresco de la *G. americana* y distribución de cascara semilla y fruto.

**Cuadro 05.** Análisis proximal del fruto fresco de la *G. americana* L. (por cada 100 g de pulpa)

Análisis	Resultados
Humedad (g)	81.3± 0.05
Proteínas (g)	15.1± 2.3
Lípidos (g)	11.1±0.1
Carbohidrato (g)	70.9

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

Los resultados encontrados son comparables con datos publicados por *Tenesaca, S. 2011*, por ejemplo, con la misma base de cálculo, el % de humedad obtenido es de 81.3 que nos indica que nuestros resultados se encuentra dentro del rango de % de humedad (77-83%) hallados por *tenesaca, s. 2011*.

### 4.2 Pre-tratamiento de la Muestra de *G. americana*

Del proceso de pre-tratamiento, siguiendo las etapas descritas en el anexo 40, con tres repeticiones, el fruto de *G. Americana* está constituido de 17.71 % de cascara, 47.99 % de semilla y 34.30 % de pulpa, tal como se muestra en el cuadro 06.

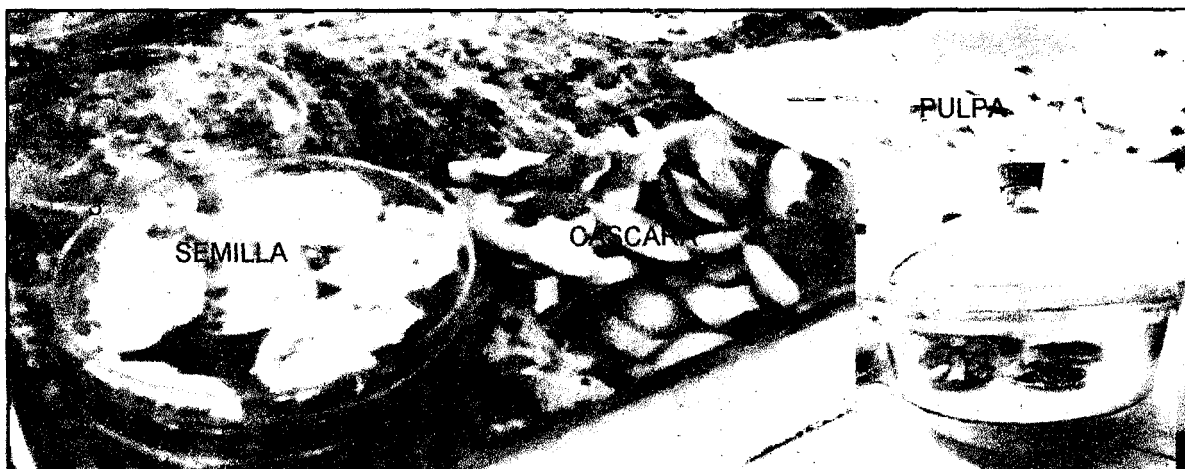
**Cuadro 06.** Distribución de Cáscara, semilla y pulpa en el fruto de *G. americana*

Descripción	Peso b/s (g)	%
Cáscara	16.43	17.71
Semilla	44.53	47.99
Pulpa	39.04	34.30

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).



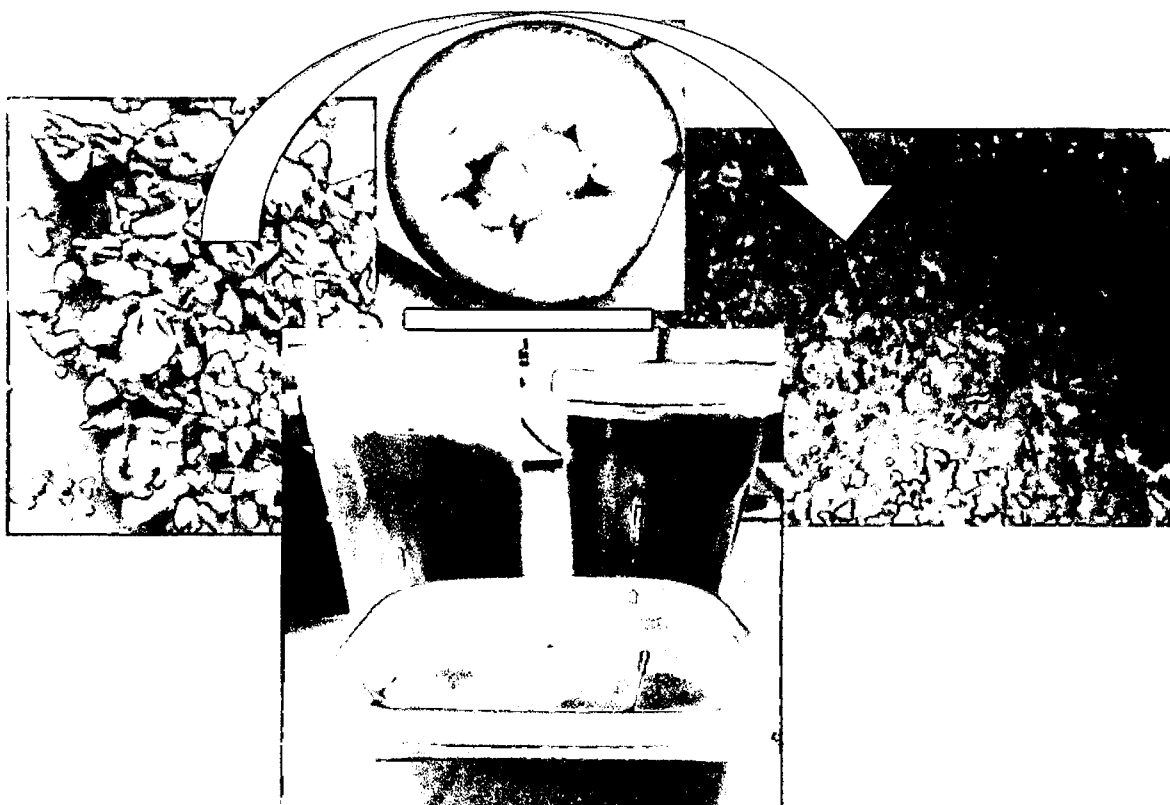
Podemos apreciar que el 39.04 % en base seca, de la muestra está contenido de pulpa, utilizado en la tesis como fuente de colorante. Los otros constituyentes (cáscara y semilla) pueden tener otros usos, dando así un valor agregado a todo el fruto. En la Figura 11, se muestra las partes constitutivas del fruto de *G. americana*.



**Figura 11.** Partes constitutivas del Fruto de *G. americana*.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

Según recomendaciones de Qu *et al.*, 2010; Cissé *et al.*, 2012; Herodez *et al.*, 2003; Hojnik *et al.*, 2008, el tamaño de partícula de las muestras tienen un efecto en la cinética de extracción de metabolitos por inundación y percolación; por tanto, fue necesario deshidratar la pulpa fresca en un secador convectivo a una temperatura promedio de 50 °C, por un lapso de 2 a 4 horas, tal como se muestra en la Fig. 12, se puede apreciar que, la coloración de la pulpa fresca (colore crema a verde claro) ha cambiado a un color azul durante el período de secado, así mismo las muestras particuladas han tenido una coloración de gris a azul. Indicativos que durante el proceso térmico de secado hubo cambio en la composición de componentes cromóforos propios del fruto de la *G. americana*.



**Figura 12.** Muestras de fruto de *G. americana*, antes y después del proceso de secado. Así mismo, muestras molidas y tamizadas.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

Esta observación se puede corroborar con lo establecido por Shirley M. Tenesaca 2012. En la Figura 12, se aprecia la diferencia de coloración de los frutos frescos y secos de la *G. americana*, así como las muestras preparadas para la siguiente etapa, extracción de colorantes.

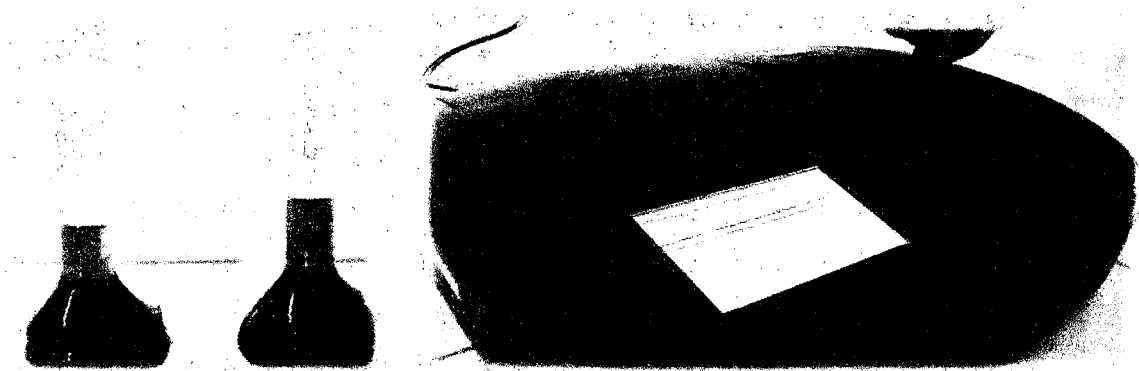
#### 4.3 Curva Patrón para Análisis de Concentración de Colorante

La concentración de colorante obtenido se ha evaluado utilizando como patrón el Indigo Blue de grado analítico, para ello se preparó una curva patrón de la concentración (mg/L) y el % de absorbancia medida por espectrofotometría UV/Vis, a una longitud de onda  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . La curva patrón tiene una tendencia lineal, Fig. 14. Los parámetros del modelo lineal fueron: 0.7129 y 16.718 de la pendiente e intercepto respectivamente, con un coeficiente de determinación  $t$  ajustada del 99.67 %, que nos indica un buen ajuste y mínima desviación. La ecuación 3.1 representa el modelo de ajuste, así mismo, en el Cuadro 09, se presenta el análisis de varianza de los datos presentados.

**Cuadro 07.** Concentración y % Absorbancia solución Patrón

Concentración, (mg/L)	Absorbancia (%)	Parámetros	C <sub>Predecido</sub> (mg/L)
70.0	4.10	0.7129	69.8871
60.0	3.50	16.8718	59.7641
50.0	2.90		49.641
40.0	2.40		41.2051
30.0	1.65		28.5513
20.0	1.25		21.8026
10.0	0.50		9.1488

Fuente: Elaboración propia, (2014).

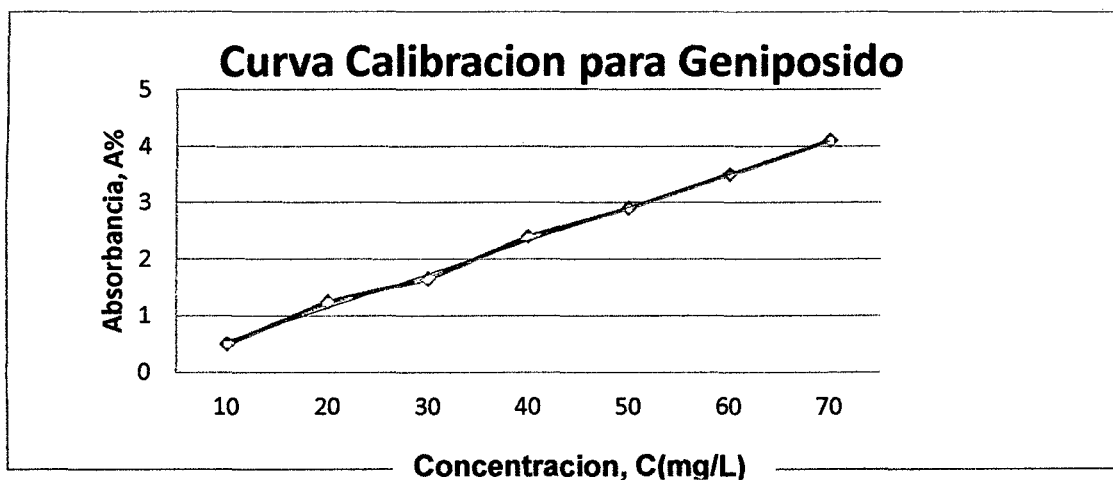
**Figura 13.** Solución Patrón de Indigo Blue y determinación de curva patrón

Fuente: Elaboración propia, (2014).

$$C = 0.7129 + 16.8718 A \quad (3.1)$$

Donde: C, concentración en mg/L

A, Absorbancia en %

**Figura 14.** Curva de Calibración

Fuente: Elaboración propia, (2014).

**Cuadro 08.** Coeficiente de determinación y Coeficiente de Ajuste del Modelo Matemático para Concentración Vs % Absorbancia

R	$R_{sq}$	$R_{Adj}$	Standard Error of Estimate	
0.9986	0.9972	0.9967	1.2428	
Coefficient		Std. Error	T	P
$b_1$	0.7129	1.0365	0.6878	0.5222
$b_0$	16.8718	0.3968	42.5198	<0.0001

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

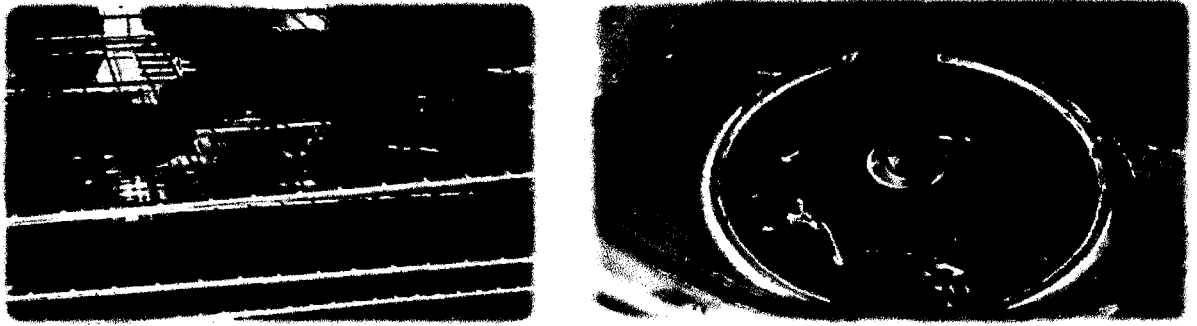
**Cuadro 09.** Análisis de Varianza para el Ajuste de Curva Patrón Concentración Vs % Absorbancia

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	1	2792.278	2792.278	1807.937	<0.001
Residual	5	7.722	1.544		
Total	6	2800.000	466.667		

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

#### 4.4 Extracción por Inundación de los Colorantes de la *G. americana*

Basado en la matriz del diseño experimental, presentado en el Cuadro 09, se llevó a cabo el trabajo experimental, utilizando muestras con distintas granulometrías, pH de solución (ajustado con solución de ácido fosfórico), tiempo de operación, razón de masa de solvente a masa de muestra, y concentración de etanol en la solución. Los resultados obtenidos, se presentan en el Cuadro 11 observándose el rendimiento en base seca de colorante obtenido (g colorante/100 g muestra) y la concentración de colorante en el extracto, analizados por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de  $\lambda=254\text{ nm}$ , y comparado con la curva patrón establecido por la Ec. (3.1). Los resultados son la consecución de tres repeticiones encada uno de los datos. En la Fig. 15, se observa los colorantes obtenidos y la evaporación de los solventes después de la extracción.



**Figura 15.** Colorante de *G. americana* obtenido y evaporación de los solventes

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

**Cuadro 10.** Matriz de Resultados para la Extracción por Inundación

N°	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Tamaño Part. (# Malla)	Ratio (Ms/Mm)	Concen. EtOH (%)	Rendimiento (%)	Concentracion (mg/L)
1	8	70	90	40	4	50	13.43	117.67
2	8	70	90	20	8	50	16.99	113.78
3	8	70	60	40	4	70	14.87	164.49
4	8	50	90	20	8	70	16.38	45.46
5	4	70	60	40	8	70	21.38	43
6	8	50	90	40	4	70	17.42	68.82
7	4	70	90	20	4	50	14.44	132.43
8	8	70	60	20	8	70	17.82	51.38
9	8	50	60	40	4	50	14.64	95.73
10	4	50	90	20	4	70	14.81	65.28
11	4	70	60	20	4	70	15.71	104.21
12	8	50	60	20	8	50	16.96	59.17
13	4	50	60	40	8	50	16.77	89.18
14	4	50	90	40	8	70	17.5	34.91
15	4	70	90	40	8	50	15.9	62.04
16	4	50	60	20	4	50	13.67	90.53
17	2.5	60	75	30	6	60	17.86	60
18	9.5	60	75	30	6	60	17.56	75.76
19	6	41.8	75	30	6	60	8.37	64.95
20	6	78.2	75	30	6	60	16.48	82.67
21	6	60	48	30	6	60	15.74	53.76
22	6	60	102	30	6	60	16.44	71.17
23	6	60	75	12	6	60	17.02	66.92
24	6	60	75	50	6	60	16.7	57.92
25	6	60	75	30	2.4	60	9.18	94.74
26	6	60	75	30	9.6	60	18.53	46.54
2.5	6	60	75	30	6	42	17.94	81.75
28	6	60	75	30	6	80	15.75	35.97
29	6	60	75	30	6	60	17.07	67.1
30	6	60	75	30	6	60	16.2	66.75
31	6	60	75	30	6	60	16.48	63.53
32	6	60	75	30	6	60	16.04	64.89

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

En el Cuadro 10, se observa que en el ensayo 05, el rendimiento de la cantidad de colorante obtenido alcanza un 21.38 % (21.38 g colorante/100 g muestra b.s), a las siguientes condiciones operacionales: pH, 4, temperatura, 70 °C, tiempo de operación, 60 min, tamaño de partícula, # malla 40, razón masa solvente: masa muestra, 8 g/g, y concentración de la solución 70 % de etanol. Por otro lado, para el mismo ensayo, podemos apreciar que la concentración en colorante es de 43 ppm, referido al patrón de Indigo Blue. Así mismo, en el ensayo 03, la concentración en colorante es de 164.49 ppm, obtenidos a pH, 8.0, temperatura, 70 °C, tiempo de operación, 60 min, tamaño de partícula, # malla 40, razón masa solvente: masa muestra, 4 g/g, y concentración de la solución 70 % de etanol; indicativo que en medio alcalino se obtiene mayor concentración en colorante, pero que el rendimiento no es el máximo.

