



Esta obra está bajo una [Licencia
Creative Commons Atribución-
NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú.](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/)

Vea una copia de esta licencia en
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN PARA TESIS A
NIVEL DE PREGRADO 2017



**Extracción de bixina de tres variedades de achiote (*Bixa orellana L.*)
utilizando tres solventes**

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTOR:

Sandra Sánchez Sánchez

ASESOR:

Ing. Mg. Juan José Salazar Díaz

Tarapoto – Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN PARA TESIS A
NIVEL DE PREGRADO 2017



**Extracción de bixina de tres variedades de achiote (*Bixa orellana L.*)
utilizando tres solventes**

AUTOR:

Sandra Sánchez Sánchez

Sustentada y aprobada el 05 de agosto del 2019, por los siguientes jurados:

.....
Ing. Dr. Thony Aree Saavedra

Presidente

.....
Ing. Dr. Jaime Guillermo Guerrero Marina

Secretario

.....
Ing. Dra. Mari Luz Medina Vivanco

Miembro

.....
Ing. Mg. Juan José Salazar Díaz

Asesor

Declaratoria de autenticidad

Sandra Sánchez Sánchez, con DNI N° **45807655**, bachiller de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, autor de la tesis que lleva como título: “**Extracción de bixina de tres variedades de achiote (*Bixa orellana L.*) utilizando tres solventes**”

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencia de las fuentes bibliográficas consultadas.
3. Toda la información que contiene la tesis no ha sido auto plagiada.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados ni copiados, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por lo antes mencionado, asumo bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndome a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 05 de agosto del 2019.




.....
Bach. Sandra Sánchez Sánchez

DNI N° 45807655

Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres:	Sánchez Sánchez, Sandra	
Código de alumno :	062131	Teléfono: 956863244
Correo electrónico :	Sansan3338@gmail.com	DNI: 45807655

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de:	Ingeniería Agroindustrial
Escuela Profesional de:	Ingeniería Agroindustrial

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(X)	Trabajo de investigación	()
Trabajo de suficiencia profesional	()		

4. Datos del Trabajo de investigación

Título:	Extracción de bixina de tres variedades de achote (Bixa orellana L.) utilizando tres solventes.
Año de publicación:	2019

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(X)	Embargo	()
Acceso restringido **	()		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI “**Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA**”.



Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

28 / 10 / 19



Firma del Responsable de Repositorio
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso
Abierto de la UNSM – T.

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

** **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a los forjadores del gran
hogar donde crecí: mi amada familia.
A mi ejemplar y extraordinaria madre Lilian
Nancy, a mis queridas hermanas Nancy y
Vanessa, a mis adorados abuelos Marthita y Erasmito.
Cinco hermosos humanos cuyas virtudes y
lecciones de vida me llevan a
admirarlos cada vez más.

Agradecimiento

Mi agradecimiento de corazón es para mi amada madre Lilian Nancy que con sus actos cotidianos me enseñó a valorar la vida, a encontrar lo positivo aún en la adversidad y a ser perseverante hasta alcanzar mis metas personales y profesionales, apoyándome siempre de manera incondicional e invaluable. Mediante este escrito quiero reconocer y destacar sus esfuerzos por sacar adelante a la familia. Sus buenas obras la enaltecen.

A mis extraordinarias hermanas, Nancy y Vanessa, quienes con su alegría, compañía y apoyo moral se convirtieron en dos grandes pilares que sustentan mi alma.

A mis inolvidables abuelos, Marthita y Erasmito, que hoy me observan desde el cielo, pero que durante su estancia terrenal contribuyeron a mi esencia permitiéndome conocer la felicidad plena. Cada consejo suyo aún es de utilidad en el día a día. Gracias por tanto, sus enseñanzas los convirtieron en seres memorables.

A mi amado Mario, cuyo acompañamiento en el camino hacia mi formación profesional me permitió superar muchas vallas y tener la fuerza para continuar.

A mi ilustre asesor de tesis, Ing. Mg. Juan José Salazar Díaz, mi maestro en la Facultad de Ingeniería Agroindustrial y destacado profesional que creyó en este proyecto, apoyándome en todo el proceso y alentándome a que concluyera esta investigación.

Al Ing. Richer Garay Montes por su continuo apoyo en el Laboratorio de Investigación durante la ejecución de mis experimentos.

A mis queridos compañeros y amigos, Maylin, Carlitos, Hanower y Darwin-que está en cielo- por su apoyo en momentos cruciales.

Y a mis tan esperados y amados sobrinos, Gabriel, Alessio e Ivanka, por su amor tan puro y miradas sinceras, ellos representan la fuerza, alegría y esperanza en un mejor mañana.

Índice general

Introducción.....	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. El Achiote (<i>Bixa orellana L.</i>)	3
1.1.1. Origen y distribución geográfica.....	3
1.1.2. Clasificación taxonómica	3
1.1.3. Condiciones edafoclimáticas.....	3
1.1.4. Descripción botánica.....	4
1.1.5. Caracterización química y nutricional de <i>Bixa orellana L.</i>	9
1.2. Bixina.....	11
1.2.1. Fórmula estructural	11
1.2.2. Solubilidad de la bixina.....	11
1.2.3. Estabilidad de la bixina.	12
1.2.4. Efecto del pH en la bixina.	12
1.3. Determinación de bixina.	12
1.3.1. Extracción de bixina.....	12
1.3.2. Cuantificación de bixina.	13
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Lugar de Ejecución	15
2.2. Materia Prima	15
2.3. Diseño Experimental.....	15
2.4. Materiales y Métodos.....	17
2.4.1. Materiales.....	17
2.4.2. Metodología experimental.	18
2.4.3. Análisis fisicoquímicos.	22
3.1. Análisis Físico del Fruto del Achiote (<i>Bixa orellana L.</i>).....	23
3.2. Rendimiento de los Extractos de Achiote.....	26
3.3. Concentración de Bixina.....	29
3.4. Análisis Fisicoquímicos en <i>Bixa orellana L.</i>	32
CONCLUSIONES.....	36
RECOMENDACIONES	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	40

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Clasificación Taxonómica del Achiote.</i>	3
Tabla 2. <i>Número de semillas por cápsula</i>	8
Tabla 3. <i>Caracterización de la materia prima por INIA (2009).</i>	9
Tabla 4. <i>Componentes de la Semilla del Achiote.</i>	10
Tabla 5. <i>Composición Química de la Semilla del Achiote.</i>	10
Tabla 6. <i>Composición Nutricional de la Semilla del Achiote.</i>	10
Tabla 7. <i>Composición de Extractos Brutos de Pigmento del Achiote</i>	11
Tabla 8. <i>El factor (a) variedades con niveles</i>	16
Tabla 9. <i>El factor (b) soluciones extractantes con niveles</i>	16
Tabla 10. <i>Combinación de los 9 tratamientos experimentales (por triplicado).</i>	16
Tabla 11. <i>Características de la materia prima.</i>	23
Tabla 12. <i>Número de semillas por cápsula de variedades de achiote en 1kg de muestra</i> ..	25
Tabla 13. <i>Residuos e impurezas en el achiote (en 1kg de frutos de achiote)</i>	26
Tabla 14. <i>Rendimiento extractivo del colorante natural de achiote a escala laboratorio</i> ..	27
Tabla 15. <i>ANVA de los datos procesados de rendimiento de la extracción.</i>	29
Tabla 16. <i>Concentraciones de bixina determinadas por UHPLC</i>	29
Tabla 17. <i>ANVA de los datos procesados de bixina.</i>	31
Tabla 18. <i>Porcentaje de humedad de las semillas de achiote</i>	33
Tabla 19. <i>ANVA de los datos procesados de humedad.</i>	33
Tabla 20. <i>Análisis de cenizas presentes en los extractos de achiote.</i>	34
Tabla 21. <i>ANVA de los datos procesados de cenizas</i>	34
Tabla 22. <i>Resumen de resultados obtenidos</i>	35

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Achiote con Cápsulas Color Rojo (Narciso, 2012).	6
<i>Figura 2.</i> Achiote con Cápsulas Color Verde (Narciso, 2012).	6
<i>Figura 3.</i> Achiote con Cápsulas Color Amarillo (Narciso, 2012).....	6
<i>Figura 4.</i> Achiote con Cápsulas Color Café (Narciso, 2012).	7
<i>Figura 5.</i> Achiote con Cápsulas sin Setas (Narciso, 2012).	7
<i>Figura 6.</i> Achiote con Cápsulas Amarillas con Pocas Setas (Narciso, 2012).....	7
<i>Figura 7.</i> Fórmula estructural de la bixina	11
<i>Figura 8.</i> Cromatograma de bixina obtenido por HPLC (Tocchini&Mercadante, 2001)..	14
<i>Figura 9.</i> Diagrama de flujo para la obtención de extractos de achiote	18
<i>Figura 10.</i> Diagrama de flujo de la cuantificación de bixina por UHPLC.	21
<i>Figura 11.</i> Diagrama de flujo para la preparación del estándar.	22
<i>Figura 12.</i> Reconocimiento y caracterización de las tres variedades de achiote.	24
<i>Figura 13.</i> Semillas de achiote según variedad.	24
<i>Figura 14.</i> Extractos: con etanol de 40° (1), etanol de 80° (2), con KOH al 2% (3).	26
<i>Figura 15.</i> Gráfico de superficie de respuesta del rendimiento de extracción (%).	28
<i>Figura 16.</i> Gráfico de superficie de respuesta de la concentración de bixina.....	30
<i>Figura 17.</i> Cromatograma obtenido por UHPLC, de extractos brutos de pigmentos.....	32

