



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

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO
COLORANTE DEL ACHIOTE (*Bixa orellana L.*) A NIVEL LABORATORIO**

Edy Boanerges Payes Aguirre

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

Guatemala, marzo de 2017

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO
COLORANTE DEL ACHIOTE (*Bixa orellana L.*) A NIVEL LABORATORIO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

EDY BOANERGES PAYES AGUIRRE

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

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, MARZO 2017

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. Jurgen Andoni Ramírez Ramírez
VOCAL V	Br. Oscar Humberto Galicia Nuñez
SECRETARIA	Inga. Lesbía Magalí Herrera López

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
EXAMINADOR	Ing. Jaime Domingo Carranza González
EXAMINADORA	Inga. Hilda Piedad Palma Ramos
EXAMINADOR	Ing. Manuel Gilberto Galván Estrada
SECRETARIA	Inga. Lesbía Magalí Herrera López



Guatemala, 21 de octubre de 2016

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 titulado "OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO COLORANTE DEL ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) A NIVEL LABORATORIO", del estudiante de Ingeniería Química Edy Boanerges Payes Aguirre quien se identifica con el carné estudiantil número 2010-20187.

Sin otro particular me suscribo de usted.

Atentamente,

Ing. Qco. Mario José Mérida Méndez
JEFE

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



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





Guatemala, 18 de noviembre de 2016.
Ref. EIQ.TG-IF.068.2016.

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 **034-2015** 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

Solicitado por el estudiante universitario: **Edy Boanerges Payes Aguirre**.
Identificado con número de carné: **2010-20187**.
Previo a optar al título de **INGENIERO QUÍMICO**.

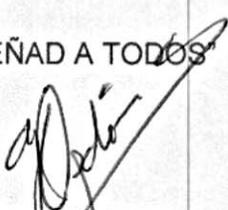
Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL EXTRACTO COLORANTE DEL ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) A NIVEL LABORATORIO

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.010.2017

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, **EDY BOANERGES PAYES AGUIRRE** titulado: **"OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO COLORANTE DEL ACHIOTE (*Bixa Orellana L.*) A NIVEL LABORATORIO"**. 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 Davila
Director
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, marzo 2017

Cc: Archivo
CSWD/ale

Universidad de San Carlos
de Guatemala

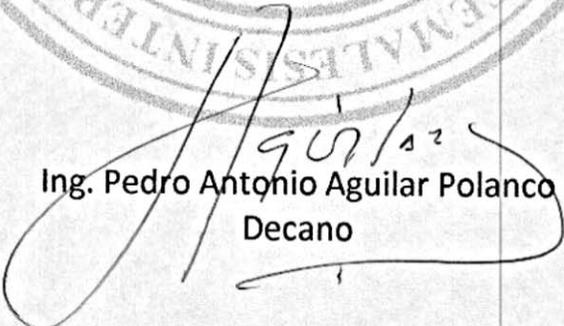


Facultad de Ingeniería
Decanato

DTG. 119.2017

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: **OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL EXTRACTO COLORANTE DEL ACHIOTE (Bixa Orellana L.) A NIVEL LABORATORIO**, presentado por el estudiante universitario: **Edy Boanerges Payes Aguirre**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:


Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
Decano

Guatemala, marzo de 2017

/gdech



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:

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO
COLORANTE DEL ACHIOTE (*Bixa orellana L.*) A NIVEL LABORATORIO**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 27 de julio de 2015.

Edy Boanerges Payes Aguirre

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Por darme la vida y ser mi pilar en mi corto caminar. Por estar siempre conmigo y darme serenidad a pesar de mis fallos. Es a ti a quien dirijo mi honra y gloria.
- Mis padres** Jose Cecilio Payes (q. e. p. d) y Juana de María Aguirre López. Su amor será siempre mi inspiración y apoyo para creer en mis sueños. Los amo por ser mi ejemplo a seguir, por su amor incondicional y lucha constante.
- Mis hermanos** Luis, Adelfo, José, Carmen y Alma Payes. Porque con su ejemplo y apoyo me motivan cada día a seguir mis metas.
- Mis tíos** Hermelinda e Isaac Payes, por haberme guiado y darme consejos sabios.
- Mi abuela** Leónides Payes, por su sabiduría, consejo y apoyo.
- Mis cuñadas** Lorena Pérez, Sylvanna Díaz e Izamar Guerra, por ser personas agradables, amables y de buen corazón, siendo el apoyo de mis hermanos.

Mis sobrinos

Aylin, Luis, Fabián, Arturo, Mariano, Jasmin, Aly e Izabella Payes, por darme alegría y ser con quien comparto mis sueños.

Esther López

Por ser paciente, darme su amor y apoyo incondicional en mis decisiones.

Mis amigos

Danilo Ajcip, Kevin Carias, José Zúñiga, Pedro Ríos, Moises Cuzco, Marco Pérez, María Ponce, Stefanie Montenegro, Miguel Martínez, Cecilia Vaquero, Luis Linares, Diana Cermeño, Karen Gatica, Pablo Méndez, Eduardo de Paz, Pedro García, Selvyin Solórzano, Gabriel Solórzano, Hector Mendoza, Sandra Ayala, por ser una importante influencia durante mi carrera con su apoyo y alegría.

AGRADECIMIENTOS A:

**Universidad de San
Carlos de Guatemala**

Por ser mi casa de estudios y la institución que me brindó la oportunidad de adquirir el conocimiento para alcanzar mis sueños, entre otras cosas.

Facultad de Ingeniería

Por brindarme la oportunidad de adquirir el conocimiento necesario para mi formación como profesional.

Mis asesores

Inga. Telma Cano e Ing. Mario Mérida, por su apoyo y paciencia en la constante revisión y asesoría de esta investigación, por alentarme a la excelencia y a siempre seguir adelante.

Ph.D. Casta Zeceña

Por el apoyo, oportunidades, y motivaciones para desarrollar esta investigación.

Mis profesores

Por ser una importante influencia en mi carrera, formar ese vínculo de conocimiento y enseñanza.

	2.1.4.2.	Inocuo.....	8
	2.1.4.3.	Especificidad.....	8
2.1.5.		Características químicas	8
	2.1.5.1.	Auxocromo	9
	2.1.5.2.	Cromóforo	9
2.2.		Achiote y bixina	9
	2.2.1.	Aspectos generales.....	9
	2.2.2.	La materia colorante.....	10
	2.2.3.	Presentación y aplicaciones	11
	2.2.3.1.	Annatto grado alimenticio	11
	2.2.3.2.	Annatto soluble en álcali frío	11
	2.2.3.3.	Extracto liposoluble	11
	2.2.3.4.	Suspensión en aceite	11
2.3.		Cromatografía	12
2.4.		Materia prima	12
	2.4.1.	Origen.....	12
	2.4.2.	Clasificación botánica.....	13
	2.4.3.	Variedades	13
	2.4.4.	Morfología	14
	2.4.4.1.	Tronco	15
	2.4.4.2.	Inflorescencias	16
	2.4.4.3.	Polinización	17
	2.4.4.4.	Frutos y semillas	17
	2.4.4.5.	Hojas	19
	2.4.4.6.	Raíces	19
	2.4.4.7.	Requerimientos y condiciones climáticas.....	19
	2.4.5.	Propagación	20
	2.4.5.1.	Reproducción sexual por semilla.....	20

	2.4.5.2.	Reproducción asexual	22
	2.4.6.	Cosecha	23
	2.4.6.1.	Manejo postcosecha	23
	2.4.7.	Usos del achiote	25
2.5.		Composición química de la semilla de achiote	26
2.6.		Farmacología.....	27
2.7.		Toxicología	28
3.		DISEÑO METODOLÓGICO	29
3.1.		Localización.....	29
3.2.		Variables.....	29
	3.2.1.	Variables independientes	29
	3.2.2.	Variables dependientes	30
	3.2.3.	Variables de respuesta	31
3.3.		Delimitación del campo de estudio	31
	3.3.1.	Obtención de la materia prima.....	31
	3.3.2.	Extracción del colorante natural.....	31
	3.3.3.	Método de extracción del colorante natural	32
	3.3.4.	Análisis cuantitativo del extracto colorante	32
	3.3.5.	Variables del proceso	32
	3.3.5.1.	Concentración del solvente	32
	3.3.5.2.	Relación cantidad de semilla y volumen de solvente	33
	3.3.5.3.	Tiempo de agitación	33
	3.3.5.4.	Velocidad de agitación.....	33
	3.3.5.5.	pH.....	33
	3.3.5.6.	Temperatura de secado.....	34
3.4.		Recursos humanos.....	34
3.5.		Recursos materiales disponibles	34

3.6.	Técnica cuantitativa.....	35
3.6.1.	Extracción del colorante natural del arilo de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>), utilizando la técnica lixiviación con álcali acuoso a escala laboratorio	36
3.6.2.	Calculo del rendimiento extractivo del colorante natural de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>).....	38
3.6.3.	Determinación de los componentes activos del extracto colorante seco de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia	38
3.6.4.	Determinación experimental de la densidad del extracto colorante de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>)	39
3.6.5.	Determinación del espacio poroso y porosidad el extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>), a nivel laboratorio.....	40
3.7.	Recolección y ordenamiento de la información.....	41
3.7.1.	Diseño experimental de tratamientos	42
3.7.1.1.	Factor A: tiempo de extracción.....	42
3.7.1.2.	Factor B: pH de la solución para obtener el precipitado del colorante	42
3.7.1.3.	Repeticiones.....	43
3.7.1.4.	Numero de combinaciones para la simulación del experimento	43
3.8.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información.....	48
3.9.	Análisis estadístico.....	51
3.9.1.	Supuestos del ANDEVA	51

3.9.2.	Proceso de análisis de varianza	52
3.9.3.	Modelo estadístico	53
3.9.4.	Media aritmética	53
3.9.5.	Desviación	53
3.9.6.	Grados de libertad	54
3.9.7.	Datos de la ANDEVA.....	54
4.	RESULTADOS	73
4.1.	Evaluación del porcentaje de rendimiento de extracción del colorante natural del arilo de las semillas de achiote en función del pH del extracto a nivel laboratorio	73
4.2.	Evaluación del porcentaje de rendimiento de extracción del colorante natural del arilo de las semillas de achiote en función del tiempo de extracción	74
4.3.	Caracterización fisicoquímica del colorante natural extraído del arilo de las semillas de achiote por medio de la determinación de la densidad, porosidad y cuantificación de bixina por cromatografía líquida de alta eficiencia	76
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	83
	CONCLUSIONES	91
	RECOMENDACIONES	93
	BIBLIOGRAFÍA.....	95
	APÉNDICES	97
	ANEXOS.....	113

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Árbol de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>)	15
2.	Inflorescencias de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>).....	16
3.	Frutos de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>)	18
4.	Diagrama de extracción de colorante de achiote a nivel laboratorio	37
5.	Media y 95 % de Fisher LSD para el rendimiento en función del tiempo de maceración	56
6.	Medias y 95 % de Fisher LSD para el rendimiento extractivo del colorante en función del pH de precipitación.....	58
7.	Gráfico de interacciones para el rendimiento extractivo en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación	58
8.	Medias 95 % y Fisher LSD para la densidad del extracto colorante en función del tiempo de extracción	60
9.	Medias 95 % y Fisher LSD para la densidad del colorante en función del pH de precipitación	61
10.	Gráfico de interacciones para la densidad del colorante en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación	62
11.	Media 95 % y Fisher LSD para porosidad del colorante en función del tiempo de maceración	63
12.	Media 95 % y Fisher LSD para porosidad del colorante en función del pH de precipitación.....	65

13.	Gráfico de interacciones para la porosidad del colorante en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación.....	65
14.	Medias 95 % y Fisher LSD para cuantificación de bixina en colorante en función del tiempo de maceración.....	68
15.	Medias 95 % y Fisher LSD para cuantificación de bixina en el colorante en función del pH de precipitación	70
16.	Gráfico de interacciones para cuantificación de bixina en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación.....	71
17.	Rendimiento extractivo del colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio en función del pH de precipitación.....	74
18.	Rendimiento extractivo del colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio en función del tiempo de maceración	75
19.	Gráfico de interacciones para el rendimiento extractivo en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación.....	75
20.	Densidad del extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio en función del tiempo de maceración	76
21.	Densidad del extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio en función del pH de precipitación	77
22.	Porosidad del extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio en función del tiempo de maceración	78
23.	Porosidad del extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio en función del pH de precipitación.....	79
24.	Cuantificación de bixina en el extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio en función del tiempo de maceración ..	80
25.	Cuantificación de bixina en el extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio en función del pH de precipitación.....	81

TABLAS

I.	Clasificación botánica.....	13
II.	Cubierta exterior.....	26
III.	Cutícula	27
IV.	Semilla interior	27
V.	Variables independientes para el proceso de extracción del colorante mediante álcali acuoso	30
VI.	Variables dependientes para el proceso de extracción de colorante mediante álcali acuoso	30
VII.	Materia prima y reactivos	34
VIII.	Cristalería, equipo y otros	35
IX.	Resumen del diseño experimental de tratamientos	43
X.	Combinaciones para el diseño experimental.....	44
XI.	Arreglo combinatorio para el diseño experimental completamente al azar	44
XII.	Rendimiento extractivo del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio.....	45
XIII.	Datos para la determinación de la densidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>), a nivel laboratorio	46
XIV.	Solubilidad del extracto colorante obtenido del arilo de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>), a nivel laboratorio. Utilizando como solvente etanol	47
XV.	Datos de la cuantificación de bixina del extracto colorante seco de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia	47
XVI.	Rendimiento extractivo del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio.....	48

XVII.	Densidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>), a nivel laboratorio	49
XVIII.	Determinación de la porosidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>), a nivel laboratorio.....	50
XIX.	Cuantificación de bixina del extracto colorante seco de la semilla de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia	51
XX.	Resumen estadístico para el rendimiento extractivo del colorante analizando el factor tiempo de maceración.....	55
XXI.	ANDEVA para el rendimiento extractivo del colorante en función del tiempo de maceración.....	55
XXII.	Comparación entre niveles del factor tiempo de maceración para el rendimiento extractivo del colorante.....	56
XXIII.	Resumen estadístico para el rendimiento extractivo del colorante analizando el factor pH	57
XXIV.	ANDEVA para el rendimiento extractivo de colorante en función del pH de precipitación	57
XXV.	Comparación entre niveles del factor pH de precipitación para el rendimiento extractivo del colorante	57
XXVI.	Resumen estadístico de la densidad del extracto colorante en función del tiempo de maceración	59
XXVII.	ANDEVA para la densidad del colorante en función del tiempo de extracción	59
XXVIII.	Comparación entre niveles para la densidad del colorante en función del factor tiempo de maceración	59
XXIX.	Resumen estadístico de la densidad del colorante en función del pH de precipitación	60
XXX.	ANDEVA para la densidad del colorante en función del pH de precipitación.....	60

XXXI.	Comparación entre niveles para la densidad del colorante en función del pH de precipitación	61
XXXII.	Resumen estadístico de porosidad del colorante en función del tiempo de maceración	62
XXXIII.	ANDEVA para porosidad por tiempo maceración	63
XXXIV.	Comparación entre niveles para la porosidad del colorante en función del tiempo de maceración.....	63
XXXV.	Resumen Estadístico para Porosidad del colorante en función del pH de precipitación.....	64
XXXVI.	ANOVA para Porosidad del colorante en función del pH de precipitación	64
XXXVII.	Comparación entre niveles para porosidad del colorante en función del pH de precipitación	64
XXXVIII.	Resumen estadístico para cuantificación de bixina en función del tiempo de maceración	66
XXXIX.	ANDEVA para cuantificación de bixina en el colorante en función del tiempo maceración	66
XL.	Comparación entre niveles para la cuantificación de bixina en el colorante en función del tiempo de maceración	66
XLI.	Pruebas de múltiple rangos para cuantificación de bixina en el colorante en función del tiempo maceración, utilizando el método con 95,0 porcentaje LSD.....	67
XLII.	Contraste de la prueba de múltiples rangos para la cuantificación de bixina del colorante en función del tiempo de maceración, indicando la significancia entre grupos.....	67
XLIII.	Resumen estadístico para cuantificación de bixina del colorante en función del pH de precipitación	68
XLIV.	ANDEVA para cuantificación de bixina en el colorante en función del pH de precipitación.....	69

XLV.	Comparación entre niveles para la cuantificación de bixina en el colorante en función del pH de precipitación	69
XLVI.	Pruebas de múltiple rangos para cuantificación de bixina del colorante en función del pH de precipitación, utilizando el método con 95,0 porcentaje LSD	69
XLVII.	Contraste de la prueba de múltiples rangos para la cuantificación de bixina del colorante en función del pH de precipitación, indicando la significancia entre grupos	70
XLVIII.	Rendimiento extractivo del colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio, analizando el factor pH de precipitación	73
XLIX.	Rendimiento extractivo del colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio, analizando el factor tiempo de maceración	74
L.	Densidad del extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio, analizando el factor tiempo de maceración	76
LI.	Densidad del extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio, analizando el factor pH de precipitación	77
LII.	Porosidad del extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio, analizando el factor tiempo de maceración	78
LIII.	Porosidad del extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio, analizando el factor pH de precipitación	79
LIV.	Cuantificación de bixina en el extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio, analizando el factor tiempo de maceración	80
LV.	Cuantificación de bixina en el extracto colorante de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>) a nivel laboratorio, analizando el factor pH de precipitación.....	81

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
°C	Grado celsius
g	Gramo
h	Hora
kg	Kilogramo
m ³	Metro cúbico
mg	Miligramo
mL	Mililitro
pH	Potencial de hidrógeno
%	Porcentaje
t	Tiempo

GLOSARIO

Arilo	Cobertura carnosa de ciertas semillas. Esta puede crearse de una estructura frutal llamada falsa fruta producida en muy pocas especies de Gimnospermas.
Bixina	Pigmento clasificado como carotenoide esterificado en un carboxilo terminal. Este pigmento se encuentra presente en el arilo de las semillas de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>).
Colorante	Sustancia capaz de absorber determinadas longitudes de onda de luz, son sustancias que se fijan en otras sustancias y las dotan de color de manera estable ante factores físicos/químicos.
Cromatografía	Método de análisis que permite la separación de gases o líquidos de una mezcla por adsorción selectiva, produciendo manchas diferentemente coloreadas en el medio adsorbente; está basado en la diferente velocidad con la que se mueve cada fluido a través de una sustancia porosa.
Extracto	Sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente.

HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (<i>high-performance liquid chromatography</i>).
Liposoluble	Sustancia que es soluble en grasas y/o aceites.
Lixiviación	Es un proceso físico de transferencia de materia que ocurre cuando un solvente líquido atraviesa un sólido produciendo la elusión de algún componente soluble (solute) en dicho sólido.
Maceración	Es el método de extracción de los principios activos de una planta el cual consiste en dejar reposar una parte vegetal en un solvente durante un periodo considerable de tiempo.
Norbixina	Pigmento tipo carotenoide obtenido a partir de la hidrólisis alcalina de la bixina presente en el arilo de las semillas de achiote (<i>Bixa orellana L.</i>).
Soluble	Término para designar al fenómeno cualitativo del proceso de disolución como para expresar cuantitativamente la concentración de las soluciones.
Solvente	Sustancia que puede disolver y producir con otra una mezcla homogénea

Suspensión

También llamada solución, es una mezcla homogénea a nivel molecular o iónico de dos o más sustancias que no reaccionan entre sí, cuyos componentes se encuentran en proporción que varía entre ciertos límites.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo el objetivo principal de extraer y caracterizar el extracto colorante natural del arilo de las semillas de achiote (*Bixa orellana* L.) utilizando el método de lixiviación con álcali acuoso a nivel laboratorio. El método consistió en colocar las semillas de achiote (*Bixa orellana* L.) en contacto con el solvente en maceración mixta. Se utilizó un tamaño de lote de 200 g, en la maceración estática el tiempo fue de 12 h y en la maceración dinámica se varió el tiempo de extracción (30, 60 y 90 min) y para la precipitación del colorante se varió el potencial de hidrógeno pH el cual comprendió valores de 2, 3 y 4. Para el porcentaje extractivo se realizó un análisis estadístico y se determinó que no existe diferencia significativa en cuanto a los valores medios en función del tiempo de maceración y en función del pH de precipitación.

Para la caracterización fisicoquímica se realizó la determinación de la densidad aparente, densidad real, la porosidad y la cuantificación de bixina. Para el análisis de los resultados se utilizó una repetición de los tratamientos tomando la misma como representativa. Al realizar el análisis estadístico se determinó que no existe diferencia significativa para los valores medios de densidad y porosidad del colorante en función del tiempo de maceración y pH de precipitación; sin embargo, para la cuantificación de bixina en el colorante se determinó que sí existe diferencia significativa en los valores medios en función del tiempo de maceración. En cuanto al contenido de bixina en función del pH de precipitación se determinó que no existe diferencia significativa en los valores medios.

OBJETIVOS

General

Caracterizar el extracto colorante natural del arilo de las semillas de achiote (*Bixa orellana L.*) utilizando el método de lixiviación con álcali acuoso a nivel laboratorio.

Específicos

1. Evaluar el porcentaje de rendimiento de extracción del colorante natural del arilo de las semillas de achiote en función del pH del extracto.
2. Evaluar el porcentaje de rendimiento de extracción del colorante natural del arilo de las semillas de achiote en función del tiempo de extracción.
3. Caracterizar fisicoquímicamente el colorante natural extraído del arilo de las semillas de achiote por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia para cuantificar contenido de bixina, densidad aparente, densidad real y porosidad del extracto colorante.

Hipótesis

Hipótesis de trabajo

Es posible extraer el extracto colorante del arilo de la semilla del achiote (*Bixa orellana L.*) por medio de lixiviación con álcali acuoso para evaluar el rendimiento de extracción y caracterización fisicoquímica.

Hipótesis estadística

Hipótesis nula

Ho₁: no existe diferencia significativa en la evaluación del porcentaje de rendimiento de la extracción a nivel laboratorio del colorante natural de la semilla de achiote por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del tiempo de extracción.

Ho₂: no existe diferencia significativa en la evaluación del porcentaje de rendimiento de la extracción a nivel laboratorio del colorante natural de la semilla de achiote por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del pH del extracto.

Ho₃: no existe diferencia significativa en las propiedades fisicoquímicas del colorante natural del achiote en función del tiempo de extracción.

Ho₄: no existe diferencia significativa en las propiedades fisicoquímicas del colorante natural del achiote en función del pH del extracto.

Hipótesis alternativa

Hi₁: existe diferencia significativa en la evaluación del porcentaje de rendimiento de la extracción a nivel laboratorio del colorante natural de la semilla de achiote por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del tiempo de extracción.

Hi₂: existe diferencia significativa en la evaluación del porcentaje de rendimiento de la extracción a nivel laboratorio del colorante natural de la semilla de achiote por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del pH del extracto.

Hi₃: existe diferencia significativa en las propiedades fisicoquímicas del colorante natural del achiote en función del tiempo de extracción.

Hi₄: existe diferencia significativa en las propiedades fisicoquímicas del colorante natural del achiote en función del pH del extracto.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el constante crecimiento de la población ha sido un impulsor de la búsqueda de alternativas para la alimentación las cuales cumplan con las necesidades de nutrición y que sean aptas para el consumo humano. En esa búsqueda mediante investigaciones y enfocado a los colorantes naturales se encuentra con el achiote (*Bixa orellana L.*), conocido también por otros nombres, achote, bixa, bija urucú, annatto, onoto, colorado y otros, es una especie árbol de la familia Bixaceae que crecen en las regiones trópicas y subtropicales de América como en Guatemala, Colombia, Brasil, Ecuador, Perú, entre otros; que en su peculiaridad se puede obtener un colorante natural proveniente del arilo de las semillas que a su vez aportan una considerable cantidad de proteínas, fibras, vitaminas, entre otros. Su uso principal durante mucho tiempo ha sido para dar color a gran variedad de alimentos, pero se puede emplear en la industria láctea, embutidos, cosméticos, entre otras.