#### **4.4.1 Rendimiento de Colorante Extraído**

En el Cuadro 09, se presenta el análisis de varianza, que nos permite evaluar el efecto de los factores y sus interacciones respecto a las variables respuesta del rendimiento de colorante obtenidos, así como las diferencias significativas de los factores cuando pasan de un nivel inferior a un nivel superior, utilizando para ello el test de Fisher (F) y el valor de probabilidad (p) para un nivel de significancia del 95 %. El tiempo de operación, la razón masa solvente: masa muestra y el pH de la solución son las variables que tienen un efecto significativo al pasar de un nivel inferior a uno superior en el rendimiento del colorante extraído, así mismo, las interacciones cuadráticas de pH, tiempo de operación, razón masa solvente a masa muestra, concentración de etanol en la solución, y las interacciones de variables como  $z_1z_4$ ,  $z_2z_3$ ,  $z_3z_5$ ,  $z_3z_6$ ,  $z_4z_6$ . Estas apreciaciones se corroboran en la Figura 16 de diagrama de Pareto.

**Cuadro 11. ANOVA para evaluar el rendimiento de la extracción de colorante de la G. americana por inundación (Diseño compuesto central)**

ANOVA; Var.:Rendimiento; R-sqr=.97829; Adj.:90385 (6 factor central composite, nc=16 ns=12 n0=2 Runs=30 in Innundation) 6 factors, 1 Blocks, 32 Runs; MS Residual=.5661852; DV: Rendimiento: g Mc/100 g	SS	Df	MS	F	p
<b>Z<sub>1</sub>: pH</b>	0.2188	1	0.21876	0.41393	0.540479
<b>Z<sub>1</sub><sup>2</sup>: (pH)<sup>2</sup></b>	9.4613	1	9.46127	17.90243	0.003883
<b>Z<sub>2</sub>: Temperatura Operación</b>	32.8860	1	32.88605	62.22632	0.000100
<b>Z<sub>2</sub><sup>2</sup>: (Temperatura Operación)<sup>2</sup></b>	20.1745	1	20.17450	38.17378	0.000455
<b>Z<sub>3</sub>: Tiempo Operación</b>	0.2450	1	0.24500	0.46358	0.517835
<b>Z<sub>3</sub><sup>2</sup>: (Tiempo Operación)<sup>2</sup></b>	0.4953	1	0.49533	0.93725	0.365236
<b>Z<sub>4</sub>: Tamaño Particula</b>	0.1882	1	0.18825	0.35620	0.569416
<b>Z<sub>4</sub><sup>2</sup>: (Tamaño Particula)<sup>2</sup></b>	2.9640	1	2.96397	5.60836	0.049738
<b>Z<sub>5</sub>: Ratio Ms/Mm</b>	43.6926	1	43.69255	82.67417	0.000040
<b>Z<sub>5</sub><sup>2</sup>: (Ratio Ms/Mm)<sup>2</sup></b>	6.0974	1	6.09744	11.53745	0.011494
<b>Z<sub>6</sub>: Concentracion Etanol</b>	3.0473	1	3.04731	5.76605	0.047378
<b>Z<sub>6</sub><sup>2</sup>: (Concentracion Etanol)<sup>2</sup></b>	3.1221	1	3.12211	5.90759	0.045384
<b>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub></b>	3.0250	1	3.02499	5.72383	0.047996
<b>Z<sub>1</sub>Z<sub>3</sub></b>	1.4430	1	1.44300	2.73042	0.142434
<b>Z<sub>1</sub>Z<sub>4</sub></b>	7.8122	1	7.81220	14.78208	0.006335
<b>Z<sub>1</sub>Z<sub>5</sub></b>	1.1472	1	1.14716	2.17063	0.184157
<b>Z<sub>1</sub>Z<sub>6</sub></b>	1.0832	1	1.08316	2.04953	0.195349
<b>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub></b>	10.6623	1	10.66230	20.17499	0.002826
<b>Z<sub>2</sub>Z<sub>4</sub></b>	0.9482	1	0.94819	1.79414	0.222276
<b>Z<sub>2</sub>Z<sub>5</sub></b>	2.6937	1	2.69370	5.09697	0.058534
<b>Z<sub>2</sub>Z<sub>6</sub></b>	1.1693	1	1.16926	2.21244	0.180499
<b>Z<sub>3</sub>Z<sub>5</sub></b>	3.3828	1	3.38284	6.40094	0.039232
<b>Z<sub>3</sub>Z<sub>6</sub></b>	20.2391	1	20.23910	38.29601	0.000450
<b>Z<sub>4</sub>Z<sub>6</sub></b>	3.7782	1	3.77816	7.14897	0.031826
<b>Error</b>	3.6994	7	0.52849		
<b>Total SS</b>	182.5451	31			

Fuente: Elaboración propia, (2014).

Un valor de 97.829 % en el Coeficiente de Determinación y de un 90.385 % en el Coeficiente de Determinación del modelo ajustado, es bueno, indicativo que un 2.171 % del espectro de datos se desvían del modelo propuesto; por tanto el modelo matemático Ec. (3.1), se puede utilizar para navegar por el espacio de diseño. Así mismo, un valor de MS Residual de 0.52849, es un indicativo de que el modelo ajusta adecuadamente los datos experimentales.

**Cuadro 12.** Coeficiente de Regresión Ajustado para el Rendimiento de Colorante Extraído

	Regressn - Coeff.	Std.Err.	t(7)	P	-95.% - Cnf.Limt	+95.% - Cnf.Limt
Mean/Interc.	26.30951	21.1807	1.24214	0.254183	-23.7751	76.39407
$Z_1$ : pH solución	-1.88021	1.27906	-1.47000	0.185023	-4.9047	1.14428
$Z_1^2$ : (pH solución) <sup>2</sup>	0.16186	0.04016	4.03061	0.004992	0.0669	0.25682
$Z_2$ : Temperatura Operación	1.87679	0.34800	5.39309	0.001016	1.0539	2.69967
$Z_2^2$ : (Temperat. Operación) <sup>2</sup>	-0.00948	0.00161	-5.89826	0.000601	-0.0133	-0.00568
$Z_3$ : Tiempo Operación	-0.30574	0.23049	-1.32649	0.226315	-0.8508	0.23927
$Z_3^2$ : (Tiempo Operación) <sup>2</sup>	0.00073	0.00073	1.00875	0.346685	-0.0010	0.00245
$Z_4$ : Tamaño Partícula	-0.76514	0.21502	-3.55849	0.009238	-1.2736	-0.25670
$Z_4^2$ : (Tamaño Partícula) <sup>2</sup>	0.00354	0.00150	2.35495	0.050717	-0.0000	0.00710
$Z_5$ : Ratio Msolvente:Mmuestra	3.51999	1.03222	3.41011	0.011286	1.0792	5.96081
$Z_5^2$ : (Ratio Msolvente:Mmuestra) <sup>2</sup>	-0.13115	0.04087	-3.20924	0.014874	-0.2278	-0.03452
$Z_6$ : Concentración Etanol	-1.91107	0.34014	-5.61854	0.000800	-2.7154	-1.10678
$Z_6^2$ : (Concentración Etanol) <sup>2</sup>	0.00363	0.00150	2.41518	0.046419	0.0001	0.00719
$Z_1Z_2$	-0.02174	0.00941	-2.31144	0.054072	-0.0440	0.00050
$Z_1Z_3$	0.01001	0.00627	1.59645	0.154420	-0.0048	0.02484
$Z_1Z_4$	0.06507	0.01752	3.71456	0.007510	0.0236	0.10650
$Z_1Z_5$	-0.12154	0.08492	-1.43114	0.195480	-0.3224	0.07928
$Z_1Z_6$	-0.01301	0.00941	-1.38314	0.209127	-0.0353	0.00923
$Z_2Z_3$	-0.00985	0.00226	-4.34733	0.003366	-0.0152	-0.00449
$Z_2Z_4$	-0.00243	0.00188	-1.29410	0.236687	-0.0069	0.00201
$Z_2Z_5$	0.02052	0.00941	2.18120	0.065525	-0.0017	0.04276
$Z_2Z_6$	0.00504	0.00350	1.43706	0.193854	-0.0032	0.01332
$Z_3Z_5$	-0.01533	0.00627	-2.44434	0.044475	-0.0302	-0.00050
$Z_3Z_6$	0.01386	0.00232	5.97883	0.000554	0.0084	0.01934
$Z_4Z_6$	0.00486	0.00188	2.58322	0.036302	0.0004	0.00931

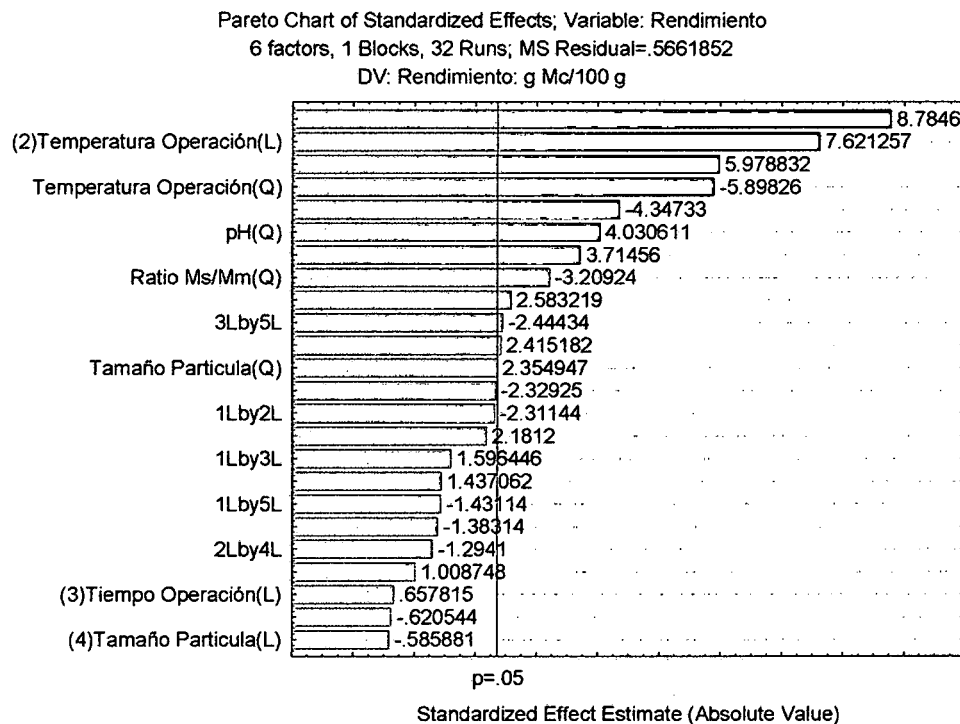
Fuente: Elaboración propia, (2014).



En la figura N° 16 se representa el Diagrama de Pareto de los Efectos estandarizados para el rendimiento de colorante de *G. americana* extraído por inundación.

Por lo tanto el modelo polinomial que representa el comportamiento del rendimiento en la extracción de colorante de *G. americana*, se establece en la Ec. (3.1).

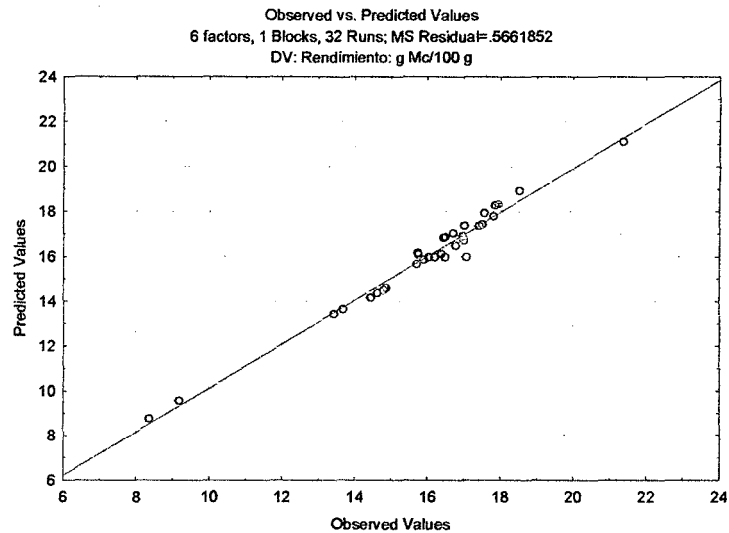
$$\begin{aligned}
 y = & 26.31 - 1.88 z_1 + 1.8768 z_2 - 0.3057 z_3 - 0.7651 z_4 + 3.52 z_5 - 1.911 z_6 + 0.1619 z_1^2 \\
 & - 0.0095 z_2^2 + 0.00073 z_3^2 + 0.00354 z_4^2 - 0.1312 z_5^2 + 0.0036 z_6^2 - 0.0217 z_1 z_2 + 0.01 z_1 z_3 \\
 & + 0.065 z_1 z_4 - 0.1215 z_1 z_5 - 0.013 z_1 z_6 - 0.00985 z_2 z_3 - 0.00243 z_2 z_4 + 0.021 z_2 z_5 \\
 & + 0.00504 z_2 z_6 - 0.0153 z_3 z_5 + 0.01386 z_3 z_6 + 0.00486 z_4 z_6
 \end{aligned} \quad (3.1)$$



**Figura 16.** Diagrama de Pareto de los Efectos estandarizados para el rendimiento de colorante de *G. americana* extraído por inundación

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

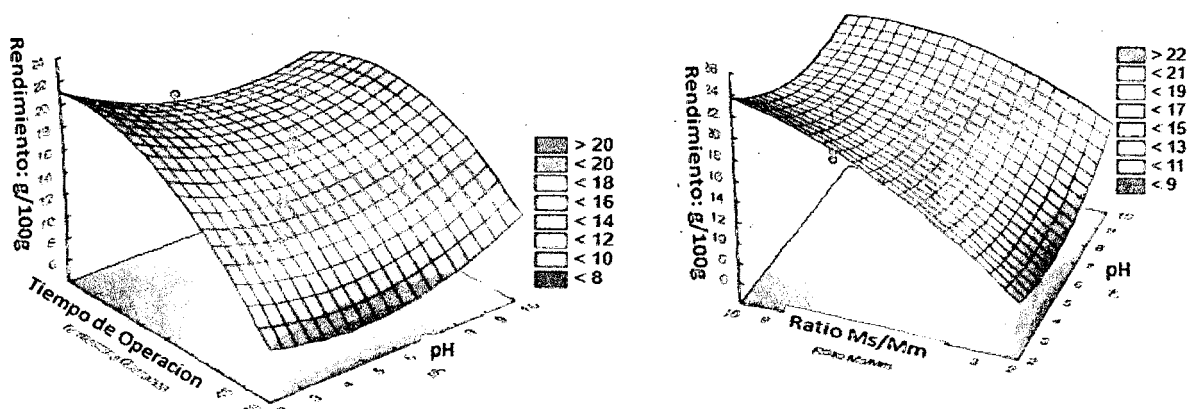
En la Figura 17, se presenta el diagrama de los residuales, observándose que la mayor parte de los puntos están en la curva diagonal, por tanto, el modelo ajusta adecuadamente el comportamiento del sistema.



**Figura 17.** Valores observados y residuales (Statística)  
*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

De los resultados de las superficies respuesta, como se muestra en la Figura 19, podemos indicar que a pH alcalino y temperaturas y tiempos de operación mayores el rendimiento es mayor, así como a tamaños de partícula menores a malla 40, y relaciones de masa de solvente a masa muestra mayores a 8, el rendimiento de colorante de *G. americana* se incrementa, llegando a mayor de 20 %. Estas observaciones corresponden a lo indicado en el Cuadro 09.

Por otro lado, según las apreciaciones de *Franco et al, 2007a; Qu et al., 2010*, el incremento de la relación  $m_s : m_m$  disminuye la barrera de transferencia de masa durante la difusión de los colorantes mejorando el rendimiento en la extracción.



**Figura 18.** Superficie respuesta del efecto del pH, temperatura y tiempo de operación, razón masa solvente: masa muestra, tamaño partícula sobre el rendimiento en colorante extraído.

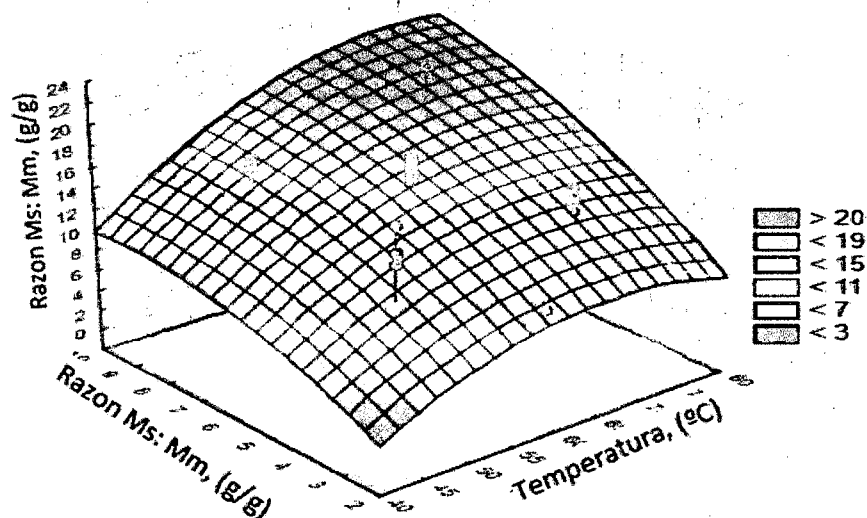
*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

A través de una optimización numérica de búsqueda de un máximo en el rendimiento de colorante extraído a través de un proceso de extracción por inundación, según la función objetivo sin restricciones, se tiene un máximo de 21.5 g de colorante por 100 gramos de muestra utilizada, a las condiciones de pH, temperatura y tiempo de operación, tamaño de partícula, razón masa solvente: masa muestra y concentración de EtOH establecidos en el Cuadro 12. Así mismo, en la Figura 19, se observa la superficie respuesta a las condiciones óptimas según el modelo matemático de la Ec. 3.1 y la función objetivo considerada.

**Cuadro 13.** Condiciones Óptimas Establecidas para Rendimiento de Extracción de Colorante de *G. americana* L.

	Variable	Unid.Med	Criterio	Valor Ópti.
$z_1$	pH	pH	En rango [2.369.6]	10.7
$z_2$	Temperatura de Operación	°C	En rango [41.878.2]	49.68
$z_3$	Tiempo de Operación	Min	En rango [48102]	107.80
$z_4$	Tamaño de Partícula	# malla	En rango [1250]	40.0
$z_5$	Razón $M_S : M_M$	g:g	En rango [2.49.6]	6.03
$z_6$	Concentración EtOH	%	En rango [4280]	45.0
$y_1$	Rendimiento de Colorante Extraído	g/100 g	Maximizar	21.5

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).