Listado de siglas o abreviaturas

ANVA	Análisis de la varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DCA	Diseño Completamente Aleatorizado
KOH	Hidróxido de potasio
OMS	Organización Mundial de la Salud
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
FDCA	Federal Food Drug and Cosmetic

Resumen

La bixina es el pigmento de mayor presencia en el achiote (*Bixa orellana L.*) y se emplea en la industria alimentaria, textil, cosmética y farmacéutica. Esta investigación estuvo orientada a la obtención de bixina empleando tres soluciones extractoras. La metodología empleada tuvo tres etapas: en la primera etapa se determinó el rendimiento de los extractos brutos de pigmentos de las semillas de achiote con etanol de 40°, etanol de 80° y KOH al 2%; en la segunda etapa se determinó el rendimiento de bixina en *Bixa orellana L.* según las soluciones extractantes utilizadas para cada una de las tres variedades de achiote seleccionadas y en la tercera etapa se determinó la composición físico-química del extracto de achiote. Los resultados indican que de las tres variedades de semillas de achiote investigadas (verde, amarilla y roja), el mayor rendimiento de los extractos brutos de pigmentos fue de 7,8%, realizada a la variedad verde con hidróxido de potasio al 2%. La mayor concentración de bixina determinada por UHPLC fue de 0,59% *p/p* como resultado de la interacción de la variedad verde con etanol de 80°. La variedad verde presentó el mayor porcentaje de humedad en sus semillas, con 44,77 % y la mayor cantidad de cenizas presentes en el extracto de achiote fue de 6,54% *p/p*, resultado de la interacción variedad verde-etanol 40°.

Palabras clave: achiote, *Bixa orellana L.*, rendimiento, soluciones extractantes, fisicoquímico.

Abstract

Bixin is the pigment with the highest presence in achiote (*Bixa orellana* L.) and is used in the food, textile, cosmetic and pharmaceutical industry. This research was aimed at obtaining bixin using three extraction solutions. The methodology used had three stages: in the first stage the yield of the crude pigment extracts of the annatto seeds with 40 ° ethanol, 80 ° ethanol and 2% KOH was determined; in the second stage, the yield of bixin in *Bixa orellana* L. was determined according to the extractant solutions used for each of the three selected annatto varieties and in the third stage the physicochemical composition of the annatto extract was determined. The results indicate that of the three varieties of annatto seeds investigated (green, yellow and red), the highest yield of crude pigment extracts was 7.8%, made to the green variety with 2% potassium hydroxide. The highest concentration of bixin determined by UHPLC was 0,59% w / w as a result of the interaction of the green variety with 80 ° ethanol. The green variety had the highest percentage of moisture in its seeds, with 44,77% and the highest amount of ashes present in the achiote extract was 6,54% w / w, the result of the 40 ° green-ethanol variety interaction.

Keywords: achiote, *Bixa orellana* L., yield, extractant solutions, physicochemical.



Introducción

La tendencia actual de emplear colorantes de origen natural para obtener productos que sean idóneos visualmente, más apetecibles y reemplazar las pérdidas de color sufridos durante el proceso de elaboración, incentiva a la búsqueda de nuevos y mejores aditivos alimentarios que no incidan en el deterioro de la salud de los consumidores (Imbarex, 2017). Los extractos brutos de pigmentos extraídos a partir de la semilla del achiote son una excelente alternativa para satisfacer esta demanda, por ser uno de los pocos colorantes autorizados para utilizarse en la alimentación por la Organización Mundial para la Salud (OMS), dado que no son tóxicos, son insípidos y no alteran el sabor de los alimentos (González, 1992). Esto lo convierte en uno de los colorantes más solicitados a nivel mundial.

El pigmento mayoritario presente en el achiote (*Bixa orellana L.*) se denomina bixina y se emplea en diversas industrias para dar tonalidades anaranjadas y rojizas a productos cárnicos, lácticos, de confitería y panadería (Bio derivados, s.f.). El uso de este colorante natural ayuda para la recuperación de la confianza en los aditivos y el interés de los consumidores que siempre están buscando opciones más saludables (Eroski consumer, 2008).

En los próximos años, Perú podría pasar a liderar el mercado de colorantes naturales del mundo, debido a que es el tercer proveedor de achiote en el mundo, por debajo de Brasil y África. Con la diferencia de que la semilla del achiote peruano posee una concentración de bixina del 3%, mientras que en la semilla brasileña esta es del 6% (Ysla, 2016); cifras que motivaron a realizar esta investigación con la finalidad de determinar la cantidad de extractos brutos de pigmentos presentes en el achiote, teniendo como materia prima las semillas de las tres variedades (verde, amarilla y roja). Estas fueron cosechadas de plantas nativas en el distrito de Lamas y se utilizaron para la obtención de los extractos a evaluar en esta investigación financiada por el Instituto de Investigación y Desarrollo de la Universidad Nacional de San Martín.

Este trabajo tuvo por objetivo general:

- Determinar el mejor rendimiento de extracción de bixina por soluciones extractantes en tres variedades de achiote (*Bixa orellana L.*) – verde, amarillo y rojo – del distrito de Lamas.

Para lograrlo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el rendimiento de los extractos brutos de pigmentos de achiote (*Bixa orellana L.*), mediante tres soluciones extractantes (etanol de 40°, etanol de 80° y KOH al 2%).
- Determinar el rendimiento de bixina en el achiote (*Bixa orellana L.*), según las soluciones extractantes (etanol de 40°, etanol de 80° y KOH al 2%) utilizadas para cada una de las tres variedades.
- Determinar la composición físico-química del extracto bruto de pigmento del achiote (*Bixa orellana L.*).

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. El Achiote (*Bixa orellana* L.)

1.1.1. Origen y distribución geográfica

El achiote es nativo de América Tropical, donde su posible origen es la cuenca amazónica, ya que en ese lugar se encuentran creciendo silvestres otras especies del género (Arce, 1999).

En el Perú, Quillabamba en Cusco y Puerto Bermúdez en Pasco cultivan el achiote con fines de exportación. En la Región San Martín se cultiva la variedad roja (Diario Gestión, 2015).

En la provincia de Lamas, distrito de Lamas es posible encontrar algunas variedades por color pero de forma silvestre.

1.1.2. Clasificación taxonómica

El achiote pertenece a la familia Bixaceae y género *Bixa*. La clasificación botánica del achiote se presenta a continuación. Ver Tabla 1.

Tabla 1

Clasificación Taxonómica del Achiote.

División	Spermatophyta
Sub-división	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Sub-clase	Dialipetala
Orden	Guttiferales
Familia	Bixaceae
Género	<i>Bixa</i>
Especie	<i>Orellana</i> L.

Fuente: (Figuerola, 1995).

1.1.3. Condiciones edafoclimáticas

Según la propuesta de Zonificación Ecológica y Económica de San Martín 2005, mencionada por Saavedra (2015), el distrito de Lamas “posee un clima ligero a

moderadamente húmedo, semi-cálido, con baja concentración térmica en verano, con una precipitación de 1469 mm/año y temperatura promedio de 25,5°C, con una máxima de 38 °C y mínima de 12,5 °C”.

Según lo mencionado por Onern (1983) como se citó en Saavedra (2015) el achiote crece a base de especies permanentes propias del ecosistema tropical de la zona, por esto el achiote se considera como un cultivo permanente.

1.1.4. Descripción botánica

El achiote, es llamado por diferentes nombres, según el país en el que crece. Conocer este dato sirve para buscar información sobre manejo, procesamiento o comercialización y resultados de investigaciones.

Estos nombres con: Acose, Achote, Achiolt, Achihuite, Achuete, Aisiri, Analte, Anate, Annatta, Annatto, Annetto, Annotta, Arnota, atsuwete, Aplopplas, Beningun-ki, Beni-No-Ki, Bija, Bijo, Bijol, Bixa, Biza,Bizo, Cacicuto, Diteque, Eroya Chamgarica, Chancaguarica, Changuarica, Foucou, Jafara, Kham thai, Ksujmba- Kelling, Katsha, Kisafa, Krikra, Kuswe, Latkhan, Lipstick tree, Onoto, Orellana, Orlean, Orleana, Orleanstrauch, Oroya, Orocuaxiote, Permacoa, Pumacoa, Rocou, Rocouyer, Rucu, Ruku, Sendri, Shambu, So, Shong Guo, Urucu, Urucum, Urucuicero, Uruku. El nombre común en nuestro medio es achiote (Bonilla, 2009).

Variedades.

El achiote posee un alto porcentaje de polinización cruzada, esta se acentúa al propagarse por semilla, expresándose posteriormente en variedad de formas, tamaño y coloración de las cápsulas y plantas. Es un cultivo con una amplia variabilidad genética (Bonilla, 2009).

Según Gonzáles (2011), la descripción de la especie reporta lo siguiente:

- Hojas.- Simples, alternas, ovadas, tiene de 8 a 10 cm. de largo y de 4 a 15 cm. de ancho, con un ápice acuminado, disminuyendo gradualmente y la base truncada es algo acorazonada, el color del envés es algo plateada especialmente cuando maduras, las mismas que se tornan algo coriáceas.
- Flores.- Son panículas terminales, la floración es escalonada, la apertura de las flores ocurren primero en la posición superior y luego se abren de la parte inferior. Las flores tienen 5 sépalos, caducos, rojizos o blancos, ovales que miden 2,4 a 2,8 cm. de largo en

el ápice: el color puede variar desde blanco hasta rosado o morado, el tamaño es variado, el bastón floral es globuloso, dando la impresión de estar recubierto por sucesivas capas (sépalos). Las flores poseen 5 pétalos, redondos o de forma ovalada de 1 a 2 cm. de largo, rosado o blancos según el cultivar. Los estambres son pequeños con pedúnculos cortos muy numerosos (350 -400), dispuestos alrededor del pistilo, la antera contiene 8 sacos embrionarios que producen abundante polen. El pistilo tiene un estigma en forma de boca abierta y el estilo es alargado, erecto y llega a tener la forma de ‘S’ al madurar, termina en un ovario de tipo elipsoidal supero recubierto por muchos pelos glandulares. El ovario consta de 2 valvas, ocasionalmente 3, a cuyos costados en la placenta alberga numerosos óvulos. Las flores son hermafroditas, regulares, bisexuales y actinomorfcos.

