



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE DE LAS
SEMILLAS DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) A NIVEL PLANTA PILOTO, PROVENIENTE DE
COBÁN, ALTA VERAPAZ**

Luis Eduardo Búcaro Pape

Asesorado por la Inga. Telma Maricela Cano Morales
e Ing. Mario José Mérida Meré

Guatemala, marzo de 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE DE LAS
SEMILLAS DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) A NIVEL PLANTA PILOTO, PROVENIENTE DE
COBÁN, ALTA VERAPAZ**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

LUIS EDUARDO BÚCARO PAPE

ASESORADO POR LA INGA. TELMA MARICELA CANO MORALES
E ING. MARIO JOSÉ MÉRIDA MERÉ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, ABRIL DE 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL I	Ing. Angel Roberto Sic García
VOCAL II	Ing. Pablo Christian de León Rodríguez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Oscar Humberto Galicia Nuñez
VOCAL V	Br. Carlos Enrique Gómez Donis
SECRETARIA	Inga. Lesbia Magalí Herrera López

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO


DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
EXAMINADOR	Ing. Gerardo Ordóñez
EXAMINADOR	Ing. Orlando Posadas Valdez
EXAMINADORA	Inga. Adolfo Narciso Gramajo Antonio
SECRETARIA	Inga. Lesbia Magalí Herrera López

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) A NIVEL PLANTA PILOTO, PROVENIENTE DE COBÁN, ALTA VERAPAZ

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 11 de agosto de 2015.



Luis Eduardo Búcaro Pape



Guatemala, 26 de octubre de 2017

Ingeniero
Carlos Salvador Wong Davi
Director Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Estimado Ingeniero Wong:

Por medio de la presente HACEMOS CONSTAR que hemos revisado y dado nuestra aprobación al Informe Final del trabajo de graduación **“EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) A NIVEL PLANTA PILOTO, PROVENIENTE DE COBÁN ALTA VERAPAZ”**, del estudiante de Ingeniería Química Luis Eduardo Búcaro Pape quien se identifica con CUI No. 2093633120101 y registro académico número 2011-23104.

Sin otro particular me suscribo de usted.

Atentamente,

Ing. Qco. Mario José Mérida Meré
JEFE

Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales
Sección Química Industrial CII / USAC
Asesor



INGENIERO QUÍMICO
Mario José Mérida Meré
Colegiado 1411

Inga. Qca. Telma Maricela Cano Morales
Profesora Investigadora Titular IX
Sección Química Industrial
Centro de Investigaciones de Ingeniería/USAC
Asesora



INGENIERA QUÍMICA
Telma Maricela Cano M.
Colegiada 433



Guatemala, 06 de febrero de 2018.
Ref. EIQ.TG-IF.004.2018.

Ingeniero
Carlos Salvador Wong Davi
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Wong:

Como consta en el registro de evaluación del informe final EIQ-PRO-REG-007 correlativo **031-2015** le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

**INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN
-Modalidad Seminario de Investigación-**

Solicitado por el estudiante universitario: **Luis Eduardo Búcaro Pape**.
Identificado con número de carné: **2093 63312 0101**.
Identificado con registro académico: **2011-23104**.
Previo a optar al título de **INGENIERO QUÍMICO**.


Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE
DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) A NIVEL PLANTA PILOTO,
PROVENIENTE DE COBÁN ALTA VERAPAZ**

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por los Ingenieros Químicos: **Telma Maricela Cano Morales** y **Mario José Mérida Meré**.

Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Ing. Gerardo Ordoñez
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



Ref.EIQ.TG.002.2018

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación del estudiante, **LUIS EDUARDO BÚCARO PAPE** titulado: **"EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE (*Bixa Orellana L.*)" A NIVEL PLANTA PILOTO, PROVENIENTE DE COBÁN, ALTA VERAPAZ.** Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

"Id y Enseñad a Todos"

Ing. Carlos Salvador Wong Davi
Director
Escuela de Ingeniería Química

Guatemala, marzo 2018

FACULTAD DE INGENIERIA USAC
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
DIRECTOR

Cc: Archivo
CSWD/ale



Asociación Centroamericana de Ingenieros de
Programas de Ingeniería de la Especialidad

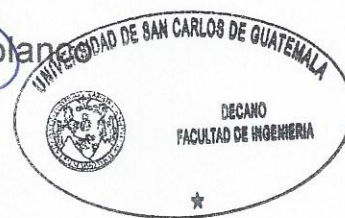




El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE (Bixa Orellana L.) A NIVEL PLANTA PILOTO, PROVENIENTE DE COBÁN, ALTA VERAPAZ**, presentado por el estudiante universitario: **Luis Eduardo Búcaro Pape**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, se autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
Decano



Guatemala, abril de 2018

/cc

ACTO QUE DEDICO A:

Dios	Por darme la bendición de la vida y ser esa fuerza, motivación y compañía para siempre seguir adelante.
Mis padres	Hugo Búcaro y Astrid Pape, por su apoyo incondicional, amor y ser ese ejemplo a seguir en mi vida.
Mis hermanos	Vanessa y Carlos Búcaro, por su apoyo incondicional y ser mi motivación para alcanzar mis metas.
Mi esposa	María Fernanda, por su amor, paciencia y apoyo incondicional para alcanzar mis sueños.
Familia Almeda Soria	Alida Soria, Vivian y Pedro, por su aprecio y apoyo incondicional.
Mis tíos	Dagmar Polasek y Marwin Pape, por su consejo y apoyo incondicional.
Familia Pape Duering	Por su apoyo incondicional.
Familia Búcaro Pérez	Por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS A:

Universidad de San Carlos de Guatemala	Por ser mi casa de estudios que me brindó los conocimientos para alcanzar mis metas profesionales y personales.
Facultad de Ingeniería	Por ser la influencia directa para mi formación y desarrollo como profesional.
Mi padre	Hugo Búcaro, por su apoyo incondicional, amor y ser ese ejemplo a seguir en mi vida.
Mi madre	Astrid Pape, por su apoyo incondicional, amor y ser ese ejemplo a seguir en mi vida.
Mis hermanos	Por ser una importante influencia en mi carrera, entre otras cosas.
Mi esposa	Por ser mi motivación para alcanzar mis metas.
Mis amigos	Por ser los mejores acompañantes para la formación profesional.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS	IX
GLOSARIO	XI
RESUMEN.....	XIII
OBJETIVOS.....	XV
HIPÓTESIS.....	XVII
INTRODUCCIÓN	XIX
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Colorantes naturales	5
2.1.1. Origen de los colorantes naturales	5
2.1.2. Historia de los colorantes naturales.....	6
2.2. Clasificación de los colorantes naturales.....	7
2.2.1. Colorantes naturales.....	8
2.2.1.1. Carotenoides	8
2.2.1.2. Clorofílicos	8
2.2.1.3. Antocianínicos	8
2.2.1.4. Flavonoides	8
2.2.1.5. Betalaínicos	9
2.2.1.6. Taninos.....	9
2.2.2. Colorantes animales.....	9
2.2.2.1. Insectos	10
2.2.2.2. Organismos marinos.....	10

2.3.	Achiote	10
2.3.1.	Etimología	11
2.3.2.	Taxonomía	11
2.3.3.	Origen del cultivo.....	11
2.3.4.	Descripción botánica	12
2.3.5.	Importancia económica	12
2.3.6.	Requerimientos edafoclimáticos.....	13
2.3.6.1.	Temperatura.....	13
2.3.6.2.	Precipitación.....	13
2.3.6.3.	Humedad relativa	13
2.3.6.4.	Altitud	14
2.3.6.5.	Viento	14
2.3.6.6.	Intensidad lumínica	14
2.3.6.7.	Suelo	15
2.3.7.	Tipos de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.)	15
2.3.8.	Composición química y nutricional	17
2.3.9.	Aplicaciones del extracto colorante de la semilla de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.).....	20
2.4.	Cromatografía	21
2.4.1.	Cromatografía de capa fina.....	22
2.4.2.	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	22
3.	METODOLOGÍA	23
3.1.	Variables	23
3.1.1.	Variables independientes	23
3.1.2.	Variables dependientes	23
3.2.	Delimitación del campo de estudio.....	24
3.2.1.	Obtención de la materia prima	24
3.2.2.	Extracción del colorante	24

3.2.3.	Evaluación de la calidad y cuantificación del extracto colorante	25
3.2.4.	Secado del extracto colorante	25
3.2.5.	Recursos humanos disponibles	25
3.3.	Recursos materiales disponibles	25
3.4.	Técnica cuantitativa	26
3.4.1.	Procedimiento para la extracción del colorante de la semilla de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) en planta piloto por medio de lixiviación con álcali acuso	27
3.4.2.	Determinación del porcentaje de rendimiento de las muestras recuperadas de colorante seco de semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.)	29
3.4.3.	Determinación de los componentes activos y su cuantificación del extracto colorante de la semilla de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia	30
3.5.	Recolección y ordenamiento de la información	31
3.6.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	33
3.7.	Análisis estadístico	34
3.7.1.	Diseño de los tratamientos	35
3.7.1.1.	Repeticiones	36
3.7.1.2.	Número de tratamientos para el experimento	36
3.7.2.	Modelo para un análisis de la varianza de un factor	37
3.7.3.	Supuestos para la aplicación del ANOVA	38
3.7.4.	Bases del ANOVA	38

3.7.5.	Procedimiento para el análisis de varianza ANOVA.....	39
3.7.6.	Datos del ANOVA.....	40
4.	RESULTADOS.....	49
4.1.	Evaluación del rendimiento de extracción del colorante natural de las semillas de achiote en función del pH a nivel planta piloto.....	49
4.2.	Evaluación del rendimiento de extracción del colorante natural de las semillas de achiote en función del pH a nivel planta piloto.....	50
4.3.	Evaluación del porcentaje de Bixina del colorante natural de las semillas de achiote en función del tiempo de maceración a nivel planta piloto.....	51
4.4.	Evaluación del porcentaje de bixina del colorante natural de las semillas de achiote en función del pH a nivel planta piloto.....	52
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	53
	CONCLUSIONES.....	57
	RECOMENDACIONES.....	59
	BIBLIOGRAFÍA.....	61
	APÉNDICES.....	65
	ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Achiote con cápsulas de color rojo.....	15
2.	Achiote con cápsulas color verde.....	16
3.	Achiote con cápsulas de color amarillo	16
4.	Achiote con cápsulas sin setas	17
5.	Estructura química de la bixina	18
6.	Estructura química de la norbixina	18
7.	Diagrama de extracción del colorante de las semillas de achiote en planta piloto.....	28
8.	Media 95 % y Fisher LSD para el rendimiento xtractivo del colorante en función del tiempo de maceración	42
9.	Media 95 % y Fisher LSD para el rendimiento extractivo del colorante en función del pH.....	43
10.	Gráfica de interacciones del rendimiento extractivo en función del tiempo de maceración y del pH.....	44
11.	Media 95 % y Fisher LSD del porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración.....	45
12.	Media 95 % y Fisher LSD para el porcentaje de bixina presente en colorante en función del pH.....	46
13.	Gráfico de interacción del porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración y del pH.....	47
14.	Rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) a nivel planta piloto, en función del pH.....	49

15.	Rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) a nivel planta piloto, en función del tiempo de maceración dinámica.....	50
16.	Porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) a nivel planta piloto, en función del pH.....	51
17.	Porcentaje de Bixina del colorante de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) a nivel planta piloto, en función del pH.....	52

TABLAS

I.	Composición química de la semilla de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.)	19
II.	Composición nutricional de la semilla de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.).....	19
III.	Composición del pigmento del achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.).....	20
IV.	Variables independientes para el proceso de extracción por maceración dinámica.....	23
V.	Variables dependientes para el proceso de extracción por maceración dinámica.....	23
VI.	Materia prima y reactivos.....	25
VII.	Instrumentos de medición, equipo y cristalería.....	26
VIII.	Equipo de seguridad.....	26
IX.	Rendimiento extractivo del colorante natural a partir de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) elaborado en planta piloto	31
X.	Datos generales sobre la cuantificación de bixina del extracto colorante seco por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia...32	
XI.	Rendimiento extractivo del colorante natural obtenido de las semillas de achiote (<i>Bixa Orella</i> L.) a nivel planta piloto	33
XII.	Cuantificación de bixina contenida en el extracto colorante seco por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia.....	34
XIII.	Combinaciones del diseño experimental	37

XIV.	Arreglo combinatorio totalmente al azar para el experimento	37
XV.	Resumen estadístico para el rendimiento extractivo del colorante en función del tiempo de maceración.....	41
XVI.	ANOVA para el rendimiento extractivo del colorante en función del tiempo de maceración.....	41
XVII.	Prueba de múltiples rangos para el rendimiento extractivo en función del tiempo de maceración.....	41
XVIII.	Contraste de la prueba de múltiples rangos para el rendimiento extractivo en función del tiempo de maceración	42
XIX.	Resumen estadístico para el rendimiento extractivo del colorante en función del pH	43
XX.	ANOVA para el rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote en función del pH.....	43
XXI.	Resumen estadístico del porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración.....	44
XXII.	ANOVA del porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración.....	45
XXIII.	Resumen estadístico del porcentaje de bixina en función del pH	46
XXIV.	ANOVA del porcentaje de bixina en función del pH.....	46
XXV.	Rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) a nivel planta piloto, en función Ph.....	49
XXVI.	Rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) a nivel planta piloto, en función del tiempo de maceración dinámica	50
XXVII.	Porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) a nivel planta piloto, en función del pH	51
XXVIII.	Porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) a nivel planta piloto, en función del tiempo de maceración dinámica	52

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
°C	Grados Celsius
g	Gramo
h	Hora
kg	Kilogramo
m³	Metro cúbico
mL	Miligramo
t	Tiempo
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno

GLOSARIO

Arilo	Corteza carnosa que tienen ciertas semillas.
Bixina	Es un pigmento carotenoide presente en la corteza externa de las semillas de achiote (<i>Bixa Orellana</i> L.) utilizado como colorante natural.
Carotenoide	Pigmentos orgánicos que normalmente se encuentran naturalmente en ciertas plantas.
Colorante	Sustancia capaz de fijar un color a fibras vegetales o animales por su capacidad entre ciertas longitudes de ondas de luz.
Extracto	Sustancia obtenida normalmente por separación con solventes.
Hidrosoluble	Sustancias solubles en agua.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
Liposoluble	Sustancias solubles en grasas.
Lixiviación	Operación unitaria que consta que un líquido sustraiga una sustancia en específico de un sólido.

Maceración	Método de extracción que consta de dejar reposar un material sólido con una sustancia líquida que extraiga un componente en específico.
Precipitado	Es el sólido remanente de una disolución debido a una reacción química.
Solubilidad	Es la capacidad de una sustancia de disolverse en un líquido, donde se expresan los valores en términos de concentración.
Solvente	Sustancia utilizada para disolver o formar mezclas homogéneas.

RESUMEN

El presente trabajo de graduación tuvo como objetivo evaluar el rendimiento y la calidad del extracto colorante seco de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.), a escala planta piloto, proveniente de Cobán, Alta Verapaz.

El método extractivo utilizado fue lixiviación con álcali acuoso; a las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) se les aplicó maceración mixta (estática y dinámica) en contacto con un solvente. El tamaño del lote fue de 9 kilogramos por cada 36 litros de solvente, donde la maceración estática fue de 12 horas y la maceración dinámica se varió el tiempo (30, 60 y 90 minutos) y para la precipitación del colorante se varió el potencial de hidrógeno pH utilizando valores de (2, 3 y 4).

Se realizó un análisis estadístico para relacionar los valores medios de las variables tiempo de maceración dinámica y potencial de hidrógeno con el rendimiento extractivo donde se determinó que no existen diferencias significativas en cuanto al rendimiento respecto al pH, pero si existe una diferencia significativa entre los valores de rendimiento para tiempos de maceración de 30 minutos respecto a los valores obtenidos para 90 minutos de maceración.

Para la calidad del extracto colorante se realizó la cuantificación de la bixina mediante una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) donde se replicó el análisis estadístico para relacionar el tiempo de maceración dinámica y potencial de hidrógeno pH respecto a la cuantificación de la bixina y no hay diferencias significativas en los valores medios.

OBJETIVOS

General

Evaluar el rendimiento del extracto colorante de las semillas de achiote (*Bixina Orellana L.*) a nivel planta piloto utilizando el método de maceración dinámica en una solución de hidróxido de potasio al 2 %.

Específicos

1. Evaluar el rendimiento de extracción del colorante de las semillas de achiote en función del pH (2, 3 y 4).
2. Evaluar el rendimiento de extracción del colorante de las semillas de achiote en función del tiempo de extracción (30, 60 y 90 minutos).
3. Evaluar el contenido de bixina del extracto colorante en función del pH (2,3 y 4).
4. Evaluar el contenido de bixina del extracto colorante en función del tiempo de extracción (30, 60 y 90 minutos).

HIPÓTESIS

Es posible extraer el colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto para evaluar el rendimiento de extracción y el porcentaje de bixina.

Hipótesis nula

Ho1: no existe diferencia significativa en cuanto al rendimiento al variar el potencial de hidrógeno pH del extracto (2, 3, 4).