Los colorantes naturales se obtienen por medio de la extracción de materia de origen vegetal, animal o son colorantes inorgánicos de procedencia mineral. Por ser productos de extracción en general no son productos puros sino que se obtienen mezclados con otros componentes del material de partida que pueden ser grasas, carbohidratos o proteínas; sin embargo, en algunos casos se ha llegado al aislamiento del colorante puro. Dependiendo del colorante puede presentarse en forma hidrosoluble, óleo soluble o en ambas. Durante la aparición de los colorantes de síntesis, por su amplio rango de colores, su estabilidad y su mayor poder colorante, provocó una disminución de uso temporalmente los colorantes naturales. Sin embargo, actualmente, los

colorantes naturales experimentan un nuevo auge debido al interés de los consumidores por los productos naturales y a las ventajas que tiene por su bajo riesgo a la salud.

Actualmente en Guatemala se exportan grandes cantidades de achiote (*Bixa orellana L.*) como un cultivo tradicional de exportación donde únicamente se empaqueta las semillas previamente deshidratadas sin ningún proceso de transformación; en el presente trabajo de investigación se pretende realizar la extracción del colorante natural proveniente del arilo de las semillas para generar datos de rendimiento y calidad que permitan elaborar parámetros para que los principales productores puedan optar por un proceso productivo de transformación y darle un valor agregado a su producción.

1. ANTECEDENTES

Casanova D., Ortiz M., Restrepo J., Colmenares A., Grupo de Investigación en Productos Naturales y de Alimentos, GIPNA, de la Universidad del Valle. Trabajó una investigación de procesos biotecnológicos como la extracción mediante biocatalizadores (enzimas) de pigmentos en este caso la bixina, principal colorante de las semillas de achiote (*Bixa orellana L.*) como propuesta en el reemplazo de la tartrazina la cual se utiliza en la industria alimenticia y se encuentra catalogada como cancerígena a concentraciones altas. Las enzimas comerciales α -amilasa, celulasa y pectinasa, empleadas en la extracción de bixina de la semilla de achiote (*Bixa orellana L.*) beneficiaron la obtención de este colorante al mostrar rendimientos mayores a la extracción realizada con agua reportada en la literatura. En el rango de operación evaluado para cada enzima, la que presentó mejores resultados en las variables de respuesta (concentración de bixina: 16 % y porcentaje de rendimiento: 8,93 %) fue la α -amilasa. La extracción enzimática no desnaturaliza la bixina obtenida en el colorante, ni por aumento de la temperatura o concentración de la enzima, ya que los análisis realizados así lo demuestran (IR, espectro de masas y UV-visible)¹.

En 2003, la investigación *planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (Bixa orellana L.)*, fue realizada en la Universidad de EAFIT de Medellín, Colombia. El equipo seleccionado para capacidad de producción de 50 kg/día logra una mayor eficiencia en el proceso cuando se obtiene un rendimiento cercano al 8 %, esto al trabajar con una relación en cuanto a cantidad de semilla y volumen de solvente 1:3, con concentración de solvente de 2 % de KOH y tiempo de agitación de 45 min a velocidad de 140 RPM. Mediante análisis de cromatografía en capa delgada, y en los espectros infrarrojo y UV-VIS del producto colorante obtenido se puede identificar claramente la bixina.

¹ Salvá, B. *Utilización de enzimas en la extracción de colorante a partir de semillas de achiote (Bixa orellana L.)*. p13.

Al utilizar el complejo enzimático extrazyme se aumenta el rendimiento de extracción de norbixina en 13 % y de bixina en 11 %, respecto a la extracción acuosa. En cuanto a la extracción alcalina, los rendimientos de extracción son menores, pero en cuanto a la pureza del annato es mayor, 5 % y 10 % más en bixina y norbixina, respectivamente. “Es posible aumentar la pureza del annato obtenido por extracción alcalina, realizando una hidrólisis previa del extracto con celluclast. La pureza en bixina y norbixina aumentan en 4 % y 6 % respectivamente. El empleo de enzimas en la extracción del colorante de achiote resultaría como una alternativa a reducir el empleo de sustancias químicas que pueda ocasionar riesgos toxicológicos”².

En 2014, Lucero del Carmen Huerta Cárdenas y Renzo Rodrigo Ostos Arias presentan su trabajo de tesis, *estudio de prefactibilidad de una empresa productora y comercializadora de bixina dirigido al mercado de Japón*. Dicho estudio de investigación se basa en la obtención de la bixina en polvo a partir de semillas de achiote (*Bixa orellana L.*) usando KOH como solvente. Se plantean diversos métodos para la extracción industrial de bixina a partir de las semillas, pero se diferencian en el tipo de solvente que se usa y su respectiva metodología entre los que destaca álcali acuoso, aceites vegetales, propilenglicol, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, agua (método tradicional). Pero el proceso elegido para dicho proceso productivo es el que utiliza hidróxido de potasio (KOH) debido a las siguientes características encontradas: a) utilizar hidróxido de potasio como solvente obtiene un colorante de mejor calidad y rendimiento, b) extrae más del 30 % del total posible de colorante de semillas de achiote (*Bixa orellana L.*), c) empresas como KALSEC han comprobado que el hidróxido de potasio es el indicado para el proceso;

² CAMPOS GUTIÉRREZ, David. *Anales Científicos UNALM. Utilización de enzimas en la extracción de colorante a partir de semillas de achiote (Bixa orellana L.)*. p. 55.

d) se considera un solvente económico y es un proceso continuo ya que la materia prima sigue un recorrido lineal en la trayectoria del proceso.

En 2014, Zoila Concepción Reyes Buenafe presenta su trabajo de tesis titulado, *extracción y evaluación del colorante natural de achiote (bixa orellana l.) como sustituto del colorante artificial e-102 amarillo no. 5 (tartracina) en la elaboración de un yogurt*. EL colorante fue extraído de las semillas de la planta de achiote, utilizando como materia prima proveniente del municipio de San Miguel Tucurú del departamento de Alta Verapaz. Se realizó extracción del colorante de achiote utilizando como solventes: agua, solución acuosa de KOH al 1 %, 2 % y 3 %, a escala laboratorio. En dichos resultados se observó que el solvente KOH al 2 % presenta mayor rendimiento extractivo de 6,34 % \pm 1,28 % comparado con el agua con valor de 1,41 % \pm 1,10 %.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Colorante

Los colorantes son sustancias de color intenso que pueden usarse para producir un alto grado de decoloración cuando se dispersan en otros materiales o se hacen reaccionar con los mismos por medio de un proceso que, cuando menos temporalmente, destruye la estructura cristalina de las sustancias. Este último punto es la característica que distingue a los colorantes de los pigmentos, que casi siempre se aplican en forma de agregados a cristales insolubles.

2.1.1. Colorantes naturales

Un colorante natural es toda aquella materia colorante que tiene origen vegetal o animal. Para que una sustancia coloreada sea considerada un colorante deberá contener grupos cromóforos llamados auxocromos los que dan a la sustancia afinidad con la fibra. Los colorantes se dividen en varios grupos: colorantes naturales, tintes naturales y pigmentos naturales. Los colorantes naturales son productos que se adicionan a los alimentos para proporcionarles un color específico y hacerlos más agradables a la vista. Los tintes naturales se usan para teñir telas, madera y cuero. Finalmente, los pigmentos naturales son los compuestos responsables del color visible de una planta; además, son utilizados por la industria farmacéutica.

2.1.1.1. Ventajas de los colorantes naturales

Presentan una alta compatibilidad con los sistemas vitales, principal diferencia con muchos colorantes sintéticos que se bioacumulan y pueden alterar el metabolismo. La mayoría son biodegradables. Da origen a prácticas productivas novedosas y a mayor sostenibilidad económica y ecológica.

2.1.2. Colorante sintético o artificial

Un colorante artificial es una sustancia obtenida por síntesis química que suministra o intensifica el color de un alimento. Los colorantes artificiales son solubles en agua por la presencia de grupos de ácido sulfónico. Esto implica que son fácilmente utilizados en forma de sales de sodio, en soluciones y pastas.

2.1.2.1. Ventajas del colorante sintético

Los colorantes artificiales son fáciles de utilizar comparado con los naturales, debido a que resisten a los tratamientos térmicos y son estables en amplios intervalos de pH y son poco degradables por la luz. (Aceituno, 2010).

2.1.2.2. Desventajas del colorante sintético

La mayor desventaja de los colorantes artificiales es el riesgo que presenta a la salud de los consumidores. Presenta riesgos al ambiente por los efluentes derivados de sus síntesis. La resistencia química hace difícil su degradación por medios químicos o biológicos.

2.1.3. Clasificación de los colorantes

Existen diferentes clasificaciones sobre los colorantes naturales. Mayer en 1972 los clasificó en:

2.1.3.1. Pigmentos carotenoides

Hidrocarburos, hidroxilados, cetónicos, hidroxicarboxílicos, carboxílicos, entre otros.

2.1.3.2. Derivados diarilmetánicos

Cumarina.

2.1.3.3. Compuestos carboxílicos

Benzoquinónicos, naftoquinónicos, antracénicos y fenantrécenicos.

2.1.3.4. Compuestos heterocíclicos nitrogenados

Pirrólicos, derivados de la piridina, trapirrólicos de origen vegetal y animal y derivados indólicos. En todos estos, los pigmentos carotenoides son aceptables sin discusión como aditivos para ser ingeridos sin causar daño al organismo por considerar como precursores de la vitamina A. En general, los carotenoides se definen como derivados isoprénicos de peso molecular entre 530 y 650 g/mol, inestables ante cambios térmicos y de luz, de fácil oxidación en presencia de oxígeno, poseen estructuras químicas con diferencias en el tipo de sustituyentes que puedan tener sobre la estructura básica de los isómeros de carotenos, aquí pertenece la bixina.

2.1.4. Características de los colorantes

El color es la primera sensación que se percibe de un alimento, y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Es también un factor importante dentro del conjunto de sensaciones que aporta el alimento, y tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor.

2.1.4.1. Penetración

Entrada del colorante a la célula a través del tejido.

2.1.4.2. Inocuo

No debe producir alteraciones en las células ni en los demás componentes del tejido a colorear.

2.1.4.3. Especificidad

Debe colorear ciertas estructuras celulares a través de uniones fuertes.

2.1.5. Características químicas

Se basa en los procesos de la materia colorante los cuales se dividen en dos: Pigmentos y Tintes. Estos a su vez en orgánicos e inorgánicos los cuales pueden ser de origen vegetal, animal, mineral y sintéticos.

2.1.5.1. Auxocromo

Los auxocromos son grupos ionizables, los que permiten la unión del colorante a la sustancia a teñir, a través de uniones con grupos de carga opuesta. Determinan si son colorantes básicos (negativos), ácidos (positivos) o neutros; son por tanto determinantes para su unión a los tejidos.

2.1.5.2. Cromóforo

Los cromóforos son grupos que poseen el color, por lo tanto, cuando se elija que colorante utilizar se debe tener en cuenta las características de los grupos funcionales a determinar; presentan dobles enlaces alternados con enlaces simples. Según el grupo cromóforo se pueden clasificar en:

- Colorantes nitrados
- Colorantes azoicos
- Colorantes quinoides
- Colorantes derivados del dibenzopirano
- Ptalocianinas

2.2. Achiote y bixina

2.2.1. Aspectos generales

Achiote es el nombre común para la especie *Bixa orellana L.* (bixaceae), pequeño arbusto indígena de la zona subtropical andina y de Latinoamérica; su fruto es una cápsula cuya semilla contiene un colorante rojizo, en concentraciones de alrededor de 3 % en semillas de mejor calidad. El término orellana es debido a Francisco de Orellana, quien fue el primer conquistador

que exploró el río Amazonas en 1541. Otros nombres comunes para la *bixa orellana* L. son bija, urucú, annatto, siendo este último utilizado comercialmente. El achiote ha sido utilizado desde la Antigüedad por los indios para pintarse el cuerpo de color rojo (pintura de guerra), como colorante en la textilería y en la cerámica y como repente de insectos. El Perú es el mayor exportador de semillas de achiote; es cultivado en los departamentos de Amazonas, Cusco, Huáuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, San Martín y Ucayali. Otros países productores son Kenia, India, Brasil, Bolivia, Ecuador, Jamaica, República Dominicana y Guatemala.

2.2.2. La materia colorante

La bixina (éster monometílico del ácido 6,6'-diapo- ψ,ψ -carotenodioico), de fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$ (PM 394,49), insoluble en agua, ligeramente soluble en aceite, y de color naranja a púrpura, su $\lambda_{m\acute{a}x}$ ($CHCl_3$) es 509,5, 475, 443 nm y su absorptividad $E^{1\%}_{2870}$ a 502 nm en $CHCl_3$. Fue aislado por primera vez por Boussingault en 1825 y su fórmula molecular determinada por Heiddushka y Panzer en 1914.

Las semillas de achiote contienen principalmente cis-bixina, con pequeñas cantidades de la trans-bixina. Por calentamiento la cis-bixina se isomeriza a la forma trans que es la más estable y por hidrólisis alcalina se convierte en norbixina (ácido dicarboxílico) soluble en agua.

La norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$) presenta un $\lambda_{m\acute{a}x}$ 428 nm y una absorptividad $E^{1\%}$ de 2870 a 428 nm en NaOH a 0,1 N.

2.2.3. Presentación y aplicaciones

2.2.3.1. Annatto grado alimenticio

Se obtiene mediante extracción alcalina de semillas seguido de una precipitación del extracto con ácido mineral separando un polvo que luego de secado puede contener 30 % de bixina.

2.2.3.2. Annatto soluble en álcali frío

Se obtiene mediante extracción del colorante de la semilla y procesada para producir un polvo el cual es soluble en álcali frío, contiene hasta 30 % de norbixina. Este polvo se comercializa también en solución diluida de hidróxido de potasio, conteniendo norbixina entre 0,5 % a 4,0 %.

2.2.3.3. Extracto liposoluble

Se obtiene utilizando un aceite vegetal como solvente en las semillas pretratadas con agua o vapor de agua, el contenido del colorante en solución amarilla es de 0,2 % a 0,3 %.

2.2.3.4. Suspensión en aceite

Se obtiene al incorporar el pigmento no disuelto al aceite vegetal formándose una suspensión microcristalina, puede contener hasta 4 % de bixina (cis y trans). Esta suspensión de bixina en aceite es de color naranja.

2.3. Cromatografía

Estas técnicas se utilizan para poder 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. Materia prima

2.4.1. Origen

El achiote es originario de la América tropical. A la llegada de los europeos, el achiote era cultivado desde México hasta Brasil siendo, posiblemente, su área de origen la hoya amazónica. El uso inicial del achiote fue para pintura y tatuaje del cuerpo, como se utiliza aún entre ciertas tribus nativas del sur de América, protegiéndose así de los insectos de la época; prácticamente todas las etnias indígenas amazónicas y centroamericanas están familiarizadas con su uso.

2.4.2. Clasificación botánica

Tabla I. Clasificación botánica

Reino	Plantae (vegetal)
Subreino	Tracheobionta
Subdivisión	Diploidalia
Sección	Espermatofita (fanerógamas)
Subsección	Angiosperma
Clase	Magnollopsida (Dicotiledónea)
Subclase	Arquiclamidea
Orden	Violales (Pariales)
Familia	Bixaceae
Genero	<i>Bixa</i>
Especie	<i>Bixa Orellana</i> L.

Fuente: GONZALES CORAL, Agustin. *Folia Amazonica*. p. 125.

2.4.3. Variedades

Las variedades de achiote se distinguen por las características fenotípicas que se expresan al crecer las plantas. Entre ellas existen diferentes tipos que exhiben características que las identifican.

Como se menciona, esta especie es alógama con un alto porcentaje de polinización cruzada que se acentúa cuando se propaga por semilla y que se puede observar en la descendencia con variedad de formas, tamaño y coloración de cápsulas y plantas. Algunas características son las siguientes:

- Plantas con flores blancas y cápsulas verdes.
- Plantas con flores rosadas y cápsulas con diferentes tonos rojizos.
- La forma de la cápsula puede ser redonda, acorazonada, oblonga, lancetada, con muchas, pocas o sin setas.
- El color de la corteza de los tallos se presenta de colores gris, rojo, amarillo y verde.

- Los colores de las cápsulas son verdes, rojas, anaranjadas, cafés, doradas y amarillas.
- El color del pigmento puede ser amarillo con semillas color café y rojo con semillas color rojo anaranjado.
- La época de floración y cosecha es otra característica que se usa para diferenciar los tipos que existen.
- La tolerancia natural al mildiú polvoriento las clasifica como susceptibles o tolerantes.
- La dehiscencia es una característica que permite agrupar los tipos de plantas en dehiscentes o indehiscentes.

2.4.4. Morfología

Las plántulas de achiote crecen rápidamente, a los 4 meses alcanzan una talla entre 15 cm y 20 cm. Los árboles son de lento crecimiento. Es un árbol que llega a vivir hasta 50 años en condiciones naturales y solo 30 años en plantaciones; árbol perene de rápido desarrollo que puede alcanzar alturas que van desde los 3.0 m hasta los 6.5 m, en su hábitat natural; su aspecto es robusto, con flores muy vistosas de color blancas o rosadas según sea la variedad.

Figura 1. **Árbol de achiote (*Bixa orellana* L.)**



Fuente: elaboración propia.

2.4.4.1. Tronco

Cuando se le deja en libre crecimiento normalmente desarrollan ramas leñosas de 2 a 6 ramas. El tronco alcanza un diámetro que va desde 10 cm a 30 cm a una altura de 10 m sobre la superficie del suelo. Las ramas normalmente son delgadas y leñosas. La corteza café claro, algo fisurada, se desprende fácilmente en largas tiras. Interna amarilla o amarillo-anaranjada, con savia anaranjada, pegajosa, ligeramente amarga. Bajo la corteza empieza a fluir el colorante hacia las semillas.

2.4.4.2. Inflorescencias

Consiste de flores grandes y vistosas, compuestas, actinomorfas, de sexualidad hermafrodita, dispuestas en corimbos terminales, estambres indefinidos y libres en la base; filamentos filiformes de color blanco, amarillo y violeta. El ovario es elevado por un ginóforo y adopta la apariencia de ser súpero, con rudimentos seminales que varían de 10 a 60 por cápsula, estilo filiforme, estigma bilobulado. Cada rama suele tener de 2 a 4 flores de 4 cm a 5,5 cm de diámetro; cáliz de 5 sépalos y un anillo de glándulas debajo de este, verde castaño, que en ocasiones se caen; de prefloración imbricada, corola de 5 pétalos anchos y redondeados. La época de floración y madurez del achiote varía según la latitud y según la temperatura de la zona, siendo más temprana en las regiones cálidas y húmedas. En Centroamérica generalmente hay plantas de achiote que inician su floración entre julio y septiembre con un máximo de floración en agosto. La floración dura entre 3 y 4 meses y no es sincronizada.

Figura 2. Inflorescencias de achiote (*Bixa orellana* L.)



Fuente: elaboración propia.

2.4.4.3. Polinización

En el cultivo del achiote la polinización es entomófila, proceso realizado por avispas, hormigas, abejas y mariposas, los dos últimos, los principales insectos polinizadores en poblaciones naturales; sus flores se abren en la mañana entre las 4:00 y 5:00 am y el polen permanece viable durante 10 a 11 horas, es común observar muchas abejas que se empujan y pelean para recolectar el polen. Además, el achiote florece en la época lluviosa, una época en que existe mucha escasez de polen y es frecuente en esta época que abejas de una colmena ataquen a otra para robarles alimentos.

2.4.4.4. Frutos y semillas

El fruto es una cápsula. En su forma pueden ser redondas, acorazonadas, lancetadas y oblongas. Está cubierto de muchos apéndices o setas, que pueden ser largos, medianos y cortos, aunque existen cultivares que no los tienen. También pueden ser abundantes y ralos. La coloración de la cápsula difiere según sea la variedad: las hay verdes, rojas, ocre y amarillas. Algunas variedades poseen dehiscencia y otras no. Esta puede ser completa e incompleta. La cápsula generalmente está compuesta de 2 lóbulos o segmentos, aunque debido a cruzamientos naturales hay frutos o cápsulas de tres segmentos con mayor número de semillas, lo cual aumentaría el rendimiento de llegar a tener una variedad que tuviera esta característica. El fruto contiene un número variable de semillas, entre 20 y 55, la cual parece estar ligada a la polinización entomófila o por insectos. El fruto en el exterior posee unas protuberancias de forma triangular y en el interior posee una placenta donde se aloja la semilla. La placenta es de color amarillo verdoso si la cápsula aún no ha madurado y cuando alcanza la madurez y se seca, el color cambia a café claro con una mancha de forma triangular color café oscuro en la

parte central. En algunos tipos de achiote la placenta es de color café oscuro. La semilla es muy pequeña de 3,5 mm a 5 mm de longitud y está situada dentro de una placenta, siendo sostenida por un pedúnculo. La semilla tiene forma piramidal y está unida a la placenta por la parte más puntiaguda. En la parte más gruesa tienen una mancha circular, color negro. La semilla a su vez tiene una hendidura o fisura en un solo lado, que va desde la parte más puntiaguda de la semilla hasta la mancha circular en la parte más gruesa.

Figura 3. Frutos de achiote (*Bixa orellana* L.)



Fuente: elaboración propia.

2.4.4.5. Hojas

Hojas simples, grande de 6 cm a 19 cm de largo por 6 cm a 11 cm de ancho, alternas con peciolo corto, cordiforme o acorazonado, tienen un ápice acuminado y un borde cordado, son brillantes de color verde oscuro y variables en su tamaño, cuando maduran el envés es de color plateado y se vuelven coriáceas y ásperas.

2.4.4.6. Raíces

La raíz del achiote es pivotante y bien desarrollada, por lo cual puede penetrar a profundidad si el suelo es pobre o si es apropiado. Son además leñosas, cilíndricas y ramificadas.

2.4.4.7. Requerimientos y condiciones climáticas

El árbol de achiote se desarrolla excelentemente en las zonas tropicales de la costa del Pacífico, con estación seca de 4 a 7 meses de duración. Se encuentra también en algunas partes de la Costa Atlántica, donde hay períodos con exceso de lluvias. La temperatura ideal para la producción de achiote se encuentra entre los 20 °C y 38 °C. La temperatura media anual es de 27 °C.

El tiempo luz que requiere consta de 10 h diarias, distribuidas uniformemente sobre su copa, con el objetivo de una mayor cantidad de fructificación, en la etapa de floración. Incluso puede crecer y producir bajo condiciones de sombra moderada. La humedad relativa óptima para este cultivo varía entre el 60 % y el 80 %, si se sobrepasa, es propicia para el desarrollo de hongos especialmente el mildiu polvoriento y la antracnosis. También para la presencia excesiva de insectos dañinos.

La altura para esta especie oscila entre los 300 y 600 msnm. A mayor altitud el achiote crece lentamente, podría sufrir daños por frío, se desarrolla con limitaciones en la producción y tiene mayor incidencia de enfermedades.

2.4.5. Propagación

El achiote es un cultivo de fácil propagación ya que puede efectuarse por medio de semilla, acodo, injerto, estaca y por cortes de la raíz, y utilizando la técnica más moderna también puede propagarse por cultivo de tejidos.

2.4.5.1. Reproducción sexual por semilla

Esta es la forma más comúnmente utilizada y es necesario hacer una buena selección de la semilla para garantizar una buena plantación y establecer un vivero. La mayoría de los árboles de achiote del mundo han sido sembrados mediante semilla y debido a que el achiote es un árbol de polinización abierta, la siembra mediante semilla produce una amplia variación en las plantaciones.

Sin embargo, puede seleccionarse una buena semilla de árboles que sean buenos productores y que muestren tolerancia o resistencia natural a la enfermedad mildiú polvoriento, causado por el hongo *Oidium bixae* Viegas.

La desventaja de este método de siembra es que debido a la polinización cruzada del achiote, produce una gran variabilidad de individuos y no se puede mantener la uniformidad y la calidad de los frutos. Para la obtención de las semillas se deben seleccionar los árboles más vigorosos y bien formados, de buen rendimiento, escogiendo las mejores cápsulas. Las semillas tienen un alto poder germinativo.