- Fruto.- Es una cápsula dehiscente, hemisférica, ovoide, cónica, cubierta por espinas largas y suaves en la mayoría de los cultivares, lisa en algunas mutantes y su color puede ser rojo, café, verde o amarillo cuando está maduro y se abren en dos valvas, las paredes son delgadas y en el lado interno de cada valva hay una placenta, que se prolonga en una membrana blanca adherida en parte a la pared del fruto, presenta placentación parietal laminar. Cada placenta lleva numerosas semillas recubierta por una membrana fina y blancuzca, debajo de esta hay una capa de parénquima acuoso anaranjado brillante o rojizo amarillento. Se puede encontrar frutos trivalvares, lo cual puede ser una característica beneficiosa para aumentar la capacidad de producción. Del arilo de la semilla se obtiene la bixina que viene a ser un carotenoide, que es muy utilizado en industria alimentaria.

Narciso (2012) refiere que las diferentes variedades de achiote se distinguen por las características fenotípicas que se expresan al crecer las plantas. Estas se distinguen en los diferentes colores de las cúpulas que pueden ser 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. Véase las figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Variedades de achiote en cuanto a color:



Figura 1. Achiote con Cápsulas Color Rojo (Narciso, 2012).



Figura 2. Achiote con Cápsulas Color Verde (Narciso, 2012).



Figura 3. Achiote con Cápsulas Color Amarillo (Narciso, 2012).

Variedades de achiote en cuanto a color:



Figura 4. Achiote con Cápsulas Color Café (Narciso, 2012).



Figura 5. Achiote con Cápsulas sin Setas (Narciso, 2012).



Figura 6. Achiote con Pocas Setas (Narciso, 2012).

La Amazonia Peruana contiene una gran diversidad genética de la especie *Bixa orellana* L. referida a:

- Hábito de crecimiento (arbustos y árboles).
- Coloración del tallo (gris, anaranjado y marrón).
- Color de las hojas (verdes con diferentes tonalidades y violetas).
- Color de las flores (blancas y violetas con diferentes tonalidades).
- Color de los frutos (verdes con diferentes tonalidades; amarillo con diferentes tonalidades, anaranjado, rojo con diferentes tonalidades, marrón y negro).
- Forma de los frutos (ovoide, redondo elíptico y cónico).
- Espinosidad de los frutos (sin espinas, muy baja, baja, alta y muy alta espinosidad).
- Longitud de las espinas (muy cortas, cortas, largas y muy largas); número de semillas por fruto (Gonzáles, 1992).

El achiote presenta alta variabilidad y para seleccionar las mejores plantas es necesario tomar en cuenta los índices de rendimiento como son: el número de semillas por cápsula, la dehiscencia, el contenido de bixina (Bonilla, 2009).

CENTA (2009) e INIA (2009) mencionan el número de semillas por cápsula encontradas en sus caracterizaciones, Ver Tabla 2:

Tabla 2

Número de semillas por cápsula

Color de cápsula	CENTA (2009)	INIA (2009)
Verde		40
Amarillo	20-55	60
Rojo		35

INIA (2009) menciona que según los ecotipos, líneas o variedades el fruto inmaduro puede presentar diferentes tonalidades de verde, rojo o anaranjado y entre 40 a 60 semillas por cápsula; por tanto, se consideró seleccionar las variedades verde, amarillo y rojo cuya cápsula fuese dehiscente, siendo esta característica un índice de rendimiento. Sin embargo, las variedades por color seleccionadas por dicho instituto para conservar en su Banco de Germoplasma no presentan características similares en cuanto a forma y dehiscencia de las cápsulas caracterizadas en esta investigación. Evaluaron semillas de diferente origen,

nombrando a la variedad verde como verde amarillento; a la variedad amarilla, amarillo dorado y a la variedad roja, verde- rojizo. Ver Tabla 3.

Tabla 3

Caracterización de la materia prima por INIA (2009).

Accesiones promisorias de achiote, por INIA (2009)			
Características	Accesión PER001115	Accesión PER001119	Accesión PER001114
Procedencia	Chanchamayo	Iquitos	Costa Rica
Forma de la cápsula	Elíptica	Hemisférica	Ovoide
Color de la cápsula	Verde amarillento	Amarillo dorado	Verde rojizo
Color de las semillas	Rojo	Rojo	Rojo
Dehiscencia	Indehiscente	Dehiscente	Indehiscente

Usos

Según INIA (2009) este cultivo es utilizado desde tiempos remotos por nativos del Amazonas como tinte para la piel, lo cual, además del valor estético, los protege de los rayos del sol y de las picaduras de insectos. Los Asháninkas inician fuego por fricción a partir de los tallos secos pequeños, mientras que los nativos Amahuacas, los usan para confeccionar las puntas de sus flechas. La madera es empleada en trabajos de carpintería. El uso medicinal del achiote es amplio. Las semillas poseen propiedades estimulantes y digestivas, la raíz en decocción se usa contra la malaria y el asma. Se elaboran preparados a base de las hojas contra los malestares de garganta, afecciones respiratorias, dolores renales, inflamaciones dérmicas y vaginales, fiebre, hipertensión, vómitos sanguíneos, diarrea, hemorroides, prostatitis, angina, cefalalgia, dolores renales, infecciones de la piel y conjuntivitis. El colorante bixina es empleado en la industria de alimentos, así como para la elaboración de cosméticos, pinturas, ceras y en trabajos de artesanía. También como alimento para aves. Sus semillas son consumidas como condimento en platos típicos.

1.1.5. Caracterización química y nutricional de *Bixa orellana* L.

Los componentes de la semilla y del pigmento del achiote se verifican en las Tablas 4, 5, 6 y 7.

Tabla 4*Componentes de la Semilla del Achiote.*

Componente	Porcentaje (%)
Celulosa	40 - 45
Humedad	20 - 28
Pigmentos	4 – 5,5
Azúcares	3,5 – 5,2
Aceite esencial	0,25 – 0,85
Colorante principal	Bixina

Fuente: Figueroa (1995).

Tabla 5*Composición Química de la Semilla del Achiote.*

Composición química (%)	
Humedad	8,00 – 13,00
Proteína	13,00 -14,24
Celulosa	13,80
Carbohidratos totales	39,91
Ceniza	4,50 – 7,97

Fuente: Devia & Saldarriaga (2002).

Tabla 6*Composición Nutricional de la Semilla del Achiote*

Composición (mg/100g)	
Calcio	7,00
Hierro	1,4
Vitamina A	45 mg
Riboflavina	0,2
Niacina	1,46
Tiamina	0,39
Ácido ascórbico	12,50

Fuente: Devia & Saldarriaga (2002).

1.2.3. Estabilidad de la bixina.

La bixina se degrada por la acción de la luz y de altas temperaturas. Sin embargo su estabilidad mejora considerablemente en presencia de bajas concentraciones de oxígeno y por la adición de antioxidantes cuando el colorante se utiliza en productos alimenticios. Es bastante resistente a los ácidos y a los álcalis. No es afectado por metales como el hierro, aluminio y el zinc. Es relativamente estable al congelamiento y a la maceración. En presencia de vitamina C (ácido ascórbico) previene los cambios de sabor en los alimentos y su estabilidad como colorante no se altera. Según el proceso de extracción se puede obtener bixina soluble en agua, soluble en aceite y emulsiones, que se pueden utilizar en una gran diversidad de productos alimenticios, industriales y en cosméticos (Arce, 1990).

1.2.4. Efecto del pH en la bixina.

Al parecer, la concentración de iones hidroxilo de la solución y por consiguiente el pH, influyen en la mayor o menor solubilidad de los pigmentos en las soluciones extractantes, más aún cuando la solubilidad viene dada al ocurrir una reacción de hidrólisis alcalina, también denominada saponificación, donde la bixina (oleosoluble) se transforma en la sal del ácido dicarboxílico denominado norbixina, que es hidrosoluble. Es posible que a concentraciones más elevadas puedan desarrollarse reacciones colaterales que afecten la eficiencia del proceso (García, 2008).

1.3. Determinación de bixina.

Al estudiar al achiote como colorante se suele emplear solo la variedad roja al determinar la cantidad de bixina presente; en esta investigación la experimentación con diversas variedades nos da un panorama más claro de qué variedades de esta planta aprovechar para fines comerciales y también de investigación.

1.3.1. Extracción de bixina.

Extracción con etanol.

Según Montes (1991) y Osborne et al. (1982), mencionados en Rueda (2004), se han realizado extracciones con alcoholes utilizando especialmente etanol y/o metanol, los cuales fundamentalmente extraen los pigmentos de carácter más polar y entre ellos la bixina. Cook en 1932 extrajo con etanol al 80% un material resinoso, fuertemente coloreado que no pudo identificar y lo calificó como como parte integrante de la vitamina A.

Extracción con KOH.