Ho2: no existe diferencia significativa en cuanto al rendimiento al variar los tiempos de extracción (30, 60 y 90 minutos).

Ho3: no existe diferencia significativa en cuanto a la cuantificación de la bixina al variar el potencial de hidrógeno del extracto (2, 3, 4).

Ho4: no existe diferencia significativa en cuanto a la cuantificación de la bixina al variar los tiempos de extracción (30, 60 y 90 minutos).

Hipótesis alternativa

Hi1: existe diferencia significativa en cuanto al rendimiento al variar el potencial de hidrógeno pH del extracto (2, 3, 4).

Hi2: existe diferencia significativa en cuanto al rendimiento al variar los tiempos de extracción (30, 60 y 90 minutos).

Hi3: existe diferencia significativa en cuanto a la cuantificación de la bixina al variar el potencial de hidrógeno del extracto (2, 3, 4).

Hi4: existe diferencia significativa en cuanto a la cuantificación de la bixina al variar los tiempos de extracción (30, 60 y 90).

INTRODUCCIÓN

El achiote con nombre científico *Bixa Orellana* L. pertenece a la familia Bixaceae, que crece en ambientes tropicales; su origen data desde los tiempos prehispánicos y se cultiva en Guatemala, Colombia, Brasil, Perú, otros países centroamericanos, entre otros.

De la planta en general se pueden obtener productos y subproductos funcionales para diferentes industrias, pero lo que más demanda la industria es el extracto colorante, el cual se encuentra en el arilo o parte carnosa que recubre a la semilla; este colorante es aplicado para dar olor y/o color a alimentos, pinturas, cosméticos, barnices, entre otras aplicaciones.

Los colorantes naturales se obtienen tanto de materia vegetal como animal y son características por sus tonalidades. Los colorantes naturales decayeron hace algún tiempo debido a que el auge tecnológico trajo a los colorantes sintéticos, pero las ventajas que tienen sobre los colorantes sintéticos son no ser dañinos para la salud del ser humano.

En la actualidad, los colorantes naturales están siendo más demandados debido a que las regulaciones internacionales de alimentos como FDA y las normas COGUANOR aseguran que los colorantes sintéticos pueden ser alergénicos y cancerígenos para cierta población mundial, con lo cual están optando por la utilización nuevamente de colorantes naturales.

En Guatemala se exportan millones de kilos de achiote sin procesar al extranjero, con lo cual el presente trabajo se pretende tecnificar la obtención del extracto colorante de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.) y obtener datos de rendimiento extractivo y su calidad para que los productores guatemaltecos puedan optar por darle un valor agregado al achiote.

1. ANTECEDENTES

A escala industrial se pueden utilizar diferentes solventes para obtener el pigmento colorante del achiote: aceites vegetales, propilenglicol o álcali acuoso. Según Proexport la utilización de hidróxido de potasio tiene un rendimiento de extracción del componente activo del 30 %; se establece así que sobre todos los demás solventes para extraer pigmentos colorantes el hidróxido de potasio es el más utilizado; corroborado por la empresa KALSEC de Estados Unidos.

En el año 2003, Jorge Devia Pineda y Lilian Saldarriaga Calderón realizaron la investigación titulada *Planta piloto para obtener colorante de las semillas de achiote*, en la Universidad de Eafit de Medellín, Colombia; determinaron que para producir 50 kg diarios, con un rendimiento cercano al 8 %, se debe utilizar una relación 1:3 de masa de semilla de achiote e hidróxido de potasio al 2 % como solvente, en conjunto de un tiempo de agitación de 45 minutos a 140 rpm.

Obtuvieron como producto final un polvo rojo intenso el cual fue caracterizado por medio de cromatografía en capa delgada, espectro infrarrojo y UV-VIS como Bixina.

Por otro lado, Jorge Mario Lanza, también en 1997, presentó su trabajo de grado de ingeniero químico titulado *Optimización del tiempo de lavado en el proceso de extracción de bixina con álcali a partir de semillas de achiote de diferente maduración*. Lanza determinó y estableció que tanto la pureza del colorante como el rendimiento son dependientes, totalmente, del tiempo de lavado en el equipo extractor; con lo cual pudo encontrar que el tiempo óptimo

de extracción del colorante de las semillas de achiote por medio de álcali acuoso es de 6 minutos.

En 1997 Salvá Ruiz Bettit y David Campos Gutiérrez llevaron a cabo la investigación *Utilización de enzimas en la extracción de colorante a partir de semillas de achiote*; se estudió como cuatro preparaciones enzimáticas comerciales influyen a la extracción de annato a partir de las semillas de achiote, determinando que con las cuatro preparaciones enzimáticas se aumentó el rendimiento de extracción, siendo estas mejores que la extracción por medio de álcali acuoso.

En 1984 fue realizada la investigación *Caracterización de 81 plantas de achiote de la colección del CATIE procedentes de Honduras y propagación vegetativa por estacas* por Jorge Arce Portuguez, quien realizó el estudio en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Departamento de Producción Vegetal, Turrialba, Costa Rica. Arce determinó que la propagación vegetativa del achiote por medio de estacas suele ser un método más eficiente, que con el cual se demuestra el potencial agronómico y económico debido a que la demanda de achiote ha ido aumentando con el tiempo en los mercados nacionales e internacionales.

Luego, se han llevado a cabo otros trabajos de graduación y proyectos de investigación con relación a extractos colorante diferentes al achiote realizados en la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, algunos se describen a continuación:

- *Evaluación de la capacidad tintórea de los tintes naturales obtenidos de los desechos agroindustriales del coco y del aguacate en el proceso de tinción de fibras naturales utilizadas en la elaboración de artesanías llevado a cabo por el grupo de investigadores de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniera, Usac, en el año 2008.*
- *Estudio tecnológico sobre los tintes naturales extraídos de la corteza de tres especies forestales cultivadas en Guatemala, para teñir fibras naturales que cumplan con especificaciones de calidad exigidas en el mercado., proyecto 6-46 PUIDI-DIGI, realizado por el grupo de investigadores de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniera, Usac, en el año 2007.*
- *Evaluación de la capacidad de tinción de los tintes obtenidos de dos especies forestales guatemaltecas, en el proceso de teñido de fibras, lana y maguey, proyecto que llevo a cabo la Inga. Telma Cano con su grupo de investigadores y la Digi, en el año 2006.*
- *“Extracción a nivel laboratorio, de pigmentos colorantes del tipo flavonoides contenidos en la flor de subín (Acaccia farnesiana L. Wild) proveniente de un bosque silvestre guatemalteco” elaborado por Del Cid Vásquez, Henry en el año 2004.*
- *Extracción del colorante acuoso, a partir de los rechazos de exportación de la producción nacional de dos variedades de pitahaya, a nivel planta piloto el cual es el proyecto FODECYT 13-99 llevado a cabo por el Ing. Eduardo Calderón en el año 2001.*

- *Extracción de carotenoides de la caléndula para su utilización como colorante natural en productos de consumo humano* realizado por Marco Antonio Donado Miranda, en 2000.
- Extracción de los pigmentos colorantes del tipo xantofilas contenidos en la flor de *Tagetes erecta* (Marigold) realizada por Mario Domínguez, en 1987.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Colorantes naturales

Algunas estructuras vegetales y animales pueden tener coloraciones naturales, las cuales se hacen visibles a la precepción humana. Las principales funciones o aplicaciones de los colorantes es dar color a diferentes componentes celulares de una muestra para facilitar su análisis, observación y dar color a productos del consumo del ser humano como la comida y los cosméticos.

Un colorante es útil en la industria una vez cumpla bien con su función de teñir fuertemente el producto al que se le aplica, que al ser lavado este no pierda coloración y que soporte la acción directa de la luz.

2.1.1. Origen de los colorantes naturales

Las antiguas civilizaciones fueron las primeras en utilizar materia vegetal y animal como colorantes; los pigmentos o extractos colorantes los extraían de plantas, animales y minerales. Estas civilizaciones empleaban la materia colorante para pintura y dibujos cavernícolas, teñir ropas, pieles y para la fabricación de artefactos religiosos.

Las civilizaciones precolombinas de América Latina y los antiguos egipcios dieron a conocer la era donde el colorante natural tuvo una función importante ya que era tan útil para la tinción textil como para los alimentos, hasta llegar a las aplicaciones cosméticas; las materias primas más utilizadas para teñir o

colorear eran la cúrcuma, índigo natural, palo de Campeche. Por otro lado, de los animales, en general, se utilizaba la sangre y puramente el extracto se empleaba de animales como la cochinilla.

2.1.2. Historia de los colorantes naturales

Para el siglo XIX, las plantas, animales y minerales fueron las fuentes de materia prima colorante para teñir y pigmentar. En el año 1000 a.C. está evidenciado que se tiñeron fibras; fueron teñidos simples que marcaron el camino del uso de colorantes para teñir. El colorante azul de índigo que se deriva de la planta *Indigofera tinctoria*, ha sido conocida por aproximadamente 4 000 años. Luego, los antiguos comerciantes introdujeron al mercado de esa época estos colorantes azules en el Mediterráneo al igual como se hizo con el colorante azul *Asatis tinctoria*, que ha estado presente como colorante desde la Edad de Bronce, aproximadamente entre 2500 – 800 a.C.

Los tonos rojizos se obtuvieron por primera vez de la raíz de rubia, *Rubia tinctorum*, planta que crece en el Mediterráneo y Asia; esta planta está compuesta por alizarina, la cual es un colorante mordiente, grupo al cual pertenecen la mayoría de colorantes naturales.

A lo largo de la Edad Media (aproximadamente 1250 d.C.) los monjes registraron procedimientos de tintura, donde no solo usaban las plantas para teñir, también, como medicina.

En tiempos más actuales, en 1971 los colorantes químicos inician una pelea por tomar el lugar de los colorantes naturales; ya que, las propiedades de los colorantes sintéticos eran más amplios; según los requerimientos aumentó su uso ya no solo en la industria alimenticia, también, en la tinción de productos

farmacéuticos. En este año, Woulfe sintetizó el primer colorante, el ácido píorico, el cual fue sintetizado a partir de la acción del ácido nítrico sobre el índigo natural.

Luego, en 1856 la era de los colorantes sintéticos inició; William Henry Perkin (1838-1907) obtuvo el colorante púrpura por el efecto oxidante del ácido crómico sobre la anilina.

En 1834 se logró preparar Aurina a partir del alquitrán de hulla, obtenida por Friedlich Ferdinand Runge; para 1855 se tecnificó la obtención de la Aurina.

En los inicios, los colorantes naturales, debido a la falta de tecnología, eran mucho más utilizados que en la era actual; aunque, debido a los efectos contra de la salud, actualmente, los colorantes sintéticos están perdiendo campo; se les está dando la oportunidad a los colorantes naturales de volver a ser demandados masivamente.

2.2. Clasificación de los colorantes naturales

Existen diferentes clasificaciones de los colorantes naturales; la autora del libro *Colorantes naturales*, Lock Olga Sing de Ugaz los clasifica según su naturaleza química: tetrapirrolles, carotenoides, flavonoides, xantonas, quinonas, derivados indigoides e índoles y pirimidinas sustituidas.

Por otro lado, la Red Textil Argentina los clasifica con base en su estructura molecular, los cuales se dividen en dos grupos generales: colorantes vegetales y colorantes animales. A partir de la clasificación general, se pueden clasificar según su estructura química.

2.2.1. Colorantes naturales

Proviene de diferentes especies vegetales que se pueden dividir en 6 grupos debido a sus estructuras moleculares.

2.2.1.1. Carotenoides

Tienen estructuras isoprenoides, los cuales están presentes en colorantes y pigmentos naturales como hongos, algas y bacterias; su estructura química está compuesta de dobles enlaces insaturados y la mayoría son tetraterpenos con 40 átomos de carbono.

2.2.1.2. Clorofílicos

Están constituidos por porfirina, la cual tiene incorporado un átomo de magnesio en el centro del núcleo tetrapirrólico; este tipo de pigmentos son de los que más abundan en la naturaleza.

2.2.1.3. Antocianínicos

Forman parte de uno de los seis grupos que constituyen al grupo de los flavonoides, los cuales son metabolitos secundarios en las plantas; estos son verdaderamente colorantes naturales ya que son pigmentos hidrosolubles.

2.2.1.4. Flavonoides

Los flavonoides no antocianínicos son característicos por la gama de colores amarillos, los cuales se caracterizan por ser polifenoles solubles en

agua. De estos se pueden derivar lo que son los taninos condensados, flavonas y las flavononas.

2.2.1.5. Betalaínicos

Son colorantes que están constituidos por 70 pigmentos hidrosolubles con estructura de glucósidos, los cuales se dividen en dos grupos: las betacianinas y las betaxantinas. Un ejemplo de materia prima para su obtención es la remolacha (*Beta vulgaris*) para la betacianinas y las bayas de los cactus pitaya (*Hylocereus*) en el caso de las betaxantinas.

2.2.1.6. Taninos

Son colorantes extraídos de plantas superiores, los cuales son compuestos fenólicos en una gama de colores que van desde el amarillo hasta el castaño oscuro; se dividen en taninos hidrolizables y taninos condensables.

Los taninos hidrolizables son prácticamente polímeros que están formados por fenoles y azúcares simples; por otro lado, los taninos condensados se pueden hidrolizar en medios ácidos. Algunas de las plantas de las cuales se pueden obtener taninos se encuentran los robles (*Quercus robur*), paquió (*Hymenaea courbaril*), castaños (*Castanea sativa*), entre otros.

2.2.2. Colorantes animales

Por obvias razones, se obtienen colorantes naturales a partir de especies del reino animal, que se encuentran en menos cantidad que el reino vegetal pero que pueden ser útiles. Estos se dividen en insectos y organismos marinos.

2.2.2.1. Insectos

Uno de los principales y ya conocidos insectos para la obtención de colorante es la llamada cochinilla, de la cual se obtiene un colorante rojo. Otro ejemplo es el kermes, del cual también se extrae colorante rojo.

2.2.2.2. Organismos marinos

La obtención de colorantes naturales a partir de organismos marinos se da en su mayoría de los moluscos cefalópodos, como la llamada cañadilla (*Murex brandaris*) de la cual se obtiene un color púrpura; otro ejemplo, sería la jibia de la cual se extrae colorante marrón rojizo.

2.3. Achiote

En la siguiente figura se muestra la semilla de achiote dentro de la capsula.

Figura 1. **Bixa Orellana L.**



Fuente: *Archiote*. <http://www.plantasmedicinal.com/achiote/>. Consulta: 14 de mayo de 2015.

2.3.1. Etimología

El achiote con nombre científico *Bixa Orellana* L. tiene como sinónimos *Bixa acuminata* Boj, *Bixa americana* Poir y *Bixa purpurea* Boj.

- Bixa: género que se deriva del nombre común, bixa o bija, debido a los indígenas de las Antillas.
- Orellana: epíteto dado en honor a Francisco de Orellana compañero de Pizarro cuando se llevó a cabo la conquista de Perú y el descubrimiento del Amazonas.
- Achiote: viene de axiotl, nombre que le dieron los indígenas en México.

2.3.2. Taxonomía

Esta planta pertenece a la familia de las Bixaceae (Bixácea), con nombre científico *Bixa Orellana* L.

2.3.3. Origen del cultivo

Esta planta es originaria del trópico de América, donde se encuentra la posibilidad que sea de la cuenca amazónica de la parte de Brasil. Según otros investigadores, es una planta que se ha extendido a lo largo del Caribe y que puede ser específica de Centroamérica.

Se cultiva en todas las regiones tropicales del mundo; se puede dar hasta los 1 500 metros sobre el nivel del mar. El achiote es cultivado en jardines, patios y fincas con los fines de comercializarlo ya sea con objetivos

ornamentales o con el objetivo de ser un aditivo colorante para diversos productos como cosméticos y alimentos.

2.3.4. Descripción botánica

- **Árbol:** o arbusto hasta de 9 metros de altura, el cual es muy ramificado con una copa densa casi esférica.
- **Hojas:** perennes, alternas, simples, enteras, elípticas, cordiformes u ovadas con base cordada, ápice agudo, pecíolo largo de hasta 9 centímetros de longitud; limbo hasta de 19 centímetros de longitud por 11 de ancho en la parte media.
- **Flores:** son vistosas, reunidas en panículas terminales, cada flor con 5 sépalos café, pubescentes, 5 pétalos blancos o rosados, glandulosos; numerosos estambres amarillos o vino tinto a morados, anteras amarillas, largos.
- **Frutos:** cápsulas ovoides u ovoide globosas, valvosas, con espinas flexibles, de color café, rojo o púrpura.
- **Semillas:** ovoides o cónicas, cubiertas con arilo viscoso de color anaranjado o rojizo.

2.3.5. Importancia económica

El simple hecho de que se cultive le da un valor por el trabajo que representa cuidar y hacer crecer a la planta; pero en muchos países, incluyendo a Guatemala, no se tienen un proceso tecnificado para la obtención del extracto

colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.); con lo cual tanto los pequeños como los grande agricultores de esta planta, no obtienen remuneraciones tan alta y Guatemala exporta la mayoría de esta materia prima: 1 169 089 y 2 502 253 millones de kilos para el 2013 y 2014, respectivamente. Si se extrajera el extracto colorante de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.) se le daría un valor agregado el cual brindaría mayores ingresos a los agricultores tanto guatemaltecos y de otros países.