**Figura 19.** Superficie respuesta a las condiciones óptimas, maximizando el % rendimiento

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

#### 4.4.2 Concentración de Colorante Extraído

Evaluando el Análisis de Varianza, Cuadro 14, del efecto de los factores y sus interacciones respecto a la concentración del colorante extraído, para un nivel de

significancia de 95 % y  $\alpha=0.05$  , podemos apreciar que la concentración de EtOH y el pH de la solución, y la razón de masa de solvente a masa de muestra, son las variables de operación que tienen un efecto significativo al pasar de un nivel inferior a uno superior en la concentración de colorante extraído, así mismo, las interacciones cuadráticas de temperatura de operación y razón de masas de solvente a muestra. Las interacciones de las variables que han tenido un efecto significativo son el tiempo de operación con tamaño de partícula, razón de masa solvente: muestra, y tiempo de operación con la concentración de Etanol en la solución de extracción. Estas apreciaciones se corroboran en la Figura 20 de diagrama de Pareto.

**Cuadro 14.** ANOVA para evaluar la Concentración de la extracción de colorante de la *G. americana* por inundación (Diseño compuesto central)

ANOVA; Var.:Concentración; R-sqr=.97613; Adj.:.89427 (6 factor central composite, nc=16 ns=12 n0=2 Runs=30 ([No active dataset]) in Innundation) 6 factors, 1 Blocks, 32 Runs; MS Residual=86.33545 DV: Concentración: mg/L	SS	df	MS	F	P
Z <sub>1</sub> : pH	678.2	1	678.2	8.368	0.0201
Z <sub>1</sub> <sup>2</sup> : (pH) <sup>2</sup>	436.4	1	436.4	5.384	0.0488
Z <sub>2</sub> : Temperatura Operación	162.3	1	162.3	2.003	0.1946
Z <sub>2</sub> <sup>2</sup> : (Temperatura Operación) <sup>2</sup>	812.8	1	812.8	10.02	0.0132
Z <sub>3</sub> : Tiempo Operación	151.5	1	151.554	1.869	0.2086
Z <sub>3</sub> <sup>2</sup> : (Tiempo Operación) <sup>2</sup>	155.8	1	155.8	1.923	0.2029
Z <sub>4</sub> : Tamaño Particula	2.37	1	2.366	0.029	0.8685
Z <sub>4</sub> <sup>2</sup> : (Tamaño Particula) <sup>2</sup>	115.6	1	115.6	1.426	0.2665
Z <sub>5</sub> : Ratio Ms/Mm	1161.6	1	1161.62	14.33	0.0053
Z <sub>5</sub> <sup>2</sup> : (Ratio Ms/Mm) <sup>2</sup>	580.68	1	580.68	7.164	0.0280
Z <sub>6</sub> : Concentracion Etanol	3193.50	1	3193.49	39.40	0.0002
Z <sub>6</sub> <sup>2</sup> : (Concentracion Etanol) <sup>2</sup>	62.60	1	62.59	0.772	0.4051
Z <sub>1</sub> Z <sub>2</sub>	846.2	1	846.22	10.44	0.0120
Z <sub>1</sub> Z <sub>4</sub>	286.1	1	286.103	3.530	0.0970
Z <sub>1</sub> Z <sub>6</sub>	311.3	1	311.346	3.841	0.0856
Z <sub>2</sub> Z <sub>4</sub>	114.5	1	114.49	1.412	0.2687
Z <sub>2</sub> Z <sub>5</sub>	1539.7	1	1539.77	18.99	0.0024
Z <sub>2</sub> Z <sub>6</sub>	326.7	1	326.77	4.031	0.0795
Z <sub>3</sub> Z <sub>4</sub>	1612.4	1	1612.42	19.89	0.0021
Z <sub>3</sub> Z <sub>5</sub>	443.3	1	443.31	5.469	0.0475
Error	648.3	8	81.048		
Total SS	25313	31			

Fuente: Elaboración propia, (2014).

Un valor de coeficiente de determinación de 89.427 %, indica que el modelo polinómico de segundo orden con interacciones ajusta adecuadamente a los datos experimentales, con una desviación de 10.57 % del universo de datos.

En el cuadro 15, se presentan el valor de los coeficientes del modelo de segundo orden, y el modelo matemático, Ec. 1.2 en términos de factores naturales.

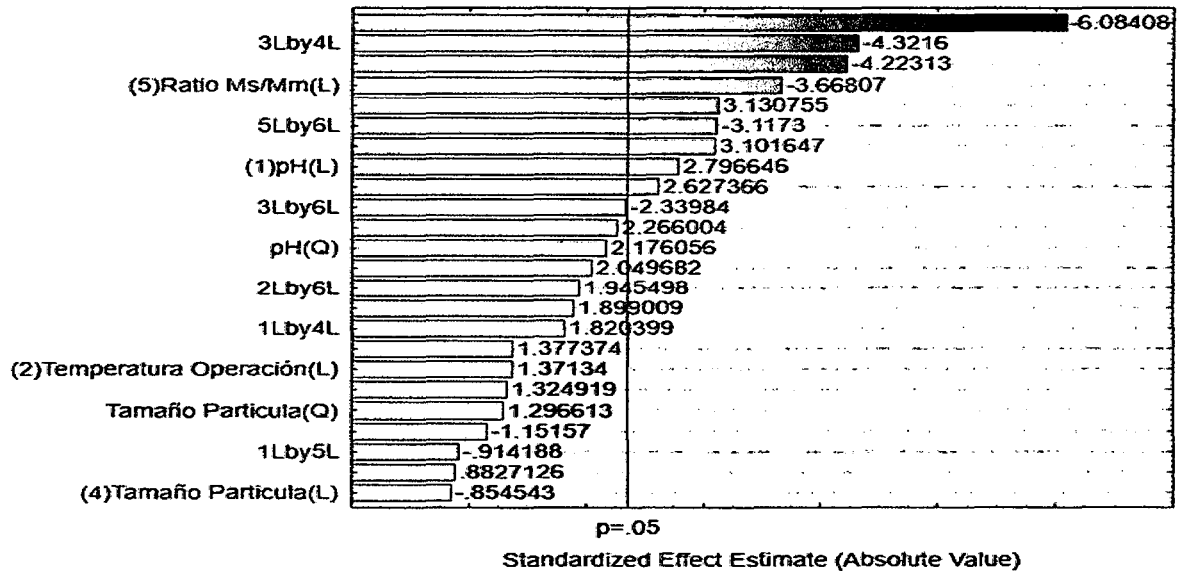
**Cuadro 15. Coeficiente de Regresión Ajustado para la Concentración de Colorante Extraído por Inundación**

	Coeff. Regresión	Error Estánda	T	p	-95.% - Cnf.Limt	+95.% - Cnf.Limt
Mean/Interc.	473.6083	244.655	1.935	0.0941	-104.910	1052.127
$Z_1$ : pH solución	-51.3308	14.688	-3.494	0.0100	-86.063	-16.599
$Z_1^2$ : (pH solución) <sup>2</sup>	1.0791	0.495	2.176	0.0660	-0.094	2.252
$Z_2$ : Temperatura Operación	-10.3766	3.741	-2.773	0.0275	-19.223	-1.530
$Z_2^2$ (Temperatura Operación) <sup>2</sup>	0.0615	0.019	3.1016	0.0172	0.015	0.108
$Z_3$ : Tiempo Operación	3.4417	2.291	1.5020	0.1767	-1.977	8.860
$Z_3^2$ : (Tiempo Operación) <sup>2</sup>	0.0124	0.009	1.3773	0.2108	-0.009	0.034
$Z_4$ :Tamaño Partícula	-0.3393	2.898	-0.117	0.9100	-7.192	6.514
$Z_4^2$ : (Tamaño Partícula) <sup>2</sup>	0.0241	0.018	1.296	0.2358	-0.020	0.068
$Z_5$ : Ratio $M_{\text{solvente}}:M_{\text{muestra}}$	21.1419	14.527	1.455	0.1889	-13.209	55.493
$Z_6$ : Concentración Etanol	-3.7378	4.220	-0.885	0.4051	-13.716	6.241
$Z_6^2$ : (Concentración Etanol) <sup>2</sup>	0.0163	0.0184	0.882	0.4066	-0.027	0.060
$Z_1Z_2$	0.3636	0.1161	3.130	0.0165	0.089	0.638
$Z_1Z_4$	0.3938	0.2163	1.820	0.1115	-0.118	0.905
$Z_1Z_5$	-0.9587	1.0487	-0.914	0.3910	-3.438	1.521
$Z_1Z_6$	0.2206	0.1161	1.899	0.0993	-0.054	0.495
$Z_2Z_4$	-0.0268	0.0232	-1.151	0.2873	-0.082	0.028
$Z_2Z_5$	-0.4905	0.1161	-4.223	0.0039	-0.765	-0.216
$Z_2Z_6$	0.0842	0.0433	1.945	0.0927	-0.018	0.186
$Z_3Z_4$	-0.0669	0.0155	-4.320	0.0034	-0.104	-0.030
$Z_3Z_5$	0.1755	0.0774	2.2660	0.0578	-0.008	0.359
$Z_3Z_6$	-0.0670	0.0286	-2.339	0.0518	-0.135	0.001
$Z_4Z_6$	0.0476	0.0232	2.0496	0.0795	-0.007	0.103

Fuente: Elaboración propia, (2014).

Modelo matemático:

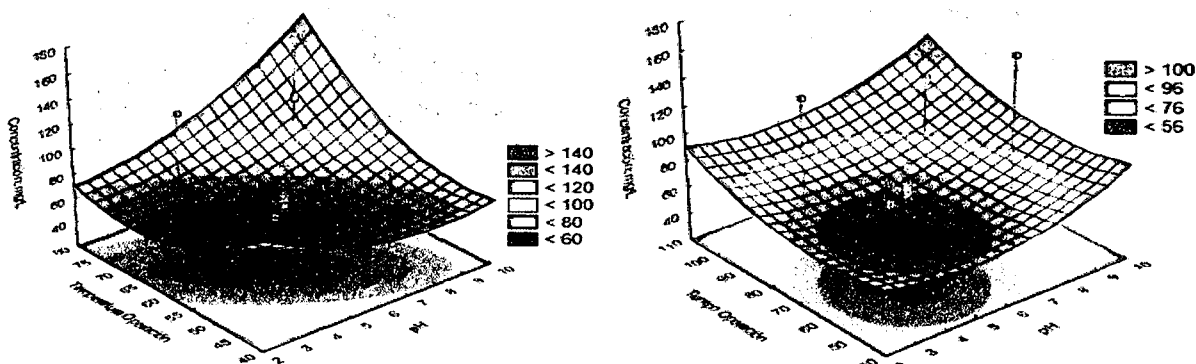
$$\begin{aligned}
 \text{Concentración} = & 494.617 - 51.31 z_1 - 10.30 z_2 + 3.48 z_3 + 0.092 z_4 + 15.60 z_5 - 3.67 z_6 \\
 & + 1.18 z_1^2 + 0.061 z_2^2 + 0.0121 z_3^2 + 0.0213 z_4^2 + 1.309 z_5^2 + 0.0157 z_6^2 \quad (3.2) \\
 & + 0.3636 z_1 z_2 + 0.3938 z_1 z_4 + 0.2206 z_1 z_6 - 0.0268 z_2 z_4 - 0.4905 z_2 z_5 \\
 & + 0.0842 z_2 z_6 - 0.0669 z_3 z_4 + 0.1755 z_3 z_5 - 0.067 z_3 z_6 + 0.0476 z_4 z_6 - 0.3621 z_5 z_6
 \end{aligned}$$



**Figura 20.** Diagrama de Pareto de los Efectos estandarizados en la Concentración de colorante de *G. americana* extraído por inundación

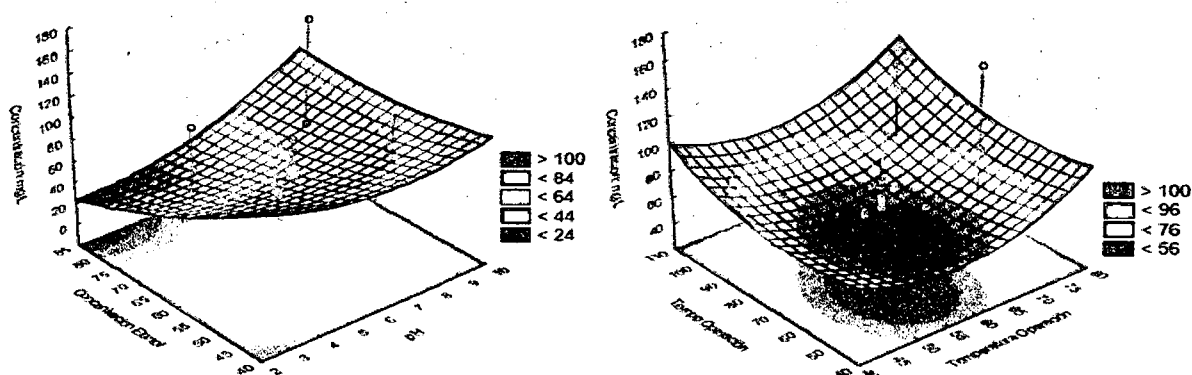
*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

En la Figura 21, se presentan las superficies de respuesta de la variación de la concentración de colorante extraídas (ppm) con respecto a los parámetros operativos cuando cambian de un nivel superior a un nivel inferior, del cual podemos indicar que a pH alcalino y temperaturas y tiempos de operación mayores la concentración de colorante es mayor, Fig. 22, así mismo, a concentraciones de etanol de 40 a 45 % y pH alcalino se tiene mayor concentración de colorante extraído, por otro lado, la interacción de tiempo y temperatura de operaciones influyen en la concentración de colorante, así es que a valores altos de estas dos variables se extrae colorante de *G. americana* con mayor concentración. Estas observaciones corresponden a lo indicado en el Cuadro 09. Según las apreciaciones de Franco et al, 2007a; Qu et al., 2010, el incremento de la relación  $m_s : m_m$  disminuye la barrera de transferencia de masa durante la difusión de los colorantes mejorando el rendimiento y la concentración de colorante extraído de la matriz vegetal.



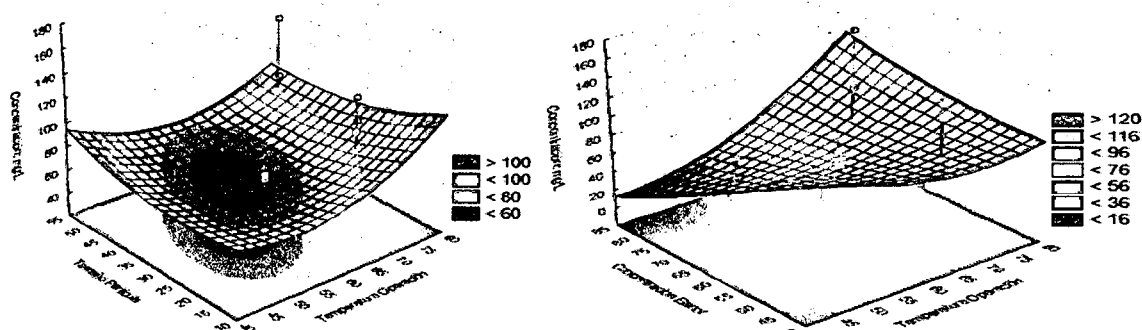
**Figura 21.** Superficie respuesta del efecto de pH, temperatura y tiempo de operaciones en la Concentración de Colorante de *G. americana* Extraído.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).



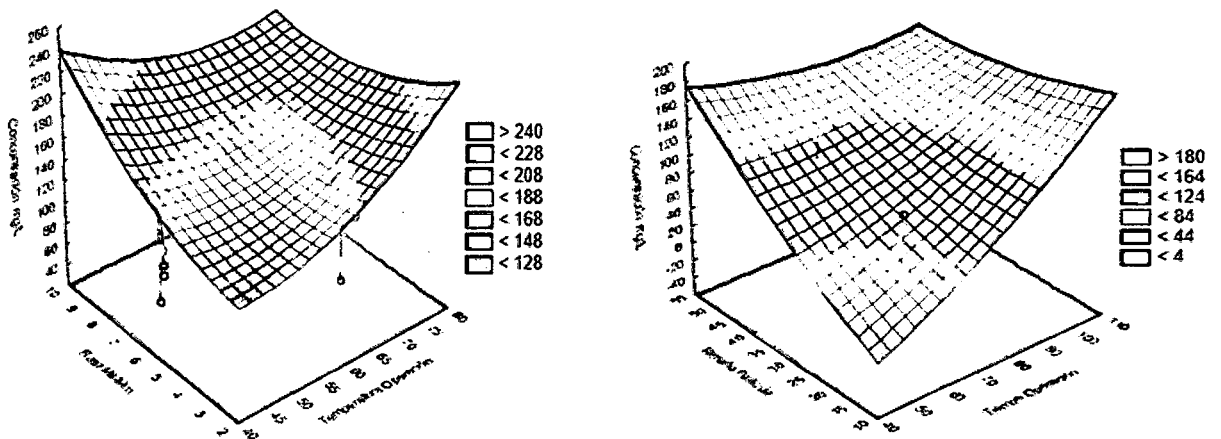
**Figura 22.** Superficie respuesta del efecto de pH, concentración de EtOH y temperatura y tiempo de operaciones en la Concentración de Colorante de *G. americana* Extraído.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).



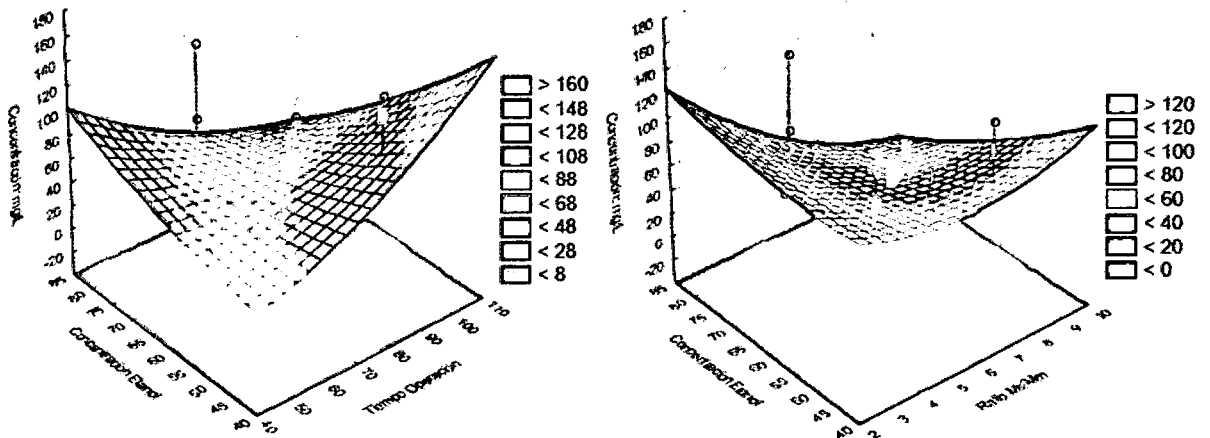
**Figura 23.** Superficie respuesta de la temperatura y tiempo de operaciones, concentración de EtOH y en la Concentración de Colorante de *G. americana* Extraído.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).