Según Devia & Saldarriaga (2002), las semillas pesadas, se dejan en remojo en la solución alcalina (KOH) por un período de 12 horas. Luego se separa la solución coloreada y las semillas que quedan se mezclan con otra parte de la solución de KOH y se agitan durante un tiempo que se determina experimentalmente. Después de la agitación, las semillas se separan nuevamente, se lavan con solución de KOH y se secan al sol, y las soluciones coloreadas resultantes se mezclan. A esta solución básica se le disminuye el pH con ácido sulfúrico para precipitar el colorante. Así se obtiene una suspensión del colorante, con un pH ácido y un color rojo intenso. De esta mezcla se parte para obtener el colorante en diferentes presentaciones, según la aplicación que se quiere dar, bien sea en polvo o en solución. Para efectos de experimentación en el laboratorio, el proceso continúa hasta obtener el colorante en polvo.

1.3.2. Cuantificación de bixina.

Para la separación de los pigmentos presentes en la pasta de achiote, se realiza extracciones con soluciones. Existen diferentes técnicas de separación de pigmentos, una de ellas consiste en la partición por medio de un sistema de soluciones extractantes, de menor a mayor polaridad pero encontrándose en cada extracto un sinnúmero de compuestos que hace necesaria la posterior utilización de la cromatografía para obtener una buena separación. A pesar del cambio de polaridad, los pigmentos son los mismos que en la placa a menor polaridad, pero las manchas tienen un mayor desplazamiento (Rueda, 2004).

Tocchini & Mercadante (2001) afirmaron que todas las muestras de colorante analizadas en su estudio contenían bixina como el carotenoide mayoritario y la norbixina en menor cantidad. La bixina representa alrededor del 80% de los extractos brutos de pigmentos de la semilla de achiote. Los contenidos de bixina variaron de 154 a 354 mg / 100g. Los contenidos de bixina entre los lotes de la misma marca tuvieron una variación del 3 al 14%, indicando que las industrias poseen un buen control de la materia prima y del proceso. Sin embargo algunas marcas presentaron cerca del doble de bixina que las demás. Estos resultados indican que es necesario que este tipo de producto tenga un patrón de identidad y calidad a seguir por todas las industrias fabricantes. Este autor, además, determinó bixina y norbixina en colorantes por HPLC, este método le llevó alrededor de 30 minutos por cada análisis, en los que hubo una variación de hasta un 100% entre los

niveles de extractos brutos de pigmentos de las diferentes marcas que evaluó. Teniendo como condiciones cromatográficas lo siguiente: columna Spherisorb ODS-2 y acetonitrilo: ácido acético 2% (65:35) como fase móvil con flujo de 1mL / min. Ver Figura 8.

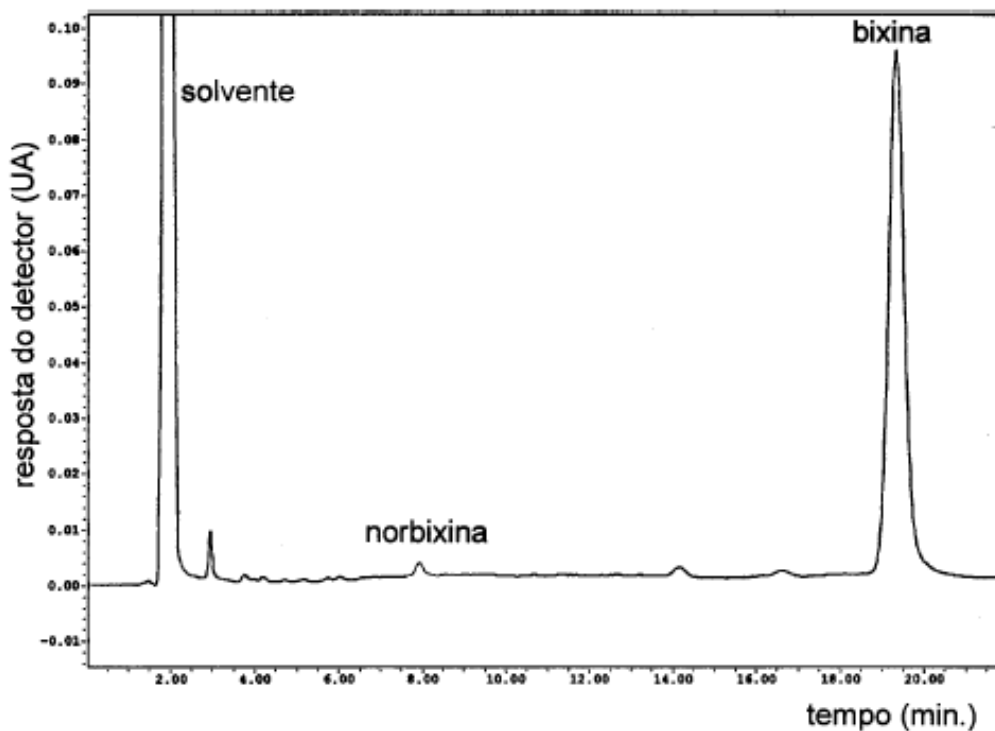


Figura 8. Cromatograma de bixina obtenido por HPLC (Tocchini & Mercadante, 2001)

Respecto a la temperatura de secado, la bixina es muy termolábil y se degrada a temperaturas mayores a 78°C. El colorante palidece rápidamente al exponerse a la luz solar o al aire, debido a la fácil oxidación en presencia de aire y la degradación en presencia de rayos ultravioleta (Rueda, 2004).

A temperaturas por encima de 60°C la bixina se degrada, disminuyéndose la calidad del colorante y el rendimiento del proceso (Jaramillo, 1992).

La composición de cenizas en el pigmento del achiote oscila entre 5,44 y 6,92 (g/100g) (Devia & Saldarriaga, 2002).

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de Ejecución

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la UNSM, en el distrito de Morales, provincia San Martín, departamento de San Martín.

2.2. Materia Prima

Los frutos de las tres variedades de achiote (*Bixa orellana L.*) se recolectaron según el color de las cápsulas (verde, amarillo y rojo) y teniendo en cuenta su dehiscencia por ser un indicador de rendimiento que permite seleccionar las mejores plantas ante la alta variabilidad genética entre plantas de achiote (Bonilla, 2009). Estas plantas crecieron de forma silvestre en la temporada de noviembre- diciembre en el distrito de Lamas. Los frutos fueron seleccionados y liberados de residuos como tallos y ramas y posteriormente transportados a temperatura ambiente hacia el Laboratorio de Investigación.

2.3. Diseño Experimental

Para el estudio del rendimiento de la extracción de semillas de achiote por soluciones extractantes se utilizó un diseño factorial en DCA (Diseño Experimental Completamente Aleatorizado), teniendo como factores el tipo de la solución extractora (etanol de 40°, etanol de 80° y KOH al 2%), y como materia prima semillas de achiote de tres variedades: verde, amarillo y rojo.

Estos tratamientos se aplicaron en un diseño DCA con arreglo factorial 3 x 3, con tres repeticiones, totalizando 27 ensayos. Siendo las variables dependientes el rendimiento, la humedad, las cenizas y las variables independientes el tipo de solución extractante (etanol de 40°, etanol de 80° y KOH al 2%) y las semillas de achiote de cápsulas de color verde, amarillo y rojo. Considerando las variables variedades y soluciones extractantes ver Tablas 8 y 9.

Tabla 8*El factor (a) variedades con niveles*

Factor	Variedad
a ₁	Verde
a ₂	Amarilla
a ₃	Roja

Tabla 9*El factor (b) soluciones extractantes con niveles*

Factor	Soluciones extractantes
b ₁	Etanol de 40°
b ₂	Etanol de 80°
b ₃	KOH al 2%

El diseño experimental se muestra en la tabla N° 10 muestra 9 tratamientos (T₁-T₉).

El análisis de varianza se realizó utilizando el programa Statistica Versión 12.

Semillas: variedades 3 niveles, soluciones extractantes 3 niveles.

$$3 \times 3 = 9 \text{ tratamientos}$$

Tabla 10*Combinación de los 9 tratamientos experimentales (por triplicado).*

Tratamiento	Variedad	Solución extractora	Repeticiones
T ₁	Verde	Etanol de 40°	3
T ₂	Verde	Etanol de 80°	3
T ₃	Verde	KOH al 2%	3
T ₄	Amarillo	Etanol de 40°	3
T ₅	Amarillo	Etanol de 80°	3
T ₆	Amarillo	KOH al 2%	3
T ₇	Rojo	Etanol de 40°	3
T ₈	Rojo	Etanol de 80°	3
T ₉	Rojo	KOH al 2%	3

2.4. Material y Métodos

2.4.1. Material.

a) De campo

Entre los materiales de campo se utilizaron bolsas de polietileno para la recolección y traslado de los frutos de achioté.

b) Equipos

Agitador vórtex vibrador p/ tubos (J.P SELECTA), agitador magnético con placa máscara (BOECO GERMANY- modelo MSH420), balanza analítica (A&D Weighing-Resolution- modelo GH-200), baño ultrasónico (BRANSON- modelo 3510 DTH), bomba de vacío (VALUE- modelo VE125N), centrífuga (BOECO GERMANY- modelo C-28A), desecador de vacío (SIMAX, modelo CSN), esterilizador de calor seco digital. (MEMMERT- modelo ED080), estufa (MEMMERT- modelo UN55), estufa (POL-EKO- APARATURA SP.J. - modelo SLW115 STD), lámpara ultravioleta (UVP- modelo UVGL-25), mufla (THERMOLYNE 1500 FURNACE - modelo FD1520M-1 240V), potenciómetro (METROHM - modelo 827 pH lab), refrigeradora (SAMSUNG- modelo Twin Cooling), refrigeradora (J. P. SELECTA- modelo TEMFLOW S), sistema de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (THERMOSCIENTIFIC - modelo Ultimate 3000), sistema de agua ultra pura (THERMO SCIENTIFIC- modelo Gen Pure).

c) Materiales de laboratorio

Botella de vidrio, cabeza del filtro de vidrio, embudos de vidrio, espátula cuchara de laboratorio, filtros de 0,22 μm , filtros de membranas, fioles de 10, 25, 100 y 250 ml, guantes de goma, jeringas de 10 ml, micropipetas (10 – 100 μl y 100 – 1000 μl), papel aluminio, papel filtro, papel kraft, pastillas magnéticas, pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml, pinzas de laboratorio, taza de filtro de vidrio, tubos de ensayo de 10 ml, vasos de precipitación de 80 y 100 ml, viales 9mm de 1,5 ml THD, tapa de agujero abierto forrada de PTFE / silicona acanalada de 9 mm verde R.A.M.

d) Reactivos

Acetona para análisis, acetonitrilo para HPLC, acetato de etilo, ácido acético, cloroformo para análisis, diclorometano, etanol de 40°, etanol de 80°, éter de petróleo, KOH al 2%, metanol grado HPLC.