2.3.6. Requerimientos edafoclimáticos

Estos requerimientos están constituidos por la temperatura, humedad relativa, altitud, precipitación, intensidad lumínica, viento y suelo.

2.3.6.1. Temperatura

El cultivo necesita temperaturas que se encuentren entre los 20 °C y 80 °C.

2.3.6.2. Precipitación

El achiote necesita una precipitación entre los 600 y 2 000 milímetros de agua al año; pero el achiote crece con una menor cantidad de lluvia; lluvias intercaladas con una estación seca de 4 a 5 meses y una precipitación de 1 700 a 2 000 milímetros de agua anuales son considerados condiciones aceptables.

2.3.6.3. Humedad relativa

La humedad relativa que se considera adecuada para que se de bien el cultivo de achiote (*Bixa Orellana* L.) varía entre 60 % y 80 %, cuando es

superior se propicia para el desarrollo de hongos los cuales aumentan la presencia de insectos dañinos.

2.3.6.4. Altitud

El achiote presenta un rango muy amplio en cuanto a su adaptación en relación con la altitud, que oscila entre los 30 y 1 200 msnm, pero esta se comporta mejor específicamente entre los 300 y 600 msnm; la producción de semilla disminuye cuando la planta sobre pasa los 800 msnm; este comienza a tener limitaciones en su producción y está más propensa la planta a contraer enfermedades.

2.3.6.5. Viento

Esta planta tolera vientos fuertes ya que tiene un sistema radicular, pero si se encuentra en una zona de alta actividad de vientos huracanados se ve perjudicada en especial las flores y hojas, también, causa daños a las ramas; esto va relacionado con la luminosidad, la cual se ve afectada a perder hojas y ramas.

2.3.6.6. Intensidad lumínica

El achiote (*Bixa Orellana* L.) requiere de una buena luminosidad; esta debe estar distribuida uniformemente sobre su capa para fructificar con uniformidad; los índices más elevados de sol se dan en la etapa de floración y fructificación las cuales casualmente coinciden en le estación seca. La cantidad de luz necesaria es de 10 horas/día.

2.3.6.7. Suelo

Esta planta (achiote) se adapta sin mucho problema a diferentes tipos de suelo, donde solo importa que tengan un buen drenaje, profundidades mayores a los 0.9 metros, textura franco arenosa, con pendientes menores del 5 %. Por otro lado, esta planta no tolera suelos mal drenados y con alto contenido de arcilla. El pH en el que crecen estas plantas es de aproximadamente de 5 a 7,5, tomando en cuenta que esta puede adaptarse a pH entre 4,3 y 8,7.

2.3.7. Tipos de achiote (*Bixa Orellana* L.)

Estos se pueden clasificar según el color de las cápsulas de las semillas o si contiene cápsula que proteja las semillas.

Figura 2. **Achiote con cápsulas de color rojo**



Fuente: *Archiote*. <http://www.tusplantasmedicinales.com/achiote/>. Consulta: 15 mayo de 2015.

Figura 3. **Achiote con cápsulas color verde**



Fuente: *Archiole verde*. http://www.plantsystematics.org/imgs/robbin/r/Bixaceae_Bixa_orellana_5330.html. Consulta: 16 de mayo de 2015.

Figura 4. **Achiote con cápsulas de color amarillo**



Fuente: *Archiole amarillo*. <http://www.cich.org/Publicaciones/03/CNTAF-Manual-Tecnico-del-Achiote.pdf>. Consulta: 16 de mayo de 2015.

Figura 5. **Achiote con cápsulas sin setas**



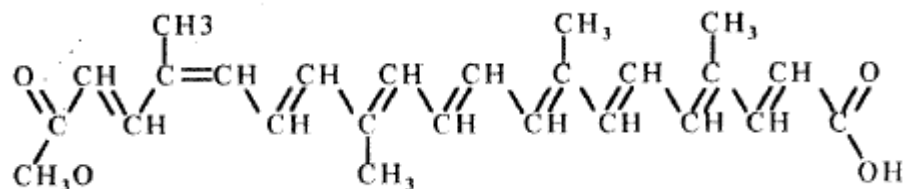
Fuente: *Archiole sin setas*. <http://www.cich.org/Publicaciones/03/CNTAF-Manual-Tecnico-del-Achiote.pdf>. Consulta: 16 de mayo de 2015.

2.3.8. Composición química y nutricional

El achiote está compuesto por componentes como la bixina, norbixina, apigenina, luteína, betacaroteno y triterpenos. Pero los componentes que más abundan son la bixina y la norbixina.

La bixina es un ácido carotenocarboxílico, el cual tiene como fórmula química $C_{24}H_{30}O_4$, esta pertenece al grupo de los lípidos. Debido a que el terminal libre esterificado es un alcohol metílico, es el que le da característica de ser liposoluble.

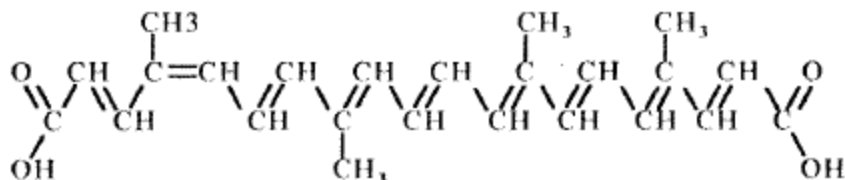
Figura 6. Estructura química de la bixina



Fuente: LANZA GALINDO, Jorge Mario. *Optimización del tiempo de lavado en el proceso de extracción de bixina con álcali a partir de semillas de achiote (Bixa Orellana) de diferente maduración.* p. 53.

“Por el otro lado, también está presente la norbixina, la cual tiene como fórmula química C₂₄H₂₈O₄. La norbixina se obtiene de la saponificación del éster metílico que la bixina tiene y debido a esta característica este compuesto se vuelve hidrosoluble a pH alcalinos.¹”

Figura 7. Estructura química de la norbixina



Fuente: LANZA GALINDO, Jorge Mario. *Optimización del tiempo de lavado en el proceso de extracción de bixina con álcali a partir de semillas de achiote (Bixa Orellana) de diferente maduración.* p. 53.

¹ LANZA GALINDO, Jorge Mario. *Optimización del tiempo de lavado en el proceso de extracción de bixina con álcali a partir de semillas de achiote (Bixa Orellana) de diferente maduración.* p. 53.

Tabla I. **Composición química de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.)**

Composición química (%)	
Humedad	8.00 – 13.00
Proteína	13 – 14.24
Celulosa	13.8
Fibra Cruda	18.48
Almidones	11.45
Carbohidratos totales	39.91
Ceniza	4.50 – 7.97
Energía	54 kcal

Fuente: DEVIA PINEDA, Jorge Enrique; SALDERRIAGA CALDERON, Liliana. *Planta piloto para obtener colorante de la semilla de achiote (Bixa Orellana L.)*. p. 15.

Tabla II. **Composición nutricional de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.)**

Composición (mg/100g)	
Calcio	7
Fósforo	10
Hierro	1.4
Vitamina A	45 mg
Riboflavina	0.2
Niacina	1.46
Tiamina	0.39
Ácido Ascórbico	12.5

Fuente: DEVIA PINEDA, Jorge Enrique; SALDERRIAGA CALDERON, Liliana. *Planta piloto para obtener colorante de la semilla de achiote (Bixa Orellana L.)*. p. 15.

Tabla III. **Composición del pigmento del achiote (*Bixa Orellana* L.)**

Composición (g/100g)	
Proteínas	12.3 – 13.2
Pectina	0.23
Carbohidratos	39.91 – 47.90
Ceniza	5.44 – 6.92
Taninos	0.33 – 0.91
Pentosanos	11.35 – 14.97
Carotenoides	1.21 – 2.30
β-carotenos	6.8 – 11.30 mg

Fuente: DEVIA PINEDA, Jorge Enrique; SALDERRIAGA CALDERON, Liliana. *Planta piloto para obtener colorante de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.)*. p. 15.

2.3.9. Aplicaciones del extracto colorante de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.)

Del aprovechamiento de las ramas se puede obtener una goma, muy parecida a la goma arábica; esta resina disuelta en agua se puede usar como adhesivo de esmaltes cerámicos.

De la madera del tronco se pueden fabricar muebles, mangos para herramientas, entre otros.

Por otro lado, del arilo o porción carnosa que envuelve la semilla, se puede extraer el colorante; el cual es muy demandado en la industria para dar color y olor a productos alimenticios (queso, mantequilla, embutidos), aceites, ceras, barnices, pinturas, cosméticos y fibras textiles.

El aceite de las semillas es un emoliente con un alto contenido de carotenoides los cuales proveen propiedades antioxidantes; por eso se ha utilizado para la fabricación de productos para el cuidado del cuerpo humano, como lo serían cremas, lociones y champú.

La semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.) molida se puede utilizar para tratar enfermedades como el sarampión, viruela, enfermedades del riñón, disentería y febrífugo, como astringente.

De la raíz se pueden hacer té para infusiones, hechos con pequeños vástagos y hojas, que pueden ser antidisentérico, afrodisíaco, astringente y para tratar infecciones en la piel, fiebres y hepatitis; por otro lado, el extracto etanólico de los frutos y hojas se ha mostrado una actividad en contra del *Escherichi coli* y *Stephylococcus aureus*.

2.4. Cromatografía

Estas técnicas se utilizan para separar los componentes de forma individual de una mezcla, en su mayoría de casos para identificar un compuesto en específico, comparándolo con sustancias conocidas o mejor llamadas patrones primarios.

La técnica cromatográfica está basada por la interacción de un soluto con dos fases: una sólida y las otras líquidas, llamada fase estacionaria. Que por medio de adsorción se solubiliza cada fase por la fase móvil. Cuando se está en equilibrio, la relación de las concentraciones se le denomina coeficiente de reparto, el cual si difiere entre cada componente se separa eficientemente cada componente y esta característica depende de la naturaleza de cada componente.

2.4.1. Cromatografía de capa fina

Es una técnica sencilla, la cual le debe el nombre a que la fase estacionaria es una capa fina de una materia porosa, extendida para su manejo sobre un soporte inerte; donde la fase móvil se mezcla con disolventes, esta se traslada por la capilaridad de la capa fina, donde esta arrastra los componentes en su mayoría con un coeficiente de reparto alto.

2.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

En la cromatografía líquida se utiliza una fase móvil, la cual fluye por una columna que contiene una fase fija; donde la separación se da debido a las interacciones entre moléculas de la muestra de ambas fases.

La ventaja de utilizar este tipo de cromatografía es que no está limitada a la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra, y que es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, polímeros, entre otros.

3. METODOLOGÍA

3.1. Variables

3.1.1. Variables independientes

Tabla IV. **Variables independientes para el proceso de extracción por maceración dinámica**

Núm.	Variable	Símbolo matemático	Dimensional (SI)	Descripción
1	Masa	m	Kg	Es la masa que se le introducirá a la marmita, la cual será constante.
2	Volumen	V	L	La cantidad de solvente que se añadirá a la marmita, la cual será constante.
3	Temperatura	T	K	La temperatura de extracción será constante.
4	Tiempo de extracción	t	s	El tiempo de extracción será variable para hacer la comparación de rendimiento.

Fuente: elaboración propia.

3.1.2. Variables dependientes

Tabla V. **Variables dependientes para el proceso de extracción por maceración dinámica**

Núm.	Variable	Símbolo matemático	Dimensional (SI)	Descripción
1	Porcentaje de rendimiento	%	adimensional	Es el porcentaje obtenido por cada extracción de colorante.
2	Cantidad de componentes activos	%	adimensional	Es tanto la presencia como la cantidad presente de componentes activos.

Continuación de la tabla V.

3	Densidad	ρ	g/ml	La densidad del aceite esencial se mantendrá constante.
4	Índice de refracción	n	adimensional	Este depende de tiempo de extracción y del pH para precipitar el colorante.

Fuente: elaboración propia.

3.2. Delimitación del campo de estudio

3.2.1. Obtención de la materia prima

Para la extracción del colorante de achiote la materia prima se recolectó en comunidades de Alta Verapaz con el apoyo de SEDEAGRO S.A. y AROMATECA S.A.; la materia prima se colocó en envases plásticos con tapadera y se transportaron a la Sección de Química Industrial, Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales CII/USAC.4

3.2.2. Extracción del colorante

La parte del vegetal a utilizar es la semilla para extraer el colorante por medio del método de maceración dinámica con álcali acuoso; dicho procedimiento se realizó en el Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales, LIEXVE, en la sección de Química Industrial de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ciudad universitaria zona 12.

3.2.3. Evaluación de la calidad y cuantificación del extracto colorante

La cromatografía líquida de alta eficiencia se realizó en el Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala.

3.2.4. Secado del extracto colorante

El extracto colorante obtenido se secó en un secador de bandejas de flujo transversal; este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales LIEXVE, en la Sección de Química Industrial de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ciudad universitaria zona 12.

3.2.5. Recursos humanos disponibles

- Investigador: Br. Luis Eduardo Búcaro Pape
- Asesores: Inga. Telma Maricela Cano Morales, Ing. Mario José Mérida Meré

3.3. Recursos materiales disponibles

Tabla VI. **Materia prima y reactivos**

Materia prima	Semilla de achiote
Reactivos	Hidróxido de potasio
	Acido sulfúrico
	Cloroformo
	Acetato de etilo
	Metanol
	Bromuro de potasio
	Agua desmineralizada

Fuente: elaboración propia.

Tabla VII. **Instrumentos de medición, equipo y cristalería**

Instrumentos de laboratorio	Espátulas
	Embudo
	Cronómetro
Instrumentos de medición	Balanza analítica marca VWR
	Termómetro
	Picnómetro 1 mL
	Cromatógrafo de capa fina
	Refractómetro
	Potenciómetro
Cristalería	Varillas de agitación
	Beacker de 500 mL
	Balón aforado de 500 mL
	Probeta de 250 y 1000 mL
	Ampolla de decantación de 500 mL
	Erlenmeyer de 500 mL
Equipo	Marmita con agitador
	Horno secador (PREMLAB)
	Campana de extracción de gases (PREMLAB)
	Refrigerador (Whirlpool)
	Plancha de calentamiento (VWR de 60 Hertz)
Otros	Botes plásticos de 10 galones

Fuente: elaboración propia

Tabla VIII. **Equipo de seguridad**

Equipo de seguridad	Guantes de látex
	Mascarilla
	Botas industriales
	Bata blanca
	Cofia
	Lentes de laboratorio
	Mascarilla con filtros para gases

Fuente: elaboración propia.

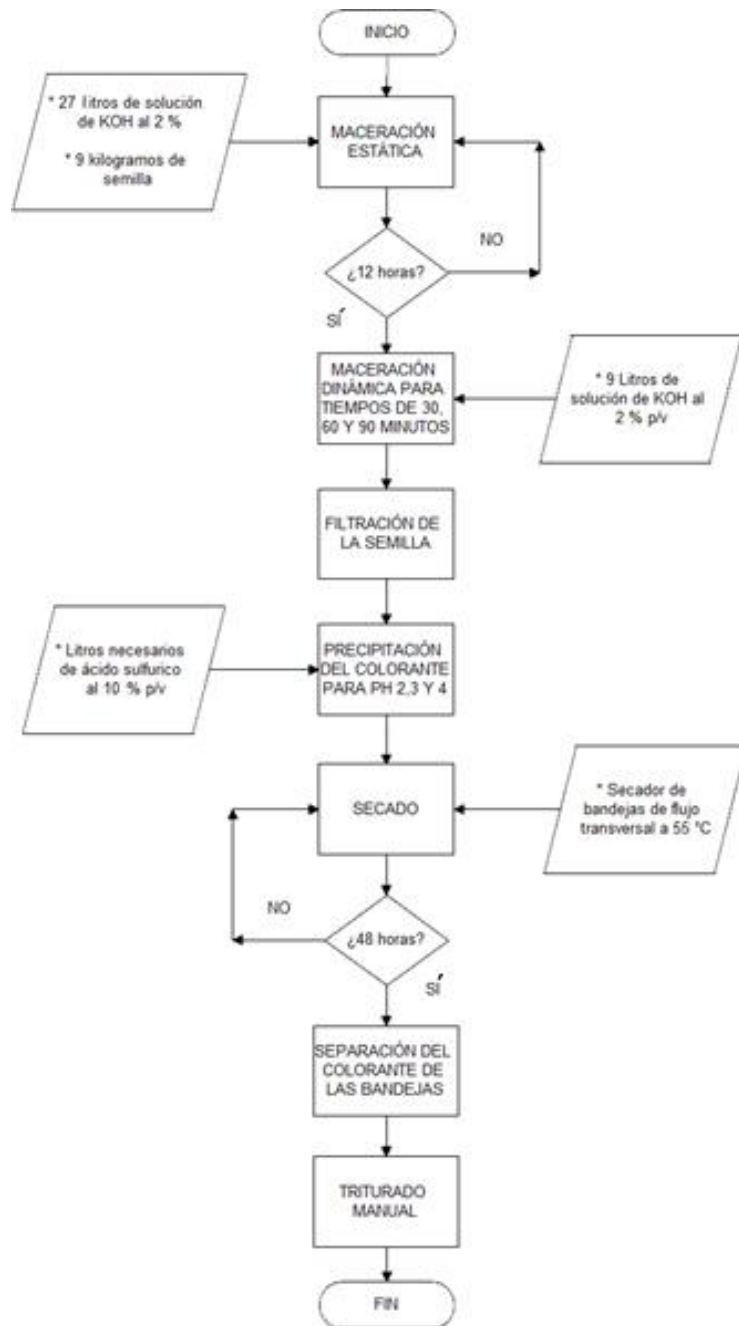
3.4. Técnica cuantitativa

En este trabajo de graduación se utilizó la técnica cuantitativa para determinar el porcentaje de rendimiento de colorante seco y la cuantificación de la bixina; a continuación, se presenta el procedimiento utilizado en el proceso experimental, según la técnica cuantitativa planteada.