**Figura 24.** Superficie respuesta de la temperatura y razón de operaciones, concentración de EtOH y en la Concentración de Colorante de *G. americana* Extraído.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).



**Figura 25.** Superficie respuesta del efecto de  $z_1, z_2, z_3, z_4$  y  $z_5$  en la Concentración de Colorante de *G. americana* Extraído.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

Utilizando optimización numérica de búsqueda de un máximo en la concentración de colorante extraído, según la función objetivo (Ec.3.2) y sin restricciones, se tiene un máximo de 165 ppm de colorante de la *G. americana* a las condiciones de pH, temperatura, tiempo, tamaño de partícula, razón masa solvente: masa muestra y concentración de la solución de EtOH indicadas en el Cuadro 16, con un factor de deseabilidad de 91.3 %. Así mismo, en la Figura 26, se observa la superficie de contorno a las condiciones óptimas según el modelo matemático de la Ec. 3.2 y la función objetivo considerada.

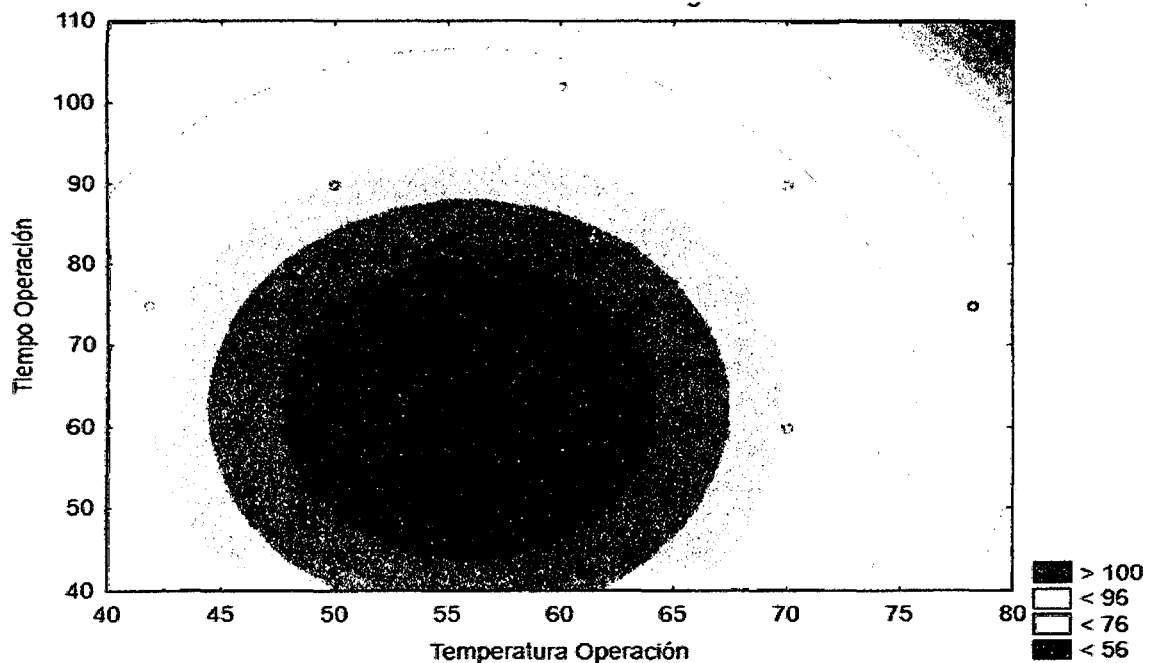


**Cuadro 16.** Condiciones Óptimas Establecidas para la Concentración de Colorante Extraído de la *G. americana* L.

	Variable	Unidad Medina	Criterio	Valores Óptimos
$z_1$	pH	pH	En rango [2.369.6]	10.7
$z_2$	Temperatura de Operación	°C	En rango [41.878.2]	49.68
$z_3$	Tiempo de Operación	Min	En rango [48102]	107.80
$z_4$	Tamaño de Partícula	# malla	En rango [1250]	40.0
$z_5$	Razón $M_S : M_M$	g:g	En rango [2.49.6]	6.03
$z_6$	Concentración EtOH	%	En rango [4280]	45.0
$y_1$	Concentración Colorante Extraído	Ppm	Maximizar	165.0

**Fuente:** Elaboración propia, (2014).

Utilizando optimización numérica de búsqueda de un máximo en la concentración de colorante extraído, según la función objetivo (Ec.3.2) y sin restricciones, se tiene un máximo de 165 ppm de colorante de la *G. americana* a las condiciones de pH, temperatura, tiempo, tamaño de partícula, razón masa solvente: masa muestra y concentración de la solución de EtOH indicadas en el Cuadro 15, con un factor de deseabilidad de 91.3 %. Así mismo, en la Figura 26, se observa la superficie de contorno a las condiciones óptimas según el modelo matemático de la Ec. 3.2 y la función objetivo considerada.

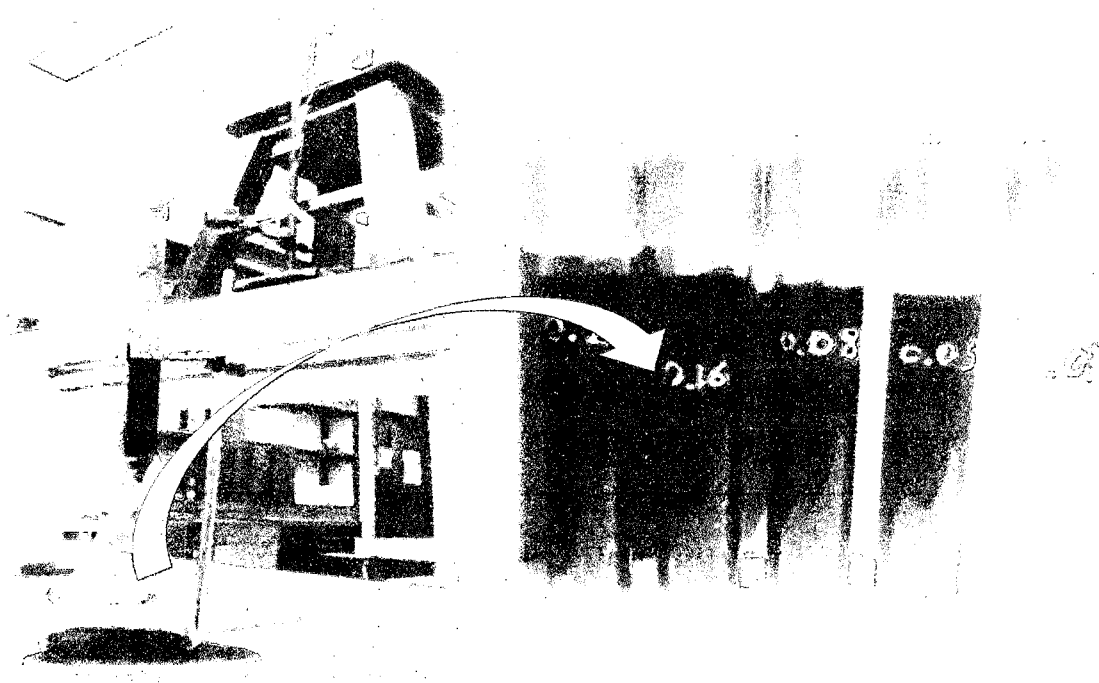


**Figura 26.** Superficie de contorno de las condiciones óptimas, maximizando la concentración de Colorante extraído de la *G. americana*

**Fuente:** Elaboración propia, (2014).

#### 4.5 Extracción por Percolación del Colorante de la *G. americana*

Una de los métodos para la extracción de metabolitos secundarios es por percolación, operación en el que solvente fluye a través de una matriz empacada en una columna, y los solutos (colorante) contenidos en la matriz vegetal se disuelven y transfieren al solvente, arrastrando por tanto hacia el exterior del equipo a través del flujo convectivo del fluido. Este mecanismo se ha llevado a cabo en un equipo de percolación en el que el flujo (mL/min) de solvente se ha controlado con un sistema de alimentación semi-automática, el tamaño de partícula seleccionada a través de un banco para tamizado. En la Figura 27 se presenta el equipo utilizado.

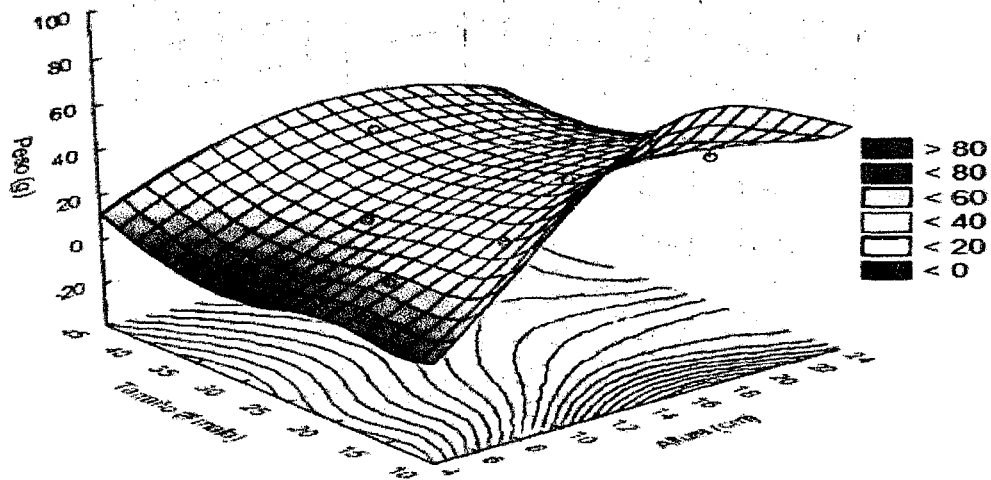


**Figura 27.** Equipo para extracción por percolación y muestras extraídas de colorante de *G. americana* en periodos de tiempo definidos.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

##### 4.5.1 Establecimiento de la Relación Altura Columna – Tamaño Partícula

En la Fig. 28, se visualiza la variación de la cantidad de muestra (g) empacado en la columna en función a la altura de la columna y tamaño de partículas establecidas en la matriz de diseño del Cuadro 18. Esta relación se expresa a través de un modelo matemático de segundo orden, Ec. 3.3. La representatividad del modelo con los datos experimentales, a un nivel de significancia de 95 % y  $\alpha=0.05$ , podemos apreciar en el Cuadro 17. Donde las dos variables y sus interacciones, tienen el efecto significativo en la cantidad de muestra empacada en la columna.



**Figura 28.** Gráfica 3-D, peso de muestra en relación a la altura de relleno y tamaño de partícula

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

En el Cuadro 17, se indican los coeficientes del modelo matemático, así mismo el coeficiente de determinación de 86.607 % es un indicativo la representatividad de la ecuación polinómica, Ec. 3.3.

**Cuadro 17.** Coeficientes de Regresión para Relación Altura Relleno (cm), Tamaño Partícula (# malla) y Peso Muestra (g)

Regr. Coefficients; Var.:Peso (g); R-sqr=.86607; Adj.:83695 (Spreadsheet39) 2 factors, 1 Blocks, 29 Runs; MS Residual=24.45069 DV: Peso (g)						
Factor	Regressn - Coeff.	Std.Err.	t(23)	P	-95.% - Cnf.Limt	+95.% - Cnf.Limt
$b_0$	6.14401	20.43695	0.30063	0.766395	-36.1330	48.42106
$z_1$	9.38172	1.72211	5.44781	0.000015	5.8193	12.94417
$z_1^2$	-0.21560	0.05157	-4.18090	0.000359	-0.3223	-0.10892
$z_2$	-3.32404	1.11551	-2.97985	0.006700	-5.6316	-1.01644
$z_2^2$	0.06465	0.01975	3.27340	0.003337	0.0238	0.10550
$z_1 z_2$	-0.05680	0.03453	-1.64511	0.113547	-0.1282	0.01462

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

Donde,

$z_1$  , altura de relleno del soluto en la columna, (cm)

$z_2$  , Tamaño de partícula del soluto, (# malla)

Modelo matemático:

$$y = 6.144 + 9.382 z_1 - 3.324 z_2 - 0.2156 z_1^2 + 0.06465 z_2^2 - 0.0568 z_1 z_2 \quad (3.3)$$

**Cuadro 18.** Valores ANOVA Establecidas para relacionar Altura Relleno (cm), Tamaño Partícula (# malla) y Peso Muestra (g)

	SS	df	MS	F	p
$x_1$ : Altura (cm)	1362.381	1	1362.381	55.71951	0.000000
$x_1^2$ : Altura (cm)	427.396	1	427.396	17.47993	0.000359
$x_2$ Tamaño (# malla)	1457.129	1	1457.129	59.59458	0.000000
$x_2^2$ : Tamaño (# malla)	261.992	1	261.992	10.71513	0.003337
$x_1 x_2$ Altura * Tamaño	66.173	1	66.173	2.70638	0.113547
Error	562.366	23	24.451		
Total SS	4198.802	28			

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

#### 4.5.2 Rendimiento de Colorante Extraído por Percolación

En el Cuadro 18, se observa la matriz de los resultados experimentales según el diseño compuesto central, considerando cinco variables independientes,  $z_1$ : flujo de solvente (mL/min),  $z_2$ : Altura de relleno (cm),  $z_3$ : pH solución,  $z_4$ : Concentración de Etanol en la solución (%), y  $z_5$ : Tamaño de partícula (# malla). Podemos indicar que en el ensayo 13, la concentración de colorante fue de 10.63 g/100 muestra, a las condiciones:  $z_1$ : 30 mL/min,  $z_2$ : 20 cm,  $z_3$ : pH 8.0,  $z_4$ : 50 % EtOH y  $z_5$ : # malla 30. Los puntos centrales tienen concentraciones de 6.89, 6.73 y 6.49 respectivamente, con una media de 6.70 g/100 g.

**Cuadro 19. Matriz de Resultados para la Extracción por Percolación según Diseño Compuesto Central**

2**(5-1) central composite, nc=16 ns=10 n0=1 Runs=27 (Spreadsheet4) + 2 center points						
	Flujo solvente (mL/min)	Altura de relleno (cm)	pH Solución	Conc. Etanol (%)	Tamaño partícula (# malla)	Rendimiento - g extracto/100 g muestra
22	4.5	15.0	9.3	60.0	20.0	6.49
23	4.5	15.0	6.0	43.5	20.0	5.77
16	6.0	20.0	8.0	70.0	30.0	8.79
1	3.0	10.0	4.0	50.0	30.0	9.09
29 (C)	4.5	15.0	6.0	60.0	20.0	6.89
17	2.0	15.0	6.0	60.0	20.0	9.40
14	6.0	20.0	4.0	70.0	16.0	6.43
27 (C)	4.5	15.0	6.0	60.0	20.0	6.73
26	4.5	15.0	6.0	60.0	32.0	8.60
6	3.0	20.0	4.0	70.0	30.0	9.35
5	3.0	20.0	4.0	50.0	16.0	8.36
2	3.0	10.0	4.0	70.0	16.0	7.53
8	3.0	20.0	8.0	70.0	16.0	8.57
24	4.5	15.0	6.0	76.5	20.0	6.25
15	6.0	20.0	8.0	50.0	16.0	8.34
20	4.5	23.0	6.0	60.0	20.0	9.16
9	6.0	10.0	4.0	50.0	16.0	7.27
21	4.5	15.0	2.65	60.0	20.0	7.21
19	4.5	6.5	6.0	60.0	20.0	9.75
25	4.5	15.0	6.0	60.0	10.0	4.51
4	3.0	10.0	8.0	70.0	30.0	9.00
28 (C)	4.5	15.0	6.0	60.0	20.0	6.49
10	6.0	10.0	4.0	70.0	30.0	7.07
7	3.0	20.0	8.0	50.0	30.0	10.41
3	3.0	10.0	8.0	50.0	16.0	6.78
13	6.0	20.0	4.0	50.0	30.0	10.63
12	6.0	10.0	8.0	70.0	16.0	9.79
18	7.0	15.0	6.0	60.0	20.0	7.69
11	6.0	10.0	8.0	50.0	30.0	8.12

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

En el Cuadro 20, se presenta el análisis de varianza, que nos permite evaluar el efecto de los factores y sus interacciones respecto a las variables respuesta del rendimiento de colorante obtenidos, así como las diferencias significativas de los factores cuando pasan de un nivel inferior a un nivel superior, utilizando para ello el

test de Fisher (F) y el valor de probabilidad (p) para un nivel de significancia del 95%. El tiempo de operación, la razón masa solvente: masa muestra y el pH de la solución son las variables que tienen un efecto significativo al pasar de un nivel inferior a uno superior en el rendimiento del colorante extraído, así mismo, las interacciones cuadráticas de pH, tiempo de operación, razón masa solvente a masa muestra, concentración de etanol en la solución, y las interacciones de variables como  $z_1z_4$ ,  $z_2z_3$ ,  $z_3z_5$ ,  $z_3z_6$ ,  $z_4z_6$ . Estas apreciaciones se corroboran en la Fig. 29 de diagrama de Pareto.