2.4.2. Metodología experimental.

a) Diagrama de flujo para la obtención de extractos de achiote.

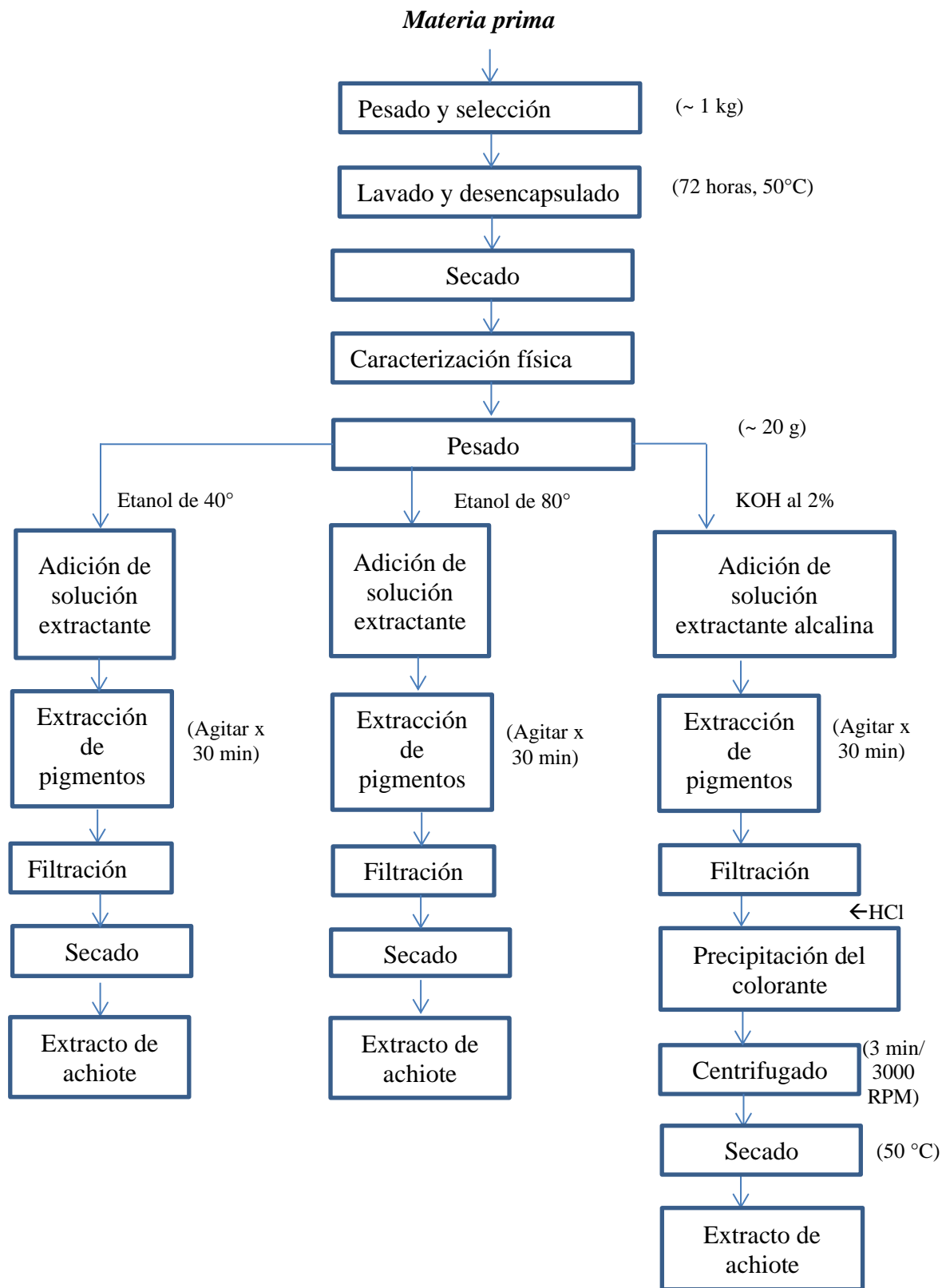


Figura 9. Diagrama de flujo para la obtención de extractos de achiote

b) Proceso de obtención del extracto de achiote.

- **Materia prima.** 3 variedades de achiote según el color de sus cápsulas (verde, amarillo y rojo).
- **Pesado y selección.** Se pesa 1kg de achiote. Se eliminan los frutos de cápsulas negras, húmedas y/o con algún rasgo que denote enfermedad.
- **Lavado y desencapsulado.** Se lavan manualmente los frutos seleccionados y se desencapsulan para obtener las semillas.
- **Secado.** Se realiza el secado de las semillas en una estufa a 50°C, para posteriormente sacar el rendimiento de las semillas.
- **Caracterización física.** Se toma nota de las características del fruto, tales como número de semillas por cápsula según la variedad por color.
- **Pesado.** Se pesa 20g de semillas secas.
- **Adición de solución extractante.** Se prepara 300 ml de solución extractante (etanol de 40° ó etanol de 80°) en un vaso de precipitados. Luego, se adiciona 50 ml de solución extractante preparada a las semillas.
- **Extracción de pigmentos.** Se realizan 6 extracciones, agregando 50 ml de la solución extractante en cada vez, a través de maceración dinámica por 30 minutos realizada con un agitador magnético de placa, hasta que la semilla se quede sin colorante.
- **Filtración.** Se emplea un colador para separar el extracto de las semillas.
- **Secado.** Se retira el exceso de solución extractante por evaporación a 50 °C en una estufa, evaluando hasta peso constante.

Por encima de 60°C la bixina se degrada, disminuyéndose la calidad del colorante y el rendimiento del proceso (Devia & Saldarriaga, 2002).
- **Extracto de achiote.** Una vez obtenido el extracto de achiote se evaluó el rendimiento de la extracción.
- **Adición de solución alcalina.** Se prepara una solución alcalina de KOH al 2% (Devia & Saldarriaga 2002). Se lleva la solución a pH 13 en agua, temperatura de 18°C y adicionándola en porciones de 50 ml.

- **Extracción de pigmentos.** Se realizan 8 extracciones (400 ml), a través de maceración dinámica por 30 minutos realizada con un agitador magnético de placa, hasta que la semilla se quede sin colorante.
- **Filtración.** Se separa el extracto de las semillas con un colador
- **Precipitación del colorante.** Se lleva el extracto coloreado alcalino a pH 2 con ácido sulfúrico al 20% para precipitar el colorante.
- **Centrifugado.** Se retiró el exceso de ácido por centrifugación (3 min por 3000 rpm), lavando el sólido con agua destilada hasta obtener pH 7.
- **Secado.** Realizarlo a temperatura ambiente.
- **Extracto de achiote.** Una vez obtenido el extracto de achiote se evaluó el rendimiento de la extracción.

Según Reyes (2015), existe gran variedad de soluciones extractantes del colorante natural del achiote, entre ellos: agua, aceites, propilenglicol, etanol, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio. Para esta investigación se escogieron como soluciones extractantes: etanol de 40°, etanol de 80° y KOH al 2% debido a que diversos estudios señalaban que el mayor rendimiento de extracción del colorante se da con KOH y también para contrastar dichos resultados con los extraídos con una solución extractante de menor precio y fácil acceso como es el etanol de 40° y 80°, buscando así una alternativa económica y útil para una posterior extracción a nivel industrial de ser necesario.

d) Diagrama de flujo para la cuantificación de bixina por UHPLC.