El sistema de propagación por semillas se puede efectuar de tres formas:

- Siembra directa: pueden colocarse entre tres o cuatro semillas por hoyo y posteriormente eliminar las plantitas más débiles, dejando solamente las mejores. Cuando las plantas están pequeñas se les debe proporcionar un poco de sombra para luego, cuando alcancen unos 30 cm de altura, dejarlas a pleno sol.
- Siembra en almácigo: el semillero debe hacerse en un lugar sombreado o confeccionar una enramada, ligeramente elevada, de 1 cm a 1,5 m de ancho. Es conveniente llevar a cabo una desinfección previa del suelo con productos como bromuro de metilo. Las semillas se deben distribuir en línea a una profundidad de 2 cm y a una distancia de 10 cm entre sí. Cuando las semillas han germinado y se encuentran en estado de plántula, se ralean; cuando tengan entre 15 cm o 20 cm de altura se trasplantan al campo definitivo.
- Siembra en bolsas: antes de sembrar la semilla, es necesario ponerla en una solución de fungicida, para evitar enfermedades con hongos de los géneros fusarium, phythophthora, pythium y rizocthonia que producen el mal del talluelo. Toda la semilla que flote debe descartarse porque está mal formada, es bofa y si germina produce planta raquíca.

Después de ponerla en esta solución es necesario ponerla a secar a temperatura ambiente en la sombra, luego se siembra. La razón por la que no se siembra húmeda es porque se pega en las manos y se pierde demasiado tiempo, por lo que es mejor esperar a que se seque. Si dispone de un ventilador puede utilizarse para quitar el exceso de humedad. La semilla se siembra a un centímetro de profundidad. Si la siembra a mayor profundidad la plántula no

alcanza a emerger y se pudre. Es necesario mantener la humedad constante sin encharcar la bolsa y no dejar muy húmeda la tierra porque la semilla se pudre. Y si se riega en forma irregular, días sí y días no, se corre el riesgo de que la semilla ya turgente o hinchada por la humedad sufra estrés, pierda la capacidad de germinar y se pudra.

2.4.5.2. Reproducción asexual

Para mantener la pureza genética completa se utilizan otras formas de multiplicación. La propagación mediante injertos acodos, estacas o esquejes, cortes de la raíz y la biotecnología son técnicas que puede ayudar a producir plantas de excelente calidad. Estos diferentes métodos permiten obtener clones. El método efectivo actual para la propagación vegetativa es el injerto de escudete. Mediante él se mantienen los beneficios mayores de la propagación vegetativa al conservar las características deseables de una planta de achiote seleccionada. Entre las características deseables se encuentra el contenido de bixina, el número de semillas por cápsula, el número de cápsulas por racimo, el número de racimos por árbol y la tolerancia al mildiú polvoriento.

Si la plantación de achiote ha sido debidamente cuidada la producción de semilla empieza a los 18 o 20 meses, pero normalmente comienza a los 4 años. La producción fuerte se mantiene por 10 años y puede continuar hasta 20 los 50 años, dándole un buen manejo. El rendimiento anual promedio de un árbol adulto de cinco años es de 2,33 Kg de semilla. Unas 1 111 plantas por hectárea rinden en promedio 2 597 Kg. de semilla en oro por hectárea.

2.4.6. Cosecha

Según la variedad y el lugar donde se encuentren sembrada, la primera cosecha se produce a los 20 meses la misma que es escasa, la producción comercial se obtiene pasado los 3 años. Se han identificado variedades que producen una vez al año y otra que producen dos veces al año. La selección de variedades a sembrar dependerá de la preferencia del productor. Las cápsulas se deben cosechar cuando alcancen su madurez comercial, pues ese es el estado en el que la concentración de bixina es mayor. Según la variedad, el estado de madurez comercial se alcanza aproximadamente de 2 a 3 meses después de haber ocurrido la floración. Un buen índice para determinar ese estado es palpar las cápsulas, cuando estas resulten duras al tacto se pueden cosechar con seguridad. Existen algunas variedades que cambian de color cuando alcanzan la madurez comercial lo que constituye un buen indicador para cosechar. La cosecha se debe hacer con la ayuda de tijeras podadoras o de machetes, evitando desgarraduras en las ramas. Se deben cosechar las panículas y no las cápsulas individualmente.

2.4.6.1. Manejo postcosecha

El manejo de poscosecha de las cápsulas y de las semillas es de fundamental importancia para mantener la integridad de la bixina. De nada sirve sembrar en el campo cultivares altos en bixina, si el manejo postcosecha no es el apropiado. Un manejo postcosecha inadecuado puede dar el traste con todo el trabajo realizado, ya que las mayores pérdidas de bixina se dan en esa etapa. De ahí la importancia de seguir los siguientes consejos:

- Se deben cosechar únicamente cápsulas que estén en su punto adecuado de madurez. Las cápsulas inmaduras (muy tiernas) y las que están secas (muy viejas) no tienen los contenidos de bixina adecuadas.
- Como la maduración de las cápsulas ocurre gradualmente aun en una misma panícula (racimo) es conveniente esperar a que la mayoría alcance la madurez en un tiempo determinado. Es preferente dejar que algunas cápsulas maduren antes y no cosecharlas a fin de permitir que la mayor parte alcance su madurez y su mayor concentración de colorante.
- Las cápsulas secas y abiertas no se deben cosechar pues la bixina se descompone por los rayos solares y por el ataque de plagas, especialmente hongos e insectos.
- Las cápsulas maduras cosechadas pueden secarse al aire libre, bajo el sol o bajo sombra según se prefiera. Cuando el secado se realice bajo el sol, se debe tener cuidado que las cápsulas no se abran y se expongan las semillas a la acción de los rayos solares.
- Por ningún motivo se deben secar las semillas bajo el sol, pues esta es una de las principales causas de pérdida de colorante.
- No se deben mezclar semillas de cultivares altos en bixina con la de cultivares bajos en bixina. Es mejor hacer las mezclas únicamente de cultivares altos en colorante.
- Solo se debe almacenar semilla seca con contenidos de agua inferiores a 12 % a fin de evitar el ataque de hongos.

2.4.7. Usos del achiote

Habitualmente el achiote tiene una amplia variedad de usos, que pueden beneficiar de manera directa ya sea en medicina, en la industria, en la gastronomía, maderables, entre otros. Las partes del árbol que generalmente se usan son las siguientes: ramas, fruto, semillas, madera, corteza, hojas, raíz y vástagos.

- Las hojas y las ramillas jóvenes se cocinan en agua. Una vez que el agua se enfría, se cuele y se hacen baños en la cabeza para contrarrestar la caída del cabello, estimula su crecimiento y combatir la caspa. A veces el cocimiento se puede hacer agregando conos de ciprés o ramitas de romero a fin de hacer más efectivo el tratamiento.
- Las hojas se cocinan en agua se cueles y cuando el agua este tibia, se hacen gárgaras para combatir males de la garganta.
- Las hojas majadas y humedecidas con aceite se emplean para aliviar dolores de cabeza.
- La raíz se cocina en agua, se cuele y cuando el agua esté tibia, se toma para contrarrestar problemas asmáticos.
- Las semillas mezcladas con aceite de oliva se ponen a hervir a baño María, y una vez fría la mezcla, se utiliza para curar quemaduras y evitar las ampollas que estas producen.
- La pasta de achiote mezclada con grasa vegetal, sirve para curar las quemaduras.

- La pasta de achiote mezclada con aceite de oliva y colocada en la parte afectada sirve para combatir las varices.
- La pasta de achiote hervida en agua se toma para bajar la fiebre, para combatir las diarreas y los problemas en los riñones.
- El aceite de las semillas se usa en productos para el cuidado del cuerpo como son las cremas, lociones y jabones para el cabello.
- De la porción carnosa (arilo rojo-naranja) que envuelve a la semilla se extrae un colorante apreciado industrialmente para dar color a productos alimenticios: quesos, mantequilla, aceites, ceras, barnices, pinturas, cosméticos y fibras textiles de seda y algodón.
- En Centroamérica se usa como colorante y condimento diario en las comidas tales como el arroz preparado de varias formas, en caldos, consomés o sopas, recaudos y en la preparación de carnes y embutidos. En la siguiente figura se presentan algunos de los productos que se elaboran industrialmente para el uso culinario y en la medicina naturista.

2.5. Composición química de la semilla de achiote

Tabla II. **Cubierta exterior**

Celulosa	40 % - 45 %
Humedad	20 % - 25 %
Pigmentos	4,0 % - 7,8 %
Azucares	3,5 % - 5,2 %
Subtotal	68 %

Fuente: *Diseño de una planta piloto para la producción de bixina a partir de achiote.*

<http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6932/2/112754.pdf>. Consulta: 4 de abril de 2015.

Tabla III. **Cutícula**

Celulosa v taninos	1.0 % - 1.65 % de reserva
Aceite esencial	0.05 %
Subtotal	22 %

Fuente: *Diseño de una planta piloto para la producción de bixina a partir de achiote.*

<http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6932/2/112754.pdf>. Consulta: 4 de abril de 2015.

Tabla IV. **Semilla interior**

Piel	1,8 %
Aceites esenciales	0.1 % - 1.1 %
Sustancia cerosa	3.0 %
Alcaloides	Trazas
subtotal	10 %

Fuente: *Diseño de una planta piloto para la producción de bixina a partir de achiote.*

<http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6932/2/112754.pdf>. Consulta: 4 de abril de 2015.

2.6. **Farmacología**

Los estudios farmacológicos son relativamente escasos ya que los colorantes utilizados en la industria alimenticia son claramente inertes biológicamente, no tienen olor ni sabor y se utilizan en una proporción tan pequeña que su acción farmacológica es poco activa. Sin embargo, su uso como en la medicina tradicional de diversos grupos humanos ha atraído alguna atención de estudios.

Se ha encontrado que los extractos alcohólicos del fruto son activos contra *Staphilococcus aureus* y contra *Escherichia coli*, pero falta por comprobar su acción total.

2.7. Toxicología

La comisión del Codex de la FAO (1974) indica que para los extractos de achiote la ingestión diaria admisible (IDA), es de 0,01 a 1,25 mg por kg de peso corporal, expresado en bixina. Asimismo, los estudios realizados hasta el momento no han reportado toxicidad en las dosis utilizadas en el uso popular para consumo humano tanto de semillas como de resto de la planta.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Localización

Las instalaciones en las cuales se realizó la fase experimental del presente estudio, tanto extracción del colorante como caracterización fisicoquímica del mismo, se detallan a continuación.

- Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales (LIEXVE), Sección de Química Industrial, Centro de Investigaciones de Ingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química, LIQA, Universidad del Valle de Guatemala.

3.2. Variables

Es un símbolo que puede tomar un valor numérico en una expresión matemática en general.

3.2.1. Variables independientes

Se define como la variable que puede cambiar su valor, sin que se vea afectado por alguna otra (s) variable (s).

Tabla V. **Variables independientes para el proceso de extracción del colorante mediante álcali acuoso**

Núm.	Variable	Dimensional	Descripción
1	Tiempo de extracción	minutos	El tiempo de extracción depende del tratamiento con valores entre 30 y 90 minutos
2	Tamaño de lote	kg	El tamaño del lote fue de 0,200 kg
3	pH	Adimensional	Depende del tratamiento y de la cantidad de ácido utilizado entre valores de 2 a 4

Fuente: elaboración propia.

3.2.2. Variables dependientes

Es la variable, cuyo valor depende del valor que tome la variable independiente de dicha función.

Tabla VI. **Variables dependientes para el proceso de extracción de colorante mediante álcali acuoso**

Núm.	Variable	Dimensional	Descripción
1	% rendimiento	%	Depende del lote utilizado para la extracción
2	Cantidad de colorante extraído	g	Depende del lote utilizado para la extracción
3	Componentes activos del colorante	mg/g	Depende del lote utilizado para la extracción
4	Densidad	g/mL	Depende de la cantidad de humedad presente
5	Porosidad	%	Depende de la cantidad de humedad presente

Fuente: elaboración propia

3.2.3. Variables de respuesta

En función de los tratamientos que se llevaron a cabo para la realización de la fase experimental, se determinó que la variable de respuesta para el proceso de extracción a nivel laboratorio del extracto colorante de achiote fue el rendimiento extractivo, en función del tiempo de maceración dinámica (30, 60 y 90 minutos); y en función del pH de precipitación del colorante (2, 3 y 4). En cuanto a la caracterización fisicoquímica, la variable de respuesta fue la cuantificación del contenido de bixina presente en el extracto colorante de achiote.

3.3. Delimitación del campo de estudio

Se define de acuerdo a la rama de estudio a la cual pertenece el tema del trabajo de investigación, proceso de obtención y evaluación de las variables descritas anteriormente, para poder tomar una decisión.

3.3.1. Obtención de la materia prima

La materia prima se obtuvo de las comunidades pertenecientes al municipio de Cahabón y Lanquín del departamento de Alta Verapaz

3.3.2. Extracción del colorante natural

Se utilizó el arilo de la semilla del fruto seco del achiote, utilizando el método de extracción por medio de un álcali acuoso. Dicho procedimiento se realizó en Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales, LIEXVE, del Centro de Investigaciones de Ingeniería, ciudad universitaria zona 12.

3.3.3. Método de extracción del colorante natural

Se utilizó el método de extracción por lixiviación por medio de maceración dinámica con álcali acuoso, ya que de acuerdo a las referencias es el que proporciona los mayores rendimientos. Dentro de las observaciones destacan.

- Se procesaron semillas de achiote lo más frescas posibles postcosecha, con humedad menor al 10 %.
- En el proceso de secado se trabajó a temperatura por debajo de los 70 °C para evitar la degradación de la bixina.

3.3.4. Análisis cuantitativo del extracto colorante

La cuantificación del contenido de bixina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se realizó en el Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química, LIQA, Universidad del Valle de Guatemala; la determinación de solubilidad del extracto se realizó en el Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales (LIEXVE), Sección de Química Industrial, Centro de Investigaciones de Ingeniería.

3.3.5. Variables del proceso

Son las variables que pueden ser medibles y controladas dentro del proceso.

3.3.5.1. Concentración del solvente

Para evitar la degradación del colorante se utilizó baja concentración del solvente, este parámetro es trabajado como variable del proceso ya que de ésta

depende la extracción del colorante del arilo de las semillas, ya que en estudios anteriores han trabajado en un rango de 0,5 % a 2 % (peso/volumen).

3.3.5.2. Relación cantidad de semilla y volumen de solvente

Esta variable indica cual fue el volumen adecuado de solvente para el peso de semilla que se trabajó. El tamaño de lote fijo quedó limitado a la capacidad del extractor con una relación masa de materia prima-solvente de 1:3.

3.3.5.3. Tiempo de agitación

El tiempo de agitación se consideró una variable de proceso porque era necesario determinar cuánto tiempo permanecía en contacto y con agitación las semillas con el colorante para lograr retirar la cantidad máxima de colorante sin que existieran demasiadas impurezas. Para el experimento se trabajaron tres tiempos de extracción de 30, 60 y 90 minutos.

3.3.5.4. Velocidad de agitación

Es una variable determinante del rendimiento a bajas velocidades el rendimiento es mayor. Pero para condiciones de laboratorio y de equipo se trabajó a una velocidad de agitación fija de 140 rpm.

3.3.5.5. pH

Para poder obtener el colorante en polvo se precipitó utilizando ácido sulfúrico antes de filtrar. El intervalo de pH en donde se obtiene un mayor

rendimiento en el precipitado está entre 2-2,5. Para el experimento se trabajó con pH 2, 3 y 4 regulado con ácido sulfúrico a temperatura ambiente.

3.3.5.6. Temperatura de secado

El colorante del achiote, la bixina es termolábil lo que implica que se degrada a temperaturas mayores a 70 °C.

3.4. Recursos humanos

- Investigador: P. Agr. Edy Boanerges Payes Aguirre.
- Asesores: Inga. Telma Maricela Cano Morales e Ing. Mario José Mérida Meré.

3.5. Recursos materiales disponibles

En la parte experimental del trabajo de investigación, se utilizaron diversas herramientas, las cuales se pueden clasificar en equipo y material de vidrio denominado cristalería.

Tabla VII. **Materia prima y reactivos**

Materia prima	Semillas de achiote
Reactivos	Hidróxido de potasio
	Ácido sulfúrico
	Agua desmineralizada

Fuente: elaboración propia.

Tabla VIII. **Cristalería, equipo y otros**

Cristalería	Pipetas
	Balones
	Erlenmeyer
	Varillas de agitación
	Embudo
	Probetas graduadas
	Magnetos
	Frascos ámbar
Equipo	Secador de bandejas PREMLAB
	Plancha de calentamiento VWR
	Equipo de vacío
	Refrigeradora
	Espectrofotómetro
Otros	Papel aluminio
	Soportes universales
	Mangueras
	Papel parafilm
	Papel mayordomo

Fuente: elaboración propia

3.6. **Técnica cuantitativa**

En el presente estudio de investigación se utilizaron las siguientes técnicas cuantitativas para poder determinar las propiedades fisicoquímicas del extracto colorante: determinación del porcentaje extractivo del colorante, pruebas de solubilidad y cuantificación de bixina presente en el extracto mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.

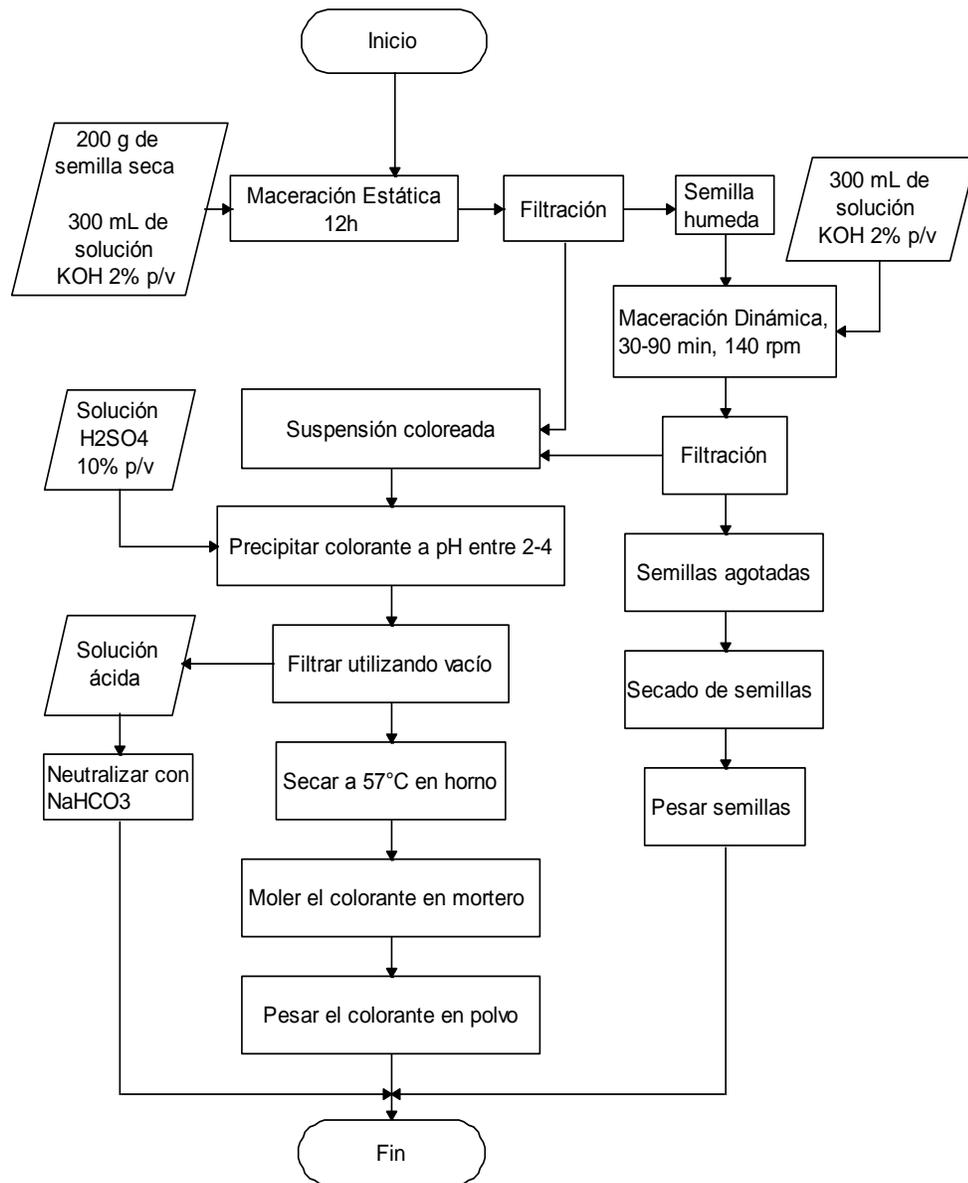
A continuación se presenta el procedimiento utilizado en la fase experimental, de acuerdo a la técnica cuantitativa utilizada.

3.6.1. Extracción del colorante natural del arilo de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L.), utilizando la técnica lixiviación con álcali acuoso a escala laboratorio

- Preparar la semilla realizando una inspección previa para eliminar cualquier hoja, tallo o impureza.
- Encender la balanza.
- Medir la masa de 100 g de semillas.
- Colocar la semilla en un *beacker* de 500 mL.
- Preparar el álcali acuoso de KOH al 2 %.
- Medir 150 mL de solución de álcali acuoso.
- Agregar el álcali directamente sobre el *beacker* que contiene la semilla.
- Iniciar con la toma de tiempo de extracción, maceración estática (12 h).
- Filtrar la solución para separar las semillas.
- Colocar las semillas después de la filtración en un *beacker* de 500mL
- Agregar 150 mL de solución de álcali.
- Colocar agitador magnético y colocar el *beacker* en plancha con agitador.
- Iniciar con la toma de tiempo de extracción con maceración dinámica (diferentes tiempo según el tratamiento 30, 60 y 90 min).
- Filtrar la solución de las semillas agotas.
- Mezclar la solución con colorante de la maceración estática de 12 h con la solución con colorante de la maceración dinámica.
- Mediante la adición de solución de ácido sulfúrico H₂SO₄ 10 % regular el pH de la solución hasta llegar a 2.
- Esperar a que el colorante precipite, y luego filtrar el precipitado.
- Colocar el colorante filtrado en forma de pasta en el secador de bandejas y someter a una temperatura de 57 °C.

- Luego del secado, moler la pasta seca en un mortero y empaclar para su posterior análisis.

Figura 4. **Diagrama de extracción de colorante de achiote a nivel laboratorio**



Fuente: elaboración propia

3.6.2. Cálculo del rendimiento extractivo del colorante natural de achiote (*Bixa orellana* L.)

- Escribir en la bitácora el peso inicial de la materia prima.
- Tarar un *beacker* de 50 mL.
- Colocar el colorante extraído de la muestra en el *beacker* y pesar en balanza analítica.
- El rendimiento se determina como la razón del peso de colorante en función de la materia prima inicial. Utilizar la siguiente ecuación.

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{W_f - W_t}{W_{mp}} \quad [\text{Ec. 1}]$$

Donde

%=rendimiento: porcentaje de rendimiento del colorante natural

Wf=peso final del *beacker* con el colorante natural (g)

Wt=tara del *beacker* vacío (g)

Wmp=peso de la materia prima (g)

3.6.3. Determinación de los componentes activos del extracto colorante seco de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L.) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia

- Aperturar los recipientes de los líquidos indicados para realizar el ensayo.
- Encender el equipo y *software*.
- Aperturar los manómetros de presión.
- Estabilizar por un tiempo de 20 minutos a 30 minutos.
- Conectar o comprobar los detectores.

- Colocar la columna adecuada para el ensayo C-18, si es que esta no estaba ya colocada.
- Seleccionar la temperatura de columna.
- Comprobar el funcionamiento del circuito neumático.
- Estabilizar el sistema durante 15 min.
- Bombear 200 ml de agua de calidad de HPLC con caudal de 5 ml/min.
- Hacer pasar de 30 a 50 ml de acetonitrilo o disolvente apropiado.
- Comprobar la presión en la columna.
- Inyectar un patrón de calibración, calcular el área y altura de pico y compararlo con los obtenidos en curva de calibración.

3.6.4. Determinación experimental de la densidad del extracto colorante de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L.)