3.4.1. Procedimiento para la extracción del colorante de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.) en planta piloto por medio de lixiviación con álcali acuso

- Limpiar la materia prima, separando todo material extraño como hojas, otras semillas, etc.
- Colocar 9 kilogramos de semillas en la marmita de extracción y agregar 27 litros de solvente (solución acuosa de hidróxido de potasio al 2 %), luego se procede con la maceración estática por un período de 12 horas.
- Someter las semillas a un agotamiento con solución de hidróxido de potasio al 2 %, agregando 9 litros adicionales para completar una relación de 1:4; procede a maceración dinámica y variando tiempos de extracción de 30, 60 y 90 minutos.
- Se filtra el extracto líquido de las semillas mediante cernidores.
- Se procede a agregar suficiente solución de ácido sulfúrico al 10 % como para que precipite el colorante, se deja como parámetro dejar el extracto a un pH de 2, 3 y 4.
- Se pasa el líquido acidificado a las bandejas de un secador de flujo transversal y se deja secando por 48 horas a una temperatura de 55 grados centígrados.
- El extracto seco se separa de las bandejas y se coloca en baldes plásticos con tapadera.

Figura 8. Diagrama de extracción del colorante de las semillas de achiote en planta piloto



Fuente: elaboración propia, empleando Visio 2016.

3.4.2. Determinación del porcentaje de rendimiento de las muestras recuperadas de colorante seco de semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.)

- Escribir en la bitácora peso inicial de la materia prima.
- Tarar el balde con tapadera a utilizar.
- Pesarse el recipiente contenido del colorante seco y colocarlo en una balanza analítica.
- El rendimiento se determina como la razón del peso del colorante extraído en función del peso de la materia prima.
- Utilizar siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(W - W_0)}{(W_T)} * 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

Donde:

- % rendimiento: porcentaje de extracto colorante seco (adimensional)
- W : peso del extracto colorante seco y el recipiente (kg)
- W_0 : peso del recipiente (kg)
- W_T : peso de la materia prima añadida a la marmita (kg)

3.4.3. Determinación de los componentes activos y su cuantificación del extracto colorante de la semilla de achiote (*Bixa Orellana* L.) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia

- Realizar la apertura de las botellas de los gases indicados para realizar el ensayo.
- Encender el equipo y software.
- Aperturar los manómetros de presión de los gases.
- Estabilizar por un tiempo de 20 a 30 minutos.
- Conectar o comprobar los detectores ultra violeta, fluorescencia, etc.
- Colocar la columna adecuada para el ensayo.
- Seleccionar la temperatura del horno de columnas.
- Comprobar el funcionamiento del circuito neumático.
- Estabilizar el sistema durante 15 min.
- Realizar el bombeo de 200 mL de agua de calidad de HPLC con un caudal de 5 mL/min.
- Hacer pasar de 30 a 50 mL de un disolvente apropiado.

- Regulador el portador del gas.
- Comprobar la presión en la columna.
- Inyectar un patrón de calibración, calcular el área y altura de pico y compararlo con los obtenidos en días anteriores.

3.5. Recolección y ordenamiento de la información

La recolección de datos se realizó siguiendo el diseño experimental bifactorial con un arreglo de combinación totalmente al azar. Para el extracto colorante se realizaron 3 tratamientos para relacionar el rendimiento extractivo en función del tiempo de maceración dinámica; luego, se realizaron 3 tratamientos para relacionar el rendimiento extractivo en función de pH de precipitación; se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento para tener un total de 27 tratamientos.

Del mismo arreglo planteado anteriormente, se elaboró el análisis del contenido de bixina en función del pH y del tiempo de extracción con un total de 27 tratamientos.

Tabla IX. **Rendimiento extractivo del colorante natural a partir de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) elaborado en planta piloto**

Tratamiento	Experimento	Descripción	Peso materia prima (kg)	Peso extracto colorante (kg)
1	25	t3.pH3.R1	9,00	2,33
2	4	t1.pH2.R1	9,00	2,15
3	26	t3.pH3.R2	9,00	2,36
4	24	t3.pH2.R3	9,00	2,11
5	3	t1.pH1.R3	9,00	2,01
6	10	t2.pH1.R1	9,00	2,40

Continuación de la tabla IX.

7	22	t3.pH2.R1	9,00	2,25
8	1	t1.pH1.R1	9,00	1,91
9	21	t3.pH1.R3	9,00	2,60
10	5	t1.pH2.R2	9,00	1,81
11	9	t1.pH3.R3	9,00	1,81
12	8	t1.pH3.R2	9,00	1,66
13	17	t2.pH3.R2	9,00	2,44
14	12	t2.pH1.R3	9,00	1,78
15	13	t2.pH2.R1	9,00	1,83
16	7	t1.pH3.R1	9,00	0,62
17	6	t1.pH2.R3	9,00	1,56
18	19	t3.pH1.R1	9,00	1,72
19	14	t2.pH2.R2	9,00	1,98
20	27	t3.pH3.R3	9,00	1,84
21	15	t2.pH2.R3	9,00	1,65
22	11	t2.pH1.R2	9,00	2,30
23	16	t2.pH3.R1	9,00	1,81
24	18	t2.pH3.R3	9,00	1,73
25	23	t3.pH2.R2	9,00	2,34
26	20	t3.pH1.R2	9,00	2,25
27	2	t1.pH1.R2	9,00	1,55

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Datos generales sobre la cuantificación de bixina del extracto colorante seco por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia**

Tratamiento	Experimento	Descripción	Tiempo de retención (min)	Área (mAU*s)	Amt/area	Amount (mg/mL)
1	25	t3.pH3.R1	1,433	15,996	1,12E-02	1,80E-01
2	4	t1.pH2.R1	1,433	20,753	6,14E-02	2,33E-01
3	26	t3.pH3.R2	1,436	19,159	1,12E-02	2,15E-01
4	24	t3.pH2.R3	1,434	22,716	1,12E-02	2,55E-01
5	3	t1.pH1.R3	1,429	25,219	1,12E-02	2,83E-01
6	10	t2.pH1.R1	1,429	23,215	1,12E-02	2,61E-01
7	22	t3.pH2.R1	1,43	24,965	1,12E-02	2,80E-01
8	1	t1.pH1.R1	1,426	24,3	1,12E-02	2,73E-01
9	21	t3.pH1.R3	1,428	24,253	1,12E-02	2,72E-01
10	5	t1.pH2.R2	1,43	31,118	1,12E-02	3,49E-01
11	9	t1.pH3.R3	1,427	27,396	1,12E-02	3,08E-01
12	8	t1.pH3.R2	1,429	29,606	1,12E-02	3,32E-01
13	17	t2.pH3.R2	1,428	32,746	1,12E-02	3,68E-01
14	12	t2.pH1.R3	1,424	30,328	1,12E-02	3,40E-01
15	13	t2.pH2.R1	1,425	31,241	1,12E-02	3,51E-01
16	7	t1.pH3.R1	1,424	28,709	1,12E-02	3,22E-01
17	6	t1.pH2.R3	1,427	31,456	1,12E-02	3,53E-01
18	19	t3.pH1.R1	1,426	30,264	1,12E-02	3,65E-01
19	14	t2.pH2.R2	1,423	30,218	1,12E-02	3,39E-01

Continuación de la tabla X.

20	27	t3.pH3.R3	1,422	35,757	1,12E-02	4,01E-01
21	15	t2.pH2.R3	1,423	36,458	1,12E-02	4,09E-01
22	11	t2.pH1.R2	1,425	31,145	1,12E-02	3,50E-01
23	16	t2.pH3.R1	1,421	29,781	1,12E-02	3,34E-01
24	18	t2.pH3.R3	1,419	33,105	1,12E-02	3,72E-01
25	23	t3.pH2.R2	1,413	38,345	1,12E-02	4,30E-01
26	20	t3.pH1.R2	1,425	33,982	1,12E-02	3,81E-01
27	2	t1.pH1.R2	1,422	34,022	1,12E-02	3,82E-01

Fuente: elaboración propia.

3.6. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

A continuación, se presenta la información de forma ordenada para procesar la información de la experimentación e interpretar los resultados.

Tabla XI. Rendimiento extractivo del colorante natural obtenido de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto

Variable	Repeticiones	Semilla (kg)	Extracto colorante (kg)	rendimiento (%)
t1.pH1	1	9,00	1,91	21,22
	2	9,00	1,55	17,22
	3	9,00	2,01	22,33
t1.pH2	1	9,00	2,15	23,89
	2	9,00	1,81	20,11
	3	9,00	1,56	17,33
t1.pH3	1	9,00	0,62	6,89
	2	9,00	1,66	18,44
	3	9,00	1,81	20,11
t2.pH1	1	9,00	2,40	26,67
	2	9,00	2,30	25,56
	3	9,00	1,78	19,78
t2.pH2	1	9,00	1,83	20,33
	2	9,00	1,98	22,00
	3	9,00	1,65	18,33
t2.pH3	1	9,00	1,81	20,11
	2	9,00	2,44	27,11
	3	9,00	1,73	19,22
t3.pH1	1	9,00	1,72	19,11
	2	9,00	2,25	25,00
	3	9,00	2,60	28,89
t3.pH2	1	9,00	2,25	25,00
	2	9,00	2,34	26,00
	3	9,00	2,11	23,44
t3.pH3	1	9,00	2,33	25,89

Continuación de la tabla XI.

	2	9,00	2,36	26,22
	3	9,00	1,84	20,44

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Cuantificación de bixina contenida en el extracto colorante seco por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia**

Núm.	Descripción	Tiempo de retención (min)	Amount (mg/mL)	Muestra de colorante (g/mL)	Bixina/achiote (mg/g)	Contenido de Bixina (%)
1	t3.pH3.R1	1,433	1.795E-01	0,001	179,50	17,95
2	t1.pH2.R1	1,433	2.329E-01	0,001	232,90	23,29
3	t3.pH3.R2	1,436	2.151E-01	0,001	215,10	21,51
4	t3.pH2.R3	1,434	2.549E-01	0,001	254,90	25,49
5	t1.pH1.R3	1,429	2.831E-01	0,001	283,10	28,31
6	t2.pH1.R1	1,429	2.606E-01	0,001	260,60	26,06
7	t3.pH2.R1	1,43	2.802E-01	0,001	280,20	28,02
8	t1.pH1.R1	1,426	2.728E-01	0,001	272,80	27,28
9	t3.pH1.R3	1,428	2.722E-01	0,001	272,20	27,22
10	t1.pH2.R2	1,43	3.493E-01	0,001	349,30	34,93
11	t1.pH3.R3	1,427	3.075E-01	0,001	307,50	30,75
12	t1.pH3.R2	1,429	3.323E-01	0,001	332,30	33,23
13	t2.pH3.R2	1,428	3.676E-01	0,001	367,60	36,76
14	t2.pH1.R3	1,424	3.404E-01	0,001	340,40	34,04
15	t2.pH2.R1	1,425	3.506E-01	0,001	350,60	35,06
16	t1.pH3.R1	1,424	3.222E-01	0,001	322,20	32,22
17	t1.pH2.R3	1,427	3.531E-01	0,001	353,10	35,31
18	t3.pH1.R1	1,426	3.654E-01	0,001	365,40	36,54
19	t2.pH2.R2	1,423	3.392E-01	0,001	339,20	33,92
20	t3.pH3.R3	1,422	4.014E-01	0,001	401,40	40,14
21	t2.pH2.R3	1,423	4.092E-01	0,001	409,20	40,92
22	t2.pH1.R2	1,425	3.496E-01	0,001	349,60	34,96
23	t2.pH3.R1	1,421	3.343E-01	0,001	334,30	33,43
24	t2.pH3.R3	1,419	3.716E-01	0,001	371,60	37,16
25	t3.pH2.R2	1,413	4.303E-01	0,001	430,30	43,03
26	t3.pH1.R2	1,425	3.814E-01	0,001	381,40	38,14
27	t1.pH1.R2	1,422	3.819E-01	0,001	381,90	38,19

Fuente: elaboración propia.

3.7. Análisis estadístico

Para validar o descartar las hipótesis nulas y alternativas se utilizará el análisis de varianzas de un factor (ANOVA) para las varianzas obtenidas para

los resultados de la evaluación del rendimiento del extracto colorante y la cuantificación de la bixina contenida en el extracto relacionándolo con el tiempo de maceración y el pH de precipitación.

3.7.1. Diseño de los tratamientos

Según lo planteado anteriormente, se utilizó un diseño combinatorio totalmente al azar donde se relacionó el rendimiento extractivo tanto con el tiempo de maceración dinámica y con el pH de precipitación; se puede definir como factor A al tiempo de maceración dinámica y factor B al pH de precipitación; a continuación, se muestra cómo se identificó a cada factor.

Para el factor A se utilizaron 3 tiempos de maceración dinámica; quedó de la siguiente manera:

- $t_1 = 30$ minutos
- $t_2 = 60$ minutos
- $t_3 = 90$ minutos

Por otro lado, para el factor B se utilizaron 3 pH para precipitar el colorante; quedó de la siguiente manera:

- $\text{pH}_1 = 2$
- $\text{pH}_2 = 3$
- $\text{pH}_3 = 4$

3.7.1.1. Repeticiones

Para este trabajo se utilizaron 3 repeticiones debido a la complejidad del experimento; este también fue un número mínimo de repeticiones para obtener datos significativos del análisis estadístico.

3.7.1.2. Número de tratamientos para el experimento

$$N = a * b * r \quad [\text{Ec.2}]$$

Donde:

- N: número de tratamientos
- a: número de niveles del factor A
- b: número de niveles del factor B
- r: número de repeticiones por cada nivel

$$N = 3 * 3 * 3 = 27$$

Dio como resultado 27 combinaciones para el total del experimento.

Tabla XIII. **Combinaciones del diseño experimental**

1	t1.pH1.R1	4	t1.pH2.R1	7	t1.pH3.R1
2	t1.pH1.R2	5	t1.pH2.R2	8	t1.pH3.R2
3	t1.pH1.R3	6	t1.pH2.R3	9	t1.pH3.R3
10	t2.pH1.R1	13	t2.pH2.R1	16	t2.pH3.R1
11	t2.pH1.R2	14	t2.pH2.R2	17	t2.pH3.R2
12	t2.pH1.R3	15	t2.pH2.R3	18	t2.pH3.R3
19	t3.pH1.R1	22	t3.pH2.R1	25	t3.pH3.R1
20	t3.pH1.R2	23	t3.pH2.R2	26	t3.pH3.R2
21	t3.pH1.R3	24	t3.pH2.R3	27	t3.pH3.R3

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIV. **Arreglo combinatorio totalmente al azar para el experimento**

1	t3.pH3.R1	4	t3.pH2.R3	7	t3.pH2.R1
2	t1.pH2.R1	5	t1.pH1.R3	8	t1.pH1.R1
3	t3.pH3.R2	6	t2.pH1.R1	9	t3.pH1.R3
10	t1.pH2.R2	13	t2.pH3.R2	16	t1.pH3.R1
11	t1.pH3.R3	14	t2.pH1.R3	17	t1.pH2.R3
12	t1.pH3.R2	15	t2.pH2.R1	18	t3.pH1.R1
19	t2.pH2.R2	22	t2.pH1.R2	25	t3.pH2.R2
20	t1.pH2.R2	23	t2.pH3.R1	26	t3.pH1.R2
21	t2.pH2.R3	24	t2.pH3.R3	27	t1.pH1.R2

Fuente: elaboración propia.

3.7.2. Modelo para un análisis de la varianza de un factor

Se suponen muestras aleatorias independientes n_1, n_2, \dots, n_k observaciones de k poblaciones. Si las medias poblacionales son $\mu_1; \mu_2, \dots, \mu_k$, con lo cual este análisis espera contrastar o debatir la hipótesis nula.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$
$$H_1: \mu_i \neq \mu_j \quad \text{para al menos un par } \mu_i, \mu_j$$

3.7.3. Supuestos para la aplicación del ANOVA

- Las poblaciones van según la distribución de probabilidad de la variable independiente para cada factor, deben ser normales.
- Las K muestras que van acorde los tratamientos que son aplicados, deben ser independientes.
- Las poblaciones deben tener una varianza igual.

3.7.4. Bases del ANOVA

El análisis de varianza ANOVA está basado en la descomposición de la variación de los datos con respecto a la media global; si la hipótesis nula es verdadera, esta sería una estimación de la desviación estándar, que va acorde a las siguientes variaciones:

- Variación dentro de las muestras; se cuantifica la dispersión de las muestras con sus medias.
- Variación entre las muestras; se cuantifica la dispersión de las muestras con la media global.