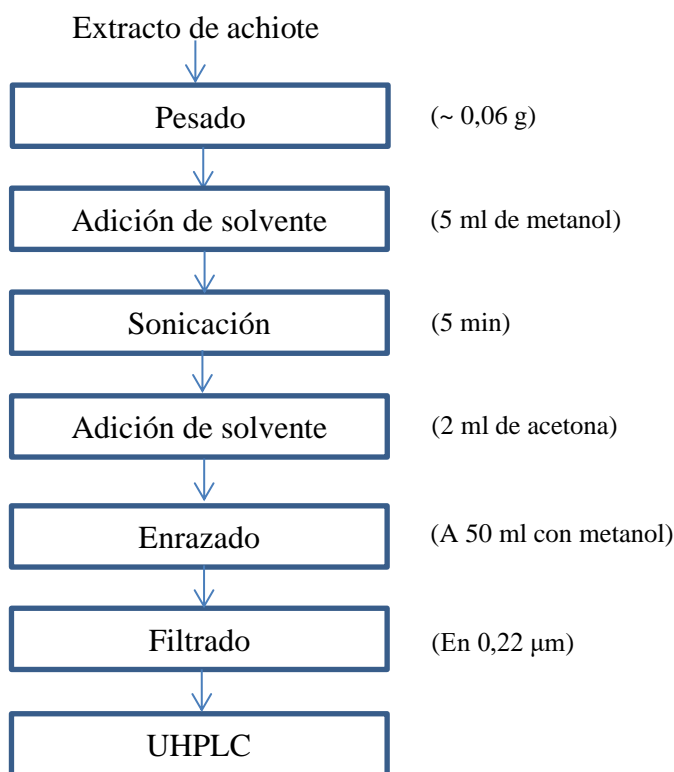


Figura 10. Diagrama de flujo de la cuantificación de bixina por UHPLC.

e) Proceso de cuantificación de bixina por UHPLC.

- **Extracto de achiote.** Se utilizaron los extractos de las tres variedades de achiote (verde, amarillo y rojo).
- **Pesado.** Se pesaron 0,06 g de cada extracto de achiote.
- **Adición de solución extractante.** Se agregó 5 ml de metanol.
- **Sonicación.** Se sonicó durante 5 minutos.
- **Adición de solución extractante.** Se añadió 2 ml de acetona.
- **Enrazado.** Se enrazó en una fiola de 50 ml con metanol. (Ver Anexo A).
- **Filtrado.** Se filtró en 0,22 µm.
- **UHPLC.** Se colocó las muestras filtradas en viales 9mm de 1,5 ml THD.

f) Diagrama de flujo para la preparación del estándar

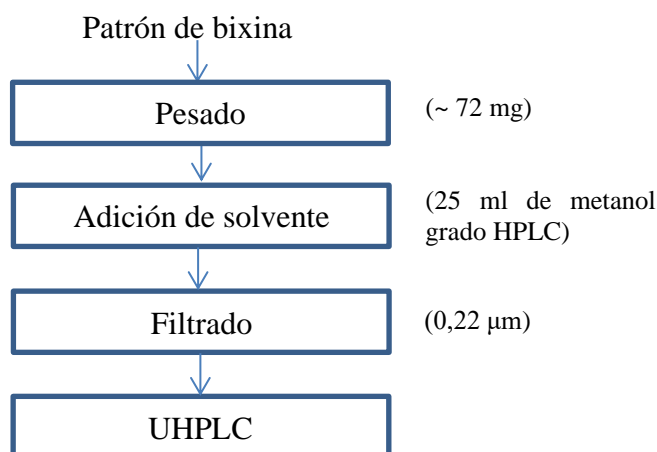


Figura 11. Diagrama de flujo para la preparación del estándar.

g) Proceso de preparación del patrón de bixina

- **Patrón de bixina.**
- **Pesado.** Se pesó 72 mg de patrón de bixina.
- **Adición de solución extractante.** Se adicionó 25 ml de metanol grado HPLC.
- **Filtrado.** Se filtró en 0,22 µm.
- **UHPLC.** Se colocó la muestra patrón filtrada en un vial 9mm de 1,5 ml THD, para posteriormente realizar la identificación de bixina por UHPLC, (ver Anexo B).

Condiciones cromatográficas

- Columna C18.
- Flujo. 0,7 ml/min.
- Longitud de onda. 300- 600 nm.
- Tiempo de retención de la bixina. 5,8 min.
- Fase móvil. Acetonitrilo: ácido acético: agua ultrapura (65:2:33)

2.4.3. Análisis fisicoquímicos.

a) Determinación de humedad . A.O.A.C (1984)

Para la determinación de humedad en las semillas de achiote fue necesario secar las semillas en una estufa a 50° C centígrados hasta peso constante, proceso que duró 72 horas.

b) Determinación de cenizas. A.O.A.C (1984)

Para la determinación de cenizas en las semillas de achiote, se sometió a 300°C por 4 horas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis Físico del Fruto del Achiote (*Bixa orellana L.*)

Los frutos de achiote son de amplia variabilidad genética, condición que dificulta determinar sus fenotipos, teniendo en cuenta esto, las tres variedades que se utilizaron en esta investigación fueron traídas de la misma zona en el distrito de Lamas para garantizar así la homogeneidad de la materia prima. Por tanto, se realizó el análisis físico de estas tres variedades por color. Ver Tabla 11.

Tabla 11

Características de la materia prima.

3 variedades seleccionadas para esta investigación			
Características	Variedad 1	Variedad 2	Variedad 3
Procedencia	Lamas	Lamas	Lamas
Forma de la cápsula	Lancetada	Lancetada	Lancetada
Color de la cápsula	Verde	Amarillo	Rojo
Color de las semillas	Rojo	Rojo	Rojo
Dehiscencia	Dehiscente	Dehiscente	Dehiscente

Las tres variedades traídas de Lamas coinciden en cuanto a forma y dehiscencia de cápsula, así como en color de semillas. Estas crecieron de forma nativa en ese medio y bajo condiciones edafoclimáticas similares, ver Figura 12.



Figura 12. Reconocimiento y caracterización de las tres variedades de achiote.

Respecto al color de las semillas, se observó que independientemente del color de sus cápsulas, las tres variedades mantienen el color rojo de sus semillas, como se aprecia en la Figura 13.

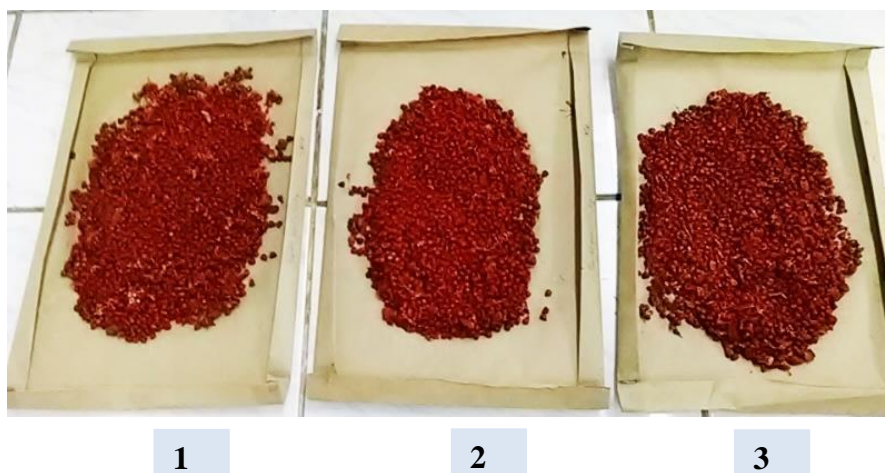


Figura 13. Semillas de achiote según variedad.

dónde:

1. variedad verde
2. variedad amarilla
3. variedad roja

En el momento en que la semilla está en formación es cuando empieza a formarse el colorante. En unas variedades varía en tonalidades que van del rojo claro al rojo encendido. En otras, anaranjado en diferentes tonalidades, los cuales al estar secas las semillas se presentan de color rojo o café opaco (Bonilla, 2009).

Las semillas estuvieron frescas, las mismas que fueron contadas (ver Anexo C). En el laboratorio se determinó que la variedad verde contiene en promedio 9 semillas por cápsula; mientras que la variedad amarilla contiene 21 semillas en promedio; en tanto, la variedad roja contiene 42 semillas por cápsula, (ver los Anexo D y E). Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

Número de semillas por cápsula de variedades de achiote en 1kg de muestra

Variedades	Número de semillas/cápsula
Verde	9
Amarillo	21
Rojo	42

El rendimiento de semilla de la variedad verde no se encuentra en el rango determinado por CENTA (2009), que menciona que el fruto contiene un número de semillas varía entre 20 y 55. Esta referencia menciona estas cantidades de forma general, sin especificar la variedad del achiote. Así mismo, difiere de los datos reportados por INIA (2009), en donde se menciona que el número de semillas por cápsula en la variedad verde es de 40, mientras que en la variedad amarilla es de 60 y en la variedad roja es de 35.

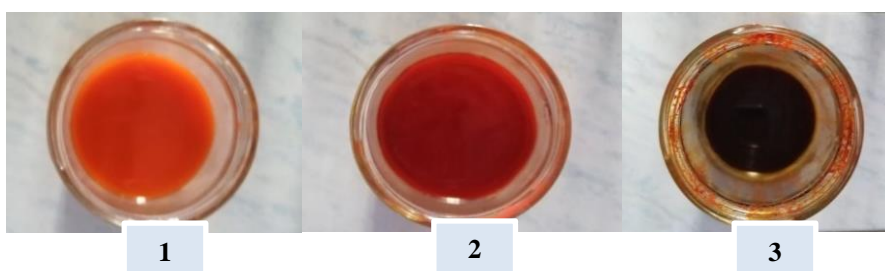
Durante la limpieza y selección de la materia prima, se desecharon cápsulas, ramas y hojas, las mismas que fueron pesadas para poder conocer el rendimiento de las semillas de achiote según su variedad. Siendo el achiote de cápsula verde el que contiene mayor cantidad de residuos e impurezas y menor peso de semillas por kg. Mientras que, el achiote de cápsula roja, es la variedad que contiene menos residuos e impurezas por kg. y contiene mayor cantidad de semillas por Kg. de materia prima. Esto se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13*Residuos e impurezas en el achiote (en 1kg de frutos de achiote)*

Variedades	Residuos e impurezas (g/kg)	Semillas (g/kg)
Verde	860,89	139,11
Amarilla	738,55	261,45
Roja	722,07	277,93

3.2. Rendimiento de los Extractos de Achiote

Como se aprecia en la Figura 14 el color de los extractos varía según la solución extractante empleado. El extracto obtenido con etanol de 40° presenta un color anaranjado; el extracto con etanol de 80°, un color rojo claro y el extraído con KOH al 2%, rojo oscuro.