**Cuadro 20.** ANOVA para evaluar el rendimiento de la extracción de colorante de la *G. americana* por Percolación (Diseño compuesto central)

ANOVA; Var.: Rendimiento; R-sqr=.92675; Adj:.79491 (2**(5-1) central composite, nc=16 ns=10 n0=1 Runs=27 (Spreadsheet4) in Percolation) 5 factors, 1 Blocks, 29 Runs; MS Residual=.4520032.					
	SS	Df	MS	F	p
$z_1$ : Flujo solvente	1.62079	1	1.62079	3.58579	0.087539
$z_1^2$ : (Flujo solvente) <sup>2</sup>	7.04588	1	7.04588	15.58811	0.002738
$z_2$ : Altura de relleno	2.07145	1	2.07145	4.58281	0.057962
$z_2^2$ : (Altura de relleno) <sup>2</sup>	16.03068	1	16.03068	35.46586	0.000140
$z_3$ : pH Solución	0.28073	1	0.28073	0.62107	0.448926
$z_3^2$ : (pH Solución) <sup>2</sup>	0.08186	1	0.08186	0.18110	0.679447
$z_4$ : Concentración Etanol	0.29460	1	0.29460	0.65177	0.438262
$z_4^2$ : (Concentración Etanol) <sup>2</sup>	0.84227	1	0.84227	1.86342	0.202153
$z_5$ : Tamaño partícula	11.74527	1	11.74527	25.98492	0.000466
$z_5^2$ : (Tamaño partícula) <sup>2</sup>	0.51420	1	0.51420	1.13760	0.311232
$z_1 z_2$	0.34516	1	0.34516	0.76361	0.402697
$z_1 z_3$	0.64401	1	0.64401	1.42478	0.260166
$z_1 z_5$	0.61723	1	0.61723	1.36554	0.269682
$z_2 z_4$	2.83081	1	2.83081	6.26280	0.031309
$z_2 z_5$	2.42657	1	2.42657	5.36848	0.042992
$z_3 z_4$	3.48756	1	3.48756	7.71578	0.019527
$z_3 z_5$	0.49669	1	0.49669	1.09887	0.319189
$z_4 z_5$	2.24539	1	2.24539	4.96764	0.049942
Error	4.52003	10	0.45200		
Total SS	61.70858	28			

**Fuente:** Elaboración propia, (2014).

Un valor de 97.829 % en el Coeficiente de determinación y de un 79.491 % en el Coeficiente de Determinación del modelo ajustado, es bueno, indicativo que un 20.5 % del espectro de datos se desvían del modelo propuesto; por tanto el modelo matemático Ec. (3.4), se puede utilizar para navegar por el espacio de diseño. Así mismo, un valor de MS Residual de 0.45, es un indicativo de que el modelo ajusta adecuadamente los datos experimentales.

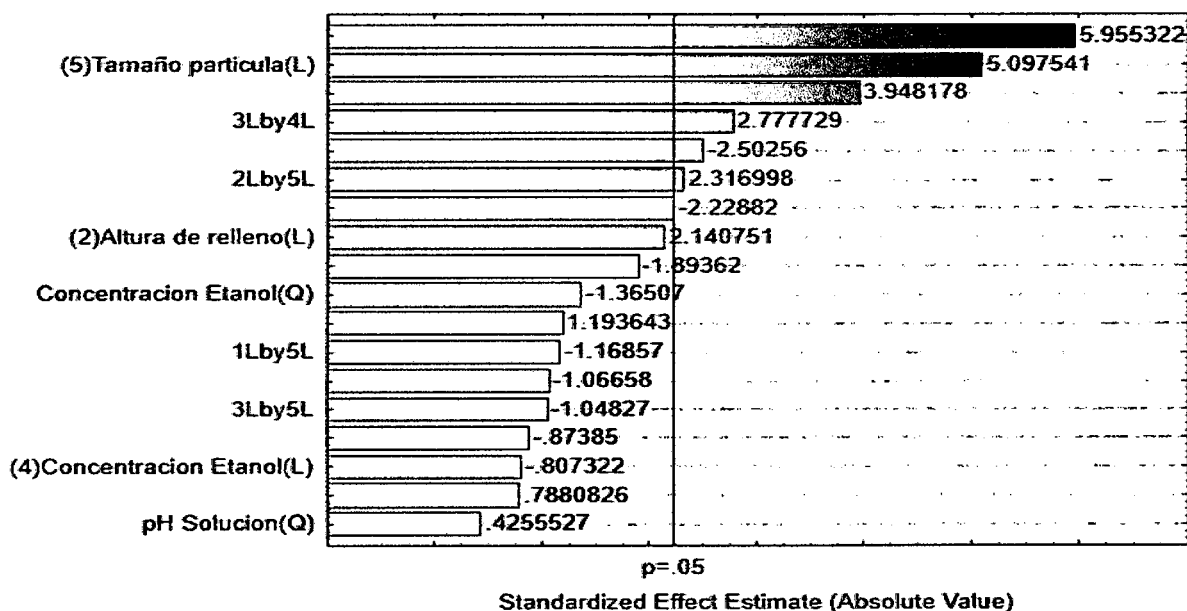
**Cuadro 21.** Coeficiente de Regresión Ajustado para el Rendimiento de Colorante Extraído de *G. americana* por Percolación

	Regres. Coeff.	Std.Err.	t(10)	p	-95.% - Cnf.Limt	+95.% - Cnf.Limt
Mean/Interc.	4.52043	9.489926	0.47634	0.644069	-16.6244	25.6653
$z_1$ : Flujo solvente	-2.58583	0.910432	-2.84022	0.017542	-4.6144	-0.5572
$z_1^2$ : (Flujo solvente) <sup>2</sup>	0.30161	0.076392	3.94818	0.002738	0.1314	0.47182
$z_2$ : Altura de relleno	-0.83938	0.324225	-2.58888	0.027002	-1.5618	-0.1169
$z_2^2$ : (Altura relleno) <sup>2</sup>	0.04149	0.006967	5.95532	0.000140	0.0260	0.05702
$z_3$ : pH Solución	-1.58138	0.810619	-1.95084	0.079638	-3.3876	0.22479
$z_3^2$ : (pH Solución) <sup>2</sup>	0.01835	0.043126	0.42555	0.679447	-0.0777	0.11444
$z_4$ : Conc. Etanol	0.38039	0.227687	1.67066	0.125742	-0.1269	0.88771
$z_4^2$ : (Conc. Etanol) <sup>2</sup>	-0.00238	0.001744	-1.36507	0.202153	-0.0063	0.00151
$z_5$ : Tamaño partícula	0.60266	0.258033	2.33560	0.041651	0.0277	1.17760
$z_5^2$ : (Tamaño partícula) <sup>2</sup>	-0.00414	0.003877	-1.06658	0.311232	-0.0128	0.00450
$z_1 z_2$	-0.01958	0.022410	-0.87385	0.402697	-0.0695	0.03035
$z_1 z_3$	0.06688	0.056026	1.19364	0.260166	-0.0580	0.19171
$z_1 z_5$	-0.01828	0.015641	-1.16857	0.269682	-0.0531	0.01657
$z_2 z_4$	-0.00841	0.003362	-2.50256	0.031309	-0.0159	-0.0009
$z_2 z_5$	0.01088	0.004695	2.31700	0.042992	0.0004	0.02134
$z_3 z_4$	0.02334	0.008404	2.77773	0.019527	0.0046	0.04207
$z_3 z_5$	-0.01230	0.011732	-1.04827	0.319189	-0.0384	0.01384
$z_4 z_5$	-0.00523	0.002347	-2.22882	0.049942	-0.0105	-0.0000

**Fuente:** Elaboración propia, (2014).

El modelo polinomial que representa el comportamiento del rendimiento en la extracción de colorante de *G. americana*, se establece en la Ec. (3.4).

$$y = 4.5204 - 2.586 z_1 - 0.8394 z_2 - 1.581 z_3 + 0.3804 z_4 + 0.6027 z_5 + 0.3016 z_1^2 + 0.0415 z_2^2 + 0.01835 z_3^2 - 0.0024 z_4^2 - 0.00414 z_5^2 - 0.0196 z_1 z_2 + 0.0669 z_1 z_3 - 0.0183 z_1 z_5 - 0.0084 z_2 z_4 + 0.0109 z_2 z_5 + 0.0233 z_3 z_4 - 0.0123 z_3 z_5 - 0.00523 z_4 z_5 \quad (3.4)$$

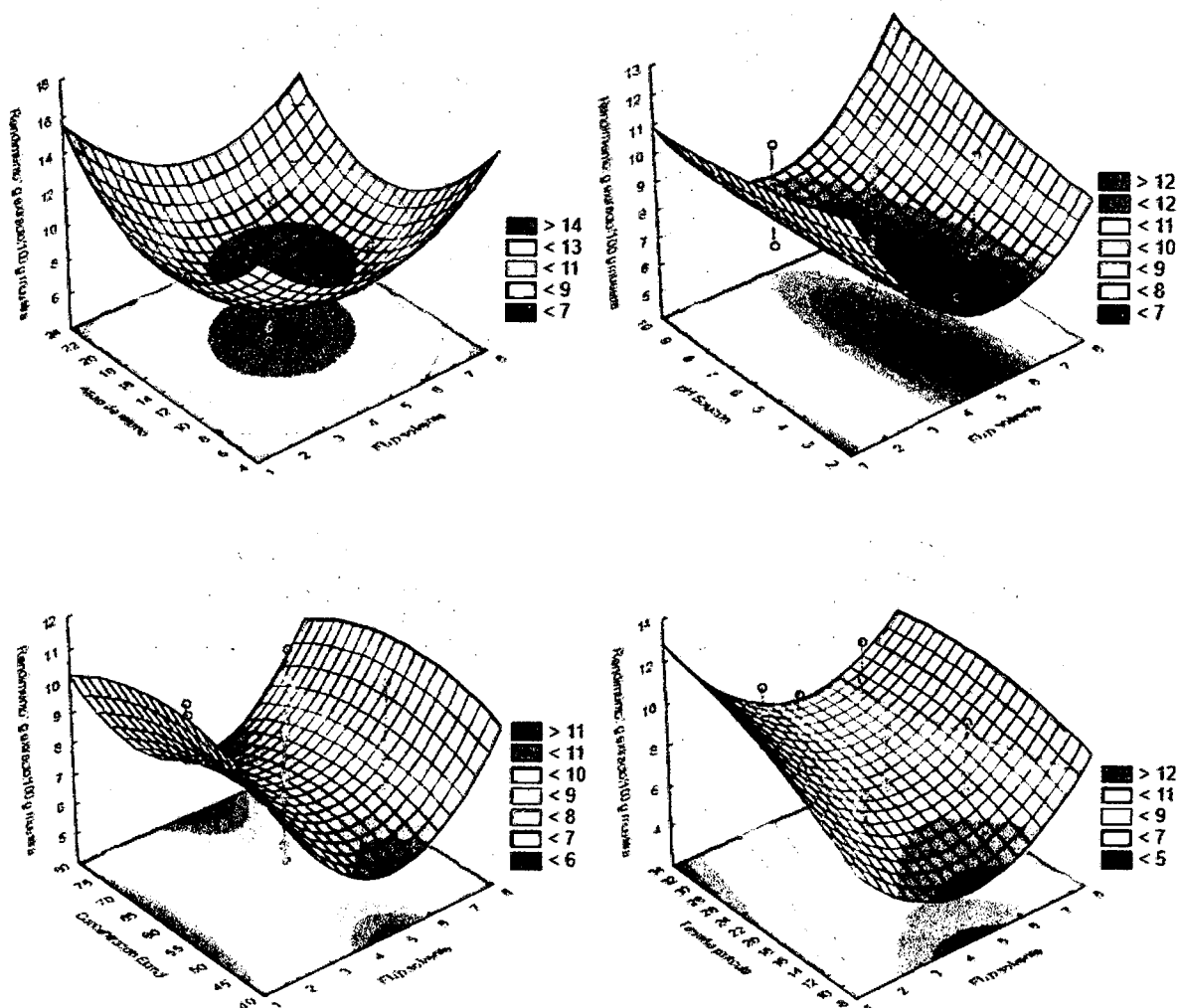


**Figura 29.** Pareto para la Extracci3n por Percolaci3n del Colorante de *G. americana*

*Fuente:* Elaboraci3n propia, (2014).

En la Fig. 30, se visualiza las superficies respuesta donde se aprecia la variaci3n del rendimiento del colorante extraído (g/100 g) en la columna de extracci3n en funci3n al flujo solvente, (mL/min), Altura de relleno, (cm), pH Soluci3n, Concentraci3n de Etanol en la soluci3n extractante, (%) y Tamaño partícula, (# malla) en el rango de valores establecidos en la matriz de diseño del Cuadro 20. Esta relaci3n se expresa a trav3s de un modelo matemático de segundo orden incluido sus interacciones, Ec. 3.4. La representatividad del modelo con los datos experimentales, a un nivel de significancia de 95 % y  $\alpha = 0.05$ , podemos apreciar en el Cuadro 19.





**Figura 30.** Superficie respuesta del efecto de  $z_1, z_2, z_3, z_4$  y  $z_5$  en el Rendimiento de Colorante de *G. americana* Extraído por Percolación

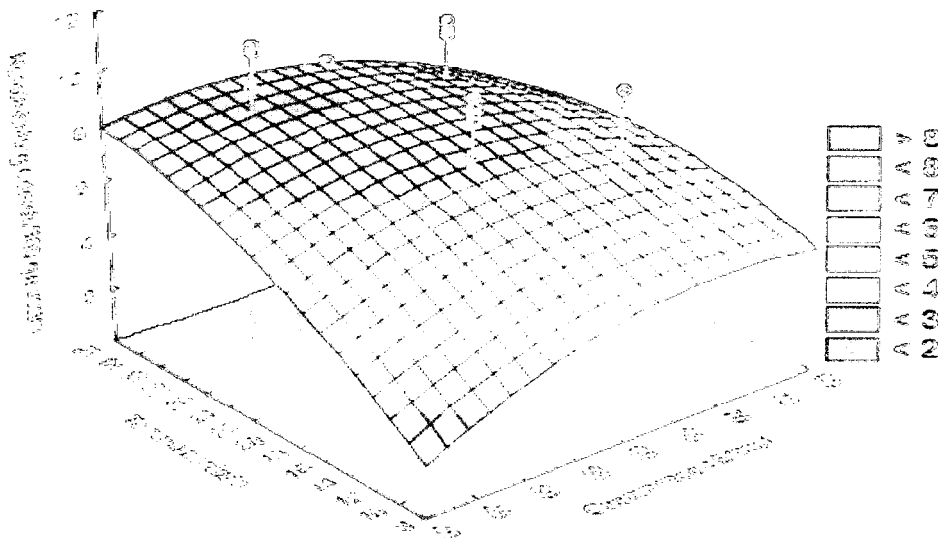
*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

**Cuadro 22.** Condiciones Óptimas Establecidas para Rendimiento de Extracción de Colorante de *G. americana* L. por Percolación

	Variable	Unidad Medina	Criterio	Valores Óptimos
$z_1$	Flujo solvente	mL/min	En rango [2.07.0]	4.84
$z_2$	Altura de relleno	Cm	En rango [6.523.0]	13.1
$z_3$	pH Solución	pH	En rango [2.659.3]	7.4
$z_4$	Concentración Etanol	%	En rango [43.576.5]	58.7
$z_5$	Tamaño partícula	# malla	En rango [10.032]	32
$y_1$	Rendimiento de Colorante Extraído	g/100 g	Maximizar	7.4867

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

A través de una optimización numérica de búsqueda de un máximo en el rendimiento de colorante extraído a través de un proceso de extracción por inundación, según la función objetivo sin restricciones, se tiene un máximo de 7.4867 g de colorante por 100 gramos de muestra utilizada, a las condiciones de flujo solvente, (mL/min), Altura de relleno, (cm), pH Solución, Concentración de Etanol en la solución extractante, (%) y Tamaño partícula, (# malla) establecidos en el Cuadro 22. Cabe indicar que este rendimiento es menor al determinado en el proceso de extracción por inundación. En la Figura 31, se observa la superficie respuesta a las condiciones óptimas según el modelo matemático de la Ec. 3.4 y la función objetivo considerada.



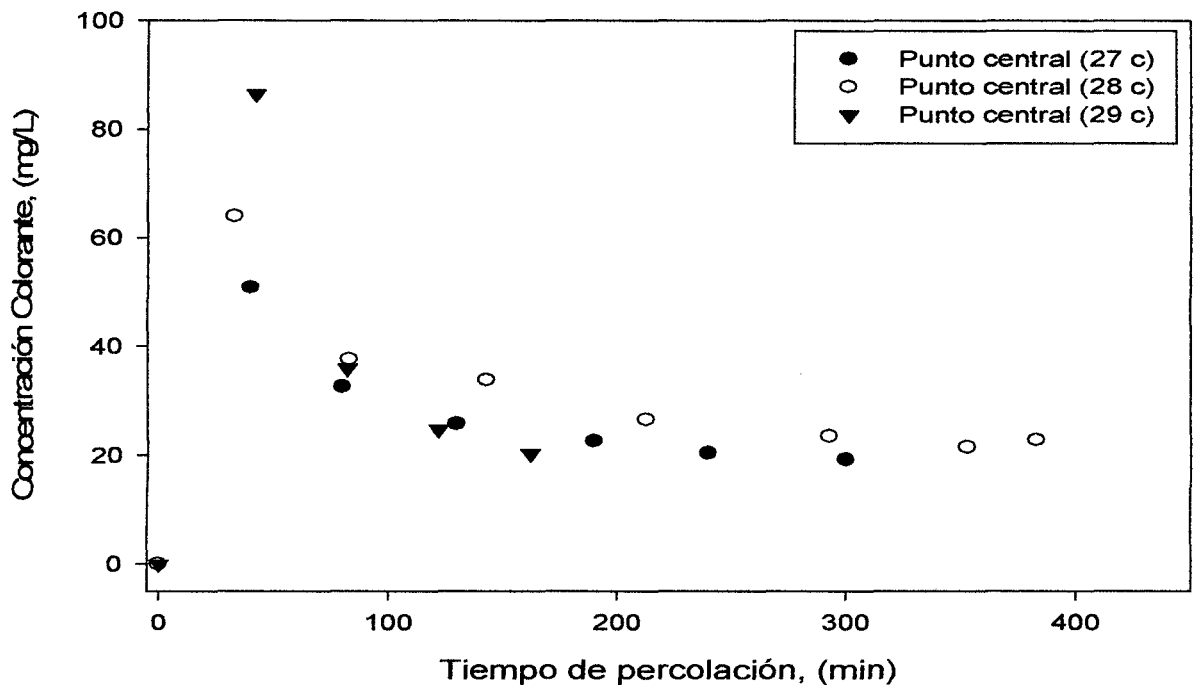
**Figura 31.** Superficie respuesta a las condiciones óptimas, maximizando el % rendimiento

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

#### **4.5.3 Evaluación de la Concentración de Colorante Durante la Extracción por Percolación**

En la Figura 32, se puede apreciar la variación de la concentración de colorante de G. americana en tres repeticiones a las condiciones de operación: Flujo solvente, 4.5 mL/min, altura de relleno, 15 cm, pH solución, 6, concentración solución, 60 % EtOH y tamaño partícula, malla # 20, llevadas a cabo con niveles del punto central del diseño experimental establecido en el Cuadro 18. Se puede observar una mínima dispersión de datos referente al promedio en cada punto. El ajuste de los datos a modelos matemáticos expresados en la Ec. (3.10), y según *Pérez et al.*,

2011, están involucrados una constante del modelo y una constante de velocidad de difusión del colorante en la solución y ella arrastrado hacia el exterior, se visualiza en la Ec. (3.4).