- Limpiar la probeta y secar cuidadosamente.
- Tarar y anotar masa de la probeta de 10 mL.
- Agregar colorante hasta tener un volumen de 2 mL en la probeta.
- Tomar la masa nuevamente de la probeta con el colorante contenido en la misma.
- Agregar 2 mL de agua destilada y anotar el volumen final.
- La ecuación que se utilizará para determinar la densidad aparente y densidad real del extracto colorante es:

$$\rho = m/v$$

[Ec. 2]

Donde

ρ = densidad del extracto colorante (g/cm³)

m= masa del extracto colorante (g)

v=volumen de extracto colorante (cm³)

3.6.5. Determinación del espacio poroso y porosidad el extracto colorante de achiote (*Bixa orellana L.*), a nivel laboratorio.

- Limpiar la probeta y secar cuidadosamente.
- Tarar y anotar masa de la probeta de 10 mL.
- Agregar colorante hasta tener un volumen de 2 mL en la probeta.
- Tomar la masa nuevamente de la probeta con el colorante contenido en la misma.
- Agregar 2 mL de agua destilada y anotar el volumen final.
- Calcular la diferencia entre el volumen final y el volumen de agua agregado.
- Se determina la densidad aparente y densidad real del extracto colorante utilizando la siguiente ecuación:

$$\rho = m/v \quad [\text{Ec. 2}]$$

Donde

ρ = densidad del extracto colorante (g/cm³)

m = masa del extracto colorante (g)

v = volumen de extracto colorante (cm³)

- La ecuación que se utilizará para determinar porosidad del extracto colorante es:

$$\varepsilon = (1 - \rho_a / \rho_R) * 100 \quad [\text{Ec. 3}]$$

Donde

ε = porosidad del colorante en %

ρ_a = densidad aparente del colorante en kg/m^3

ρ_R = densidad real del colorante en kg/m^3

3.7. Recolección y ordenamiento de la información

Teniendo definidas las variables dependientes: cantidad de colorante, porcentaje de rendimiento, componentes activos, densidad, porosidad; como las independientes: tiempo de extracción, pH de precipitación, tamaño del lote del estudio de investigación; se llevó a cabo la realización de la parte experimental así como la recolección y ordenamiento de dicha información.

Para el extracto colorante natural se realizaron 3 tratamientos de extracción para poder determinar el porcentaje de rendimiento extractivo en función del tiempo de extracción; se realizaron 3 tratamientos de extracción para determinar el porcentaje de rendimiento extractivo en función del pH de precipitación; a cada tratamiento se le realizó 3 réplicas obteniendo un total de 27 tratamientos. La recolección de datos se realizó según el diseño experimental bifactorial con arreglo combinatorio completamente al azar.

Para el análisis cromatográfico de la cuantificación del contenido de bixina en las extracciones de colorante natural se tomó en cuenta de acuerdo al arreglo bifactorial tomando una muestra representativa del arreglo el cual consistió en tomar la primera replica de dicho arreglo para analizar un total de 9 extracciones.

El ordenamiento de los resultados obtenidos se realizó de la siguiente manera:

3.7.1. Diseño experimental de tratamientos

De acuerdo a los incisos anteriores para la evaluación estadística se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo combinatorio para un experimento bifactorial evaluando el efecto que tiene la variación del tiempo de extracción y el pH del extracto colorante sobre el rendimiento obtenido del colorante del achiote.

3.7.1.1. Factor A: tiempo de extracción

Niveles del factor A: se tomarán tres tiempos de extracción.

- t_1 (30 min)
- t_2 (60 min)
- t_3 (90 min)

3.7.1.2. Factor B: pH de la solución para obtener el precipitado del colorante

Niveles del factor B: se tomaron tres valores de pH.

- pH_1 (2)
- pH_2 (3)
- pH_3 (4)

3.7.1.3. Repeticiones

Se trabajó con 3 repeticiones, porque es el valor mínimo que se puede utilizar en la toma de datos, para diferenciar el resultado promedio en las simulaciones del experimento.

3.7.1.4. Numero de combinaciones para la simulación del experimento

$$N = a * b * r \quad [\text{Ec. 4}]$$

Donde

a = número de niveles del factor A

b = número de niveles del factor B

r = número de repeticiones por cada nivel

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

N= 27 combinaciones

Tabla IX. **Resumen del diseño experimental de tratamientos**

Factores	A: Tiempo de extracción B: pH de precipitado	Número de factores	2
Niveles	A: tiempos B: pH	Número de niveles	A: 3 B: 3
Número de tratamientos	9		
Número de repeticiones	3		

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Combinaciones para el 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 XI. **Arreglo combinatorio para el diseño experimental completamente al azar**

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.

Tabla XII. Rendimiento extractivo del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (*Bixa orellana L.*) a nivel laboratorio

Núm.	Experimento	Aleatorio	Peso materia prima (g)	Masa de colorante (g)	Rendimiento (%)
1	25	t3.pH3.R1	200,0019	13,4550	6,7274
2	4	t1.pH2.R1	200,0201	10,9500	5,4695
3	26	t3.pH3.R2	200,0125	10,9548	5,4770
4	24	t3.pH2.R3	200,0022	9,9131	4,9556
5	3	t1.pH1.R3	200,0017	8,5770	4,2884
6	10	t2.pH1.R1	200,0012	8,8035	4,4017
7	22	t3.pH2.R1	200,0041	11,9021	5,9509
8	1	t1.pH1.R1	200,0202	12,2015	6,1001
9	21	t3.pH1.R3	200,0306	11,6777	5,8379
10	5	t1.pH2.R2	200,0340	13,4895	6,7436
11	9	t1.pH3.R3	200,0071	11,9619	5,9801
12	8	t1.pH3.R2	200,0082	13,6334	6,8164
13	17	t2.pH3.R2	200,0056	12,7259	6,3627
14	12	t2.pH1.R3	200,0073	13,4195	6,7095
15	13	t2.pH2.R1	200,0067	12,4908	6,2451
16	7	t1.pH3.R1	200,0098	11,5490	5,7742
17	6	t1.pH2.R3	200,0031	11,8956	5,9477
18	19	t3.pH1.R1	200,0083	12,8780	6,4387
19	14	t2.pH2.R2	200,0023	13,0930	6,5464
20	27	t3.pH3.R3	200,0075	13,0879	6,5437
21	15	t2.pH2.R3	200,0087	13,7368	6,8681
22	11	t2.pH1.R2	200,0011	13,4463	6,7231
23	16	t2.pH3.R1	200,0056	13,6241	6,8101
24	18	t2.pH3.R3	200,0048	13,2116	6,6056
25	23	t3.pH2.R2	200,0029	13,6044	6,8021
26	20	t3.pH1.R2	200,0067	13,6646	6,8300
27	2	t1.pH1.R2	200,0033	13,2572	6,6284

Fuente: Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.

Tabla XIII. **Datos para la determinación de la densidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (*Bixa orellana L.*), a nivel laboratorio**

Variable	Núm.	Masa colorante (g)	Volumen colorante (mL)	Volumen agua (mL)	Volumen total (mL)
t1.pH1	1	0,5829	1,00	2,00	2,80
	2	0,5583	1,00	2,00	2,70
	3	0,4916	1,00	2,00	3,00
t1.pH2	1	1,1482	2,00	2,00	3,90
	2	1,0453	2,00	2,00	3,40
	3	0,9940	2,00	2,00	3,40
t1.pH3	1	1,0179	2,00	2,00	3,40
	2	0,8757	2,00	2,00	3,90
	3	1,0387	2,00	2,00	3,40
t2.pH1	1	0,9662	2,00	2,00	3,80
	2	1,0997	2,00	2,00	3,60
	3	1,0616	2,00	2,00	3,60
t2.pH2	1	1,0755	2,00	2,00	3,80
	2	1,1633	2,00	2,00	3,60
	3	1,0722	2,00	2,00	3,40
t2.pH3	1	1,1139	2,00	2,00	3,40
	2	1,0226	2,00	2,00	3,80
	3	1,1266	2,00	2,00	3,20
t3.pH1	1	1,1294	2,00	2,00	3,40
	2	1,1632	2,00	2,00	3,80
	3	1,2190	2,00	2,00	3,60
t3.pH2	1	1,0512	2,00	2,00	3,90
	2	1,1314	2,00	2,00	3,20
	3	1,1474	2,00	2,00	3,90
t3.pH3	1	1,2194	2,00	2,00	3,60
	2	1,0794	2,00	2,00	3,80
	3	1,0820	2,00	2,00	3,80

Fuente: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Tabla XIV. **Solubilidad del extracto colorante obtenido del arilo de la semilla de achiote (*Bixa orellana L.*), a nivel laboratorio. Utilizando como solvente etanol**

Núm.	Cantidad	Concentración	Volumen
1	0.001 g	10 mg/L	100 mL
2	0.002 g	20 mg/L	100 mL
3	0.004 g	40 mg/L	100 mL
4	0.008 g	80 mg/L	100 mL
5	0.0140 g	140 mg/L	100 mL
6	0.0200 g	200 mg/L	100 mL
7	0.0300 g	300 mg/L	100 mL
8	0.0400 g	400 mg/L	100 mL
9	0.1000 g	1000 mg/L	100 mL

Fuente: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Tabla XV. **Datos de la cuantificación de bixina del extracto colorante seco de la semilla de achiote (*Bixa orellana L.*) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia**

Núm.	Tratamiento	Tiempo de Retención (min)	Área (mAU*s)	Cantidad/Área	Cantidad (mg/mL)
1	t1.pH1	1,2450	573,9276	1,21124E-04	6,95162E-02
4	t1.pH2	1,2470	671,3107	1,21124E-04	8,13116E-02
7	t1.pH3	1,2540	875,7653	1,21124E-04	1,07076E-01
10	t2.pH1	1,2490	1188,2823	1,21124E-04	1,43929E-01
13	t2.pH2	1,2520	1179,1014	1,21124E-04	1,42817E-01
16	t2.pH3	1,2490	1310,5344	1,21124E-04	1,58737E-01
19	t3.pH1	1,2490	1416,5827	1,21124E-04	1,71582E-01
22	t3.pH2	1,2440	1345,0337	1,21124E-04	1,62915E-01
25	t3.pH3	1,2480	1338,1178	1,21124E-04	1,62078E-01

Fuente: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

3.8. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

De acuerdo a la recolección y ordenamiento de los resultados obtenidos en la parte experimental, se procedió a tabular y procesar la información obtenida con el fin de ordenar y poder interpretar los valores obtenidos, tanto para la caracterización del extracto colorante como para los datos de rendimiento en función de las variables de estudio.

El ordenamiento de los datos tabulados se realizó de la siguiente manera:

Tabla XVI. **Rendimiento extractivo del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio**

Variable	corrida	Materia Prima (g)	Masa de colorante (g)	Rendimiento (%)
t1.pH1	1	200,0202	12,2015	6,1001
	2	200,0033	13,2572	6,6284
	3	200,0017	8,5770	4,2884
t1.pH2	1	200,0201	10,9500	5,4695
	2	200,0340	13,4895	6,7436
	3	200,0031	11,8956	5,9477
t1.pH3	1	200,0098	11,5490	5,7742
	2	200,0082	13,6334	6,8164
	3	200,0071	11,9619	5,9801
t2.pH1	1	200,0012	8,8035	4,4017
	2	200,0011	13,4463	6,7231
	3	200,0073	13,4195	6,7095
t2.pH2	1	200,0067	12,4908	6,2451
	2	200,0023	13,0930	6,5464
	3	200,0087	13,7368	6,8681
t2.pH3	1	200,0056	13,6241	6,8101
	2	200,0056	12,7259	6,3627
	3	200,0048	13,2116	6,6056
t3.pH1	1	200,0083	12,8780	6,4387
	2	200,0067	13,6646	6,8300
	3	200,0306	11,6777	5,8379
t3.pH2	1	200,0041	11,9021	5,9509
	2	200,0029	13,6044	6,8021
	3	200,0022	9,9131	4,9556

Continuación de la tabla XVI.

t3.pH3	1	200,0019	13,4550	6,7274
	2	200,0125	10,9548	5,4770
	3	200,0075	13,0879	6,5437

Fuente: Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.

Tabla XVII. **Densidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (*Bixa orellana L.*), a nivel laboratorio**

Variable	corrida	Densidad aparente (g/mL)	Densidad real (g/mL)	Densidad aparente (kg/m ³)	densidad real (kg/m ³)
t1.pH1	1	0,5829	0,7286	582,9	728,6
	2	0,5583	0,7976	558,3	797,6
	3	0,4916	0,4916	491,6	491,6
t1.pH2	1	0,5741	0,6043	574,1	604,3
	2	0,5227	0,7466	522,7	746,6
	3	0,4970	0,7100	497,0	710,0
t1.pH3	1	0,5090	0,7271	509,0	727,1
	2	0,4379	0,4609	437,9	460,9
	3	0,5194	0,7419	519,4	741,9
t2.pH1	1	0,4831	0,5368	483,1	536,8
	2	0,5499	0,6873	549,9	687,3
	3	0,5308	0,6635	530,8	663,5
t2.pH2	1	0,5378	0,5975	537,8	597,5
	2	0,5817	0,7271	581,7	727,1
	3	0,5361	0,7659	536,1	765,9
t2.pH3	1	0,5570	0,7956	557,0	795,6
	2	0,5113	0,5681	511,3	568,1
	3	0,5633	0,9388	563,3	938,8
t3.pH1	1	0,5647	0,8067	564,7	806,7
	2	0,5816	0,6462	581,6	646,2
	3	0,6095	0,7619	609,5	761,9
t3.pH2	1	0,5256	0,5533	525,6	553,3
	2	0,5657	0,9428	565,7	942,8
	3	0,5737	0,6039	573,7	603,9
t3.pH3	1	0,6097	0,7621	609,7	762,1
	2	0,5397	0,5997	539,7	599,7
	3	0,5410	0,6011	541,0	601,1

Fuente: Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.

Tabla XVIII. **Determinación de la porosidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L.), a nivel laboratorio**

Variable	corrida	Porosidad ϵ (%)
t1.pH1	1	20,00
	2	30,00
	3	0,00
t1.pH2	1	5,00
	2	30,00
	3	30,00
t1.pH3	1	30,00
	2	5,00
	3	30,00
t2.pH1	1	10,00
	2	20,00
	3	20,00
t2.pH2	1	10,00
	2	20,00
	3	30,00
t2.pH3	1	30,00
	2	10,00
	3	40,00
t3.pH1	1	30,00
	2	10,00
	3	20,00
t3.pH2	1	5,00
	2	40,00
	3	5,00
t3.pH3	1	20,00
	2	10,00
	3	10,00

Fuente: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Tabla XIX. **Cuantificación de bixina del extracto colorante seco de la semilla de achiote (*Bixa orellana L.*) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia**

Núm.	Tratamiento	Tiempo de retención (min)	Cantidad bixina (mg/mL)	Muestra colorante (g/mL)	Bixina/achiote (mg/g)	Contenido de bixina (%)
1	t1.pH1	1.245	0.0695162	0.004	173.79	17.38
4	t1.pH2	1.247	0.0813116	0.004	203.28	20.33
7	t1.pH3	1.254	0.1070760	0.004	267.69	26.77
10	t2.pH1	1.249	0.1439290	0.004	359.82	35.98
13	t2.pH2	1.252	0.1428170	0.004	357.04	35.70
16	t2.pH3	1.249	0.1587370	0.004	396.84	39.68
19	t3.pH1	1.249	0.1715820	0.004	428.95	42.89
22	t3.pH2	1.244	0.1629150	0.004	407.28	40.72
25	t3.pH3	1.248	0.1620780	0.004	405.19	40.52

Fuente: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

3.9. Análisis estadístico

Para la presentación del trabajo de investigación, se realizó un análisis estadístico para determinar la precisión de los resultados en la extracción y evaluación del extracto colorante natural obtenido del arilo de las semillas del achiote. Esto se llevó a cabo mediante el uso de un análisis de varianza (ANDEVA) que determine la significancia de las variables y de sus relaciones.

La diferencia entre las medias muestrales se basa en la variabilidad total del conjunto de datos, conocida como variabilidad entre grupos y la variabilidad debida al azar del muestreo (variabilidad dentro de grupos). La variabilidad se estima en función de la suma de cuadrados.

3.9.1. Supuestos del ANDEVA

Condiciones que deben cumplir los datos para el análisis:

- Términos de error: aleatoria, independientes y normalmente distribuidos.
- La varianza en los tratamientos es homogénea

$$\sigma^2 T_1 = \sigma^2 T_2 = \sigma^2 T_3 = \dots \dots \sigma^2 T_n$$

3.9.2. Proceso de análisis de varianza

- Datos: verificar si los datos son continuos (normales)
- Supuesto: si cumple con ANDEVA
- Hipótesis: verificar el planteamiento de la hipótesis nula y alternativa.

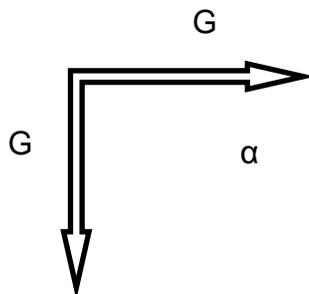
Ho: $t_i = t_i$ = todos los tratamientos son iguales

Hi: $t_i \neq t_i$ para al menos un i (al menos un tratamiento es diferente)

- Estadístico de prueba: se plantea un estadístico de prueba “F”
- Estimar estadístico calculado: “Fc” mediante el cociente entre el valor de la varianza de los tratamientos y la varianza del error.

$$F_c = \frac{\text{Varianza de los tratamientos}}{\text{Varianza del error}} \quad [\text{Ec. 5}]$$

- Encontrar estadístico tabulado: en tabla de F tabulada utilizando límite de confianza y grados de libertad.



- Regla de decisión: se verifica si está en la zona de aceptación.
- Conclusión: se determina la aceptación o rechazo de las hipótesis.

NS sí ($F_c < F$ tabulada)

NS: no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

3.9.3. Modelo estadístico

$$y_{ij} = U + T_i + E_{ij} \quad [\text{Ec. 6}]$$

3.9.4. Media aritmética

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{n} \quad [\text{Ec. 7}]$$

Donde

\bar{X} = media aritmética

a_n = valor del dato obtenido

n = número total de datos observados

3.9.5. Desviación

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n |X_i - \bar{X}|^2}{n-1}} \quad [\text{Ec. 8}]$$

Donde

S= es la suma de las diferencias al cuadrado de cada resultado individual respecto a la media de todos los resultados.

X= valor de la media.

Xi= valor de cada observacion.

3.9.6. Grados de libertad

Los grados de libertad pueden descomponerse al igual que la suma de cuadrados. Así, $GL_{total} = GL_{entre} + GL_{dentro}$. Los GL_{entre} se calculan como: $t - 1$, donde t es el número de tratamientos o niveles del factor. Los GL_{dentro} se calculan como $N - t$, donde N es el número total de observaciones o valores de la variable medida (la variable respuesta).

3.9.7. Datos de la ANDEVA

Grados de libertad	Tratamientos	Repeticiones			Suma de cuadrados	Cuadro medio	Fc	T tabulado
t-1	1				$\sum y_i - 2r - Fc$	Sc/GL	Cm/CMe	Ftab
--	2				--	--	--	--
--	3				--	--	--	--

Fuente: *Procesamiento de datos y análisis estadísticos utilizando el programa SPSS.*

<http://www.pucrs.br/edipucrs/spss.pdf>. Consulta: 22 de abril de 2015.

En el análisis estadístico referente al estudio de las hipótesis se realiza comparando el valor de la F calculada con el valor de F crítico, obtenido a partir de un nivel de confianza del 95 %. De acuerdo a los resultados, si el valor de la F calculada es mayor que F crítico existen diferencias entre los grupos y por lo

tanto se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula. Cuando las medias son iguales, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa. Si el ANDEVA permite un análisis secundario en relación a la comparación de medias, se realiza una prueba posterior la cual conlleva a una prueba múltiple de medias, conocido como prueba de múltiples rangos.

En las siguientes tablas se presenta el análisis de varianza de un factor, para los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación.

Tabla XX. **Resumen estadístico para el rendimiento extractivo del colorante analizando el factor tiempo de maceración**

Tiempo Maceración	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo
30	9	5,9720	0,7812	13,0813 %	4,2884
60	9	6,3636	0,7630	11,9907 %	4,4017
90	9	6,1737	0,6586	10,6691 %	4,9556
Total	27	6,1697	0,7259	11,7659 %	4,2884

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXI. **ANDEVA para el rendimiento extractivo del colorante en función del tiempo de maceración**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,690089	2	0,345045	0,64	0,5379
Intra grupos	13,0112	24	0,542132		
Total (Corr.)	13,7013	26			

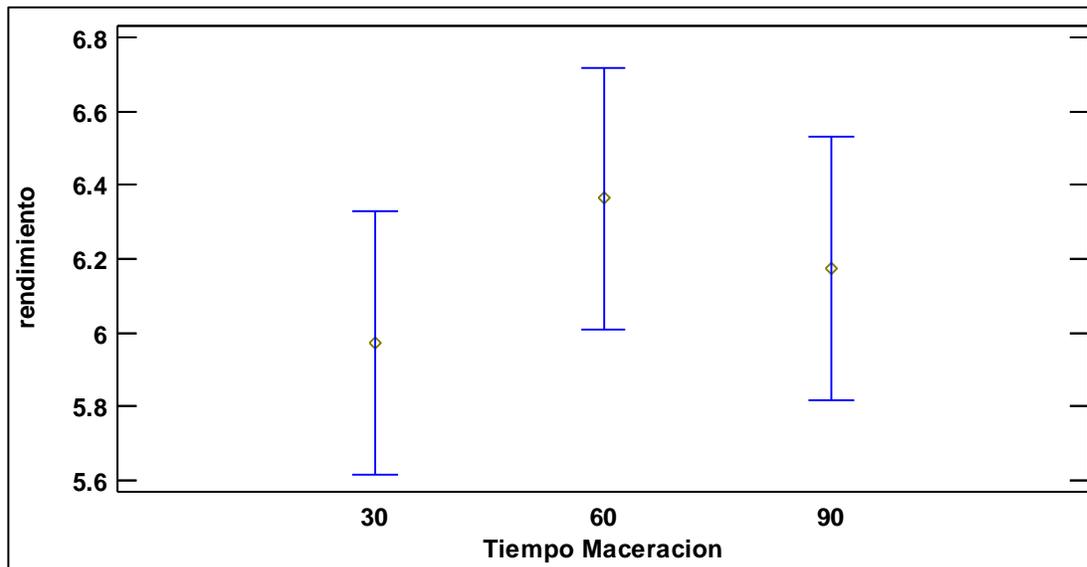
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXII. **Comparación entre niveles del factor tiempo de maceración para el rendimiento extractivo del colorante**

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
30 / 60	0,781221	0,76304	1,04822	0,9485
30 / 90	0,781221	0,658681	1,40669	0,6407
60 / 90	0,76304	0,658681	1,34198	0,6873

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 5. **Media y 95 % de Fisher LSD para el rendimiento en función del tiempo de maceración**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXIII. **Resumen estadístico para el rendimiento extractivo del colorante analizando el factor pH**

pH	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo	Rango
2	9	5,99531	0,988859	16,494%	4,2884	6,83	2,5416
3	9	6,16989	0,654419	10,606%	4,9556	6,8681	1,9125
4	9	6,34413	0,487962	7,691%	5,477	6,8164	1,3394
Total	27	6,16978	0,725928	11,766%	4,2884	6,8681	2,5797

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXIV. **ANDEVA para el rendimiento extractivo de colorante en función del pH de precipitación**

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,547546	2	0,273773	0,50	0,6130
Intra grupos	13,1537	24	0,548072		
Total (Corr.)	13,7013	26			