**Figura 14.** Extractos: con etanol de 40° (1), etanol de 80° (2), con KOH al 2% (3).

Se llevaron a cabo 9 tratamientos con tres repeticiones cada uno (ver Anexo F) para calcular el rendimiento extractivo del colorante de achiote que se muestran en la Tabla 14 de forma descendente.

Tabla 14*Rendimiento extractivo del colorante natural de achiote a escala laboratorio*

Variedad	Solución extractora	Peso de semilla (g)	Peso del extracto colorante (g)	Rendimiento (%)
Verde	KOH 2%	20,05	1,56	7,80
Amarilla	KOH 2%	20,07	1,56	7,79
Roja	KOH 2%	20,77	1,57	7,54
Roja	Etanol 80°	20,02	1,36	6,77
Amarilla	Etanol 80°	20,03	1,33	6,66
Verde	Etanol 80°	20,02	1,33	6,63
Roja	Etanol 40°	20,02	1,31	6,56
Amarilla	Etanol 40°	20,02	1,31	6,55
Verde	Etanol 40°	20,03	1,31	6,54

La extracción producto de la interacción de la variedad verde con la solución extractante KOH 2% fue la de mayor rendimiento y el extracto de la variedad verde con la solución extractante etanol de 40° fue el de menor rendimiento en cuanto a colorante se refiere.

Se obtiene mayor rendimiento del colorante cuando se emplea como solución extractante el KOH al 2%, seguido por el etanol de 80° y el etanol de 40° (ver Anexo G), coincidiendo así con lo manifestado por Jaramillo (1992), que asegura que los estudios realizados con diferentes soluciones extractantes, muestran que el colorante con mejor rendimiento y calidad, es el obtenido utilizando hidróxido de potasio en solución.

Mientras que Reyes (2015), al emplear KOH al 2% como solución extractante obtuvo rendimientos desde 5,46% hasta 7,80%, esto indica que los resultados obtenidos se encuentran dentro el rango.

La extracción alcalina garantiza mejores resultados, sin embargo a diferencia de las extracciones con etanol de 40° y 80°, requiere pasar por procesos adicionales para precipitar el colorante. En la Figura 15, se puede apreciar la diferencia entre emplear una solución extractante u otra sobre las variedades de achiote con respecto al rendimiento de la extracción de colorante. El rendimiento del colorante de la variedad roja es menor cuando la extracción se realiza con KOH al 2%, contrariamente a lo que se aprecia de esta variedad en la extracción con etanol de 40° y 80°. Tal como lo afirma Devia &

Saldarriaga (2002), se confirma que al usar KOH al 2% como solución extractora se obtiene un mayor rendimiento de los extractos brutos de pigmentos del achiote.

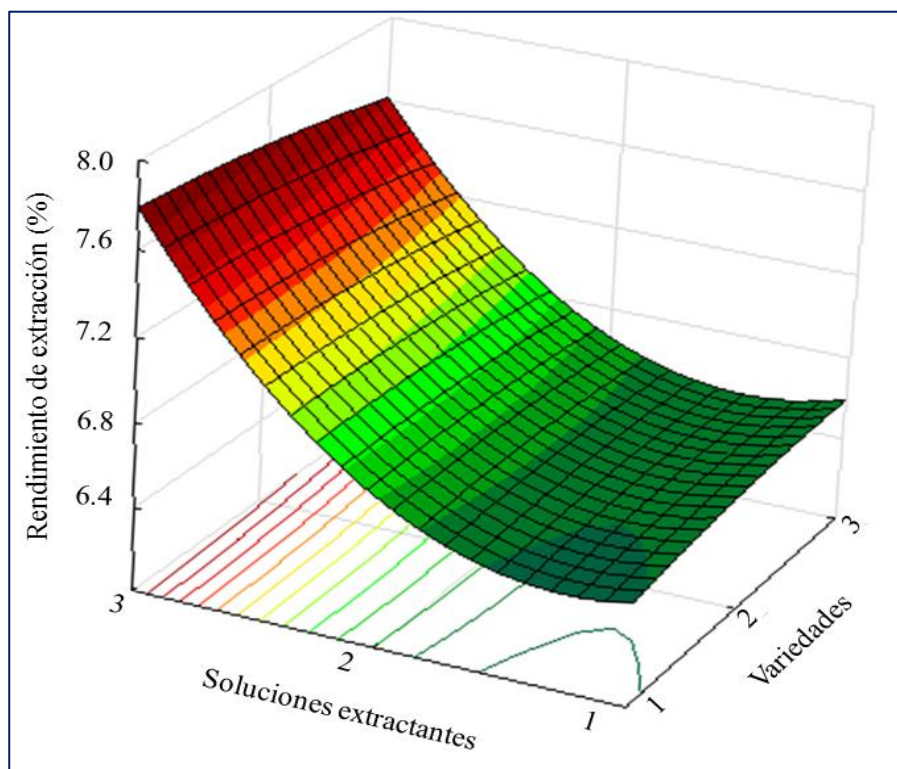


Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta del rendimiento de extracción (%).

dónde:

- Soluciones extractantes
 - 1 = Etanol de 40°
 - 2 = Etanol de 80°
 - 3 = KOH al 2%
- Variedades
 - 1 = Verde
 - 2 = Amarillo
 - 3 = Rojo

En la Tabla 15 se observa la influencia entre los tratamientos con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.99$ esto confirma la buena aplicación del modelo experimental y un Coeficiente de Variación de 1.10 que indica la variabilidad de la toma de datos y el efecto de los factores en estudio, la media alcanzó 6.98 % de rendimiento de la extracción.

Tabla 15

ANVA de los datos procesados de rendimiento de la extracción.

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	7,40360166	0,92545021	155,71	<,0001
Error	18	0,10697871	0,00594326		
Total corregido	26	7,51058037			

$R^2=0,985756$

$CV=1,104049$

Media=6,982710

3.3. Concentración de Bixina

En la presente investigación se evaluaron los valores sólo de bixina, oscilando estos entre 108,03 y 587,43 mg/100g (ver Anexo H). Ver en la Tabla 16, el caso de los tratamientos T6 (variedad amarilla y solución extractante KOH al 2%) y T3 (variedad verde y KOH al 2%), la concentración de bixina en estas muestras fueron menores que el límite de detección.

Tabla 16

Concentraciones de bixina determinadas por UHPLC

Variedad	Solución extractante	Concentración de bixina (mg/100g)
Verde	Etanol 80°	587,43
Verde	Etanol 40°	471,78
Roja	Etanol 80°	287,17
Amarilla	Etanol 80°	285,73
Roja	KOH	210,70
Amarilla	Etanol 40°	169,33
Roja	Etanol 40°	108,03
Amarilla	KOH	n.d
Verde	KOH	n.d

Las muestras de colorante analizadas en estudio contenían bixina como el carotenoide mayoritario. Tocchini & Mercadante (2001).

Las concentraciones de bixina fueron menores en las muestras extraídas por el método alcalino (con KOH al 2%).

En la Figura 16, la variedad verde cuyos extractos fueron obtenidos empleando alcohol (etanol) de 80° y 40° presenta mayores concentraciones de bixina, 587,43 y 471,78 (mg/100g) respectivamente. la variedad verde cuyos extractos fueron obtenidos empleando alcohol (etanol) de 80° y 40° presenta mayores concentraciones de bixina; 587,43 y 471,78 (mg/100g) respectivamente. Se observa el efecto de las soluciones extractantes sobre las variedades con respecto a la concentración de bixina del achiote. Al emplear como extractores a soluciones orgánicas se obtiene mayor concentración de bixina. Siendo la variedad roja la que menos niveles de concentración reportó en su interacción con las tres soluciones extractantes.

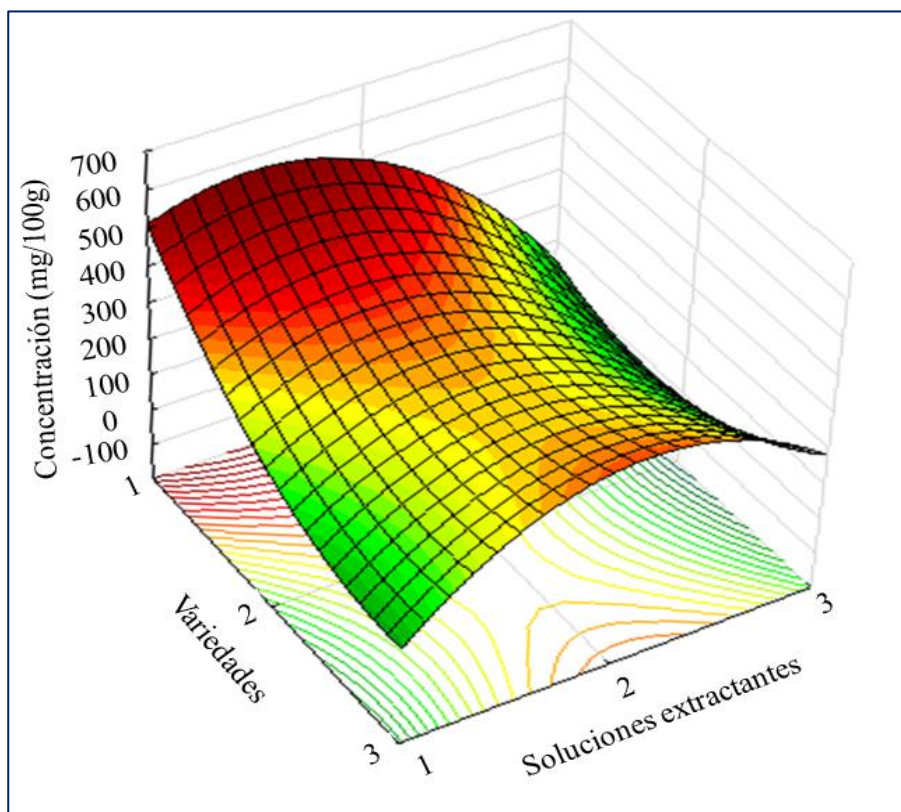


Figura 16. Gráfico de superficie de respuesta de la concentración de bixina.

dónde:

- Variedades
 - 1 = Verde
 - 2 = Amarillo
 - 3 = Rojo
- Soluciones extractantes
 - 1 = Etanol de 40°
 - 2 = Etanol de 80°
 - 3 = KOH al 2%

En esta investigación se determinó las concentraciones de bixina por UHPLC, siendo el tiempo de retención de la bixina aproximadamente 5,8 minutos por cada análisis.