**Figura 32.** Variación de la concentración del colorante de *G. americana* en tres repeticiones a las condiciones de operación: Flujo solvente, 4.5 mL/min, altura de relleno, 15 cm, pH solución, 6, concentración solución, 60 % EtOH y tamaño partícula, malla # 20.

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).

Modelo matemático:

$$C(t) = C_0 + \frac{A}{t} \exp \left[ -0.5 \left( \frac{\ln(t/t_0)}{B} \right)^2 \right] \quad (3.4)$$

Los parámetros del modelo indicados en el Cuadro 22, están evaluadas a un nivel de significancia el 95 %. Así mismo, un coeficiente de determinación de 95.89 %, es un indicativo de ajuste adecuado del modelo a los datos experimentales. El modelo final está expresado en la Ec. (3.5).

$$C(t) = 2.876 + \frac{2996.7963}{t} \exp \left[ -0.5 \left( \frac{\ln(t/45.178)}{0.9475} \right)^2 \right] \quad (3.5)$$

**Cuadro 23.** Análisis Estadístico de los Datos de variación de la concentración en la extracción de colorante de *G. americana* por percolación

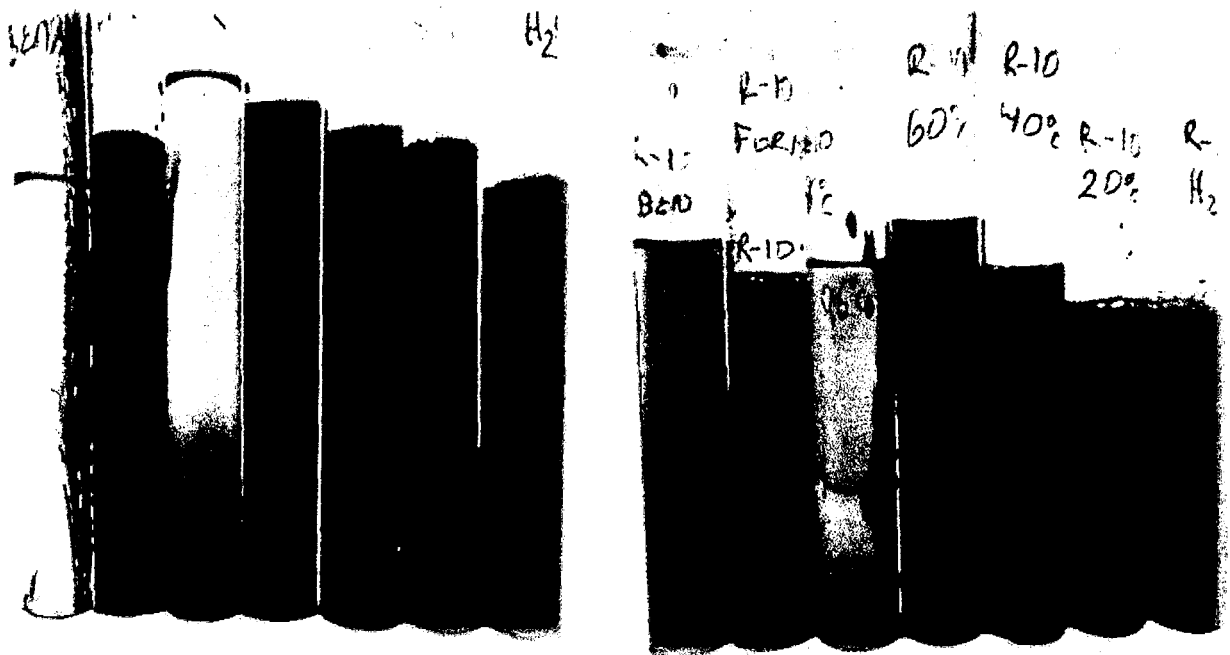
R	Rsqr	AdjRsqr	Standard Error of Estimate
0.9897	0.9794	0.9589	7.2781

	Coefficient	Std. Error	t	P
A	2996.7963	410.0571	7.3082	0.0053
B	0.9475	0.1182	8.0176	0.0041
t <sub>0</sub>	45.1780	8.8664	5.0954	0.0146
C <sub>0</sub>	2.8761	6.9226	0.4155	0.7057

Fuente: Elaboración propia, (2014).

#### 4.6 Evaluación de la Solubilidad de los Extractos de Colorantes

La evaluación de la solubilidad del colorante obtenido en distintos solventes, elegidos según su polaridad, se visualiza en la Fig. 33. Donde, se puede apreciar que el colorante de *G. americana* es soluble en agua y solventes polares, así mismo, según el anexo, Cuadro 25 y 26, no se disuelve en solventes apolares como benceno y formol. Por tanto, según, Shirley M. Tenesaca 2012, los colorantes naturales que tienen una buena solubilidad en soluciones polares como agua, tienen un uso amplio como aditivos en la industria alimentaria, cosmética, y farmacéutica.

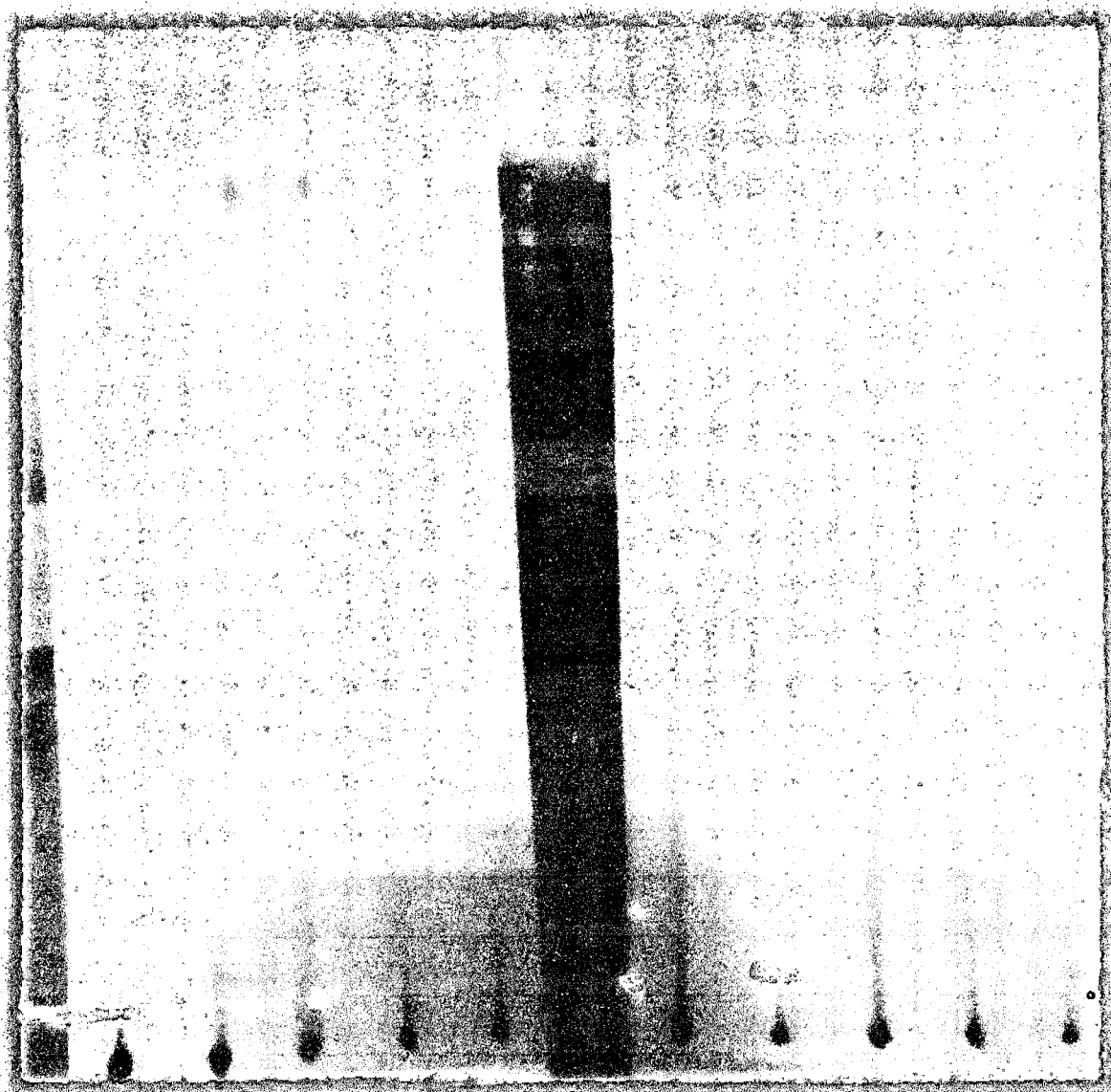


**Figura 33.** Variación de la solubilidad del colorante de *G. americana* por efecto de diferentes solventes clasificados por su polaridad.

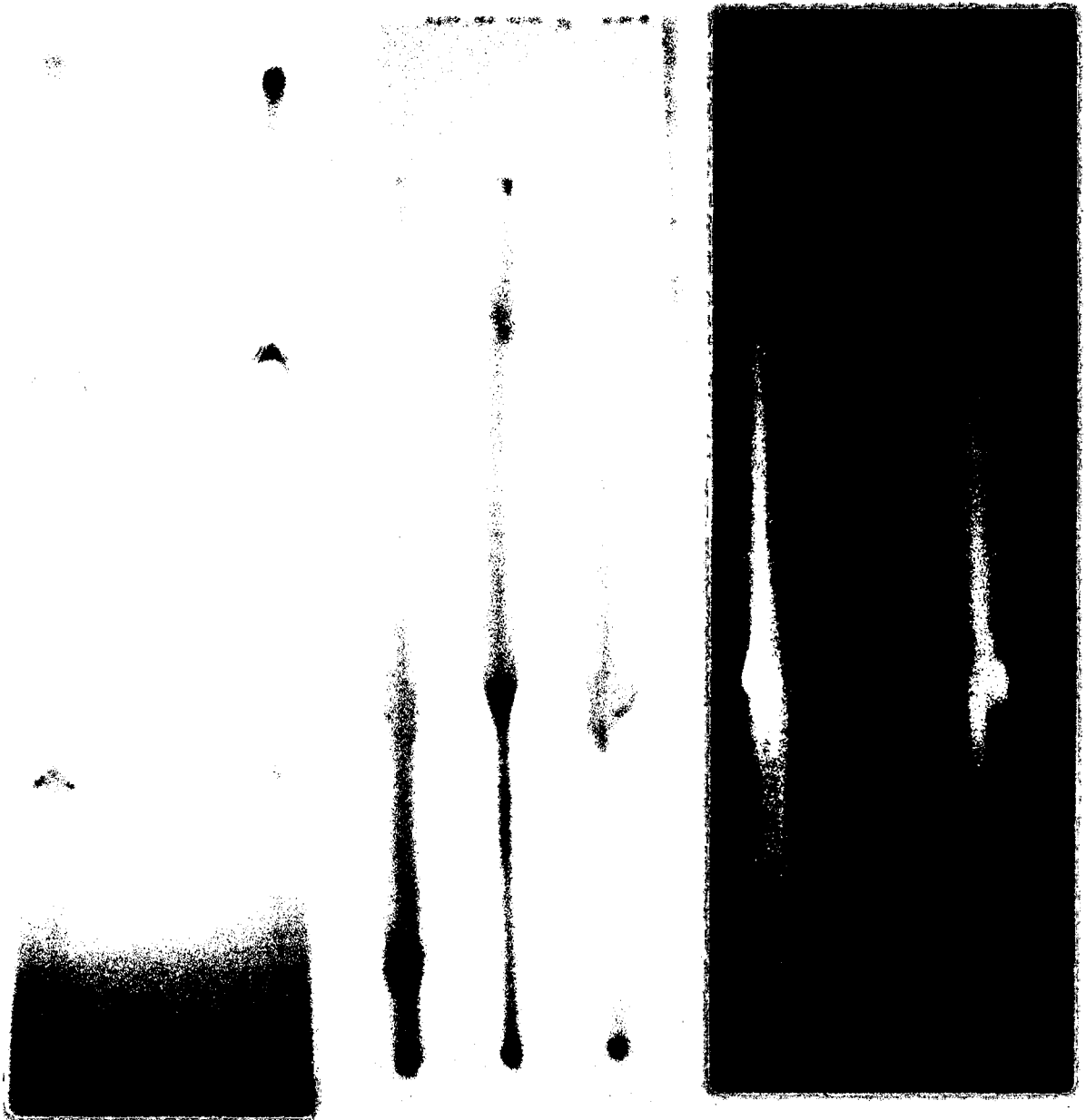
Fuente: Elaboración propia, (2014).

#### 4.7 Análisis por Cromatografía de Capa Delgada

Utilizando como patrón, el Indigo Blue, de calidad analítica, se ha comparado con las distintas pruebas de colorantes extraídas por percolación e inundación, donde podemos apreciar en la figura 34 y 35, a luz visible y UV que los genipósidos están presentes en gran cantidad, así como la banda de color indigoblue, es comparable con el colorante de *G. americana*. De la evaluación de solubilidad, se utilizó como fase móvil una solución de EtOH:MetOH:H<sub>2</sub>O, dando resultados comparables a los establecidos para otros colorantes afines a la *G. americana*.



**Figura 34.** Desarrollo Cromatográfico de colorante *G. americana*.  
(Fase estacionaria, sílica gel, y fase móvil: EtOH: H<sub>2</sub>O: MeOH)  
*Fuente: Elaboración propia, (2014).*



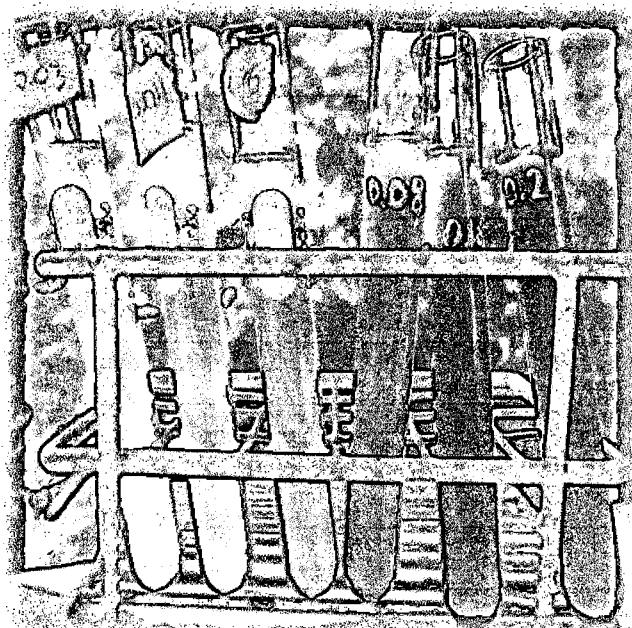
**Figura 35.** Desarrollo Cromatográfico de colorante G. americana con revelador Solución  $H_2SO_4$  y visto a luz en Visible y UV.(Fase estacionaria, sílica gel, y fase móvil: EtOH: H<sub>2</sub>O: MeOH)

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

#### 4.8 Evaluación de la Solidez de los Colorantes de G. americana

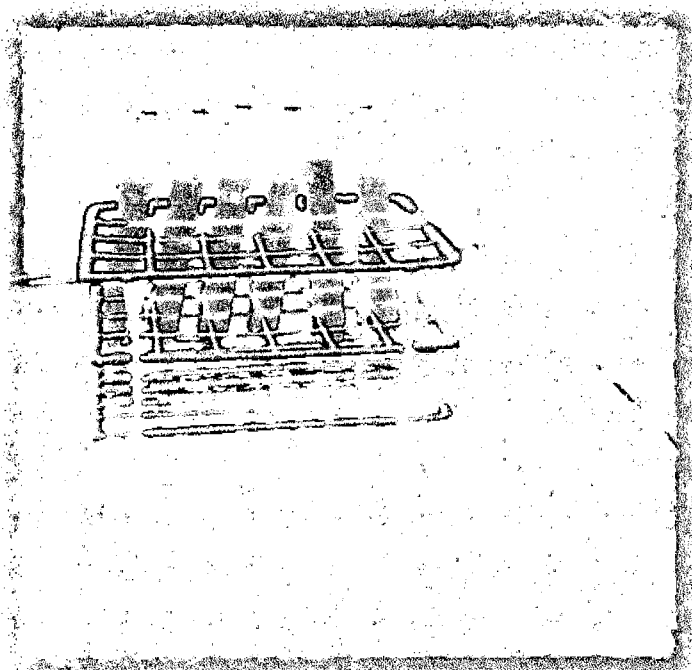
El objetivo de este estudio es conocer las posibles rutas de degradación del Genipósido por lo que se ensaya la degradación artificial mediante hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, degradación oxidativa y efecto de la luz. Además este estudio nos advierte sobre los riesgos en la estabilidad química.

Se elaboraron soluciones del extracto para el estudio de hidrólisis alcalina mediante la adición de NaOH 20%, hidrólisis ácida mediante la adición de HCl 20%, degradación oxidativa mediante la adición de peróxido de hidrógeno al 30% y efecto de la luz. Las muestras se colocaron en una estufa a 50 °C, excepto la muestra sometida al efecto de la luz, la cual se mantuvo a la luz natural durante el día y bajo luz de neón en la noche.



**Figura 36.** Evaluación de las Solidez de los Colorantes en Soluciones Oxidantes. Antes y después del tratamiento.

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*



**Figura 37.** Evaluación de la Solidez de soluciones de colorantes al efecto de la Luz incandescente. (Muestras antes de después del tratamiento).