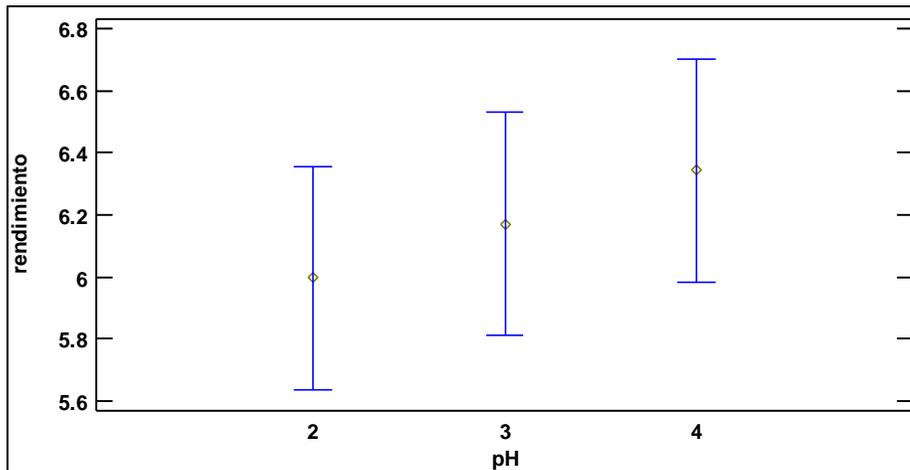
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXV. **Comparación entre niveles del factor pH de precipitación para el rendimiento extractivo del colorante**

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
2 / 3	0,988859	0,654419	2,28327	0,2641
2 / 4	0,988859	0,487962	4,10674	0,0620
3 / 4	0,654419	0,487962	1,79862	0,4242

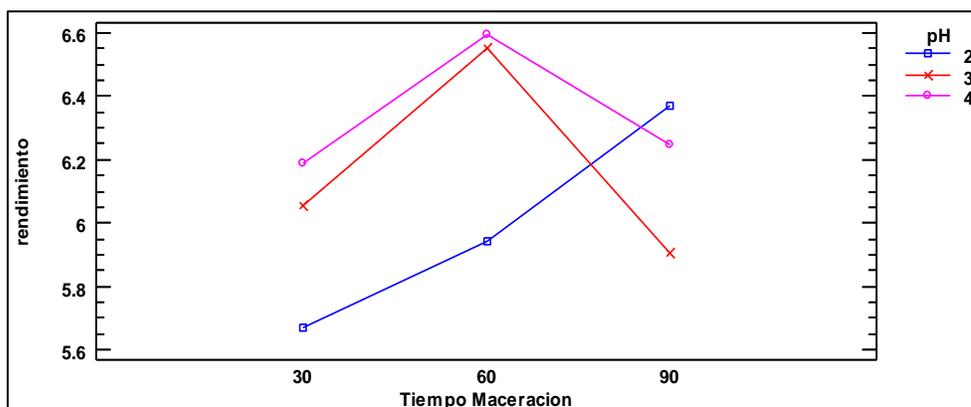
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 6. **Medias y 95 % de Fisher LSD para el rendimiento extractivo del colorante en función del pH de precipitación**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 7. **Gráfico de interacciones para el rendimiento extractivo en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXVI. **Resumen estadístico de la densidad del extracto colorante en función del tiempo de maceración**

Tiempo maceración	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo
30	9	667,622	120,119	17,992 %	460,9
60	9	697,844	126,111	18,0715 %	536,8
90	9	697,522	128,19	18,3779 %	553,3
Total	27	687,663	120,822	17,5699 %	460,9

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXVII. **ANDEVA para la densidad del colorante en función del tiempo de extracción**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5422,49	2	2711,24	0,17	0,8414
Intra grupos	374121,	24	15588,4		
Total (Corr.)	379544,	26			

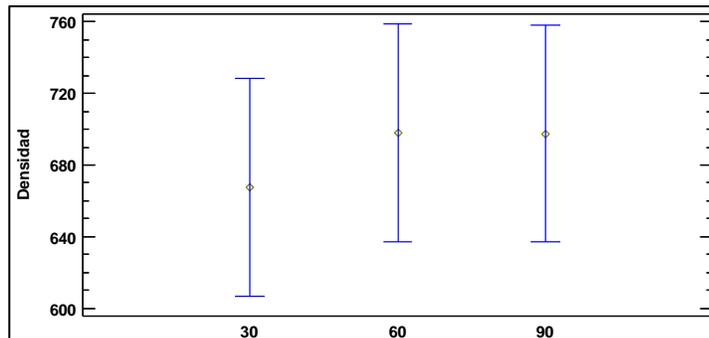
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXVIII. **Comparación entre niveles para la densidad del colorante en función del factor tiempo de maceración**

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
30 / 60	120,119	126,111	0,907228	0,8938
30 / 90	120,119	128,19	0,87804	0,8585
60 / 90	126,111	128,19	0,967827	0,9642

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 8. **Medias 95 % y Fisher LSD para la densidad del extracto colorante en función del tiempo de extracción**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXIX. **Resumen estadístico de la densidad del colorante en función del pH de precipitación**

pH	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	Mínimo	Máximo	Rango
2	9	680,022	109,784	12,1442%	491,6	806,7	315,1
3	9	694,6	120,654	13,3703%	553,3	942,8	389,5
4	9	688,367	143,919	12,9073%	460,9	938,8	477,9
Total	27	687,663	120,822	13,5699%	460,9	942,8	481,9

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXX. **ANDEVA para la densidad del colorante en función del pH de precipitación**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	962,987	2	481,494	0,03	0,9700
Intra grupos	378581,	24	15774,2		
Total (Corr.)	379544,	26			

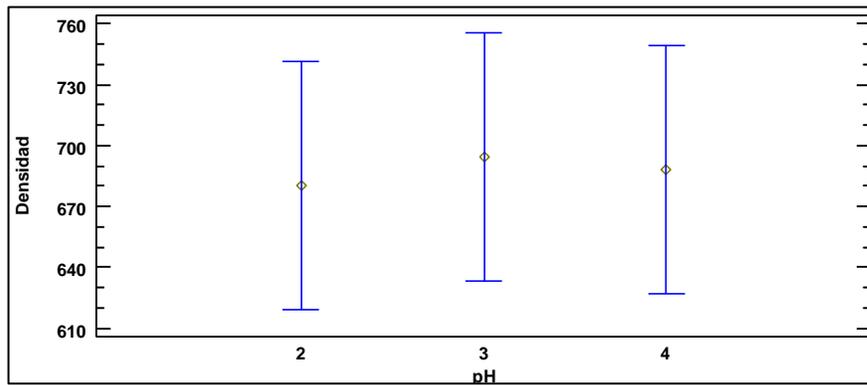
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXI. **Comparación entre niveles para la densidad del colorante en función del pH de precipitación**

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
2 / 3	109,784	120,654	0,827939	0,7959
2 / 4	109,784	143,919	0,581898	0,4606
3 / 4	120,654	143,919	0,702827	0,6297

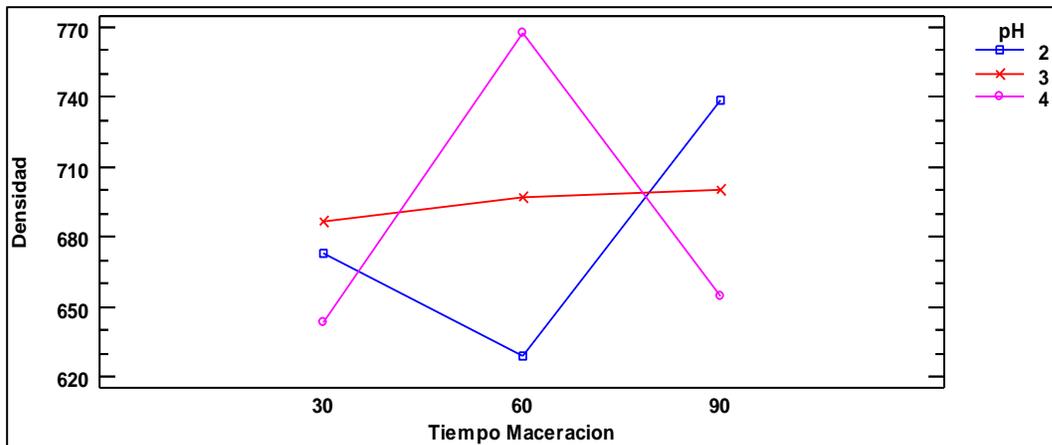
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 9. **Medias 95 % y Fisher LSD para la densidad del colorante en función del pH de precipitación**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 10. **Gráfico de interacciones para la densidad del colorante en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXII. **Resumen estadístico de porosidad del colorante en función del tiempo de maceración**

Tiempo maceración	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo
30	9	20,0	12,9904	12,9519 %	0
60	9	21,1111	10,5409	9,9307 %	10,0
90	9	16,6667	11,9896	7,9375 %	5,0
Total	27	19,2593	11,5778	11,1155 %	0

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXIII. **ANDEVA para porosidad por tiempo maceración**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	96,2963	2	48,1481	0,34	0,7145
Intra grupos	3388,89	24	141,204		
Total (Corr.)	3485,19	26			

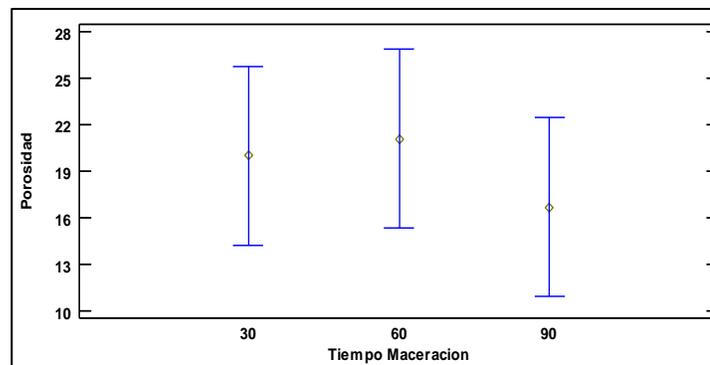
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXIV. **Comparación entre niveles para la porosidad del colorante en función del tiempo de maceración**

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
30 / 60	12,9904	10,5409	1,51875	0,5681
30 / 90	12,9904	11,9896	1,17391	0,8261
60 / 90	10,5409	11,9896	0,772947	0,7244

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 11. **Media 95 % y Fisher LSD para porosidad del colorante en función del tiempo de maceración**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXV. **Resumen Estadístico para Porosidad del colorante en función del pH de precipitación**

pH	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo	Rango
2	9	17,7778	9,71825	5,6652 %	0	30,0	30,0
3	9	19,4444	13,5657	9,7664 %	5,0	40,0	35,0
4	9	20,5556	12,3603	6,1313 %	5,0	40,0	35,0
Total	27	19,2593	11,5778	6,1155 %	0	40,0	40,0

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXVI. **ANOVA para Porosidad del colorante en función del pH de precipitación**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	35,1852	2	17,5926	0,12	0,8854
Intra grupos	3450,0	24	143,75		
Total (Corr.)	3485,19	26			

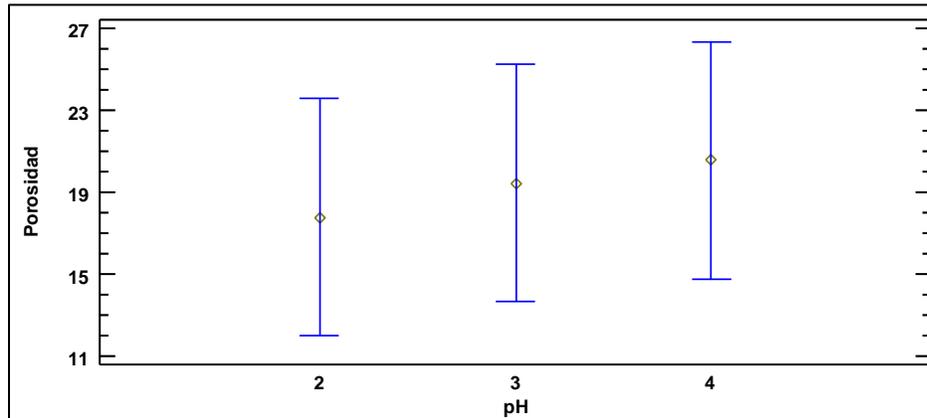
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXVII. **Comparación entre niveles para porosidad del colorante en función del pH de precipitación**

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
2 / 3	9,71825	13,5657	0,513208	0,3647
2 / 4	9,71825	12,3603	0,618182	0,5116
3 / 4	13,5657	12,3603	1,20455	0,7988

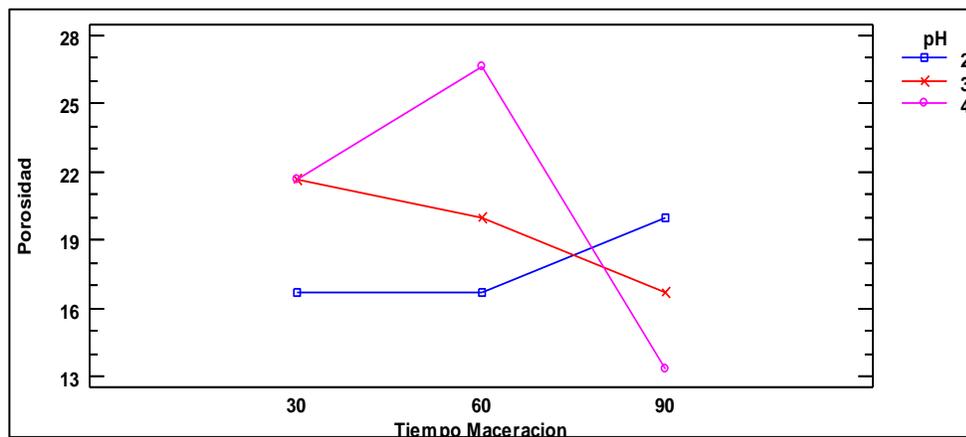
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 12. **Media 95 % y Fisher LSD para porosidad del colorante en función del pH de precipitación**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 13. **Gráfico de interacciones para la porosidad del colorante en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXVIII. **Resumen estadístico para cuantificación de bixina en función del tiempo de maceración**

Tiempo maceración	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	Mínimo
30	3	214,92	48,02	2,3432 %	173,79
60	3	371,233	22,2195	5,98533 %	357,04
90	3	413,807	13,1561	3,17928 %	405,19
Total	9	333,32	94,7019	8,4117 %	173,79

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XXXIX. **ANDEVA para cuantificación de bixina en el colorante en función del tiempo maceración**

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	65802,3	2	32901,1	33,20	0,0006
Intra grupos	5945,42	6	990,903		
Total (Corr.)	71747,7	8			

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XL. **Comparación entre niveles para la cuantificación de bixina en el colorante en función del tiempo de maceración**

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
30 / 60	48,02	22,2195	4,67061	0,3527
30 / 90	48,02	13,1561	13,3227	0,1396
60 / 90	22,2195	13,1561	2,85245	0,5192

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XLI. **Pruebas de múltiple rangos para cuantificación de bixina en el colorante en función del tiempo maceración, utilizando el método con 95,0 porcentaje LSD**

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	
30	3	214,92	X	
60	3	371,233		X
90	3	413,807		X

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

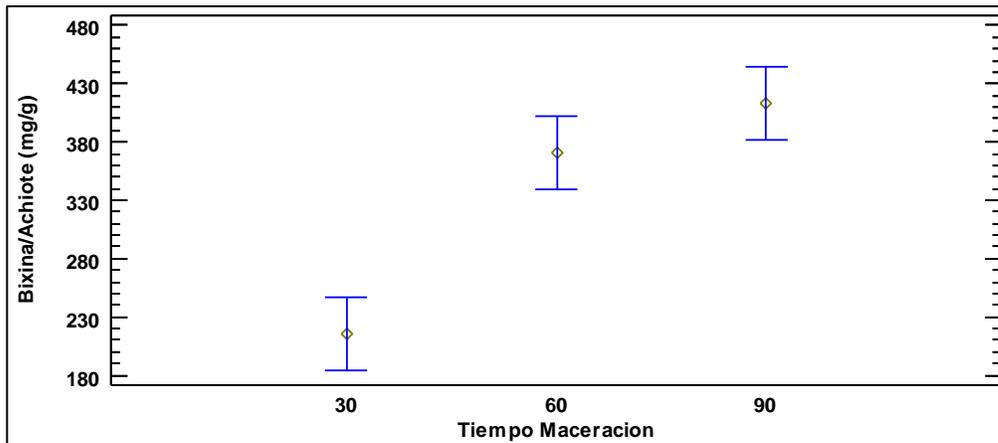
Tabla XLII. **Contraste de la prueba de múltiples rangos para la cuantificación de bixina del colorante en función del tiempo de maceración, indicando la significancia entre grupos**

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
30 - 60	*	-156,313	62,8911
30 - 90	*	-198,887	62,8911
60 - 90		-42,5733	62,8911

* indica una diferencia significativa.

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 14. **Medias 95 % y Fisher LSD para cuantificación de bixina en colorante en función del tiempo de maceración**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XLIII. **Resumen estadístico para cuantificación de bixina del colorante en función del pH de precipitación**

pH	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Mínimo	Máximo	Rango
2	3	320,853	131,968	4,1302 %	173,79	428,95	255,16
3	3	322,533	106,287	3,954 %	203,28	407,28	204,0
4	3	356,573	77,0884	2,6192 %	267,69	405,19	137,5
Total	9	333,32	94,7019	8,4117 %	173,79	428,95	255,16

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XLIV. **ANDEVA para cuantificación de bixina en el colorante en función del pH de precipitación**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2437,46	2	1218,73	0,11	0,9015
Intra grupos	69310,2	6	11551,7		
Total (Corr.)	71747,7	8			

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XLV. **Comparación entre niveles para la cuantificación de bixina en el colorante en función del pH de precipitación**

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
2 / 3	131,968	106,287	1,5416	0,7869
2 / 4	131,968	77,0884	2,9306	0,5088
3 / 4	106,287	77,0884	1,90102	0,6894

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Tabla XLVI. **Pruebas de múltiple rangos para cuantificación de bixina del colorante en función del pH de precipitación, utilizando el método con 95,0 porcentaje LSD**

pH	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	3	320,853	X
3	3	322,533	X
4	3	356,573	X

Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

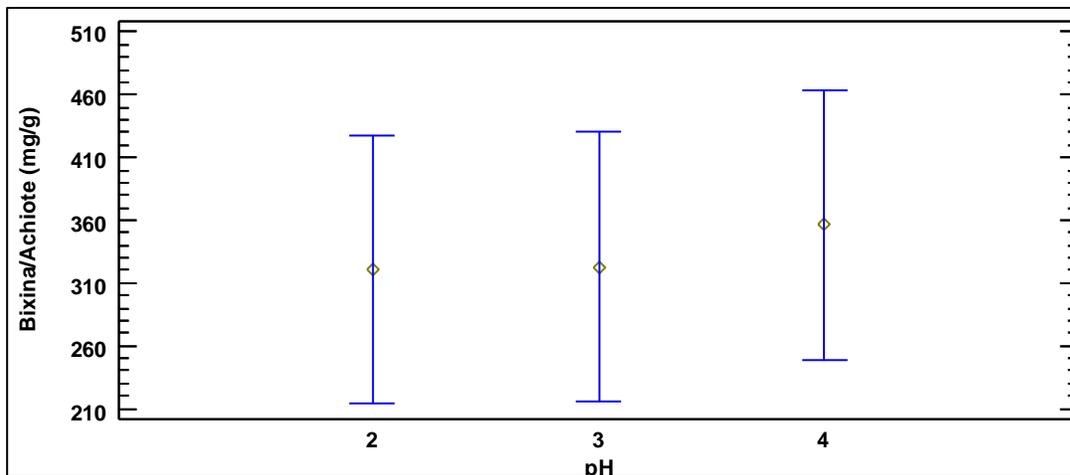
Tabla XLVII. **Contraste de la prueba de múltiples rangos para la cuantificación de bixina del colorante en función del pH de precipitación, indicando la significancia entre grupos**

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2 - 3		-1,68	214,732
2 - 4		-35,72	214,732
3 - 4		-34,04	214,732

* indica una diferencia significativa.

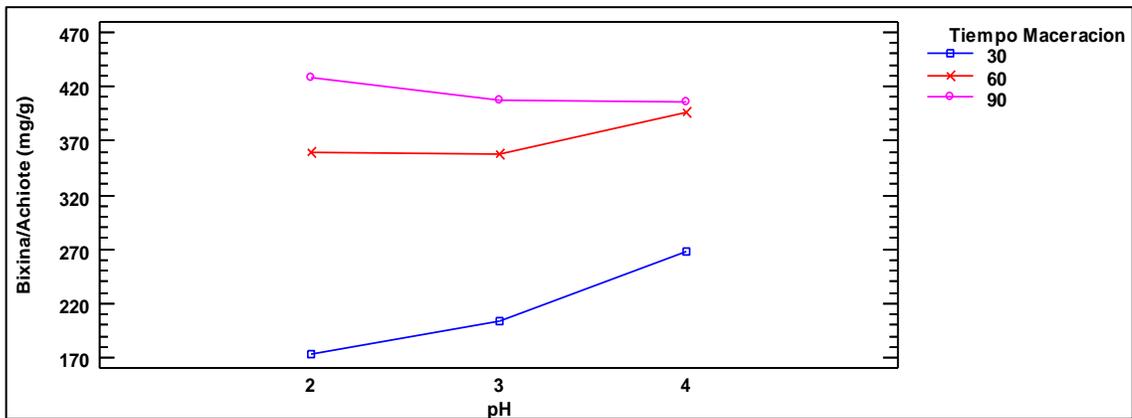
Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 15. **Medias 95 % y Fisher LSD para cuantificación de bixina en el colorante en función del pH de precipitación**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

Figura 16. **Gráfico de interacciones para cuantificación de bixina en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación**



Fuente: Statgraphics Centurion. *Análisis estadístico*. <http://www.statgraphics.net/>. Consulta: 22 de abril de 2015.

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación del porcentaje de rendimiento de extracción del colorante natural del arilo de las semillas de achiote en función del pH del extracto a nivel laboratorio

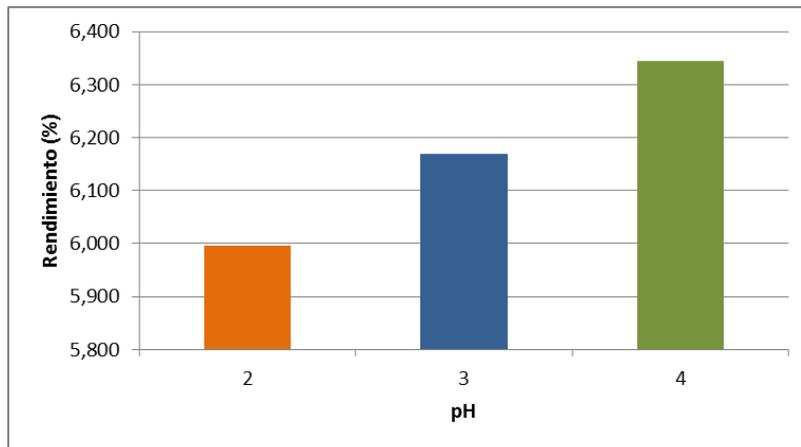
A continuación, se muestra el rendimiento del extracto colorante en función del pH de precipitación, en las siguientes tablas y figuras.

Tabla XLVIII. **Rendimiento extractivo del colorante de achiote (*Bixa orellana L.*) a nivel laboratorio, analizando el factor pH de precipitación**

pH	Rendimiento (%)
2	5,99531 ± 0,988859
3	6,16989 ± 0,654419
4	6,34413 ± 0,487962

Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Figura 17. **Rendimiento extractivo del colorante de achiote (*Bixa orellana L.*) a nivel laboratorio en función del pH de precipitación**



Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

4.2. Evaluación del porcentaje de rendimiento de extracción del colorante natural del arilo de las semillas de achiote en función del tiempo de extracción

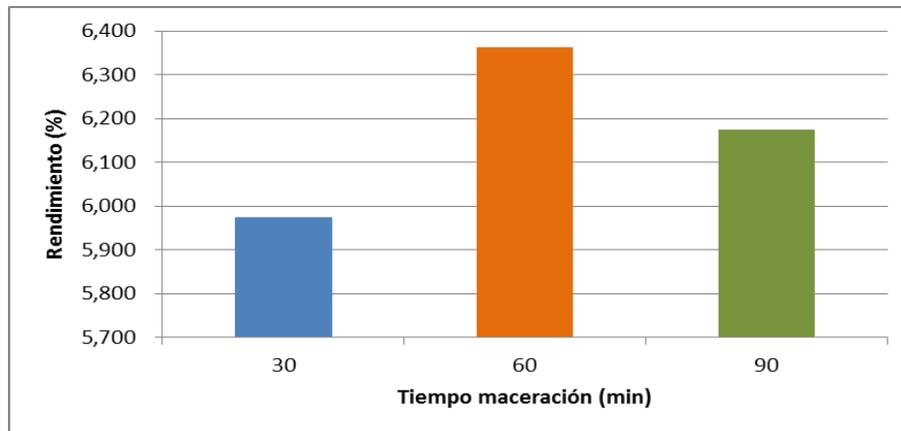
A continuación, se muestra el rendimiento extractivo del extracto colorante en función del tiempo de maceración, en las siguientes tablas y figuras.