3.7.5. Procedimiento para el análisis de varianza ANOVA

- Verificar tanto si los datos tienen una tendencia normal como si se cumplen los supuestos de ANOVA.
- Verificar si se cumple el modelo para un análisis de la varianza de un factor.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j \quad \text{para al menos un par } \mu_i, \mu_j$$

- Se plantea el contraste de la hipótesis nula con base en el cociente entre las medias de los cuadrados.
- Se calculan las siguientes expresiones matemáticas que convergen para el análisis final de ANOVA.

- Media Global

$$\bar{X} = \frac{\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}}{n} \quad [\text{Ec. 3}]$$

- Variación total

$$STC = \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{X})^2 \quad [\text{Ec. 4}]$$

- Variación dentro de los grupos

$$SCD = \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{X}_j)^2 \quad [\text{Ec. 5}]$$

- Variación entre los grupos

$$SCE = \sum_{j=1}^K (\bar{X}_j - \bar{X})^2 * n_j \quad [\text{Ec. 6}]$$

- Evaluar el cociente entre la variación dentro de los grupos con la varianza entre los grupos y según los grados de libertad K-1 y N-k, respectivamente para SCE/K-1 y SCD/n-K; si el cociente entre ambas estimaciones es 1, la hipótesis nula es cierta y si el cociente es diferente de 1, la hipótesis nula se rechaza.

3.7.6. Datos del ANOVA

Para analizar las hipótesis planteadas y concluir se realizó un análisis de varianzas de un factor; consta de comparar el valor F calculada respecto al F crítico; análisis establecido por Fischer, el cual tienen un nivel de confianza del 95 %. Según sean los resultados, si el valor de F calculada es mayor que F crítico significa que existen diferencias significativas entre los grupos; por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa rechazando la hipótesis nula de lo contrario se aceptaría la hipótesis nula rechazando la hipótesis alternativa; por otro lado, si existen diferencias significativas entre grupos se puede realizar la prueba de múltiples rangos, con la cual se puede saber entre que grupos existe una diferencia significativa.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del análisis de varianza ANOVA para el presente trabajo de investigación.

Tabla XV. Resumen estadístico para el rendimiento extractivo del colorante en función del tiempo de maceración

Tiempo (min)	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
30	9	18,6156	4,92426	26,45 %
60	9	22,1233	3,40853	15,41 %
90	9	24,4433	3,03198	12,40 %
Total	27	21,7274	4,45241	20,49 %

Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Tabla XVI. ANOVA para el rendimiento extractivo del colorante en función del tiempo de maceración

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	154,95	2	77,4748	5,16	0,0137
Intra grupos	360,474	24	15,0197		
Total (Corr.)	515,424	26			

Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Tabla XVII. Prueba de múltiples rangos para el rendimiento extractivo en función del tiempo de maceración

Tiempo (min)	Casos	Media	Grupos homogéneos
30	9	18,6156	X
60	9	22,1233	XX
90	9	24,4433	X

Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

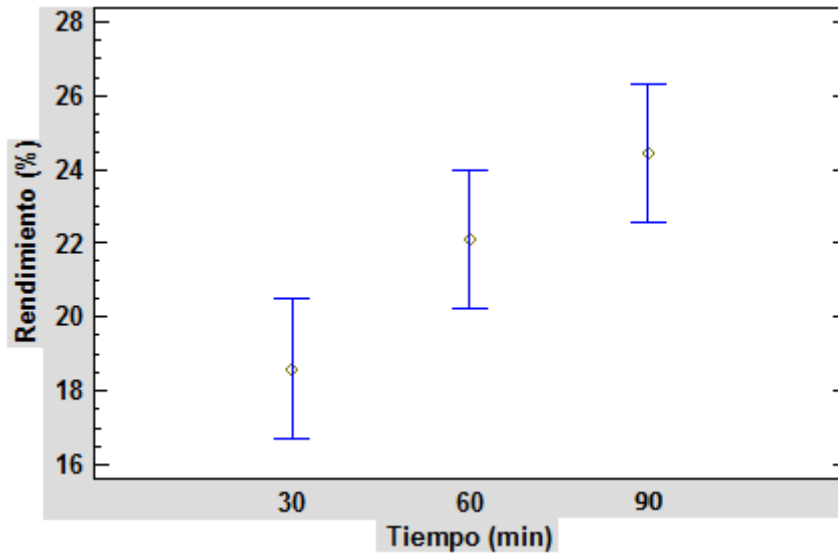
Tabla XVIII. **Contraste de la prueba de múltiples rangos para el rendimiento extractivo en función del tiempo de maceración**

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- límites
30 - 60		-3,50778	3,77063
30 - 90	*	-5,82778	3,77063
60 - 90		-2,32	3,77063

Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

*indica que existe diferencia significativa entre grupos

Figura 9. **Media 95 % y Fisher LSD para el rendimiento extractivo del colorante en función del tiempo de maceración**



Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Tabla XIX. **Resumen estadístico para el rendimiento extractivo del colorante en función del pH**

B.pH	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
2	9	22,8644	3,8903	17,01 %
3	9	21,8256	3,00022	13,75 %
4	9	20,4922	6,09184	29,73 %
Total	27	21,7274	4,45241	20,49 %

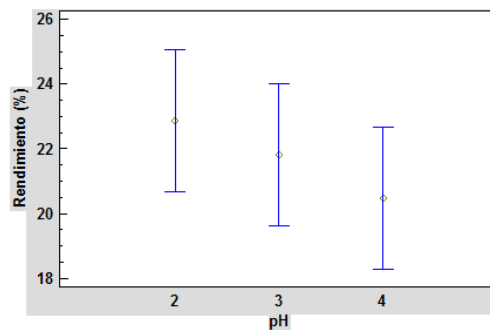
Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Tabla XX. **ANOVA para el rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote en función del pH**

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25,4535	2	12,7268	0,62	0,5446
Intra grupos	489,97	24	20,4154		
Total (Corr.)	515,424	26			

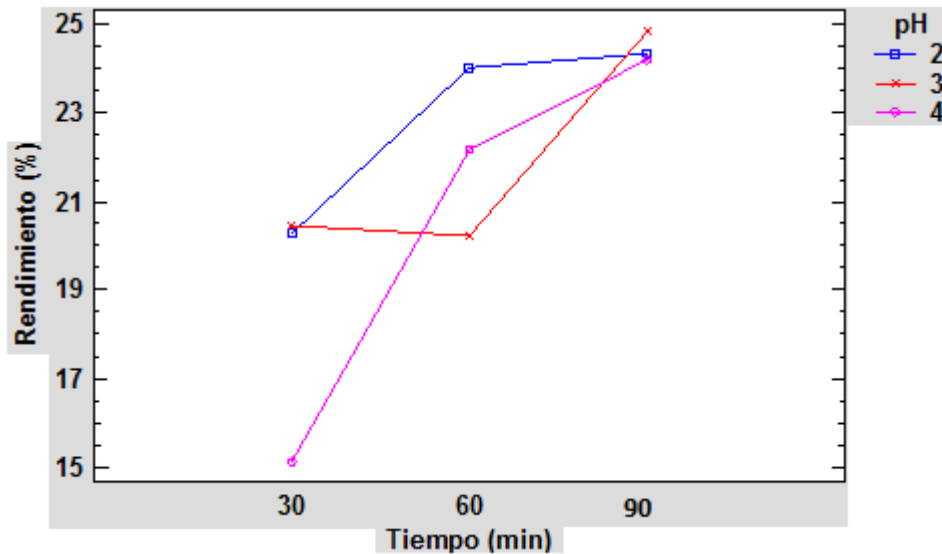
Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Figura 10. **Media 95 % y Fisher LSD para el rendimiento extractivo del colorante en función del pH**



Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Figura 11. **Gráfica de interacciones del rendimiento extractivo en función del tiempo de maceración y del pH**



Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion®.

Tabla XXI. **Resumen estadístico del porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración**

Tiempo (h)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación
30	9	31,6233	4,62562	14,63 %
60	9	34,7011	3,97629	11,46 %
90	9	30,8933	8,82978	28,58 %
Total	27	32,4059	6,18588	19,09 %

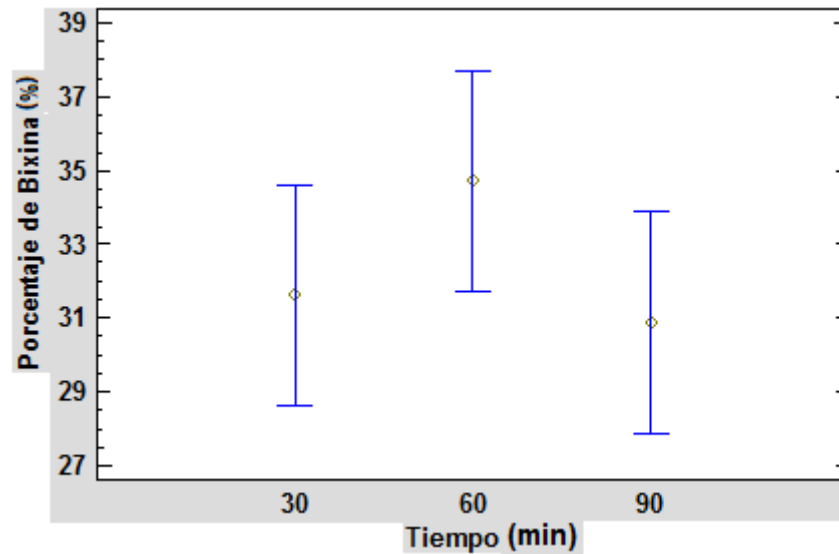
Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion®.

Tabla XXII. **ANOVA del porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración**

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	73,5144	2	36,7572	0,96	0,3981
Intra grupos	921,379	24	38,3908		
Total (Corr.)	994,893	26			

Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Figura 12. **Media 95 % y Fisher LSD del porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración**



Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Tabla XXIII. **Resumen estadístico del porcentaje de bixina en función del pH**

pH	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
2	9	32,3044	5,03417	15,58 %
3	9	33,3411	6,61422	19,84 %
4	9	31,5722	7,31392	23,17 %
Total	27	32,4059	6,18588	19,09 %

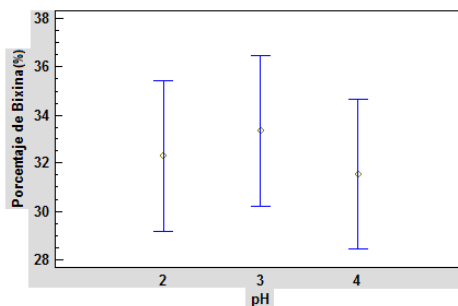
Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Tabla XXIV. **ANOVA del porcentaje de bixina en función del pH**

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14,2194	2	7,10969	0,17	0,8414
Intra grupos	980,674	24	40,8614		
Total (Corr.)	994,893	26			

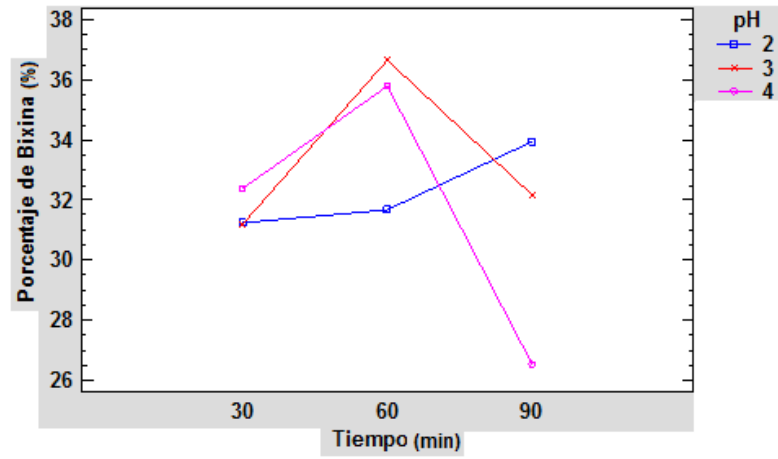
Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Figura 13. **Media 95 % y Fisher LSD para el porcentaje de bixina presente en colorante en función del pH**



Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

Figura 14. **Gráfico de interacción del porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración y del pH**



Fuente: elaboración propia, utilizando el programa Statgraphics Centurion ®.

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación del rendimiento de extracción del colorante natural de las semillas de achiote en función del pH a nivel planta piloto

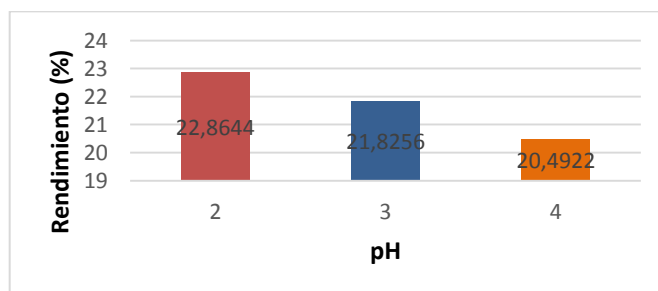
En las siguientes tablas y figuras se presentan los resultados correspondientes al rendimiento extractivo en función del pH.

Tabla XXV. **Rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto, en función Ph**

pH	Rendimiento (%)
2	22,8644 ± 3,89030
3	21,8256 ± 3,00000
4	20,4922 ± 6,09184

Fuente: elaboración propia.

Figura 15. **Rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto, en función del pH**



Fuente: elaboración propia.

4.2. Evaluación del rendimiento de extracción del colorante natural de las semillas de achiote en función del pH a nivel planta piloto

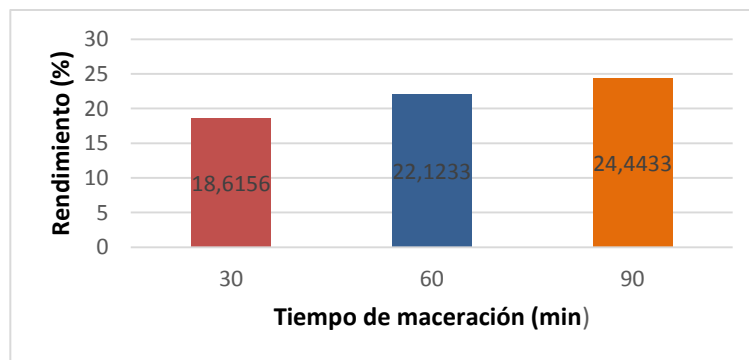
En las siguientes tablas y figuras se presentan los resultados correspondientes al rendimiento extractivo en función del pH.

Tabla XXVI. **Rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto, en función del tiempo de maceración dinámica**

Tiempo (min)	Rendimiento (%)
30	18,6156 ± 4,9242
60	22,1233 ± 3,4085
90	24,4433 ± 3,0319

Fuente: elaboración propia.

Figura 16. **Rendimiento extractivo del colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto, en función del tiempo de maceración dinámica**



Fuente: elaboración propia.

4.3. Evaluación del porcentaje de Bixina del colorante natural de las semillas de achiote en función del tiempo de maceración a nivel planta piloto

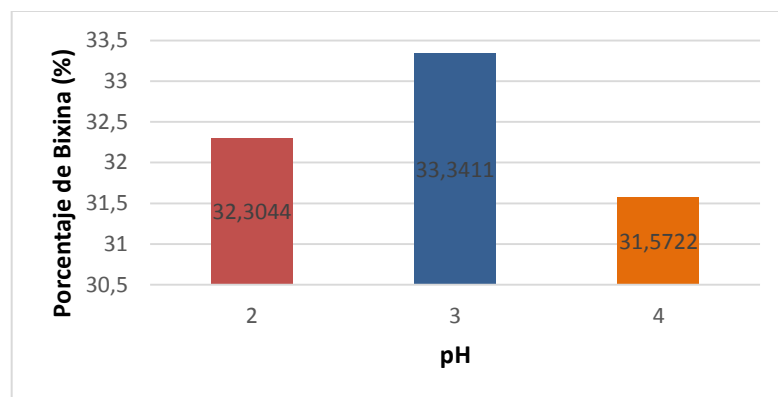
En las siguientes tablas y figuras se presentan los resultados correspondientes del porcentaje de Bixina en función del tiempo de maceración.

Tabla XXVII. **Porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto, en función del pH**

pH	Porcentaje de Bixina (%)
2	32,3044 ± 5,0341
3	33,3411 ± 6,6142
4	31,5722 ± 7,3139

Fuente: elaboración propia.

Figura 17. **Porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto, en función del pH**



Fuente: elaboración propia.