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

## V. CONCLUSIÓN

Del trabajo de tesis se puede desprender como conclusiones, lo siguiente:

- ❖ Después de la identificación botánica del fruto de Huito, se ha confirmado que se trabaja con la especie *Genipa americana* L.
- ❖ Utilizando planeamiento experimental de Superficie Respuesta – Diseño Compuesto Central, considerando seis factores:  $Z_1$ : pH de la solución,  $Z_2$ : temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y  $Z_3$ : tiempo de operación (min),  $Z_4$ : tamaño de partícula (# malla),  $Z_5$ : razón de masa de solvente: masa muestra (g:g),  $Z_6$ : concentración de etanol en la solución (%), a través de optimización numérica se han establecido los modelos matemáticos y las condiciones óptimas siguientes:
  - ✓ Función Objetiva, con el cual se maximiza el Rendimiento en colorante de *G. americana* L extraído por inundación utilizando la Ec. (3.1), es:  $Z_1$ : 10.7,  $Z_2$ : 49.68  $^{\circ}\text{C}$ ,  $Z_3$ : 107.8 min,  $Z_4$ : malla 40,  $Z_5$ : 6.03 g/g,  $Z_6$ : 45 % EtOH, y un rendimiento de 21.5 g /100 g muestra base seca.
  - ✓ Función objetiva, maximizar la concentración de colorante obtenido (ppm): según Ec. (3.2), las condiciones Óptimas es:  $Z_1$ : 10.7,  $Z_2$ : 49.68  $^{\circ}\text{C}$ ,  $Z_3$ : 107.8 min,  $Z_4$ : malla 40,  $Z_5$ : 6.03 g/g,  $Z_6$ : 45 % EtOH, y una concentración de Genipósido de 165 ppm.
- ❖ Utilizando planeamiento experimental de Superficie Respuesta – Diseño Compuesto Central, para evaluar el rendimiento de colorante extraído por percolación (g/100 g), se han considerado cinco factores:  $Z_1$ : Flujo de solvente (mL/min),  $Z_2$ : altura de relleno (cm) y  $Z_3$ : pH de la solución (pH),  $Z_4$ : concentración de EtOH en la solución (%),  $Z_5$ : tamaño de partícula (# malla), a través de optimización numérica se han establecido los modelos matemáticos y las condiciones óptimas siguientes:
  - ✓ Función Objetiva, maximizar el Rendimiento en colorante de *G. americana* L extraído por inundación: según Ec. (3.3), Condiciones Óptimas:  $Z_1$ : 4.84 mL/min,  $Z_2$ : 13.5 cm,  $Z_3$ : 7.4 pH,  $Z_4$ : 58.9 %,  $Z_5$ : malla 32, y un rendimiento de 7.4867 g /100 g muestra base seca.
- ❖ El colorante de *G. americana* L. obtenido tiene una buena solubilidad en el agua y bajas concentraciones de EtOH, así mismo se ha observado que no se disuelve en solvente apolares como benceno.



- ❖ A través del análisis por espectrofotometría UV/Vis y cromatografía de capa delgada se han identificado que el cromóforo principal es la Genipina, uno de los genipósidos identificados también por otros autores.
- ❖ Después de llevado las pruebas de estabilidad, se observa que utilizando como mordiente cloruro de sodio en solución ácida, el colorante se adhiere en algodón, pero que su estabilidad es inferior, más que todo al lavado y batanado.
- ❖ Por otro lado, la estabilidad de las soluciones del colorante de G. americana a la luz visible, incandescente y soluciones oxidantes son relativamente buenas.

Por tanto, el fruto de esta especie cuando está en un estado fresco de madurez es una muy buena fuente de colorante de color oscuro (azul a negro) por su solubilidad en solventes polares como el agua, soluciones de EtOH, por tanto pueden ser utilizados en la industria de alimentos y farmacéutica.

## **VI. RECOMENDACIONES Y/O SUGERENCIAS**

La investigación realizada permite hacer las siguientes sugerencias para trabajos futuros, según el análisis realizado de los resultados aún hay aspectos que son necesarios investigar.

- ❖ Realizar pruebas físico-químicas adicionales para que este colorante sea considerado apto para consumo humano, así poder utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica.
- ❖ Llevar a cabo pruebas por UHPLC y MNR para identificar los microcomponentes constituyentes en el fruto y colorantes de la *G. americana*.
- ❖ Realizar estudios comparativos de la calidad y propiedades físicas de los colorantes naturales y sintéticos que tengan un color azul oscuros.
- ❖ Realizar estudios de escalamiento del nivel de laboratorio a escala industrial de la producción de colorante del fruto de Huito.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Attokaran M., (2011), *Natural Food Flavors and Colorants*, Blackwell Publishing Ltd., Institute of Food Technologists, Iowa, USA.
2. Abbott D. Y Andrews R. S., *Introducción a la Cromatografía*, 3a ed., Alhambra, Madrid, 1970.
3. Annan K., *Children are our future, and their mothers are its guardians*, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 118, 10, October 2010.
4. Attokaran M., (2011), *Natural Food Flavors and Colorants*, John Wiley & Sons, Iowa, USA.
5. Bart H-J and Pilz S., (2011), *Industrial Scale Natural Products Extraction*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
6. Benigna Irene Paredes Martínez -2002“ANÁLISIS Y OBTENCION DE COLORANTE NATURAL A PARTIR DE LA BACCHARIS” Universidad Técnica Del Norte. Ibarra – Ecuador.
7. BORGES, E. S.; REZENDE, C.M. *Min aroma constituents of genipap (Genipa Americana L.) and bacuri (Platonia insignis M.)*. *Journal of Essential Oil Research*, n. 12, p. 71-74, 2000.
8. Carlos Brunatti y Ana Maria Martin, “Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano”-1987 libro: Robert L. Pecsok y L. Donal Shields “MÉTODOS MODERNOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS”, Editorial limusa, 1983.
9. Chemat Farit y Strube Jochen (2015) *Index*, in *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
10. Chemat, F., G. Cravotto *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compound*. Springer, New York, 238 pages. 2013. ISBN 978-1-4614-4829.
11. Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios, Programa Conjunto FAO / OMS sobre Normas Alimentarias; Xiamen (Fujian Province), China, 2011.
12. Dawson, T.L., 2009. *Biosynthesis and synthesis of natural colours*. *Color. Technol.* 125, 61e 73.

13. Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A.R.; Paredes- López, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Crit. Rev. Food SciNutr.* 2000, 40, 173-289.
14. DJERASSI., C., GRAY., J., and KINCL., F., Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX. Isolation and Characterization of Genipin.
15. Dos Santos M., Maier, M. (2008). *La química y color en los textiles.* Universidad de Buenos Aires.
16. Dweck, A. C. (2002), Natural ingredients for colouring and styling. *International Journal of Cosmetic Science*, 24: 287–302.
17. Eastaugh N., Walsh V., Chaplin T. & Siddall R., (2004), *The Pigment Compendium: A Dictionary of Historical Pigments*, Butterworth-Heinemann–Elsevier, Amsterdam.
18. EPSTEIN, L. Cultivo e aproveitamento do jenipapo. *BahiaAgricola*, v. 4, n. 3, p. 23-24, 2001.
19. EPSTEIN, L. Cultivo e aproveitamento do jenipapo. *BahiaAgricola*, v. 4, n. 3, p. 23-24, 2001.
20. FIGUEIREDO, R.W. de; MAIA, G.A.; HOLANDA, L.F.F. de; MONTEIRO, J.C.S. Características Físicas e químicas do Jenipapo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.21, n. 4, p. 421-428, 1986.
21. FIGUEIREDO, R.W. de; MAIA, G.A.; HOLANDA, L.F.F. de; MONTEIRO, J.C.S. Processamento e estabilidade de néctares de jenipapo submetidos a diferentes métodos de conservação. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.21, n. 10, p. 1077-1084, 1986.
22. FIGUEIREDO, R.W. de; MAIA, G.A.; HOLANDA, L.F.F. de; MONTEIRO, J.C.S. Processamento e estabilidade de néctares de jenipapo submetidos a diferentes métodos de conservação. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.21, n. 10, p. 1077-1084, 1986.
23. Francis, Jk., *Genipa americana*. Jagua, Genipa., Department Of Agriculture Forest Service, Southern Forest Experiment Station., Soil- Sm-58., New Orleans-Usa., 1993., Pp. 231-235.
24. Frick, M. G., Mason, P. A., Williams, K. L., Andrews, K., Gerstung, H. (2003). Epibionts of Hawksbill turtles in a Caribbean nesting ground: a potentially unique

- association with Snapping shrimp (Crustacea: Alpheidae). *Mar. Turt. Newslet.*, 99: 8-1
25. Gottlieb, O.R.; Mors, W.B. Potential Utilization Of Brazilian Wood Extractives. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, v.28, n.2,p. 196-215, 1980.
  26. Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JR, Geron I, Monosov EZ, et al. *NatMed* 2006; 12:310-6
  27. Hargrave D. (2006). Industria de la lana. Tomado de Industria de productos textiles. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo*. Coord. Ivester L. y NeefusJ.
  28. Henry. B.S. Natural Food Colours. In: Hendry. G. A. F.; Houghton, J.D, *Natural Food Colorants*, 2. Ed. Great. Britain: Chapman & Hall, 1996. P 40-79.
  29. Holmes, D. E. y otrosnueveautores, Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobactersulforreducens*, *Environmental Microbiology*: 8 (10), 1805-1815 (2006)
  30. Kadolph, S. (2008). Natural Dyes: A Traditional Craft Experiencing New Attention. *The Delta Kappa GammaBulletin*, 75 (1), 14-17
  31. Kato, O.R.; Oliveira, V.P. De: Faria, L.J.G. De. Plantas Corantes Da Amazonia. In: Faria, L.J.G. De.: Costa, C.M.L. *TopicosEspeciaisemTecnologia de Productos Naturais*. Belem: Universidade Federal do Para, 1998.cap.3,41-55.
  32. Kuswandi, B., JayusLarasati, T.S., Abdullah, A., Heng, L.Y., 2012. Real-time moni-toring of shrimp spoilage using on-package sticker sensor based on natural dyeofcurcumin. *Food Anal. Method* 5, 881 e 889.
  33. Licker M. M., Geller E., Weil J., Blumel D., Rappaport A., Malmoli S., Netting J., Taylor R., (2007), *McGraw–Hill Encyclopedia of Science & Technology*, 10th Ed., McGraw – Hill, New York, USA.
  34. LORENZI, H. *Arvores Brasileiras: manual de identificacion e cultivo de plantas arboreas do brasil*. V. 1. 2ª ed. Sao Paulo: Plantarum, 1998.p.302.
  35. LORENZI, H. *Arvores Brasileiras: manual de identificación e cultivo de plantas arboreas do brasil*. V. 1. 2ª ed. Sao Paulo: Plantarum, 1998.p.302.
  36. Maria Gabriela Sanchez Puertas (2010)- “Comprobacion De La Actividad Tintorea En Fibras Organicas Y Sinteticas De La *BerberisHalliii*” Escuela Superior Politecnica De Chimborazo, Riobamba-Ecuador.

37. Mielke M. S., de Almeida A F., Gomes F. P., Aguilar M. A. G., Mangabeira P. A. O., Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipaamericana* seedlings to soil flooding, *Environmental and Experimental Botany* 50 (2003) 221–231.
38. Mielke M. S., de Almeida A F., Gomes F. P., Aguilar M. A. G., Mangabeira P. A. O., Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipaamericana* seedlings to soil flooding, *Environmental and Experimental Botany* 50 (2003) 221–231.
39. Mishra S, et al. (2012) Entrapment of *Saccharomyces cerevisiae* and 3T3 fibroblast cells into blue light cured hydrogels. *J Biomed Mater Res A*100(10):2829-38
40. Nelly Saldaña Balandra. principio de tintoreria, TINS BASICOS INGENIERIA TEXTIL. Texto de Instrucción Basicos (TINS) / UTP Lima-peru.
41. Ojeda Brito Galo Antonio (2012). Tesis Teñido de fibra de abacá (*Musa textilis*) utilizando colorante extraído de la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa). Universidad de Loja, Ecuador.
42. Paredes, B. (2002). Tesis. Análisis y obtención de colorante natural a partir de la *Baccharis latifolia* (chilca).
43. Pedraza, F., Rutiaga-Quiñones J. (2011). Extracto tánico de la madera de Palo de Brasil. *Conciencia tecnológica*.
44. Quispe Herrera R., Valverde Paredes Y., Fernandez Herrera Y., extracción y caracterización físico química del colorante de Huito (*Genipa americana* L) en el distrito de Tambopata, INRENMA, UNAMAD, 2013.
45. Renhe I. R.T, Extração e Estabilidade do Corante Azul de Jenipapo (*Genipa americana* L.), Dissertação à Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Magister Scientiae, Viçosa, Minas Gerais – Brasil, 2008.
46. Renhe, I. R. T., Stringheta, P. C., Silva F. F., Oliveira, T., Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo, *Pesq. agropec. bras.* 44(6): 649-652, GRA, TAB. 2009 Jun.

47. Richardson J. F., Harker J. H. and Backhurst J. R. (2002), Coulson and Richardson's Chemical Engineering, Particle Technology and Separation Processes, Vol. 2, 5th Edition, Butterworth-Heinemann, USA.
48. Robert L. Pecsok y L. Donald Shields "MÉTODOS MODERNOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS", Editorial limusa, 1983.
49. Roquero A., (2006), Tintes y tintoreros de América. Catálogo de materias primas y registro etnográfico de México, Centroamérica, Andes Centrales y Selva Amazónica, Madrid, España.
50. Roquero A., "Aproximación a los tintes históricos: documentación sobre el color en los tejidos antiguos", Textil e indumentaria: materias, técnicas y evolución (El Grupo Español del IIC, International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, eds.), Madrid, 2003, pag. 29-43
51. Roquero A., Martínez-Verdú F. M., Presente y Futuro de los Colorantes Naturales, IX Congreso Nacional de Color Alicante, Universidad de Alicante, España, 29 y 30 de Junio, 1 y 2 de Julio de 2010.
52. Samanta, A. K. and Agarwal, P. (2009): Application of Natural Dyes on Textiles IJFTR 34, 384-399
53. SANDRI, S. Jenipapo. Globo Rural. V.13.n147, p. 60-63, 1998.
54. Shirata Yoshiko, Colorantes Naturales, , Biblioteca Nacional de Antropología e Historia (INAH), Mexico 1996.
55. SHIRLEY MIREYA TENESACA CAYAMBE, "ELABORACIÓN DE COSMÉTICOS DECORATIVOS A PARTIR DE FRUTOS VERDES DE Genipa americana L." RIOBAMBA – ECUADOR 2012.
56. SLUSAREWICZ., P., ZHUA., K., and HEDMANA., T., Kinetic Analysis of Genipin Degradation in Aqueous Solution., Fort Worth- United States., Natural Product Communications., Vol. 5 No. 12., 2010., pp.1853 – 1858.
57. STINTZING, F.C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and human nutrition. Food Science & Technology, n. 15, p. 19-38, 2004.
58. Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J., (2004). Bioquímica. Ed. Reverté, España.
59. SUNG., H. W., and TU., J., Drug-loaded biological material chemically treated with genipina., Washington D. C.-United States 2003., p. 7.

60. Susan J. Trujillo Hernandez y Wendy M. Lopez Rosales, "Obtencion De Colorantes Naturales A Partir De Cascara Allium cepa (Cebolla Blanca Y Morada) Y Raiz De Beta Vulgaris (Remolacha) Para Su Aplicacion En La Industria Textil". Universidad De El Salvador - Septiembre 2010.
61. Touyama, R.; Takeda, Y.; Inoue, K.; Kawamura, I.; Yatsuzuka, M.; Ikumoto, T.; Shingu, T.; Yokoi, T.; Inouye, H. Studies On The Blue Pigments Produced From Genipin And Methylamine. I. Structures of the Brownish- Red Pigments, Intermediates Leadig to the Blue Pigments. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.42, n.3, p. 668-673,1994.
62. Touyama, R.; Takeda, Y.; Inoue, K.; Kawamura, I.; Yatsuzuka, M.; Ikumoto, T.; Shingu, T.; Yokoi, T.; Inouye, H. Studies On The Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. II. On the Formation Mechanisms of Brownish-Red Intermediates Leadig to the Blue Pigment Formation. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.42, n.8, p. 1571-1578, 1994.
63. Touyama., R., And Others., Studies On The Blue Pigments Produced From Genipin And Methylamine. Ii. On The Formation Mechanisms Of Brownish-Red Intermediates Leading to the Blue Pigment Formation., Tokyo- Japan., Chemical and Pharmaceutical Bulletin.,Vol.42 No. 8., 1994., pp. 1571-1578.
64. Washington D. C. - United States., Journal of Organic Chemistry., Vol. 25 No. 12., 1960., pp. 2174–2177.
65. XAVIER, M.; XAVIER, A.T.T.N. Jenipapo: uma especie indígena para reflorestar. Cerrado, v, 8.n.34, p. 20-23, 1976.
66. Yusuf M, A. Ahmad, M. Shahid et al., "Assessment of colorimetric, antibacterial and antifungal properties of woollen yarn dyed with the extract of the leaves of henna (*Lawsoniainermis*)," Journal of Cleaner Production, vol. 27, pp. 42–50, 2012

### **Paginas web**

67. Rubia, Pigmenta Naturalia, <http://www.rubiapigmentanaturalia.nl>, visitada en Agosto de 2013.
68. UNESCO, International symposium-Workshop on Natural Dyes, [Http://Portal.Unesco.Org/Culture/En/Ev.PhpUrl\\_Id=35781&Url\\_Do=Do\\_Printpage&Url\\_Section=201.Html](Http://Portal.Unesco.Org/Culture/En/Ev.PhpUrl_Id=35781&Url_Do=Do_Printpage&Url_Section=201.Html), (2006).