Tabla XLIX. **Rendimiento extractivo del colorante de achiote (*Bixa orellana L.*) a nivel laboratorio, analizando el factor tiempo de maceración**

Tiempo maceración	Rendimiento (%)
30	5.97204 ± 0.781221
60	6.36359 ± 0.76304
90	6.1737 ± 0,658681

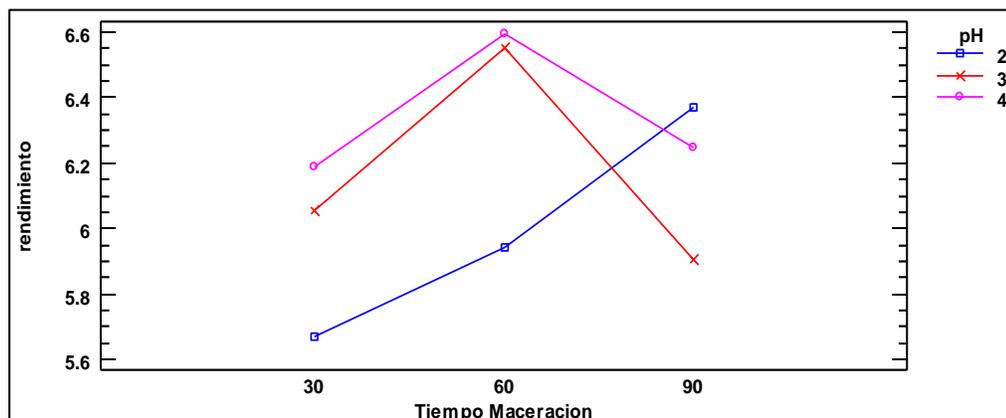
Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Figura 18. Rendimiento extractivo del colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio en función del tiempo de maceración



Fuete: Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.

Figura 19. Gráfico de interacciones para el rendimiento extractivo en relación a las medias de los factores tiempo de maceración y pH de precipitación



Fuete: Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.

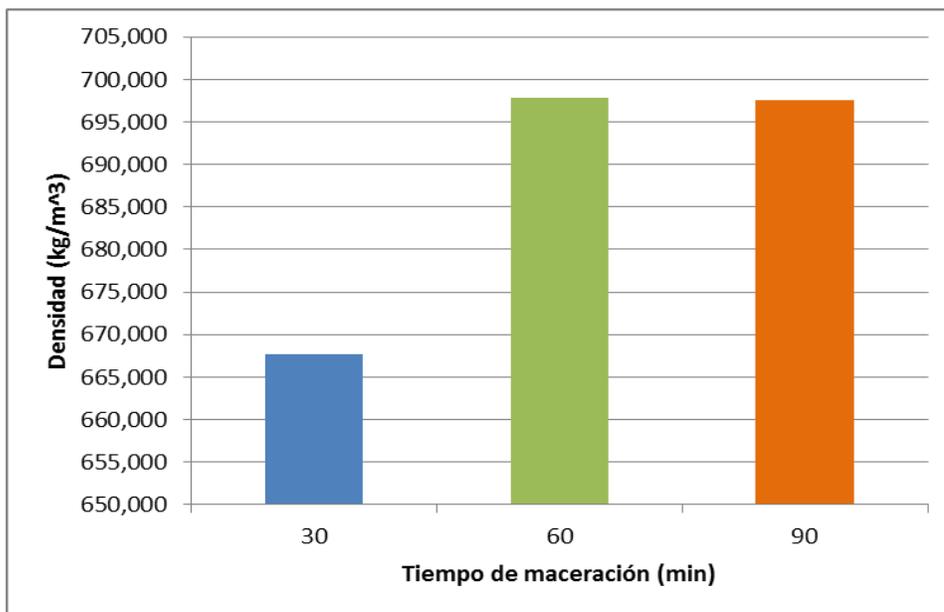
4.3. Caracterización fisicoquímica del colorante natural extraído del arilo de las semillas de achiote por medio de la determinación de la densidad, porosidad y cuantificación de bixina por cromatografía líquida de alta eficiencia

Tabla L. **Densidad del extracto colorante de achiote (*Bixa orellana L.*) a nivel laboratorio, analizando el factor tiempo de maceración**

Tiempo maceración	Densidad (kg/m ³)
30	667,622 ± 120,119
60	697,844 ± 126,111
90	697,522 ± 128,190

Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Figura 20. **Densidad del extracto colorante de achiote (*Bixa orellana L.*) a nivel laboratorio en función del tiempo de maceración**



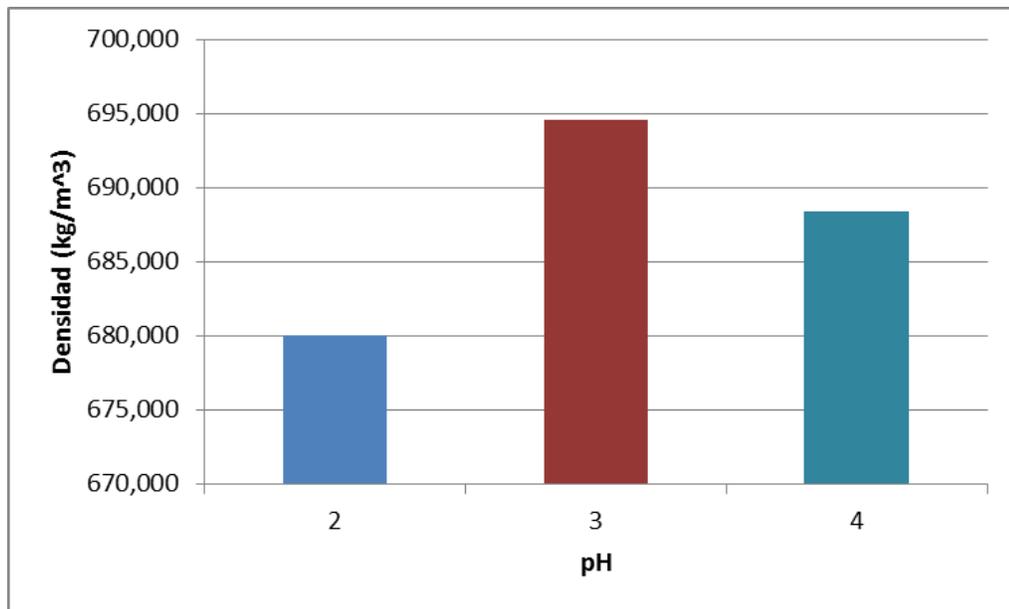
Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Tabla LI. **Densidad del extracto colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio, analizando el factor pH de precipitación**

pH	Densidad (kg/m ³)
2	680,022 ± 109,784
3	694,600 ± 120,654
4	688,367 ± 143,919

Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Figura 21. **Densidad del extracto colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio en función del pH de precipitación**



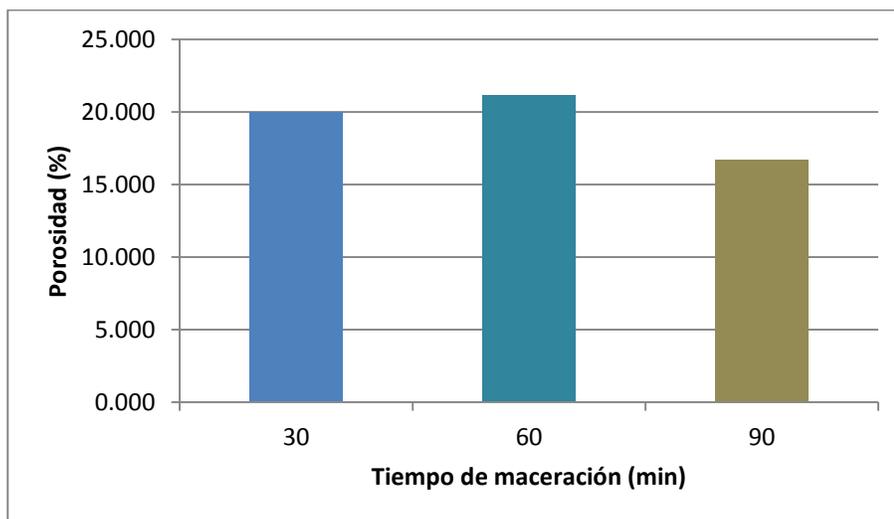
Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Tabla LII. **Porosidad del extracto colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio, analizando el factor tiempo de maceración**

Tiempo maceración	Porosidad (%)
30	20,000 ± 12,990
60	21,111 ± 10,540
90	16,666 ± 11,989

Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Figura 22. **Porosidad del extracto colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio en función del tiempo de maceración**



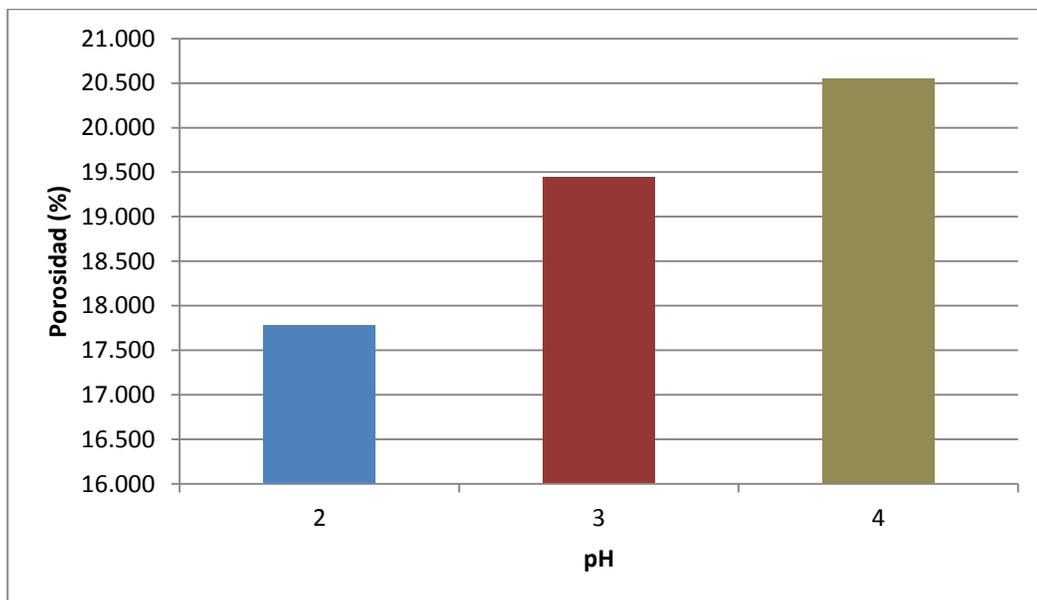
Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Tabla LIII. **Porosidad del extracto colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio, analizando el factor pH de precipitación**

pH	Porosidad (%)
2	17,777 ± 9,718
3	19,444 ± 13,565
4	20,555 ± 12,360

Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Figura 23. **Porosidad del extracto colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio en función del pH de precipitación**



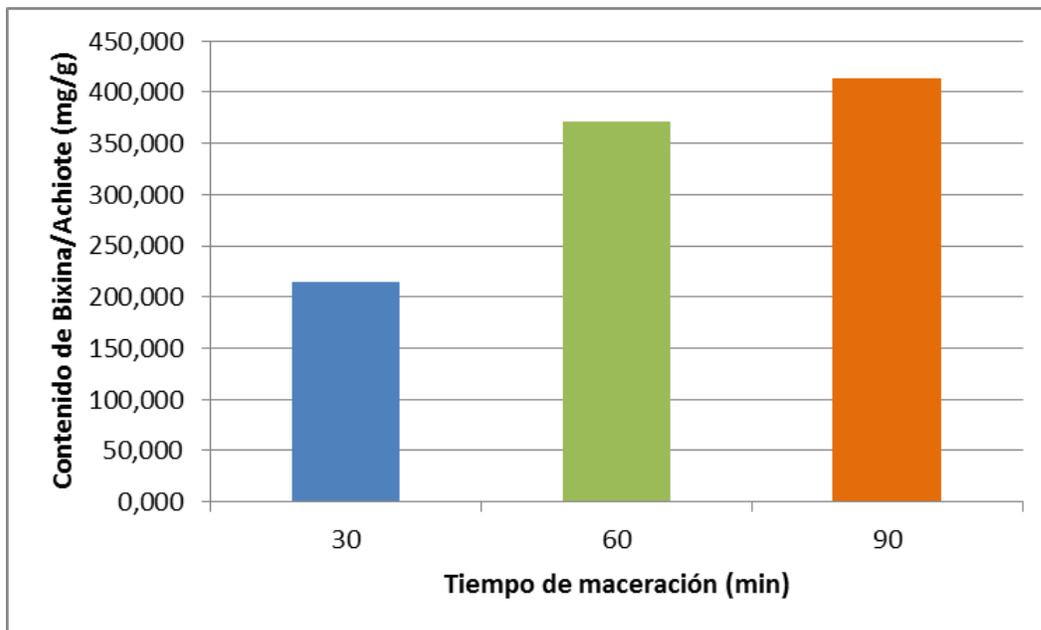
Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Tabla LIV. **Cuantificación de bixina en el extracto colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio, analizando el factor tiempo de maceración**

Tiempo maceración	Contenido de bixina/achiote (mg/g)
30	214,920 ± 48,020
60	371,233 ± 22,220
90	413,807 ± 13,156

Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Figura 24. **Cuantificación de bixina en el extracto colorante de achiote (*Bixa orellana* L.) a nivel laboratorio en función del tiempo de maceración**



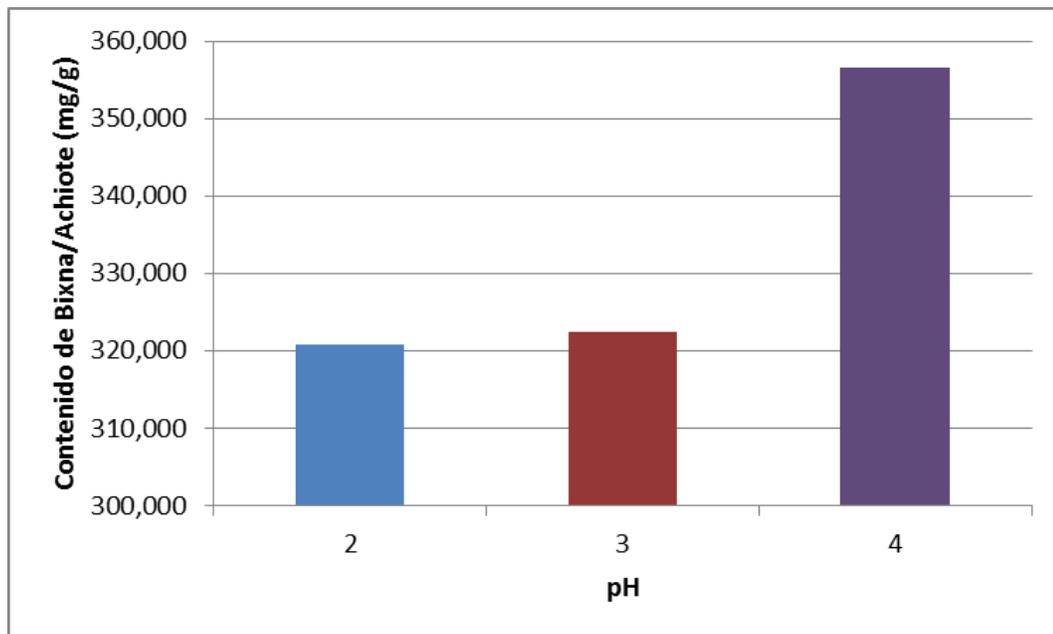
Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Tabla LV. **Cuantificación de bixina en el extracto colorante de achiote (*Bixa orellana L.*) a nivel laboratorio, analizando el factor pH de precipitación**

pH	Contenido de bixina/achiote (mg/g)
2	320,853 ± 131,968
3	322,533 ± 106,287
4	356,573 ± 77,088

Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

Figura 25. **Cuantificación de bixina en el extracto colorante de achiote (*Bixa orellana L.*) a nivel laboratorio en función del pH de precipitación**



Fuete: *Centro de Investigación de Ingeniería. Usac.*

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio tuvo como objetivo la extracción y caracterización fisicoquímica del extracto colorante natural del arilo de las semillas de achiote (*Bixa orellana L.*) utilizando el método de lixiviación con álcali acuoso a nivel laboratorio. La materia prima se obtuvo de los municipios de Cahabón y Lanquín del departamento de Alta Verapaz, Guatemala.

La extracción del colorante natural se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales LIEXVE, Sección Química Industrial, Centro de Investigaciones de Ingeniería, USAC; donde la materia prima, 200 g de semilla se colocó en *beacker* y se puso en contacto directo con el solvente a una relación 1 : 3 materia prima : solvente, la solución de álcali acuoso 2 % m/v de KOH; iniciando con maceración estática de 12 h y posteriormente con maceración dinámica variando tiempo de 30, 60 y 90 minutos a 140 rpm. Luego de realizar la maceración mixta se obtuvo por separación de las semillas la solución coloreada, que posteriormente se precipitó utilizando una solución ácida al 10 % m/v de H₂SO₄, variando el valor de pH de 2, 3 y 4. La separación del precipitado se realizó mediante una filtración total utilizando papel filtro de 12 mm. El tiempo de secado fue de 6 horas utilizando vacío parcial de 21 pulgadas de mercurio en un horno a temperatura de 57 °C.

En cuanto al rendimiento extractivo del colorante natural analizando el factor pH de precipitación, en la tabla XLVII se pueden observar los valores medios respecto a la variación del pH de precipitación con su respectiva desviación estándar utilizando sigma¹. Posteriormente se observa en la

figura 17 la tendencia del rendimiento extractivo del colorante natural en función del pH de precipitación, donde se puede visualizar que a medida que aumenta el pH de precipitación, aumenta el porcentaje de rendimiento extractivo. Para poder determinar el pH óptimo de precipitación se realizó un análisis de varianza de un factor mediante un ANDEVA según tabla XXIII, y verificar si las diferencias entre medias son significativas. De manera que el valor de prueba para la razón del valor de coeficiente de Fisher es mayor a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de rendimiento entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

En la sección de resultados para el rendimiento extractivo del colorante natural, se puede observar en la tabla XLVIII los valores medios de rendimiento respecto al factor tiempo de maceración con sus respectiva desviación estándar, la cual indica el comportamiento de la variabilidad que existe en análisis del recuento de datos respecto al factor tiempo de maceración. Posteriormente se observa en la figura 18 la tendencia del rendimiento extractivo del colorante natural en función del factor tiempo de maceración, con lo cual se puede visualizar que conforme aumenta el tiempo de maceración, aumenta el rendimiento extractivo del colorante natural. Para determinar el tiempo óptimo de maceración se realizó un análisis de varianza para un factor, en el cual contrasta mediante un ANDEVA según tabla XX, si las diferencias entre las medias son significativas. Puesto que el valor de prueba para la razón del valor de coeficiente de Fisher es mayor a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de rendimiento entre un nivel de tiempo maceración y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Para la caracterización fisicoquímica del colorante natural se determinó la densidad del extracto colorante, la determinación de la porosidad, cuantificación del contenido de bixina en el extracto colorante natural para el cual previamente

se requirió la realización de pruebas de solubilidad en etanol. Y se analizaron los resultados mediante análisis estadístico para verificar si existen diferencias significativas de acuerdo al método y diseño experimental para la extracción del colorante natural.

Analizando la relación entre factores para el rendimiento extractivo, según la figura 19 se puede visualizar el valor medio del mejor rendimiento extractivo es con tiempo de 60 minutos y pH de 4.

Para la determinación de la densidad se utilizó el método de la probeta, en el cual se analiza la relación entre la masa que ocupa cierto volumen de colorante, y se analizó la densidad real del colorante mediante un desplazamiento volumétrico utilizando agua destilada a 20 °C; la densidad real se denomina un factor importante al realizar un análisis de transferencia de calor y transferencia de masa para el contexto de alimentos, en caso del colorante natural tiene relación directa con la capacidad de retener humedad o del método que se utilice para eliminarla. La densidad real debe de tomarse en cuenta al momento de realizar un análisis de calidad ya que de esta característica dependerá el diseño que se utilice para su empaque, almacenaje y transporte. En la sección de resultados en la tabla XLIX se muestran los valores medios para la densidad analizando el factor tiempo de maceración con su respectiva desviación estándar mostrando la variabilidad de los datos. Se puede observar mediante la figura 20 el comportamiento de la densidad en función del tiempo de maceración la cual aumenta a medida que aumenta el tiempo de maceración. Para determinar si existe una influencia en la variabilidad de la densidad se realizó un análisis estadístico para un factor, y de acuerdo a un ANDEVA según la tabla XXVI, se visualizó que el valor de prueba para el coeficiente de Fisher es mayor a 0,05, por tanto no existe una diferencia

estadísticamente significativa entre la media de densidad entre un nivel de tiempo maceración y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza

En cuanto a la determinación de la densidad del colorante natural se realizó un análisis de un factor para el pH de precipitación, los valores medios obtenidos se muestran en la tabla L con su respectiva desviación estándar mostrando la variabilidad de los datos. Se puede observar en la figura 21 el comportamiento de la densidad en función del pH de precipitación el cual aumenta a medida que aumenta el pH. Para poder determinar si existe una influencia en la variabilidad de la densidad se realizó un análisis estadístico para un factor, y de acuerdo a un ANDEVA según tabla XXIX, se visualizó que el valor de prueba para el coeficiente de Fisher es mayor a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de densidad entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Analizando la relación entre factores para la densidad del colorante, según la figura núm. 10 se puede visualizar el valor medio del mejor rendimiento extractivo es con tiempo de 60 minutos y pH de 4.

Una de las propiedades importantes en cuanto al empaque de materiales biológicos es la porosidad, es una relación entre la densidad real y la densidad aparente; se puede definir como la cantidad de espacios vacíos presentes en el colorante natural y está ligada al proceso de secado, de tal manera que si la humedad presente en el colorante aumenta, la porosidad disminuye. En cuanto a los resultados obtenidos de la determinación de la porosidad según la tabla LI se presentan los valores medios de porcentaje de porosidad y su respectiva desviación estándar para verificar la variabilidad de acuerdo al factor tiempo de maceración. En la figura 22 se puede visualizar el comportamiento de la porosidad en función del tiempo de maceración, de tal manera que al aumentar

el tiempo de maceración aumenta el porcentaje de porosidad. Para la validación de esta propiedad se utilizó ANDEVA de un factor para el tiempo de maceración y según la tabla XXXII no existe diferencia significativa entre los valores de las medias de tiempo de maceración ya que el valor de prueba para el coeficiente de Fisher es mayor a 0,05.

En cuanto a la determinación de la porosidad del colorante natural se realizó un análisis estadístico de un factor para el pH de precipitación los valores medios obtenidos se muestran en la tabla LII con su respectiva desviación estándar mostrando la variabilidad de los datos. Se puede observar en la figura 23 el comportamiento de la porosidad en función del pH de precipitación en donde el porcentaje de porosidad aumenta a medida que aumenta el pH de precipitación, obteniendo mayores valores para un pH de 4. Dependiendo de las cantidades de colorante que se deseen trabajar este tendrá una relación respecto del volumen que ocupen ya que a medida que la porosidad es menor, también disminuye el volumen que este ocupe. Para la validación de esta propiedad se utilizó ANDEVA de un factor para el pH de precipitación y según la tabla XXXV, no existe diferencia significativa entre los valores de las medias de pH de precipitación ya que el valor de prueba para el coeficiente de Fisher es mayor a 0,05.