4.4. Evaluación del porcentaje de bixina del colorante natural de las semillas de achiote en función del pH a nivel planta piloto

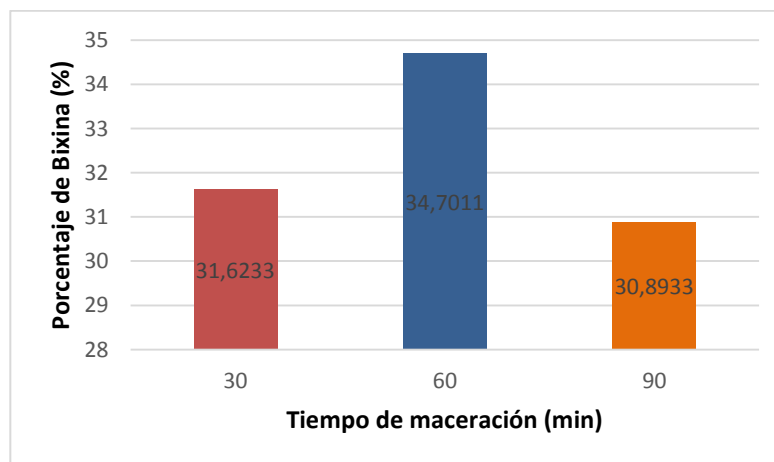
En las siguientes tablas y figuras se presentan los resultados correspondientes del porcentaje de Bixina en función del pH.

Tabla XXVIII. **Porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto, en función del tiempo de maceración dinámica**

Tiempo (h)	Porcentaje de Bixina (%)
30	31,6233 ± 4,6256
60	34,7011 ± 3,9762
90	30,8933 ± 8,8297

Fuente: elaboración propia.

Figura 18. **Porcentaje de Bixina del colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto, en función del pH**



Fuente: elaboración propia.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo de graduación tuvo como objetivo evaluar el rendimiento extractivo y cuantificación de la bixina del extracto colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) por medio de extracción con álcali acuoso nivel planta piloto. La semilla fue recolectada en los municipios de Cahabón y Lanquín del departamento de Alta Verapaz.

El proceso de extracción se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales, Área de Química Industrial, Centro de Investigaciones de Ingeniería, Usac. Se utilizaron 9 kilogramos de semilla, las cuales se colocaron en una marmita con agitación, donde se añadieron 27 litros de solvente en relación 1:3 (semilla: solvente); el solvente utilizado fue una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 2 % m/v, con 12 horas de maceración estática. Posteriormente, se realizó el proceso de maceración dinámica; se variaron los tiempos de 30, 60 y 90 minutos. Después, se filtró la semilla de la solución coloreada, la cual fue acidificada con ácido sulfúrico al 10 % m/v (H_2SO_4), con el objetivo de variar el pH de 2, 3 y 4. Luego, se colocó el extracto colorante acidificado en 14 bandejas las cuales se colocaron en un secador de bandejas de flujo transversal a 55 °C durante 48 horas.

En cuanto al rendimiento extractivo en función del pH de la solución de extracto colorante; se pueden observar en la tabla XXV los valores promedio del rendimiento extractivo con sus desviaciones estándar y en la figura 15 se puede apreciar que al disminuir el pH de precipitado aumenta el rendimiento extractivo, es decir, los mayores rendimientos se tuvieron para un pH de 2. Para determinar el pH de precipitado del extracto colorante en la solución óptimo, se

realizó el análisis de varianza ANOVA, donde el valor de prueba para la razón de valor de coeficiente de Fisher es mayor a 0,05 como se observa en la tabla XX; esto significa que no existe estadísticamente una diferencia significativa entre los rendimientos a diferentes pH de precipitación con un nivel de confianza del 95 %.

Al evaluar el rendimiento extractivo del colorante en función del tiempo de maceración dinámica, en la tabla XXVI se observan los valores promedio y su desviación estándar del rendimiento extractivo; por otro lado, se puede observar en la figura 16, al aumentar el tiempo de maceración, aumenta el rendimiento de extracto colorante; con ello se observa que los rendimientos fueron mayores para un tiempo de 120 minutos de maceración dinámica en comparación a 30 y 60 minutos. Para determinar cuál es el tiempo óptimo de maceración, se realizó un análisis de varianza ANOVA para descartar las diferencias desde el punto de vista estadístico; el valor de prueba para la razón de valor de coeficiente de Fisher es menor a 0,05 como se observa en la tabla XVI; esto significa que si existen diferencias significativas entre grupos, con lo cual se realizó la prueba de múltiples rangos donde se analiza que medias tienen significancia y según la tabla XVIII; existe diferencia estadísticamente significativa para los rendimientos de 30 minutos respecto a los de 90 minutos con un nivel de confianza del 95 %; donde el valor promedio de rendimiento extractivo de colorante para el tiempo de maceración dinámica de 30 minutos fue de $18,5156 \% \pm 4,9242$ y para el tiempo de maceración dinámica de 90 el valor promedio es de $24,4433 \% \pm 3,0319$.

Al analizar como los factores se relacionan, como se observa en la figura 11, se determinó que el mejor rendimiento medio se dio para 90 minutos de maceración dinámica y un pH de 3; se tiene como rendimiento extractivo un valor de $24,8148 \% \pm 1,2878$.

Para la cuantificación de la bixina presente en el extracto colorante de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) se utilizó una cromatografía líquida de alta eficacia; se utilizó un patrón primario o estándar que en este caso es bixina (E160b), donde se colocaron las diferentes muestras de colorante diluidas en etanol absoluto.

Se pueden observar los valores promedio del porcentaje bixina y sus desviaciones en función del pH en la tabla XXVII; en la figura 17 se puede apreciar que el mayor rendimiento extractivo se dio para un pH 3. Para determinar el pH óptimo de precipitación se realizó un análisis de varianza ANOVA como se ve en la tabla XXIV; el valor de prueba para la razón de valor de coeficiente de Fisher es mayor a 0,05, es decir, no existe estadísticamente una diferencia significativa respecto los valores media del porcentaje de Bixina en variando el pH de precipitado.

En cuanto al porcentaje de bixina en función del tiempo de maceración dinámica, se pueden observar los valores promedio y sus desviaciones estándar en la tabla XXVIII; en la figura 18 se puede observar que la mejor media de porcentaje de bixina se dio para un tiempo de 60 minutos. Para determinar el tiempo de maceración óptimo se realizó un análisis de varianza ANOVA, como se puede observar en la tabla XXII; el valor de prueba para la razón de valor de coeficiente de Fisher es mayor a 0,05; esto concluye que no existe estadísticamente una diferencia significativa entre los valores media del porcentaje de bixina al variar el tiempo de maceración con un 95 % de confianza.

Al analizar como los factores se relacionan, como se observa en la figura 14, se determinó que el mejor porcentaje promedio de porcentaje de bixina se

dio para 60 minutos de maceración dinámica y un pH de 3, con un resultado de un valor promedio de $36,6333 \% \pm 3,7558$.

La calidad de colorante se puede medir por su contenido de bixina presente en el extracto colorante, según Bristhar laboratorios C.A de Venezuela; un contenido de Bixina de calidad es del 35 %; el mejor dato promedio obtenido es del $36,6333 \% \pm 3,7558$ y el valor promedio más bajo es de $26,533 \pm 11,9174$, con lo cual se está cerca de los porcentajes que se venden en el mercado.

CONCLUSIONES

1. No existe diferencia significativa para el rendimiento de la extracción del colorante de las semillas de achiote a nivel planta piloto por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del pH; se obtuvo el rendimiento más alto promedio de $22,8644 \% \pm 3,8903$ para un pH 2.
2. Si existe una diferencia significativa para el rendimiento de la extracción del colorante de las semillas de achiote a nivel planta piloto en función del tiempo de maceración dinámica; el menor fue $18,6156 \% \pm 4,9242$ para un tiempo de 30 minutos y el mayor fue $24,4433 \% \pm 3,0319$ para un tiempo de 90 minutos.
3. No existe diferencia significativa para el porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote a nivel planta piloto por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del pH; se obtuvo el porcentaje de bixina más alto promedio de $33,3411 \% \pm 6,6142$ para un pH3.
4. No existe diferencia significativa para el porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote a nivel planta piloto por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del tiempo de maceración dinámica; se obtuvo el mayor porcentaje de bixina promedio de $34,7011 \pm 3,9762$ para un tiempo de 60 minutos.
5. El máximo porcentaje de bixina del colorante de las semillas de achiote se dio para un tiempo de maceración de 60 minutos y un pH de 3, con un $36,6333 \% \pm 3,7558$.

6. El máximo rendimiento de extracción del colorante de las semillas de achiote se dio para un tiempo de maceración dinámica de 90 minutos y un pH de 3, dando un $24,8148 \% \pm 1,2878$.

RECOMENDACIONES

1. Realizar lavados necesarios para agotar el colorante de las semillas y evaluar los rendimientos a nivel planta piloto.
2. Evaluar la degradación de la bixina presente en el extracto a diferentes temperaturas de secado a nivel planta piloto.
3. Realizar otros métodos de secado y filtrado para determinar cómo afecta esto en el rendimiento extractivo y el porcentaje de bixina presente en el colorante.
4. Evaluar el rendimiento extractivo y el porcentaje de bixina a diferentes temperaturas de solución de álcali acuoso.
5. Realizar el estudio de cuanto se ve afectado el porcentaje de rendimiento y porcentaje de bixina presentes en el colorante si no se realizar la maceración estática.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGUILAR, Christian; PORFARRERO, Karen. *Boletín de la UNAMBA, Extracción de colorante del achiote*. Perú: Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica de Perú, 1997. 450 p.
2. CANO MORALES, Telma Maricela. *Estudio tecnológico sobre los tintes naturales extraídos de la corteza de tres especies forestales cultivadas en Guatemala, Para teñir fibras naturales que cumplan con especificaciones de calidad exigidas por el Mercado*. Perú: Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica de Perú, 1997. 50 p.
3. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. *Manual Técnico, El Cultivo del Achiote, Bixa Orellana*. [En línea]. <<http://www.cich.org/publicaciones/3/CNTAF-Manual-Tecnico-del-Achiote.pdf>> [Consulta: 25 de marzo de 2015].
4. DEVIA PINEDA, Jorge Enrique, SALDERRIAGA CALDERON, Liliana. *Planta piloto para obtener colorante de la semilla de achiote (Bixa Orellana L.)*. Colombia: Revista Universidad EAFIT. Volumen 39, 2003. 175 p.
5. FONNEGRA G., Ramiro. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. 2ª ed. Colombia: FALTA EDITORIAL, 2007. 368 p.

6. QUIÑONEZ BRAVO, Ximena, YUNDA, Constanza. *El Achiote Bixa Orellana L. como posible alternativa productiva para el departamento del Meta. Rev Sist Prod Agroecol.* [En línea]. <<http://www.sistemasagroecologicos.co/art8/EI%20Achiote%20Bixa%20orellana%20L%20como%20posible%20alternativa%20productiva.pdf>> [Consulta: 8 de abril de 2015].
7. LANZA GALINDO, Jorge Mario. *Optimización del tiempo de lavado en el proceso de extracción de bixina con álcali a partir de semillas de achiote (Bixa Orellana) de diferente maduración.* Trabajo de graduación de Ing. Química. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2007. 53 p.
8. LOCK SING, Olga. *Colorantes naturales.* Perú: Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica de Perú, 1997. 75 p.
9. MÉRIDA MERÉ, Mario José. *Extracción y caracterización fisicoquímica del tinte natural obtenido del exocarpo del coco (cocos nucifera), como aprovechamiento del desecho de fuentes Comerciales.* Trabajo de graduación de Ing. Química. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2003. 250 p.
10. OZORES BELMONTE, Marta Isabel. *Cromatografía de líquidos HPLC. Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA.* [En línea]. <<http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-lquidos-hplc> > [Consulta: 16 de abril de 2015].

11. Red Textil de Argentina. *Colorantes naturales*. [En línea]. <<http://www.redtextilargentina.com.ar/index.php/fibras/f-ennoblecimiento/223-insumos-para-el-ennoblecimiento-de-fibras/colorantes-textiles/colorantes-naturales/393-colorantes-naturales>> [Consulta: 9 de abril de 2015].
12. SANDOVAL Z., Estela. *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. México: UNAM, 2005. 278 p.
13. SERRANO MARTINEZ, José Luis. *Curso: Instrumentación y métodos de análisis químico, Espectroscopia infrarroja*. [En línea]. <http://www.upct.es/~minaeees/espectroscopia_infrarroja.pdf> [Consulta 5 de abril de 2015].

APÉNDICES

Apéndice 1. **Semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.) a nivel planta piloto**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. **Solución de álcali acuoso, maceración estática y maceración dinámica a nivel planta piloto**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. **Agotamiento de las semillas de achiote (*Bixa Orellana* L.),
filtrado de la semilla y extracto colorante acidificado en
planta piloto**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. **Extracto colorante acidificado, secado en secador de bandejas de flujo transversal y extracto colorante seco a nivel planta piloto**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. **Extracto colorante seco, pesado de bandejas y extracto colorante triturado a nivel planta piloto**



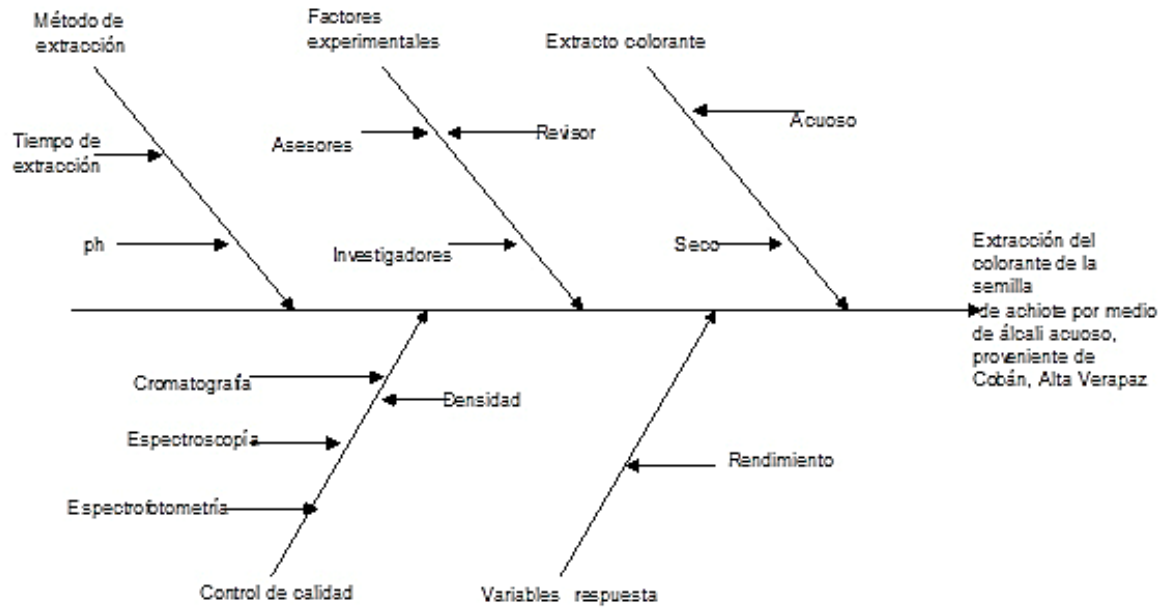
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 6. **Tabla de contenido**

Área	Curso	Tema
Química	Química 3 y 4	Soluciones
	Análisis cuantitativo	Errores de medición
	Microbiología	Control microbiológico
	Bioquímica	Colorantes
Operaciones unitarias	Transferencia de calor	Transferencia de calor
	Transferencia de masa IQ4	Destilación, secado
	Operaciones unitarias	Manejo de sólidos
	Laboratorio de Ingeniería química	Uso de caldera
Fisicoquímica	Termodinámica 3	Leyes de la termodinámica
	Termodinámica 4	Leyes de la termodinámica
Especialización	Tecnología de los Inocuidad	Inocuidad
	Extracciones industriales	Extracción de aceite esencial
Área de ciencias y complementarias	Técnicas de estudio e Investigación	Método de Investigación
	Ingeniería	Presupuesto
	Estadística 1 y 2	Análisis de datos

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 7. Diagrama de Ishikawa



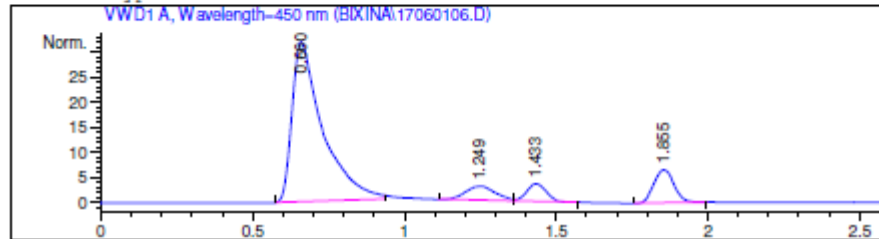
Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma para el tratamiento 1 (t3.pH3.R1)

```
=====  
Injection Date : 6/1/2017 3:14:54 PM          Seq. Line :    6  
Sample Name    : T1                          Location  : Vial 6  
Acq. Operator  : AdeM                        Inj       :    1  
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume: 20 µl  
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M  
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM  
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M  
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM  
                (modified after loading)
```

```
Metodo para analisis de bixina por HPLC.  
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,  
Universidad del Valle de Guatemala.  
Fase movil ACN: Agua (20:80)  
Flujo 0.5 ml/min  
Longitud de onda 450 nm  
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
```