# ANEXO

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS  
 FACULTAD DE INGENIERÍAS  
 CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECIMENES VEGETALES

"Evaluación de la potencialidad del fruto de *Genipa americana* L. como fuente de colorante natural"

BACHILLER: GIULIANA DAMIZÚ CÁRDENAS ENRIQUEZ

Nº	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	FAMILIA	HABITO	HABITAT	COORDENADAS		COL	FECHA COL	ID	FECHA ID
1	<i>Genipa americana</i> L.	Huito	RUBIACEAE	Arbol	Bosque Terraza Alta, Santa Teresa, Km. 8 Carretera Iberia	E 484713	N 8614435	GCE&SBQ	06/09/2013	HDL	06/09/2013

Puerto Maldonado, 06 de Septiembre de 2013

ESPECIALISTA EN IDENTIFICACIÓN  
 TAXONÓMICA FLORA Y FAUNA SILVESTRE

*M.Sc. Dgo. Hugo Duenas Linares*

Reg. CRP N° 2353

Reg. N° 028 DGFFS/MA

Figura 38. Identificación Taxonomica Del *Genipa americana*.  
 Fuente: Hugo D. L. (2013)

**Cuadro 24 A.** Determinación de Humedad del fruto de huito (Genipa americana)

PESO	PULPA (gr.)	CASCARA (gr)	PEPA (gr.)	TIEMPO (Min)
P <sub>0</sub>	10.00	10.00	10.00	00
P <sub>1</sub>	1.9791	3.6683	2.536	135
P <sub>2</sub>	1.9863	3.6583	2.5376	300
P <sub>3</sub>	1.955	3.6478	2.5136	495
P <sub>4</sub>	1.9424	3.6382	2.5079	645
P <sub>5</sub>	1.921	2.6423	2.4885	810
P <sub>6</sub>	1.8447	3.6159	2.4545	837
P <sub>7</sub>	1.8355	3.6006	2.4475	967
P <sub>8</sub>	1.839	3.6082	2.4448	1102
P <sub>9</sub>	1.8271	3.5894	2.4392	1252
HUMEDAD	81.729	64.106	75.608	

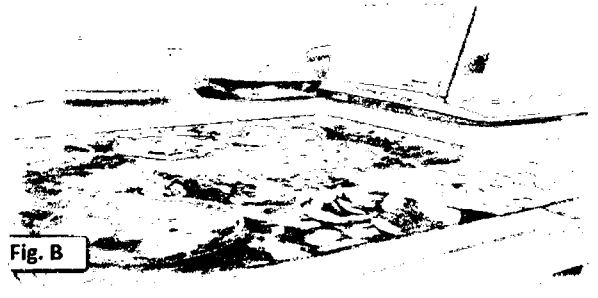
*Fuente: Elaboracion propia (2014)*

**Cuadro 24 B.** Determinación de Humedad del fruto de huito (Genipa americana)

PESO	PULPA (g)	CASCARA (gr)	PEPA (g)	TIEMPO (min)
P <sub>0</sub>	10.00	10.00	10.00	00
P <sub>1</sub>	1.986	3.9844	2.4822	135
P <sub>2</sub>	1.9911	3.984	2.4872	300
P <sub>3</sub>	1.9669	3.9685	2.4638	495
P <sub>4</sub>	1.9517	3.9651	2.4561	645
P <sub>5</sub>	1.9354	3.9538	2.4254	810
P <sub>6</sub>	1.8545	3.93	2.3937	837
P <sub>7</sub>	1.8484	3.9079	2.3861	967
P <sub>8</sub>	1.8426	3.9047	2.3817	1102
P <sub>9</sub>	1.8311	3.8976	2.3746	1252
HUMEDAD	81.689	61.024	76.254	

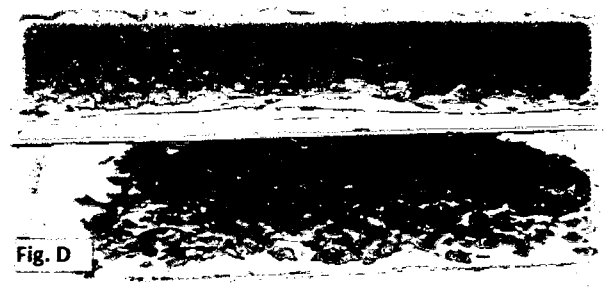
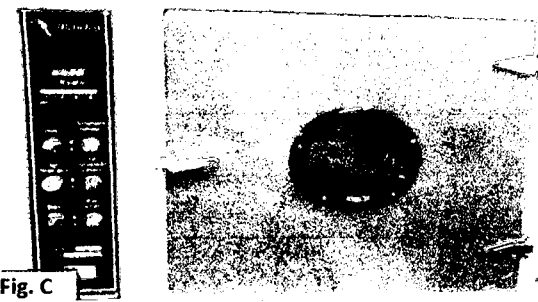
*Fuente: Elaboracion propia (2014)*

**Figura 39. Procedimiento para la Extracción de Colorante de Huito.**



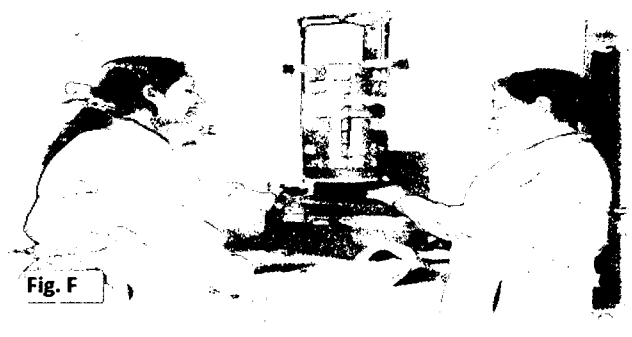
**Fig. A.** selección y lavado de los frutos *G. americana* y **fig. B.** pelado y picado de la fruta de *G. americana*.

*Fuente: Elaboracion propia (2014)*



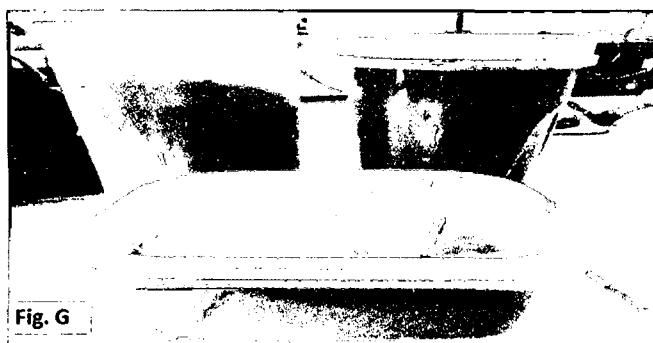
**Fig. C y D.** Secado en bandeja con aire convectivo de la Muestras *G. americana*

*Fuente: Elaboracion propia (2014)*



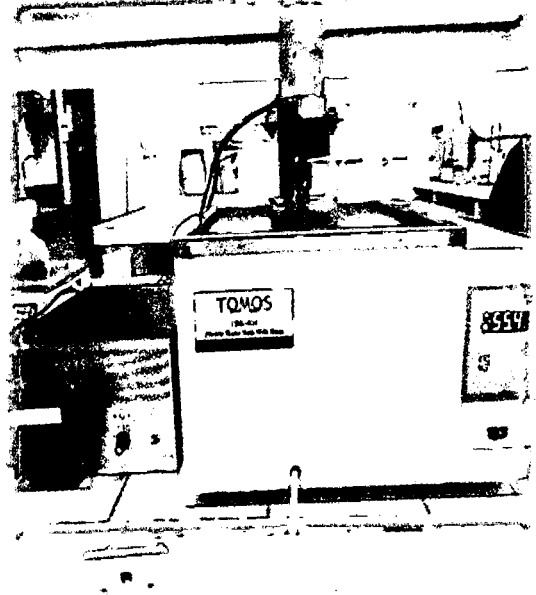
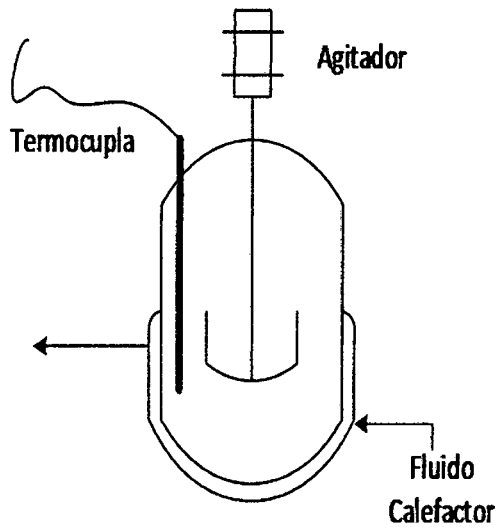
**Fig. E.** Molienda y **Fig. F.** Tamizado de muestras de *G. americana*.

*Fuente: Elaboracion propia (2014)*



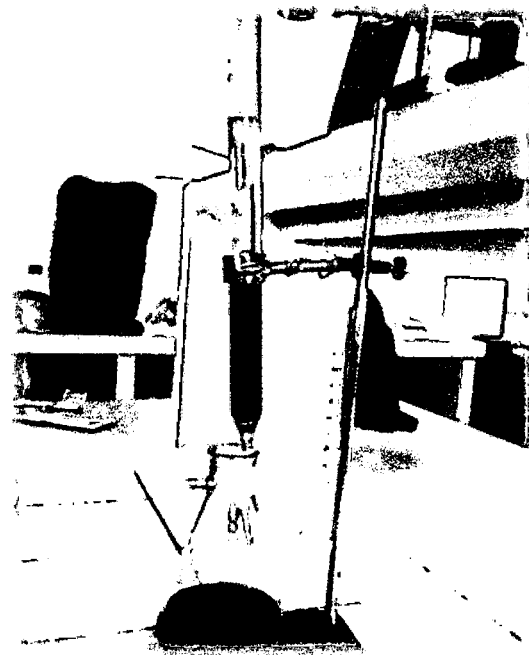
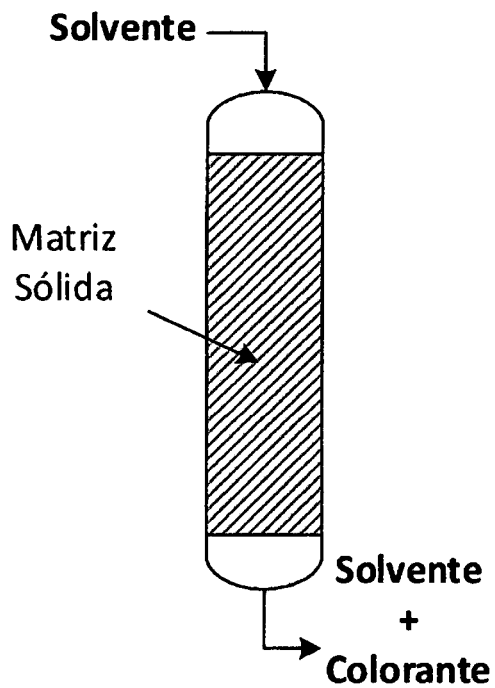
**Figura G.** Muestras de *G. americana* molidas y tamizadas a diferentes granulometrías

*Fuente: Elaboracion propia (2014)*



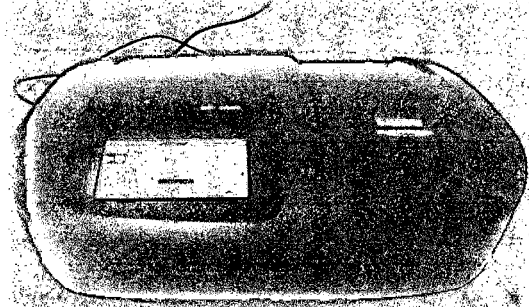
**Figura 40.** Modulos de Extraccion por inundación del colorante de *G. americana*.

*Fuente: Elaboracion propia (2014)*



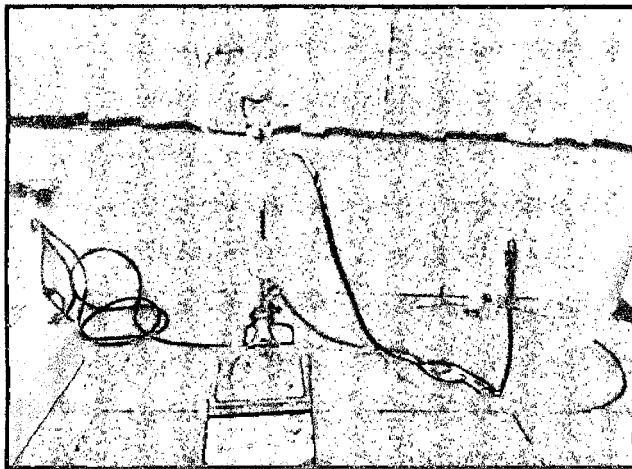
**Figura 41.** Modulo de Extracción por Percolación – escala laboratorio.

*Fuente: Elaboracion propia (2014)*



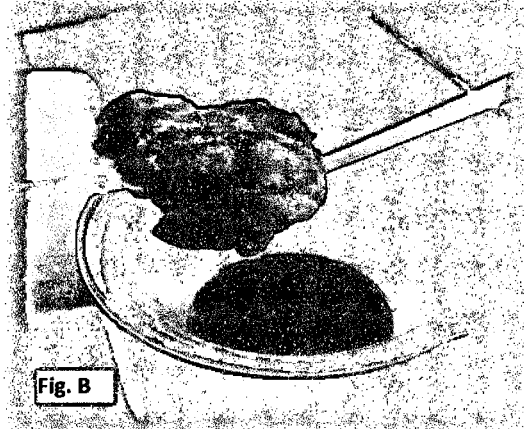
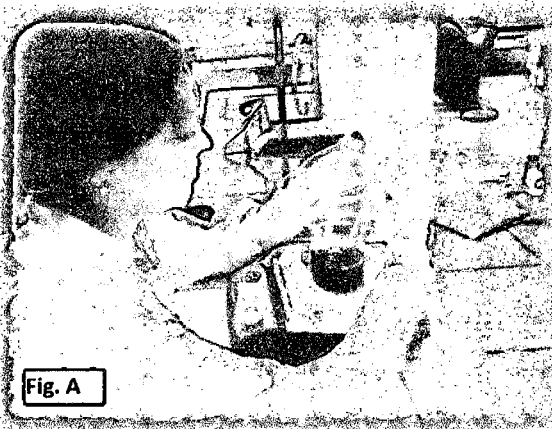
**Figura 42.** Evaluación del colorante por espectrofotometro UV/Vis. y Equipo espectrofotometro UV/Vis

*Fuente: Elaboracion propia (2014)*



**Figura 43.** Equipo de Extracción Soxhlet

*Fuente: Elaboracion propia (2014)*



**Figura 44.** Teñido de muestra de Algodón con Colorante de G. americana.

Solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mordiente NaCl, Temperatura 85 °C.

*Fuente: Elaboración propia, (2014).*

**Cuadro 25.** Pruebas de Solubilidad de los Colorantes Extraídos de la *G. americana* L. por Percolación  
(Razón muestra: solvente = 1:5 m/V)

SOLVENTE	N° EXPERIMENTO	MUY SOLUBLE	SOLUBLE	POCO SOLUBLE	INSOLUBLE
ETANOL 96°	10	-	-	+	-
	12	-	-	+	-
	7	-	-	-	-
ETANOL 60°	10	-	-	+	-
	12	+++	-	-	-
	7	-	-	+	-
ETANOL 40°	10	-	-	+	-
	12	+++	-	-	-
	7	-	-	+	-
ETANOL 20°	10	+++	-	-	-
	12	+++	-	-	-
	7	+++	-	-	-
BENCENO	10	-	-	+	-
	12	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
FORMOL	10	+++	-	-	-
	12	+++	-	-	-
	7	-	++	-	-
AGUA DESTILADA	10	+++	-	-	-
	12	+++	-	-	-
	7	-	++	-	-

**Fuente:** Elaboración propia (2014)

**Cuadro 26.** Pruebas de Solubilidad de los Colorantes Extraídos de la *G. americana* L. por Inundación

(Razón muestra: solvente = 1:5 m/V)

SOLVENTE	N° EXPERIMENTO	MUY SOLUBLE	SOLUBLE	POCO SOLUBLE	INSOLUBLE
ETANOL 96°	11	-	-	+	-
	24	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
ETANOL 60°	11	+++	-	-	-
	24	-	-	+	-
	9	-	-	-	-
ETANOL 40°	11	-	++	-	-
	24	-	-	+	-
	9	-	-	+	-
ETANOL 20°	11	+++	-	-	-
	24	-	-	+	-
	9	-	++	-	-
BENCENO	11	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
FORMOL	11	-	++	-	-
	24	-	++	-	-
	9	-	++	-	-
AGUA DESTILADA	11	+++	-	-	-
	24	+++	-	-	-
	9	+++	-	-	-

*Fuente:* Elaboración propia, (2014).





---

## **INFORME DE CONFORMIDAD DE LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES**

Puerto Maldonado, 22 de Marzo del 2016

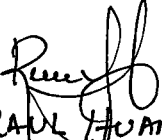
Mediante el presente, los docentes:

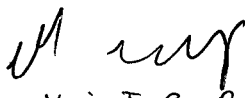
- |                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| ▪ Ing. Raul Huaman Cruz         | Presidente  |
| ▪ Dra. Maria Isabel Cajo Pinche | Secretario  |
| ▪ Dra. Roxana Madueño Portilla  | Vocal       |
| ▪ Msc. Liset Rodriguez Achata   | Accesitaria |

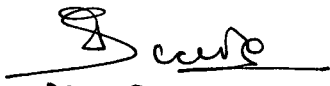
Miembros del Jurado Calificador de la Tesis intitulada: "EVALUACION DE LA POTENCIALIDAD DEL FRUTO DEL HUITO (*Genipa americana*) COMO FUENTE DE COLORANTE NATURAL", sustentada por las Bachilleres **Guiliana Damizu Cardenas Enriquez** y **Carla Claudia Miranda Perlacio**, el dia 14 de Octubre del 2015, en la Ciudad Universitaria de la UNAMAD, emitimos el presente **INFORME DE CONFORMIDAD DE LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES**, con lo cual las Srtas. Tesisistas han cumplido con realizar las modificaciones a las observaciones realizadas durante la sustentacion de la Tesis:

Es todo cuanto informamos a Usted Señor Decano, para los fines correspondientes.

Atentamente;

  
RAUL HUAMAN C.

  
DRA. Maria I. Cajo P.

  
DRA. ROXANA MADUEÑO  
VOCAL.


**ACTA DE SUSTENTACIÓN PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**


En el anfiteatro N° 02 de la ciudad universitaria de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, siendo las 17:36 horas del día 14 de octubre del 2015, dando cumplimiento a la Resolución N° 147-2015-UNAMAD-DFI, de fecha 15 de setiembre del 2015, se reunieron los miembros del Jurado para la sustentación del trabajo de tesis titulado **“EVALUACIÓN DE LA POTENCIALIDAD DEL FRUTO DEL HUITO (Genipa americana) COMO FUENTE DE COLORANTE NATURAL”**, presentado por las bachilleres **Giuliana Damizú Cárdenas Enríquez y Carla Claudia Miranda Perlacio**, los siguientes docentes:



<b>Ing. Raúl Huamán Cruz</b>	Presidente
<b>Dra. María Isabel Cajo Pinche</b>	Secretaria
<b>Dra. Roxana Madueño Portilla</b>	Vocal
<b>M.Sc. Liset Rodríguez Achata</b>	Accesitaria


Con la finalidad de evaluar el Trabajo de tesis intitulado **“EVALUACIÓN DE LA POTENCIALIDAD DEL FRUTO DEL HUITO (Genipa americana) COMO FUENTE DE COLORANTE NATURAL”**, presentado por las bachilleres **Giuliana Damizú Cárdenas Enríquez y Carla Claudia Miranda Perlacio**. Acto seguido se procedió con la exposición del trabajo de tesis por parte de las sustentantes, el jurado procede con la fase de preguntas respectivas y luego el sustento de las tesis. Acto seguido el jurado procede a deliberar de forma reservada y libremente, declarando el trabajo expuesto con el calificativo de bueno y una nota de quince, previo a esto el graduado deberá de realizar el levantamiento a las observaciones entregadas por el jurado calificador.

En fe de lo cual firmamos la presente acta, siendo las 18:35 horas del día 14 de octubre del 2015, se dio por culminado el presente acto de sustentación.

  
RAÚL HUAMÁN C.

  
María Isabel Cajo

  
Giuliana Cardenas  
  
Carla Miranda

  
Liset Rodríguez Achata

  
Roxana Madueño Portilla