Realizar la cuantificación de bixina en el colorante natural es el segundo objetivo con mayor prioridad al momento de extraer el colorante, ya que dicho contenido depende la calidad del producto final y la aceptación del mismo. Para poder realizar la cuantificación de bixina se utilizó un método indirecto mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, elaborando una curva de calibración con una correlación de 0,99937 utilizando un estándar grado puro de bixina (E160b) en el cual se estableció mediante una metodología los tipos de solvente en la fase móvil tomando en cuenta pruebas de solubilidad que no

estaban en el contexto de la parte preliminar pero como un hallazgo se demostró que el mejor solvente para poder preparar las muestras, y colocarlas en la fase móvil que consiste en una mezcla líquida de acetonitrilo y agua en relación (ACN 20:80 H₂O) es el etanol absoluto según se muestra en la tabla XIII, en donde la máxima cantidad posible a disolver fue de 0,100 g de colorante en 100 mL de etanol.

En cuanto a la cuantificación de la bixina en el colorante natural se realizó un análisis estadístico de un factor para el tiempo de maceración reportándose valores medios obtenidos según la tabla LIII con su respectiva desviación estándar mostrando la variabilidad de los datos. Se puede observar en la figura 24 el comportamiento de la cuantificación de la bixina en donde el contenido aumenta conforme se aumenta el tiempo de maceración obteniendo valores mayores para un tiempo de 90 minutos. Para poder determinar si existe una influencia en la variabilidad del contenido de bixina se realizó un análisis estadístico para un factor, y de acuerdo a un ANDEVA según tabla XXXVIII, se visualizó que el valor de prueba para el coeficiente de Fisher es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de cuantificación bixina entre un nivel de tiempo maceración y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó pruebas de múltiples rangos donde se observa en tabla XL aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de

diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. De acuerdo a este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

De acuerdo a la tabla LIV se puede visualizar los valores del contenido de bixina analizando el factor pH de precipitación en donde se muestran los valores medios y su respectiva desviación estándar, mediante un análisis gráfico en la figura 25 se observa el comportamiento de la cuantificación en donde se tienen valores similares para pH 2 y 3, sin embargo para pH 4 se tiene un mayor contenido de bixina. De acuerdo a los resultados obtenidos se procedió a realizar un análisis estadístico ANDEVA para determinar la variabilidad de los datos según la tabla XLIII se visualizó que el coeficiente de prueba de la prueba de Fisher es menor que 0.05, lo que describe que sí existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de cuantificación bixina entre un nivel de tiempo maceración y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se seleccionó pruebas de múltiples rangos el cual demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95,0 % de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. De acuerdo a este método hay un riesgo del 5,0 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

CONCLUSIONES

1. No existe diferencia significativa para el rendimiento de la extracción a nivel laboratorio del colorante natural de la semilla de achiote por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del tiempo de extracción.
2. No existe diferencia significativa para el rendimiento de la extracción a nivel laboratorio del colorante natural de la semilla de achiote por medio de lixiviación con álcali acuoso en función del pH del extracto.
3. No existe diferencia significativa para la densidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote, en función del tiempo de maceración.
4. No existe diferencia significativa para la densidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote, en función del pH de precipitación.
5. No existe diferencia significativa para la porosidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote, en función del tiempo de maceración.
6. No existe diferencia significativa para la porosidad del colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote, en función del pH de precipitación.

7. El extracto colorante del arilo de la semilla de achiote es completamente soluble en etanol absoluto, a una razón máxima de 0,100 g en 100 mL sin presentar precipitado en los componentes de la fase móvil del cromatógrafo.
8. Existe diferencia significativa para el contenido de bixina en el extracto colorante obtenido del arilo de la semilla de achiote en función del tiempo de maceración, el mayor valor fue de $413,807 \pm 13,156$ mg/g para un tiempo de 90 minutos y el menor $214,920 \pm 48,020$ mg/g para un tiempo de 30 minutos.
9. No existe diferencia significativa para el contenido de bixina en el colorante natural obtenido del arilo de la semilla de achiote, en función del pH de precipitación.
10. Se determinó que para valores de pH de precipitación de 4 se obtiene un mayor valor promedio de $6,34413 \pm 0,487962$ % del rendimiento extractivo del colorante natural del arilo de las semillas del achiote.
11. Se determinó que con un tiempo de 60 minutos se obtiene el mayor valor promedio de $6,36359 \pm 0,76304$ % de rendimiento extractivo del colorante natural del arilo de las semillas del achiote.
12. El mayor valor promedio $356,573 \pm 77,088$ mg/g del contenido de bixina en el extracto colorante se obtiene con valor de pH de precipitación de 4.
13. El mayor valor promedio de $413,807 \pm 13,156$ mg/g del contenido de bixina en el extracto colorante se obtiene con tiempo de extracción de 90 minutos.

RECOMENDACIONES

1. Realizar lavados a la semilla hasta agotar el colorante y comparar los rendimientos extractivos con los obtenidos a nivel laboratorio.
2. Realizar un estudio acerca de la degradación de la bixina presente en el colorante por la acción fotoeléctrica para poder cuantificar los isómeros que se producen.
3. Hacer extracciones sin involucrar maceración estática para comparar los rendimientos y poder realizar una cuantificación de bixina presente.
4. Verificar por medio de análisis de humedad como afecta la vida de anaquel y la porosidad presente en el extracto colorante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Casanova D., Ortiz M. *Extracción de bixina de la semilla de achiote (Bixa orellana L). con biocatalizadores*. Cali-Colombia: Grupo de Investigación. Universidad del Valle. 2005. 315 p.
2. DEVÍA PINEDA, Jorge; SALDARRIAGA CALDERÓN, Liliana. *Planta piloto para obtener colorante de la semilla de achiote (Bixa orellana L.)*. Cali-Colombia: Universidad EAFIT. 2003. 266 p
3. ESTRADA JIRÓN, J. *Extracción del aceite esencial del flavelo de la naranja dulce (citrus sinensis l.) Variedad valencia, proveniente de desechos agroindustriales, utilizando el método de destilación por arrastre con vapor a escala planta piloto para su aplicación en la formulación de cosméticos*. Trabajo de graduación. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2014. 199 p.
4. HUERTA CÁRDENAS, L. *Estudio de prefactibilidad de una empresa productora y comercializadora de bixina dirigido al mercado de Japón*. Trabajo de graduación. Universidad Católica de Perú. Lima. 2014. 387 p.
5. LANZA GALINDO, J. *Optimización del tiempo de lavado en el proceso de extracción de bixina con álcali a partir de semillas de achiote (Bixa Orellana L.) de diferente maduración*. Trabajo de graduación. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1997. 189 p.

6. LOCK SING, Olga. *Colorantes naturales*. Perú: Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica de Perú. 1997. 411 p.
7. NARCISO REYES. L. *Manual para la producción del Achiote (Bixa orellana L)*. México: Universidad Veracruzana. 2003. 365 p.
8. RAMOS, J. *El cultivo del achiote en Venezuela*. Venezuela: Fonaiap. 1991. 145 p.
9. ROJAS BARAHONA, A. *Caracterización físico-mecánica de la semilla de vitabosa (Mucuna deeringiana)*. Trabajo de graduación. Medellín. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2010. 211 p.
10. RUEDA VELÁSQUEZ, Luz. *Diseño de una planta piloto para la producción de bixina a partir de achiote*. Colombia: Universidad Industrial de Santander. Trabajo de graduación. 2004. 189 p.
11. SALVÁ, B. *Utilización de enzimas en la extracción de colorante a partir de semilla de achiote (Bixa orellana L)*. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina – UNALAM. 1997.388 p.

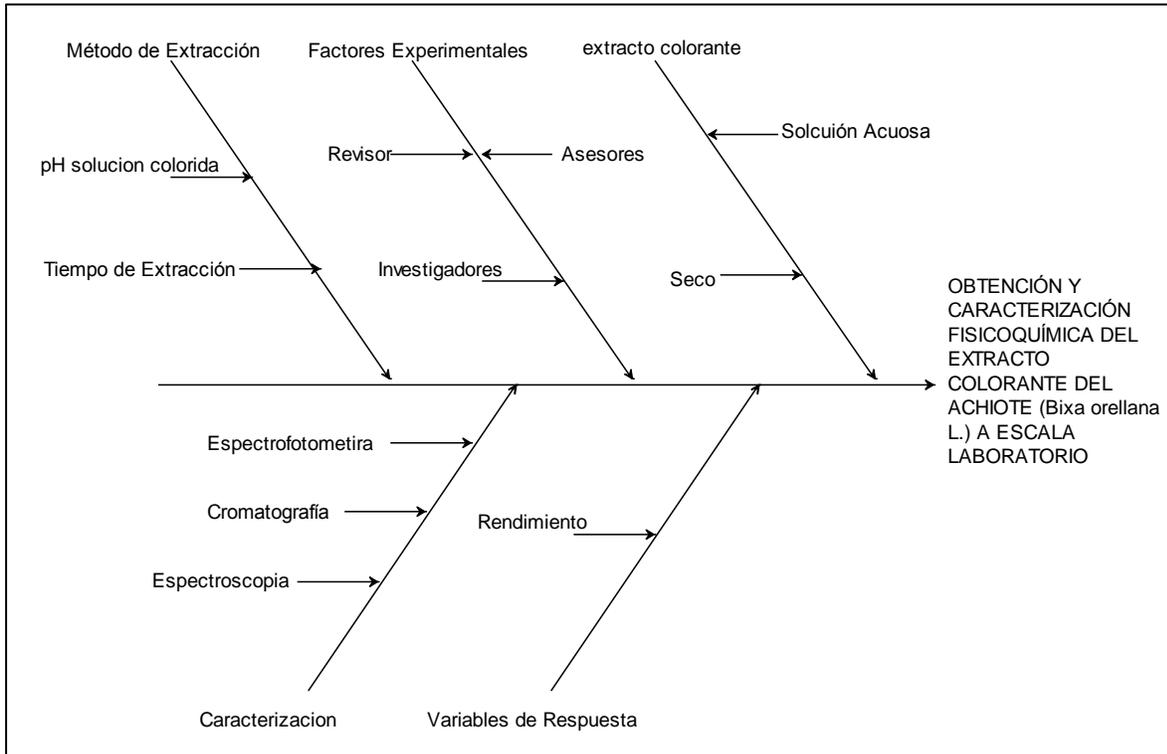
APÉNDICES

Apéndice 1. **Requisitos académicos para la carrera de licenciatura en ingeniería química**

Área	Curso	Tema
Química	Química 3 y 4	Soluciones
	Análisis Cualitativo	Soluciones acuosas
	Análisis Cuantitativo	Errores de medición
	Química Orgánica 1 y 2	Colorantes, lípidos
Operaciones Unitarias	Transferencia de calor (IQ3)	Transferencia de calor
	Transferencia de masa (IQ4)	Lixiviación
	Operaciones unitarias complementarias (IQ7)	Filtración
Fisicoquímica	Termodinámica 3 y 4	Leyes de la termodinámica
	Extracciones Industriales	Extracción de colorantes naturales
Área de ciencias básicas y complementaria	Técnicas de estudio e Investigación	Método de experimental de investigación
	Ingeniería Económica	Presupuesto
	Estadística 1	Análisis de datos

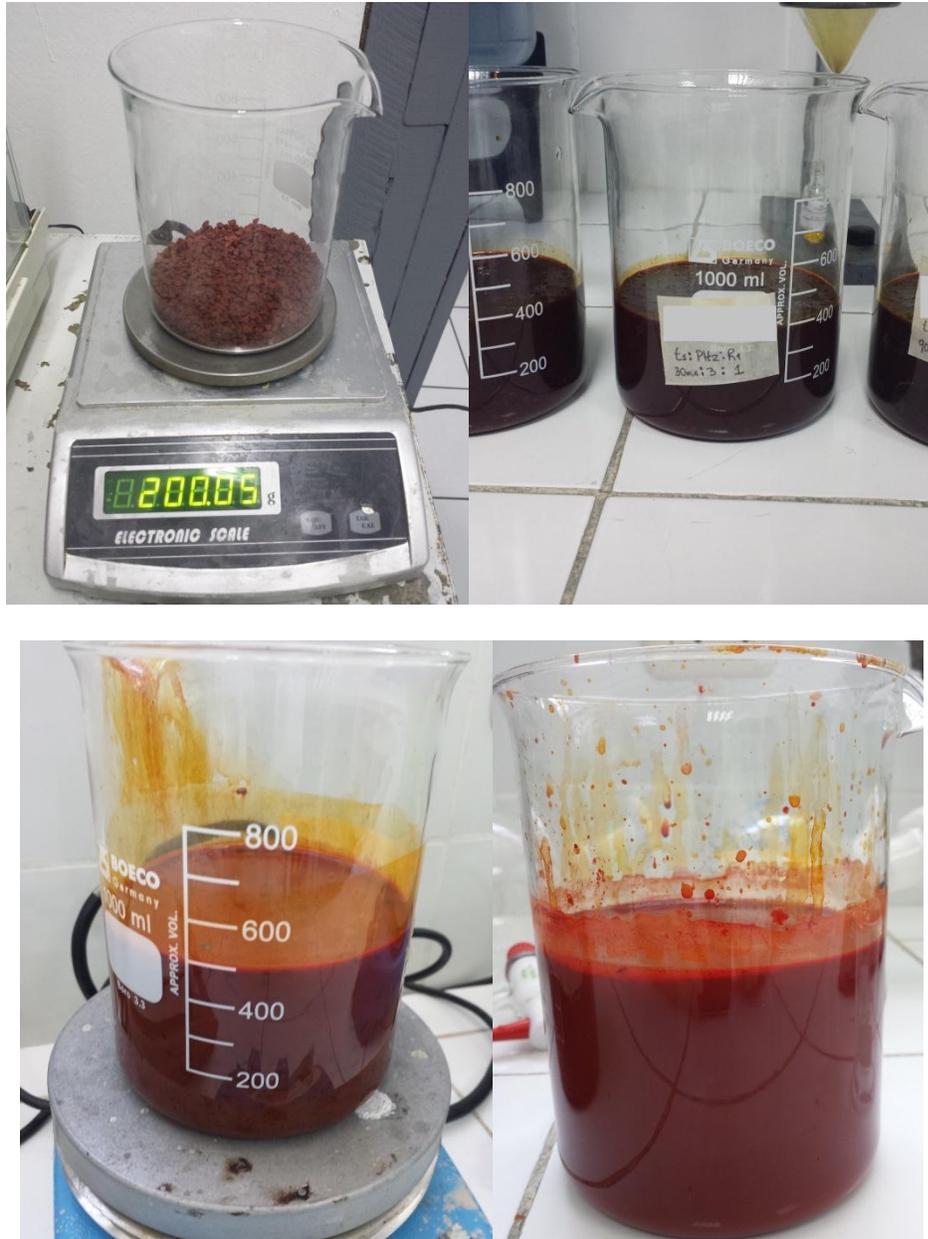
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. **Extracción del colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla. Por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. **Separación del colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla. Por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. **Precipitación del colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla. Por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**



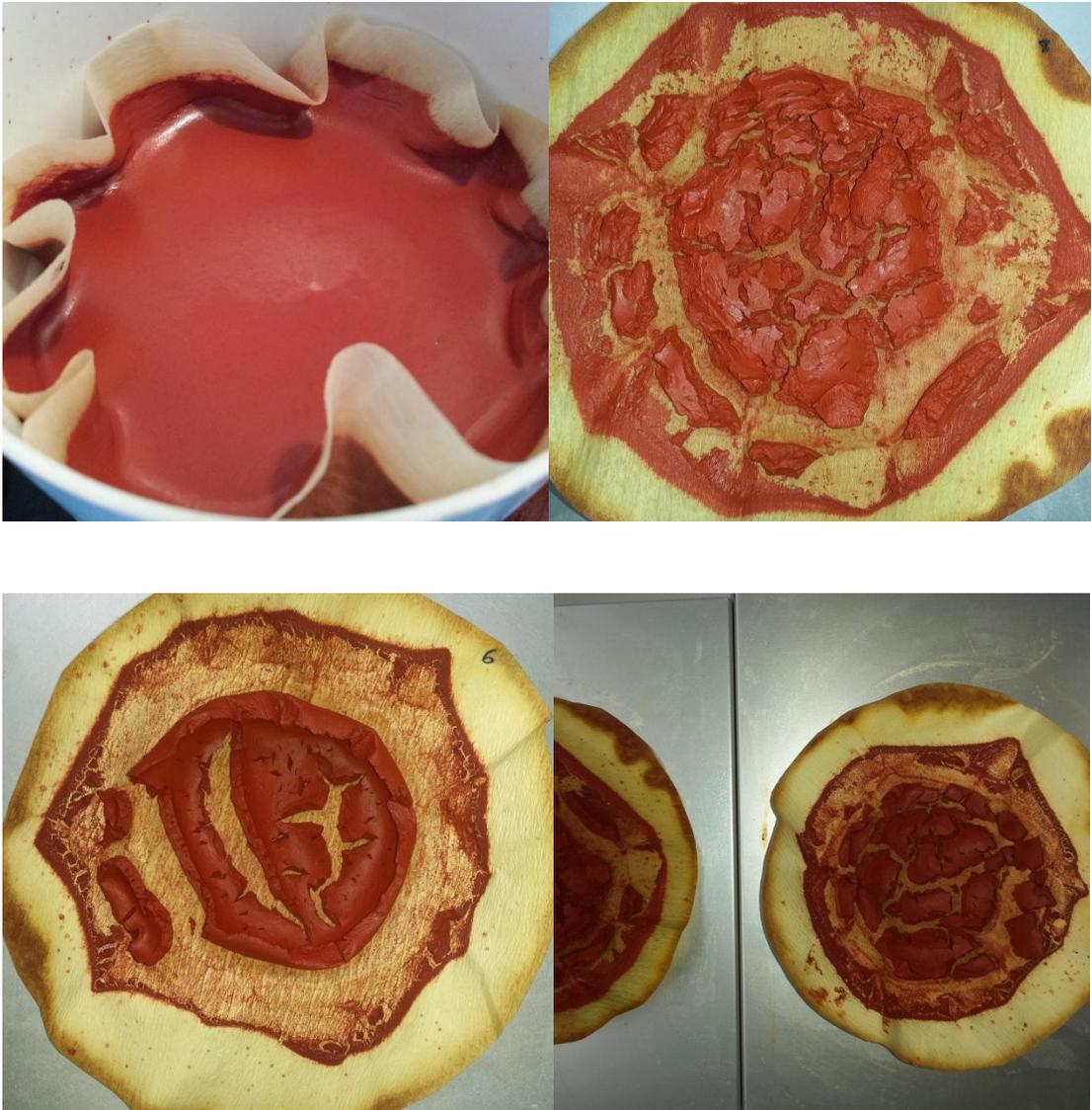
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 6. **Filtración del colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla. Por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 7. **Secado del colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla. Por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**



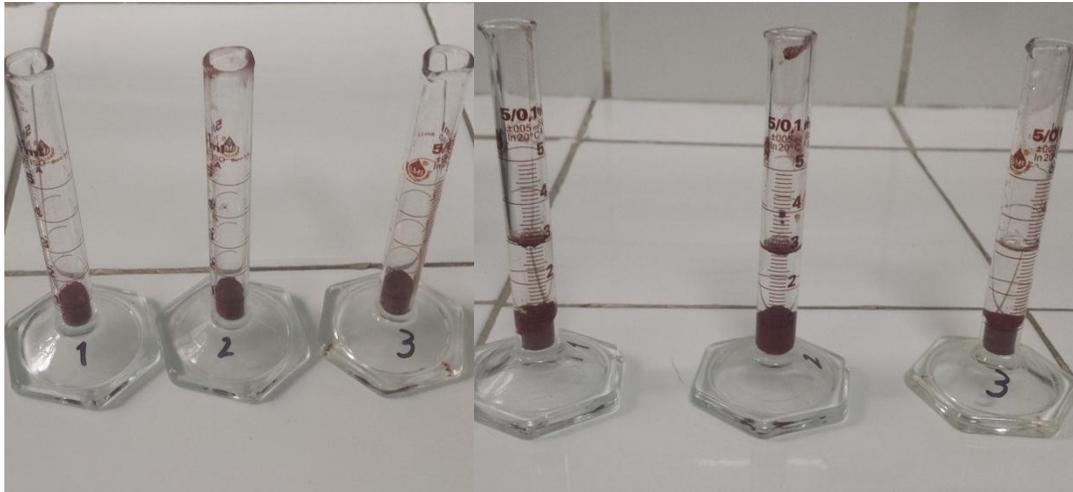
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 8. **Pulverizado y empaque del colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla. Por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**

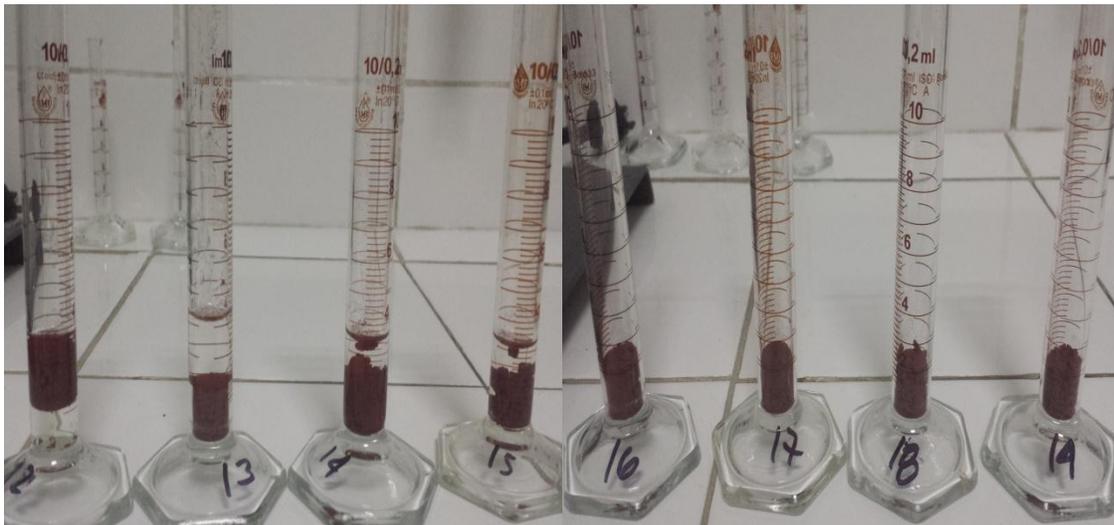


Fuente: elaboración propia.

Apéndice 9. **Determinación del colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla. Por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**

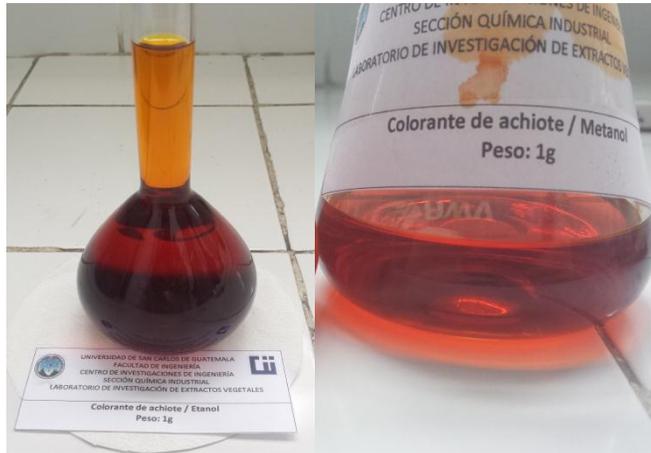


Continuación del apéndice 9.



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 10. **Pruebas de solubilidad del colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla, por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 11. **Cuantificación de bixina en el colorante natural de achiote, proveniente del arilo de la semilla, por medio del método de lixiviación con álcali acuoso, a nivel laboratorio**



Continuación del apéndice 11.



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 12. **Curva de calibración estándar de bixina (E160b)**



Continuación del apéndice 12.