External Standard Report

```
=====  
Sorted By      :      Signal  
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM  
Multiplier     :      1.0000  
Dilution       :      1.0000  
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.433	VB	15.99624	1.12246e-2	1.79552e-1		Bixina
1.855	PB	30.97955	6.14224e-3	1.90284e-1		Pico 1.82

Totals : 3.69836e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

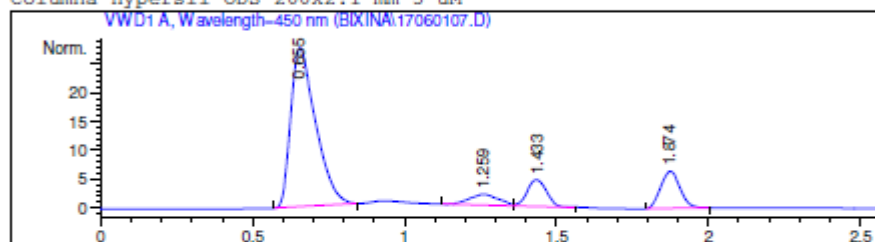
Anexo 2. Cromatograma para el tratamiento 2 (t1.pH2.R1)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 3:21:20 PM          Seq. Line : 7
Sample Name    : T2                          Location  : Vial 7
Acq. Operator  : AdeM                        Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                  (modified after loading)
  
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.433	VB	20.75311	1.12246e-2	2.32946e-1		Bixina
1.874	PB	28.70102	6.14224e-3	1.76289e-1		Pico 1.82

Totals : 4.09235e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

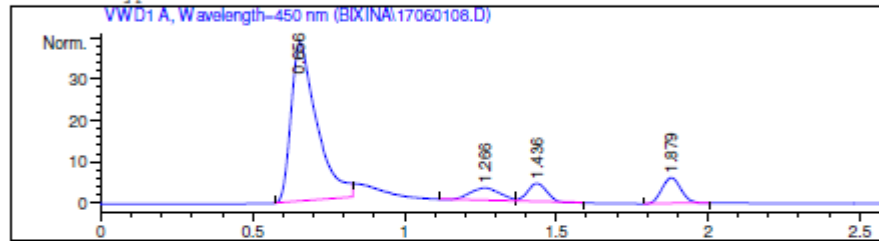
Anexo 3. Cromatograma para el tratamiento 3 (t3.pH3.R2)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 3:27:40 PM          Seq. Line : 8
Sample Name    : T3                          Location  : Vial 8
Acq. Operator  : AdeM                        Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU	Area *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.436	VP	19.15967	1.12246e-2	2.15061e-1			Bixina
1.879	PB	27.78403	6.14224e-3	1.70656e-1			Pico 1.82

Totals : 3.85717e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

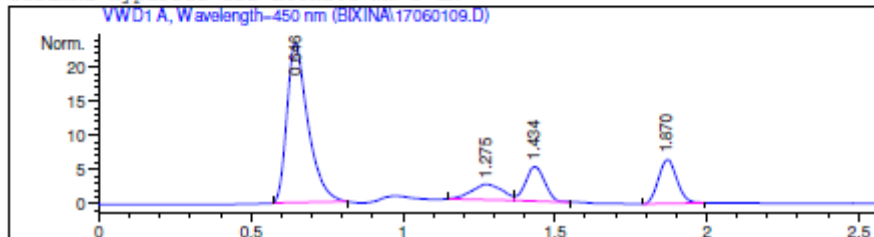
Anexo 4. Cromatograma para el tratamiento 4 (t3.pH2.R3)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 3:34:04 PM          Seq. Line :    9
Sample Name    : T4                          Location  : Vial 9
Acq. Operator  : AdeM                        Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU	Area *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.434	VB	22.71567	1.12246e-2	2.54975e-1			Bixina
1.870	PB	27.48265	6.14224e-3	1.68805e-1			Pico 1.82

Totals : 4.23780e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

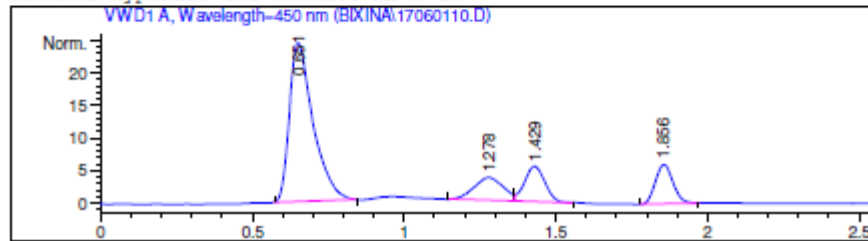
Anexo 5. **Cromatograma para el tratamiento 5 (t1.pH1.R3)**

```

=====
Injection Date   : 6/1/2017 3:40:27 PM           Seq. Line : 10
Sample Name     : T5                           Location  : Vial 10
Acq. Operator   : AdeM                        Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume: 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed    : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                  (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.429	VB	25.21900	1.12246e-2	2.83074e-1		Bixina
1.856	PB	24.53838	6.14224e-3	1.50721e-1		Pico 1.82

Totals : 4.33795e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.* www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

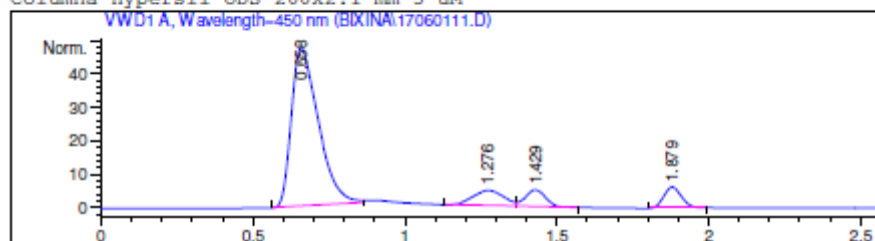
Anexo 6. Cromatograma para el tratamiento 6 (t2.pH1.R1)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 3:46:53 PM          Seq. Line : 11
Sample Name    : T6                          Location  : Vial 11
Acq. Operator : AdEM                        Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdEM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdEM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.429	VB	23.21527	1.12246e-2	2.60583e-1		Bixina
1.879	PB	25.94491	6.14224e-3	1.59360e-1		Pico 1.82

Totals : 4.19943e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

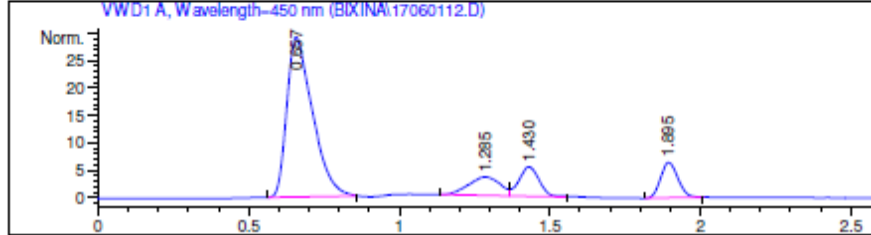
Anexo 7. Cromatograma para el tratamiento 7 (t3.pH2.R1)

```

=====
Injection Date   : 6/1/2017 3:53:15 PM           Seq. Line :   12
Sample Name     : T7                           Location  : Vial 12
Acq. Operator   : AdeM                          Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2                  Inj Volume: 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed    : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                  (modified after loading)
  
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.430	VB	24.96468	1.12246e-2	2.80220e-1		Bixina
1.895	PB	26.25063	6.14224e-3	1.61238e-1		Pico 1.82

Totals : 4.41457e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

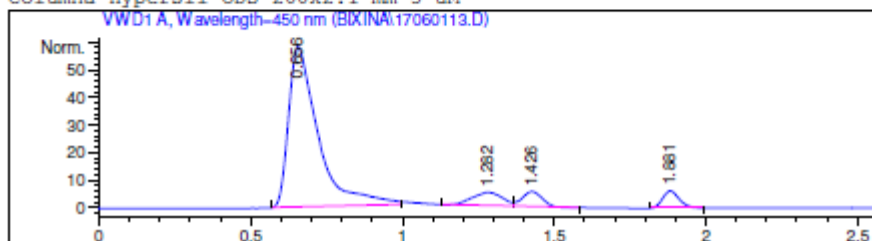
Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

Anexo 8. Cromatograma para el tratamiento 8 (t1.pH1.R1)

```

=====
Injection Date   : 6/1/2017 3:59:38 PM           Seq. Line :   13
Sample Name     : T8                           Location  : Vial 13
Acq. Operator  : AdEM                          Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2                  Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdEM
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdEM
                (modified after loading)

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.426	VP	24.30120	1.12246e-2	2.72772e-1		Bixina
1.881	PB	23.79321	6.14224e-3	1.46144e-1		Pico 1.82

Totals : 4.18916e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

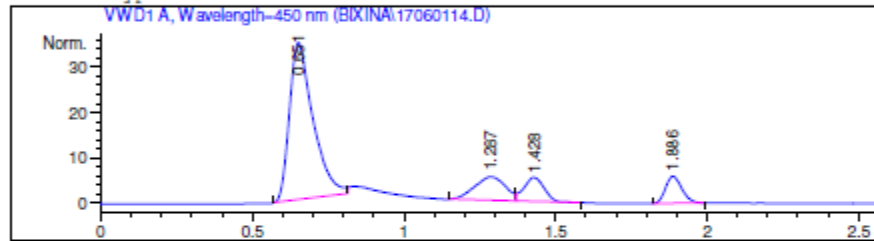
Anexo 9. Cromatograma para el tratamiento 9 (t3.pH1.R3)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 4:06:01 PM          Seq. Line : 14
Sample Name    : T9                          Location  : Vial 14
Acq. Operator  : AdEM                        Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdEM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdEM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.428	VB	24.25309	1.12246e-2	2.72232e-1		Bixina
1.886	PB	22.78057	6.14224e-3	1.39924e-1		Pico 1.82

Totals : 4.12156e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

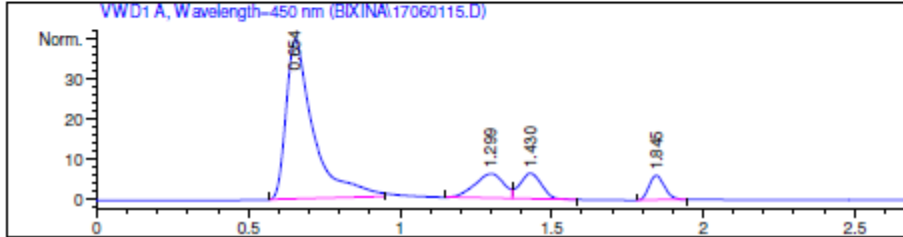
Anexo 10. **Cromatograma para el tratamiento 10 (t1.pH2.R2)**

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 4:12:23 PM          Seq. Line : 15
Sample Name    : T10                          Location  : Vial 15
Acq. Operator  : AdeM                         Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.430	VB	31.11827	1.12246e-2	3.49292e-1		Bixina
1.845	PB	21.58629	6.14224e-3	1.32588e-1		Pico 1.82

Totals : 4.81880e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

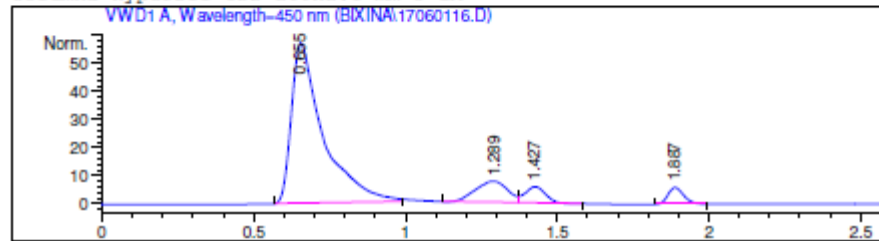
Anexo 11. **Cromatograma para el tratamiento 11 (t1.pH3.R3)**

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 4:18:42 PM          Seq. Line : 16
Sample Name    : T11                          Location  : Vial 16
Acq. Operator  : AdeM                         Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.427	VB	27.39551	1.12246e-2	3.07505e-1		Bixina
1.887	PB	21.44924	6.14224e-3	1.31746e-1		Pico 1.82

Totals : 4.39251e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.* www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

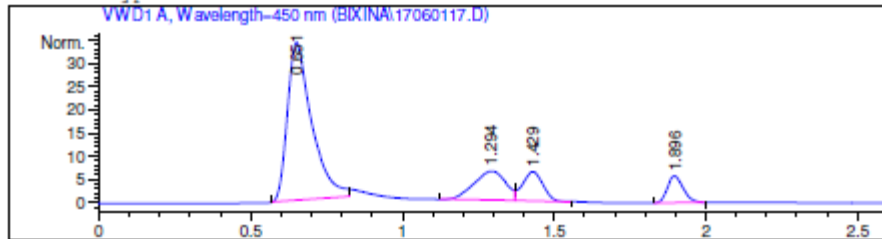
Anexo 12. **Cromatograma para el tratamiento 12 (t1.pH3.R2)**

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 4:25:04 PM          Seq. Line : 17
Sample Name    : T12                          Location  : Vial 17
Acq. Operator  : AdeM                          Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                  Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.429	VB	29.60653	1.12246e-2	3.32323e-1		Bixina
1.896	PB	21.00677	6.14224e-3	1.29029e-1		Pico 1.82

Totals : 4.61352e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

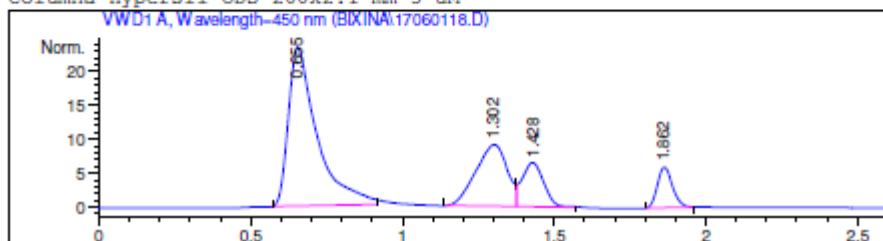
Anexo 13. Cromatograma para el tratamiento 13 (t2.pH3.R2)

```

=====
Injection Date   : 6/1/2017 4:31:26 PM           Seq. Line :   18
Sample Name     : T13                          Location  : Vial 18
Acq. Operator   : AdeM                        Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume: 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed    : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                  (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.428	VB	32.74587	1.12246e-2	3.67561e-1		Bixina
1.862	PB	20.92087	6.14224e-3	1.28501e-1		Pico 1.82

Totals : 4.96062e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

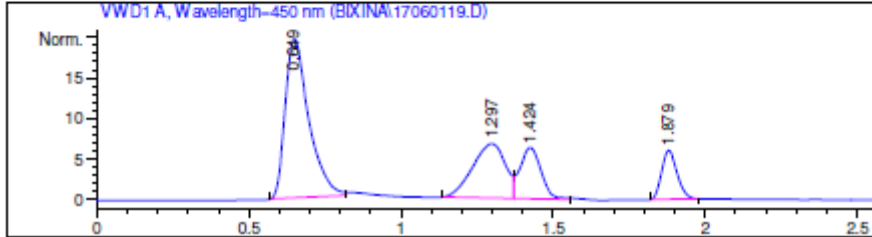
Anexo 14. **Cromatograma para el tratamiento 14 (t2.pH1.R3)**

```

=====
Injection Date   : 6/1/2017 4:37:53 PM           Seq. Line :   19
Sample Name     : T14                          Location  : Vial 19
Acq. Operator  : AdeM                          Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2                  Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.424	VB	30.32813	1.12246e-2	3.40423e-1		Bixina
1.879	BB	21.45926	6.14224e-3	1.31808e-1		Pico 1.82

Totals : 4.72230e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

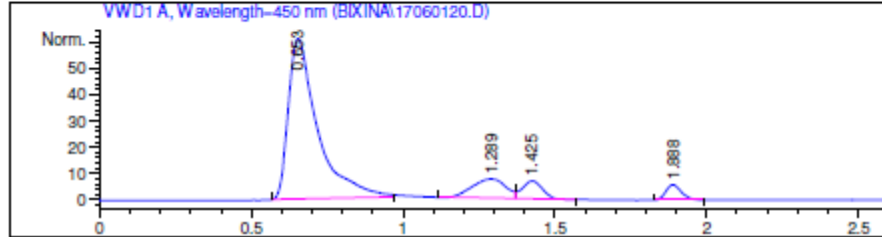
Anexo 15. Cromatograma para el tratamiento 15 (t2.pH2.R1)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 4:44:16 PM          Seq. Line : 20
Sample Name    : T15                          Location  : Vial 20
Acq. Operator  : AdeM                         Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.425	VB	31.24145	1.12246e-2	3.50674e-1		Bixina
1.888	PB	20.86814	6.14224e-3	1.28177e-1		Pico 1.82