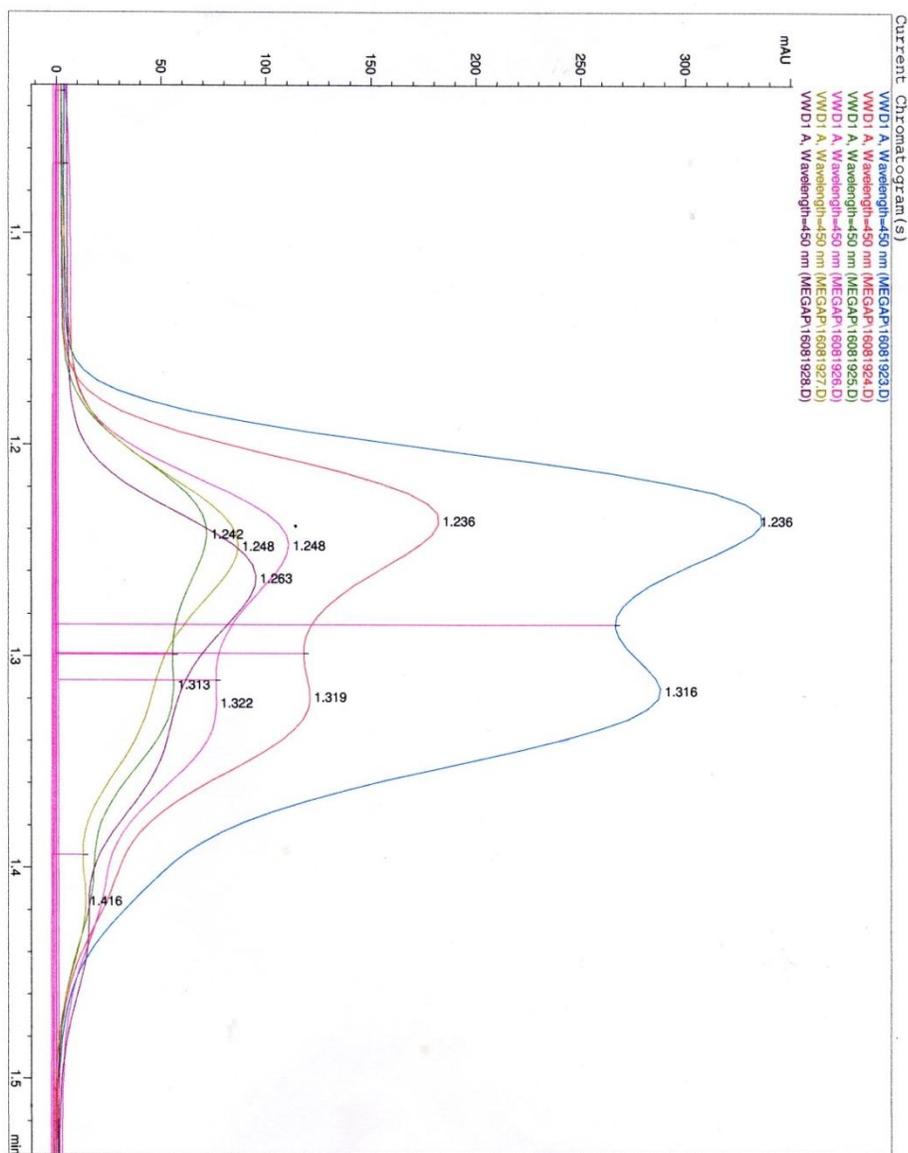
Continuación del apéndice 12.



Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma de estándar de bixina (E160b) a diferente concentración



Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química, LIQA/UVG.

Anexo 2. Datos para curva de calibración estándar de bixina (E160b)

=====
 Calibration Table
 =====

Curva calibracion bixina
 Calib. Data Modified : Monday, August 22, 2016 11:31:22 AM
 Calculate : External Standard
 Based on : Peak Area
 Rel. Reference Window : 5.000 %
 Abs. Reference Window : 0.000 min
 Rel. Non-ref. Window : 10.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times : No, only for identified peaks
 Curve Type : Linear
 Origin : Forced
 Weight : Equal
 Recalibration Settings :
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time : Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
 Printout of recalibrations within a sequence:
 Calibration Table after Recalibration
 Normal Report after Recalibration
 If the sequence is done with bracketing:
 Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/ml]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
1.236	1 2	6.00000e-2	546.38269	1.09813e-4	Bixina
	3	8.00000e-2	615.45050	1.29986e-4	
	5	1.20000e-1	966.39618	1.24173e-4	
	6	2.00000e-1	1668.50928	1.19867e-4	

=====
 Peak Sum Table
 =====

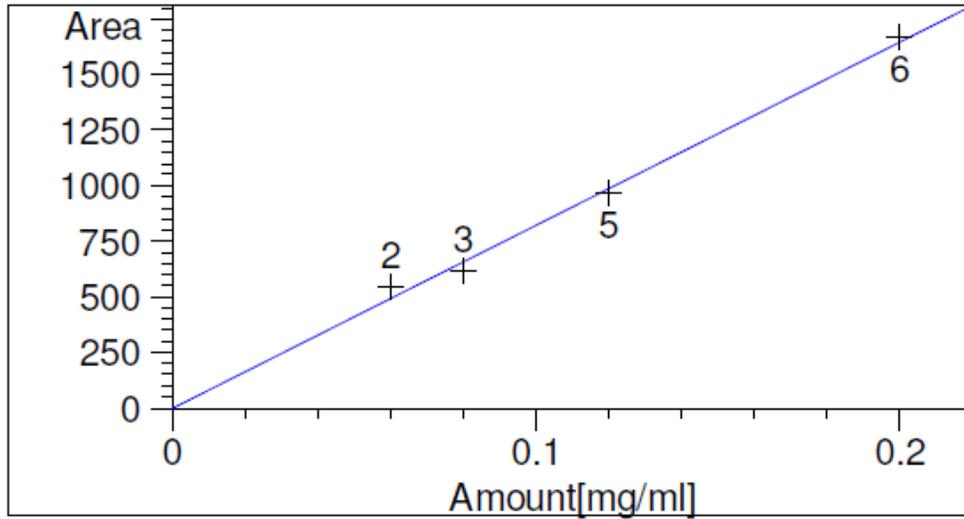
No Entries in table

=====
 Method C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
 Instrument 2 8/22/2016 11:31:42 AM AdeM Page 1 of 2

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
 LIQA/UVG.

Anexo 3. **Curva de calibración de estándar de bixina (E160b)**

=====
Calibration Curves
=====



Bixina at exp. RT: 1.236
VWD1 A, Wavelength=450 nm
Correlation: 0.99937
Residual Std. Dev.: 42.90388
Formula: $y = mx$
m: 8256.03103
x: Amount[mg/ml]
y: Area

=====
Method C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Instrument 2 8/22/2016 11:31:42 AM AdeM Page 2 of 2

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
LIQA/UVG.

Anexo 4. Cromatograma para el tratamiento 1 (pH1.t1.R1)

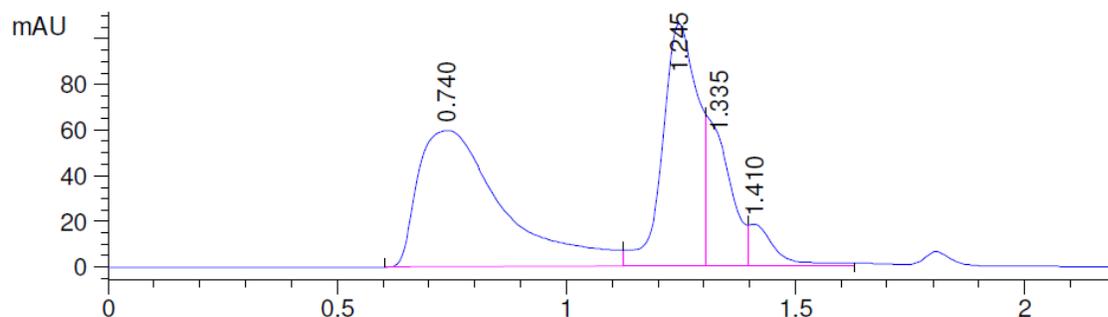
```

=====
Injection Date   : 8/19/2016 5:38:57 PM           Seq. Line   : 27
Sample Name     : T1                             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    : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/22/2016 11:35:08 AM 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 uM

VWD1 A, Wavelength=450 nm (MEGAP\16081929.D)



External Standard Report

```

=====
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	-------------	----------	----------------	----------

1.245	VV	573.92761	1.21124e-4	6.95162e-2	Bixina
-------	----	-----------	------------	------------	--------

Totals : 6.95162e-2

Results obtained with enhanced integrator!

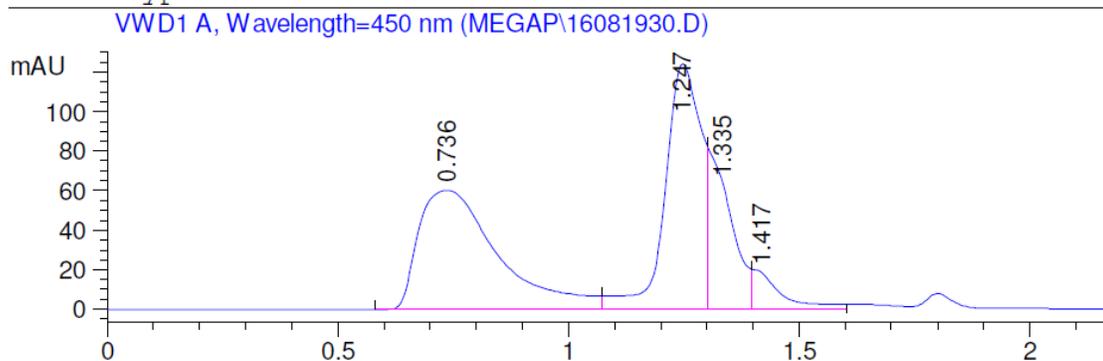
*** End of Report ***

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
 LIQA/UVG.

Anexo 5. Cromatograma para el tratamiento 4 (t1.pH2.R1)

```

=====
Injection Date      : 8/19/2016 5:45:16 PM          Seq. Line   : 28
Sample Name        : T4                          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      : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed      : 8/22/2016 11:35:08 AM 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 uM
=====
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By          : Signal
Calib. Data Modified : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	-------------	----------	----------------	----------

1.247	VV	671.31079	1.21124e-4	8.13116e-2	Bixina
-------	----	-----------	------------	------------	--------

Totals : 8.13116e-2

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

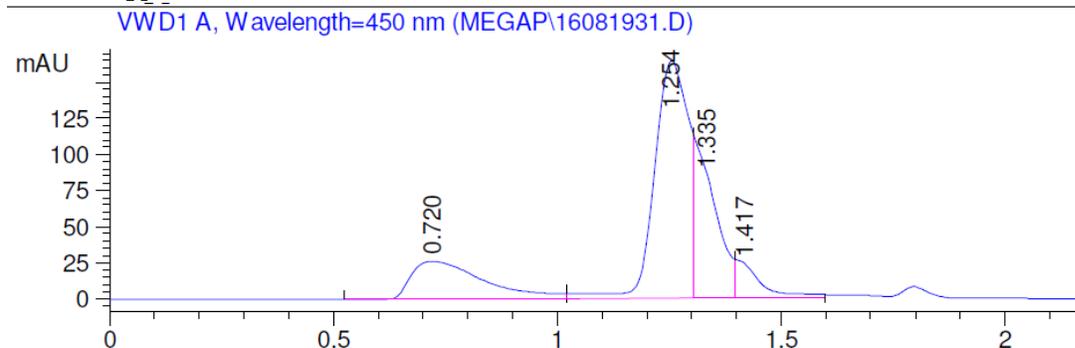
Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
LIQA/UVG.

Anexo 6. Cromatograma para el tratamiento 7 (t1.pH3.R1)

```

=====
Injection Date   : 8/19/2016 5:51:38 PM           Seq. Line   : 29
Sample Name     : T7                           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   : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed   : 8/22/2016 11:35:08 AM 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 : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	-------------	----------	----------------	----------

1.254	VV	875.76532	1.21124e-4	1.06076e-1	Bixina
-------	----	-----------	------------	------------	--------

Totals : 1.06076e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
LIQA/UVG.

Anexo 7. Cromatograma para el tratamiento 10 (t2.pH1.R1)

```

=====
Injection Date   : 8/19/2016 5:58:00 PM      Seq. Line   : 30
Sample Name     : T10                      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    : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/22/2016 11:35:08 AM by AdeM
  
```

(modified after loading)

Metodo para analisis de bixina por HPLC.

Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.

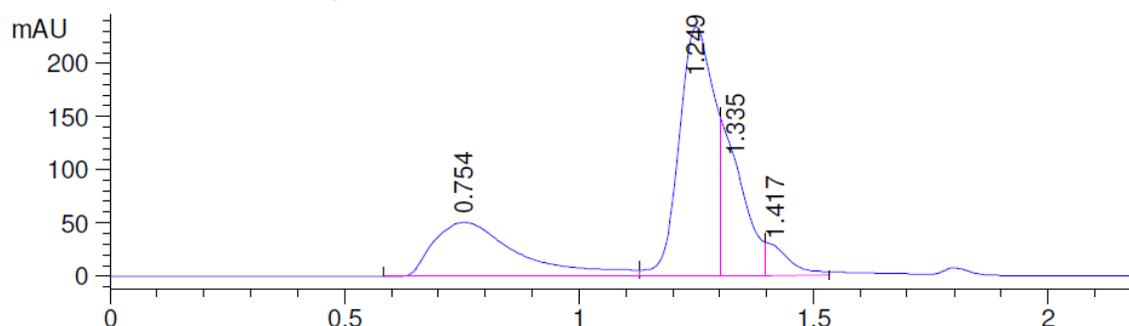
Fase movil ACN: Agua (20:80)

Flujo 0.5 ml/min

Longitud de onda 450 nm

Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM

VWD1 A, Wavelength=450 nm (MEGAP\16081932.D)



External Standard Report

```

=====
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	--------------	----------	----------------	----------

1.249	VV	1188.28235	1.21124e-4	1.43929e-1	Bixina
-------	----	------------	------------	------------	--------

Totals : 1.43929e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
LIQA/UVG.

Anexo 8. Cromatograma para el tratamiento 13 (t2.pH2.R1)

```

=====
Injection Date   : 8/19/2016 6:04:26 PM           Seq. Line   : 31
Sample Name     : T13                           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    : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/22/2016 11:35:08 AM by AdeM
  
```

(modified after loading)

Metodo para analisis de bixina por HPLC.

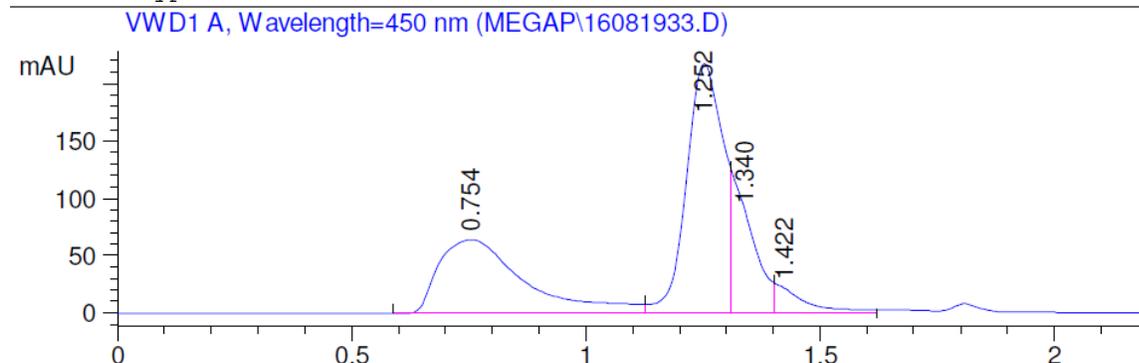
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.

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 : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	------------	----------	----------------	----------

1.252	VV	1179.10144	1.21124e-4	1.42817e-1	Bixina
-------	----	------------	------------	------------	--------

Totals : 1.42817e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
LIQA/UVG.

Anexo 9. Cromatograma para el tratamiento 16 (t2.pH3.R1)

```

=====
Injection Date   : 8/19/2016 6:10:48 PM           Seq. Line   : 32
Sample Name     : T16                           Location    : Vial 32
Acq. Operator   : AdeM                          Inj         : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                     Inj Volume  : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/22/2016 11:35:08 AM by AdeM
  
```

(modified after loading)

Metodo para analisis de bixina por HPLC.

Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.

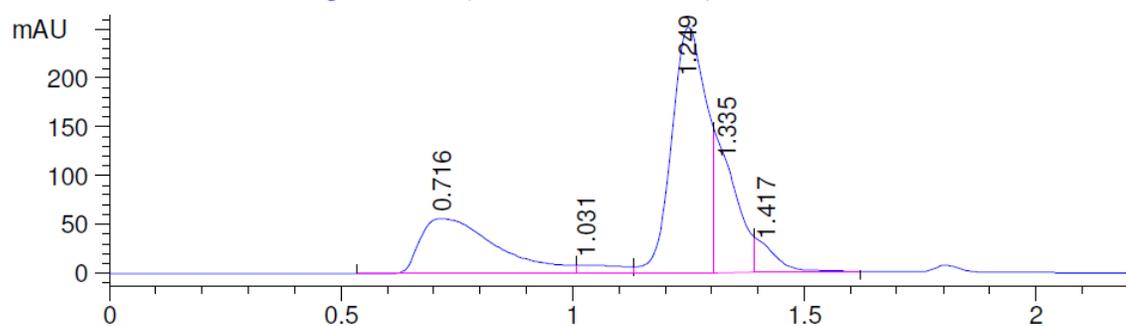
Fase movil ACN: Agua (20:80)

Flujo 0.5 ml/min

Longitud de onda 450 nm

Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM

VWD1 A, Wavelength=450 nm (MEGAP\16081934.D)



External Standard Report

```

=====
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	-------------	----------	----------------	----------

1.249	VV	1310.53442	1.21124e-4	1.58737e-1	Bixina
-------	----	------------	------------	------------	--------

Totals : 1.58737e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
LIQA/UVG.

Anexo 10. Cromatograma para el tratamiento 19 (t3.pH1.R1)

```

=====
Injection Date   : 8/19/2016 6:17:09 PM           Seq. Line   : 33
Sample Name     : T19                           Location    : Vial 33
Acq. Operator   : AdeM                          Inj         : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                    Inj Volume  : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/22/2016 11:35:08 AM by AdeM
(modified after loading)
  
```

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
 Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
 Universidad del Valle de Guatemala.

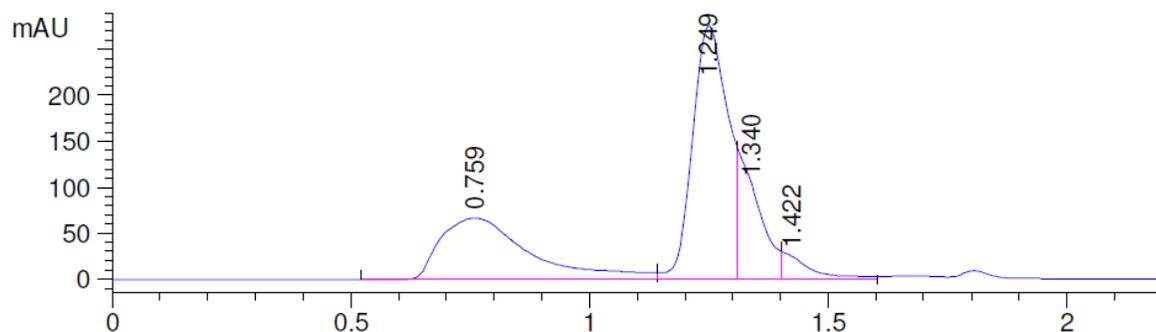
Fase movil ACN: Agua (20:80)

Flujo 0.5 ml/min

Longitud de onda 450 nm

Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 uM

VWD1 A, Wavelength=450 nm (MEGAP\16081935.D)



External Standard Report

```

=====
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	-------------	----------	----------------	----------

1.249	VV	1416.58276	1.21124e-4	1.71582e-1	Bixina
-------	----	------------	------------	------------	--------

Totals : 1.71582e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
 LIQA/UVG.

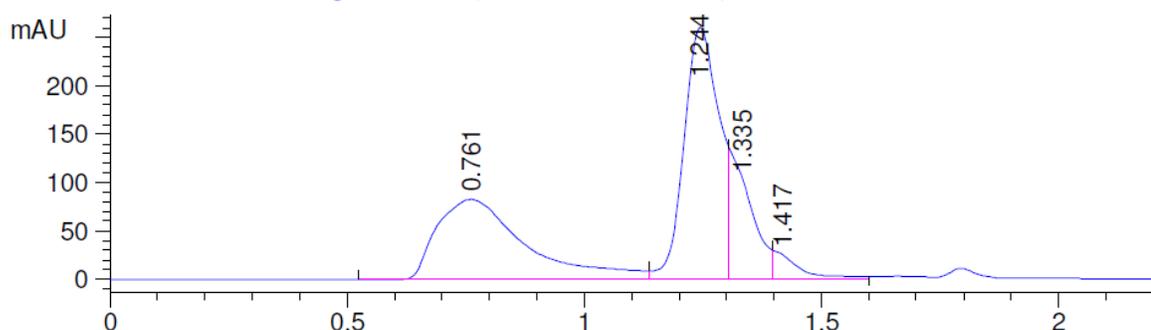
Anexo 11. Cromatograma para el tratamiento 22 (t3.pH2.R1)

```

=====
Injection Date   : 8/19/2016 6:23:33 PM          Seq. Line   : 34
Sample Name     : T22                          Location    : Vial 34
Acq. Operator   : AdeM                        Inj         : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                  Inj Volume  : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/22/2016 11:35:08 AM 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 uM

VWD1 A, Wavelength=450 nm (MEGAP\16081936.D)



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	--------------	----------	----------------	----------

1.244	VV	1345.03369	1.21124e-4	1.62915e-1	Bixina
-------	----	------------	------------	------------	--------

Totals : 1.62915e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
 LIQA/UVG.

Anexo 12. Cromatograma para el tratamiento 25 (t3.pH3.R1)

```

=====
Injection Date   : 8/19/2016 6:29:58 PM           Seq. Line   : 35
Sample Name     : T25                           Location    : Vial 35
Acq. Operator   : AdeM                          Inj         : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                    Inj Volume  : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/19/2016 1:01:37 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BIXINA.M
Last changed    : 8/22/2016 11:35:08 AM by AdeM
  
```

(modified after loading)

Metodo para analisis de bixina por HPLC.
 Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
 Universidad del Valle de Guatemala.

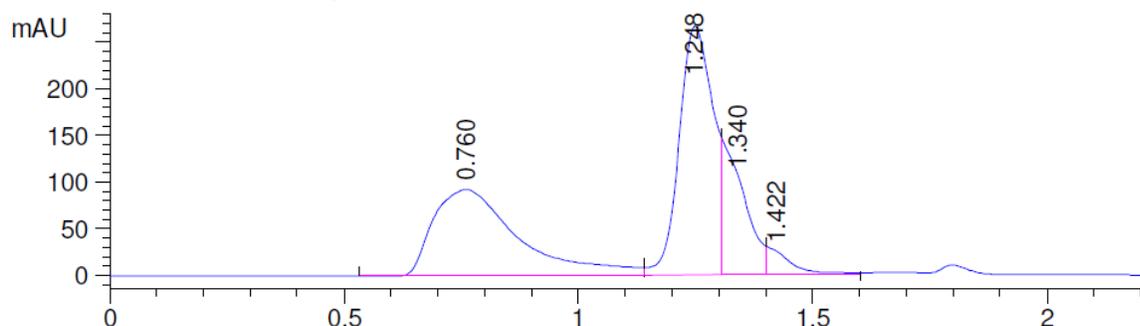
Fase movil ACN: Agua (20:80)

Flujo 0.5 ml/min

Longitud de onda 450 nm

Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µM

VWD1 A, Wavelength=450 nm (MEGAP\16081937.D)



External Standard Report

```

=====
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : Monday, August 22, 2016 11:33:00 AM
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
---------------	------	------------	----------	----------------	----------

1.248	VV	1338.11780	1.21124e-4	1.62078e-1	Bixina
-------	----	------------	------------	------------	--------

Totals : 1.62078e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: datos experimentales, Instituto de Investigaciones, CIB/Departamento de Química,
 LIQA/UVG.