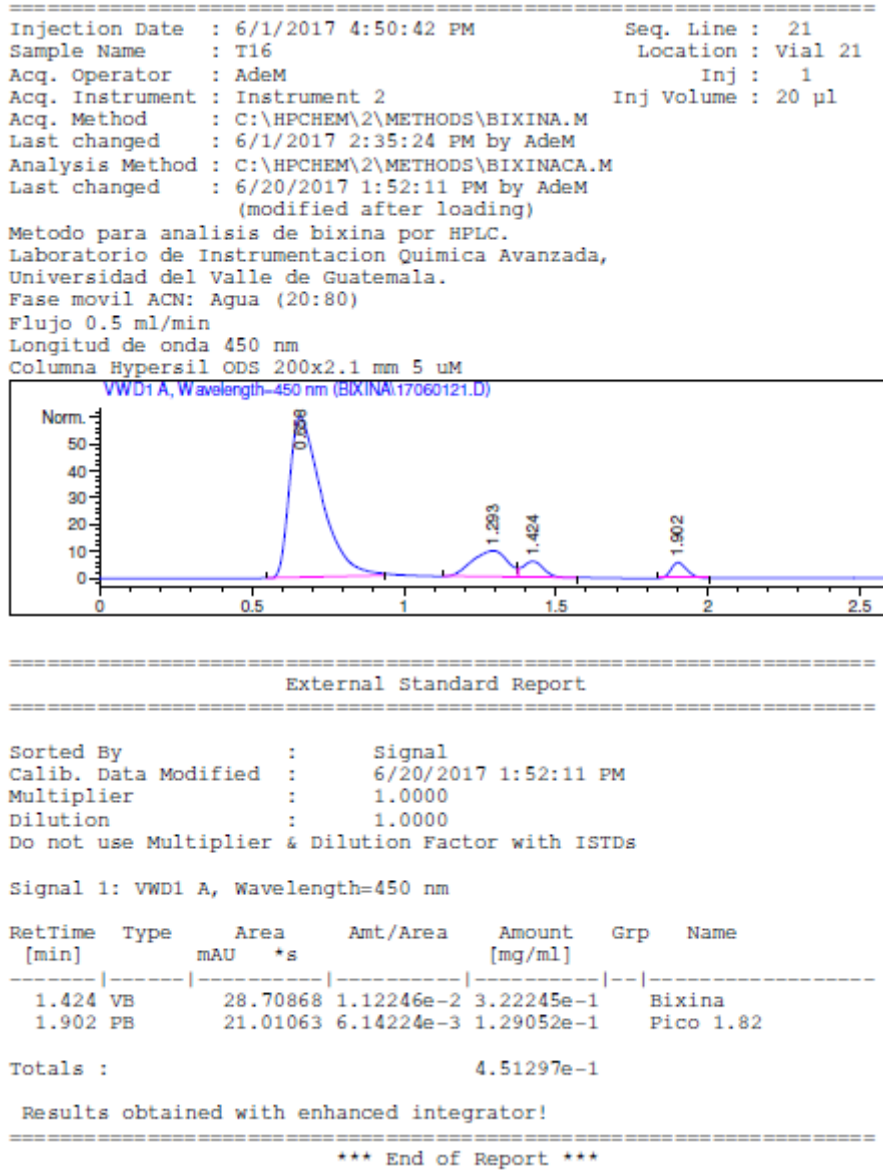
Totals : 4.78851e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

Anexo 16. Cromatograma para el tratamiento 16 (t1.pH3.R1)



Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

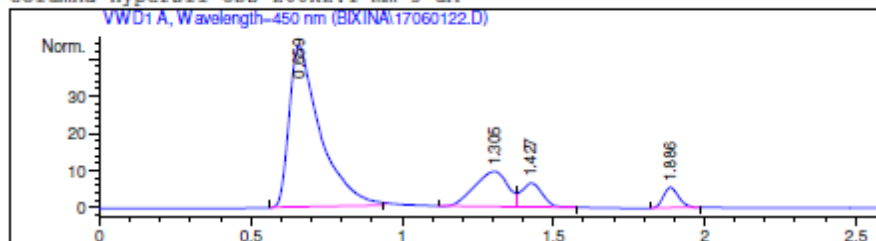
Anexo 17. Cromatograma para el tratamiento 17 (t1.pH2.R3)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 4:57:03 PM          Seq. Line : 22
Sample Name    : T17                          Location  : Vial 22
Acq. Operator  : AdeM                          Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                  Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                  (modified after loading)
  
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU	Amt/Area *s	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.427	VB	31.45610	1.12246e-2	3.53084e-1		Bixina
1.886	PB	19.91295	6.14224e-3	1.22310e-1		Pico 1.82

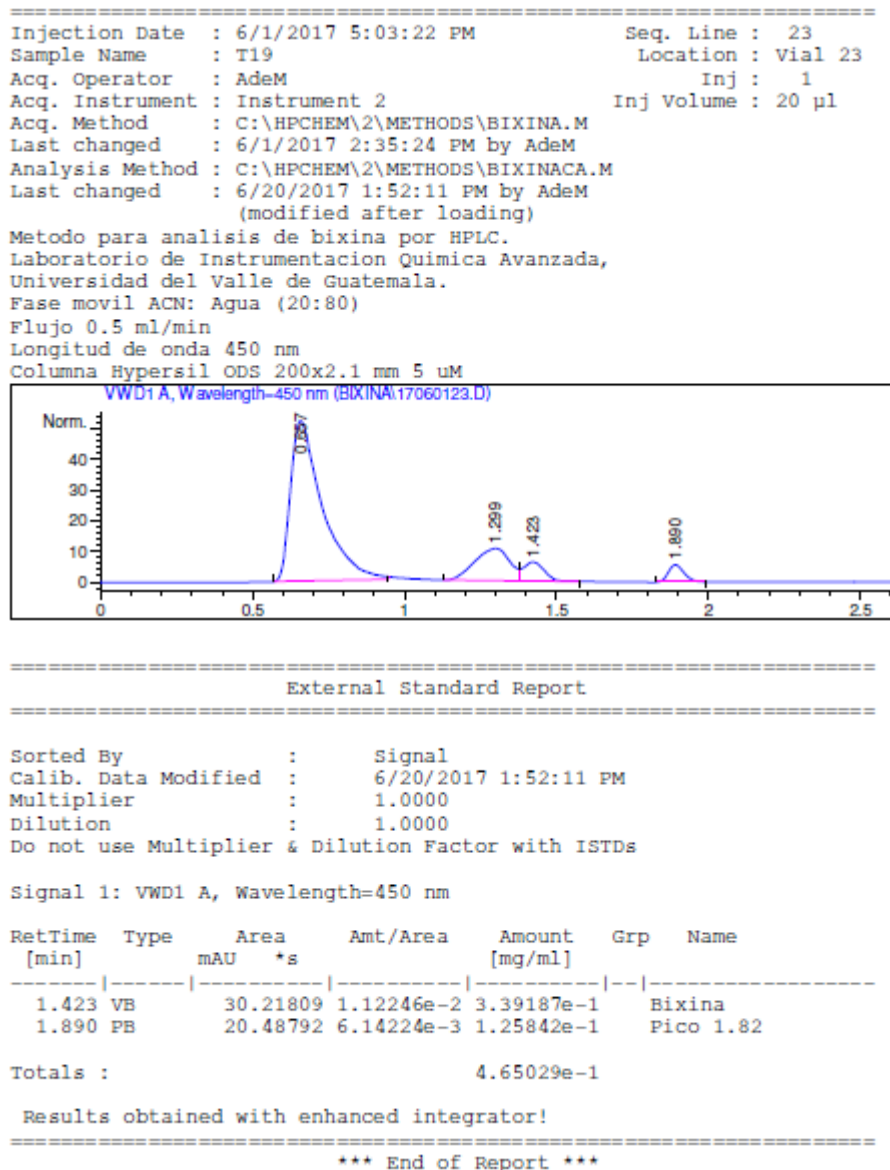
Totals : 4.75394e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

Anexo 18. Cromatograma para el tratamiento 19 (t2.pH2.R2)



Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

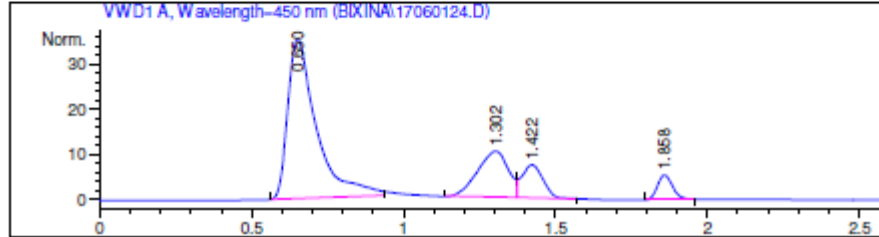
Anexo 19. Cromatograma para el tratamiento 20 (t3.pH3.R3)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 5:09:41 PM          Seq. Line : 24
Sample Name    : T20                          Location  : Vial 24
Acq. Operator  : AdeM                        Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.422	VB	35.75695	1.12246e-2	4.01359e-1		Bixina
1.858	PB	18.81657	6.14224e-3	1.15576e-1		Pico 1.82

Totals : 5.16935e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

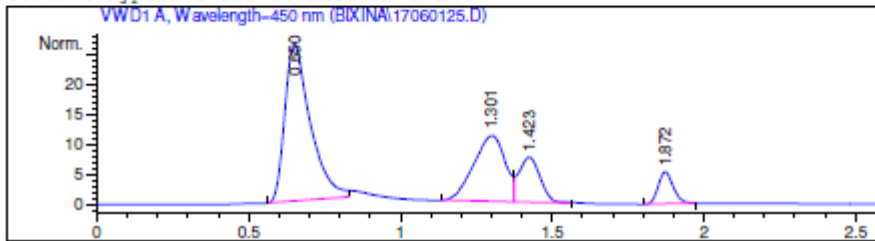
Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

Anexo 20. **Cromatograma para el tratamiento 21 (t2.pH2.R3)**

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 5:16:05 PM          Seq. Line : 25
Sample Name    : T21                          Location  : Vial 25
Acq. Operator  : AdeM                         Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
 Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
 Universidad del Valle de Guatemala.
 Fase movil ACN: Agua (20:80)
 Flujo 0.5 ml/min
 Longitud de onda 450 nm
 Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.423	VB	36.45807	1.12246e-2	4.09229e-1		Bixina
1.872	PB	18.59616	6.14224e-3	1.14222e-1		Pico 1.82

Totals : 5.23451e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

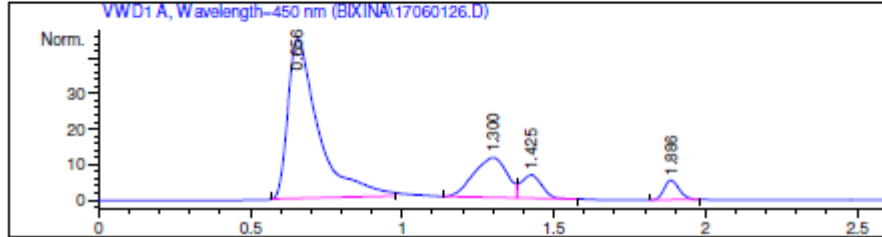
Anexo 21. **Cromatograma para el tratamiento 22 (t2.pH1.R2)**

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 5:22:30 PM          Seq. Line : 26
Sample Name    : T22                          Location  : Vial 26
Acq. Operator  : ADEM                         Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by ADEM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by ADEM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.425	VB	31.14481	1.12246e-2	3.49590e-1		Bixina
1.886	PB	19.68178	6.14224e-3	1.20890e-1		Pico 1.82

Totals : 4.70480e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

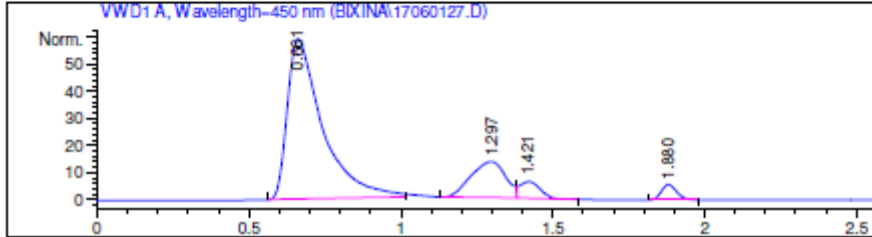
Anexo 22. **Cromatograma para el tratamiento 23 (t2.pH3.R1)**

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 5:28:56 PM          Seq. Line : 27
Sample Name    : T23                          Location  : Vial 27
Acq. Operator  : AdeM                         Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.421	VB	29.78109	1.12246e-2	3.34282e-1		Bixina
1.880	PB	20.16773	6.14224e-3	1.23875e-1		Pico 1.82

Totals : 4.58157e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

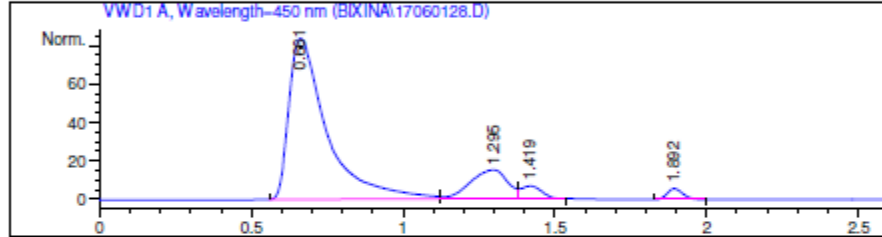
Anexo 23. Cromatograma para el tratamiento 24 (t2.pH3.R3)

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 5:35:16 PM          Seq. Line : 28
Sample Name    : T24                          Location  : Vial 28
Acq. Operator  : AdeM                          Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.419	VB	33.10493	1.12246e-2	3.71591e-1		Bixina
1.892	PB	20.49558	6.14224e-3	1.25889e-1		Pico 1.82

Totals : 4.97480e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

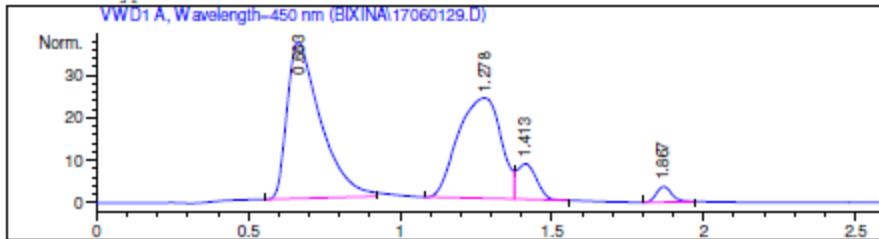
Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.* www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

Anexo 24. **Cromatograma para el tratamiento 25 (t3.pH2.R2)**

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 5:41:40 PM      Seq. Line : 29
Sample Name    : T25                      Location  : Vial 29
Acq. Operator  : AdeM                    Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2            Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
 Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
 Universidad del Valle de Guatemala.
 Fase movil ACN: Agua (20:80)
 Flujo 0.5 ml/min
 Longitud de onda 450 nm
 Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.413	VB	38.33480	1.12246e-2	4.30295e-1		Bixina
1.867	PB	13.76761	6.14224e-3	8.45640e-2		Pico 1.82

Totals : 5.14859e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

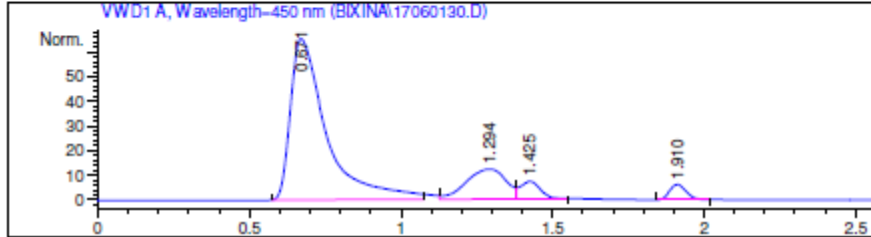
Anexo 25. **Cromatograma para el tratamiento 26 (t3.pH1.R2)**

```

=====
Injection Date   : 6/1/2017 5:48:03 PM           Seq. Line :   30
Sample Name     : T26                          Location  : Vial 30
Acq. Operator  : Adem                          Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2                  Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by Adem
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by Adem
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.425	VB	33.98223	1.12246e-2	3.81439e-1		Bixina
1.910	PB	23.31224	6.14224e-3	1.43189e-1		Pico 1.82

Totals : 5.24628e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.

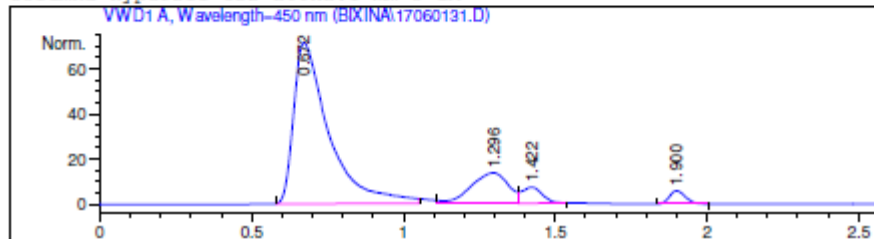
Anexo 26. **Cromatograma para el tratamiento 27 (t1.pH1.R2)**

```

=====
Injection Date : 6/1/2017 5:54:30 PM          Seq. Line : 31
Sample Name    : T27                          Location  : Vial 31
Acq. Operator  : AdEM                        Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 6/1/2017 2:35:24 PM by AdEM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINACA.M
Last changed   : 6/20/2017 1:52:11 PM by AdEM
                (modified after loading)
    
```

```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN: Agua (20:80)
Flujo 0.5 ml/min
Longitud de onda 450 nm
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/20/2017 1:52:11 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
1.422	VB	34.02273	1.12246e-2	3.81893e-1		Bixina
1.900	PB	21.60285	6.14224e-3	1.32690e-1		Pico 1.82

Totals : 5.14583e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Universidad del Valle de Guatemala. *Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada*. www.uvg.edu.gt. Consulta: 15 de abril de 2016.