En la Tabla 17 se observa la influencia entre los tratamientos con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,98$ esto confirma la buena aplicación del modelo experimental y un Coeficiente de Variación de 14,28 que indica la variabilidad de la toma de datos y el efecto de los factores en estudio, la media alcanzó 235,57 mg/100g de contenido de bixina.

Tabla 17

ANVA de los datos procesados de bixina.

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	951113,043	118889,13	105,12	<,0001
Error	18	20356	1130,9352		
Total corregido	26	971469,876			

R²=0,9790 CV=14,28 Media=235,57

En la Figura 17, se aprecia el cromatograma obtenido por UHPLC cuyas condiciones cromatográficas son las siguientes: columna C18 y acetonitrilo: ácido acético: agua ultrapura (65:2:33) como fase móvil con flujo de 0,7 ml / min.

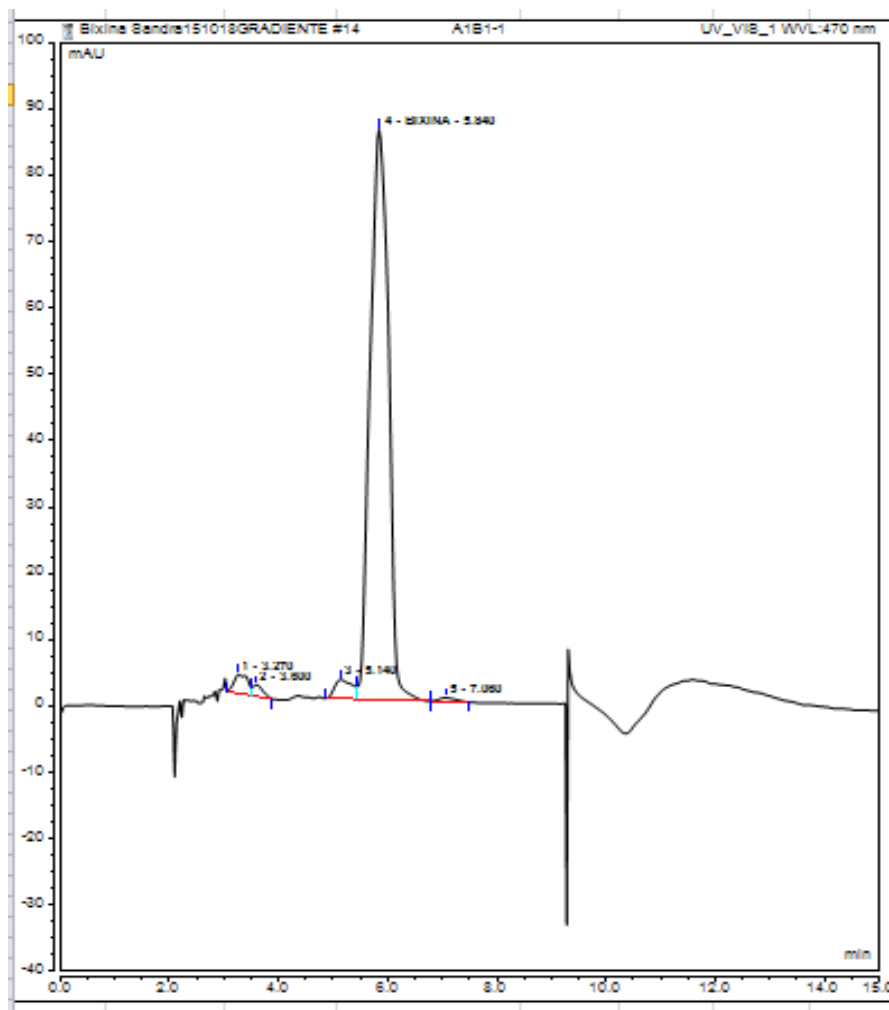


Figura 17. Cromatograma obtenido por UHPLC, de extractos brutos de pigmentos.

La curva estándar de bixina fue lineal en el rango estudiado, mostrando un coeficiente de correlación (R^2) de 0,996. (Ver Anexo I).

3.4. Análisis Físicoquímicos en *Bixa orellana* L.

Humedad

Se evaluó el porcentaje de humedad de las semillas de achiote empleadas en la extracción de pigmentos, inmediatamente después de su selección evitando así la proliferación de microorganismos en las materia prima. Las tres variedades de achiote fueron secadas en una estufa a 50° C hasta peso constante (72 horas) para conocer su porcentaje de humedad y siempre con la finalidad de preservar los componentes del achiote. Se trabajó en ambientes con luz y aire indirectos. Ver tabla 18. Siendo la variedad verde aquella que presenta mayor porcentaje de humedad con 44,77%, seguida por la variedad amarilla con 24,95% y

por la variedad roja 22,38%. (Ver Anexo J). Rueda (2004), determinó en la composición química de la semilla que la humedad varía de 20 a 25%, coincidiendo así con lo evaluado en esta investigación en las semillas de variedad amarilla y roja, mas no con la variedad verde.

Tabla 18

Porcentaje de humedad de las semillas de achiote

Variedad	Humedad (%)
Verde	44,77
Amarillo	24,95
Rojo	22,38

En la Tabla 19 se observa la influencia entre los tratamientos con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,99$ esto confirma la buena aplicación del modelo experimental y un Coeficiente de Variación de 2,59 que indica la variabilidad de la toma de datos y el efecto de los factores en estudio, la media alcanzó 30,70 % de humedad.

Tabla 19

ANVA de los datos procesados de humedad.

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	2706,85811	338,357264	534,39	<,0001
Error	18	11,396879	0,63316		
Total corregido	26	2718,25499			

R²= 0,995807 CV=2,592068 Media=30,69802

Cenizas

Las cifras de contenido de cenizas presentes en el extracto de achiote oscilarán entre 5,65 y 6,54 (g/100g). (Ver Anexo K). Ver tabla 20.

La composición de cenizas en el pigmento del achiote oscila entre 5,44 y 6,92 (g/100g). Devia & Saldarriaga (2002), encontrándose las muestras dentro del rango.

Tabla 20*Análisis de cenizas presentes en los extractos de achiote.*

Tratamiento	Variedad	Solución extractante	Cenizas (g/100g)
T1	Verde	Etanol 40°	6,54
T5	Amarilla	Etanol 80°	6,54
T3	Verde	KOH	6,43
T7	Roja	Etanol 40°	6,35
T6	Amarilla	KOH	6,34
T2	Verde	Etanol 80°	6,22
T4	Amarilla	Etanol 40°	6,14
T8	Roja	Etanol 80°	6,12
T9	Roja	KOH	5,65

En la Tabla 21 se observa la influencia entre los tratamientos con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.31$ esto confirma la buena aplicación del modelo experimental y un Coeficiente de Variación de 7,64 que indica la variabilidad de la toma de datos y el efecto de los factores en estudio, la media alcanzó 6,26 g/100g de cenizas.

Tabla 21*ANVA de los datos procesados de cenizas*

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	1,83875831	0,22984479	1,01	<,0001
Error	18	4,10972861	0,22831826		
Total corregido	26	5,94848692			

R2=0,309114

CV=7,636718

Media=6,256963

A continuación el resumen de los resultados obtenidos de contenido de bixina, rendimiento de extracción, cenizas y humedad. Ver Tabla 22.

Tabla 22*Resumen de resultados obtenidos*

Características					
Variedad	Solución extractante	Bixina (mg/100g)	Rendimiento (%)	Cenizas (g/100g)	Humedad (%)
Verde	Etanol 40°	471,78	6,54	6,54	44,20
Verde	Etanol 80°	587,43	6,63	6,22	44,88
Verde	KOH al 2%	n.d	7,80	6,43	45,21
Amarillo	Etanol 40°	169,33	6,55	6,14	25,70
Amarillo	Etanol 80°	285,73	6,66	6,54	25,05
Amarillo	KOH al 2%	n.d	7,79	6,34	24,09
Rojo	Etanol 40°	108,03	6,55	6,35	22,44
Rojo	Etanol 80°	287,17	6,77	6,12	22,52
Rojo	KOH al 2%	133,98	7,54	5,65	22,17

CONCLUSIONES

1. El mayor rendimiento de extractos brutos de pigmentos fue de 7,8%, producto de la extracción realizada a la variedad verde con hidróxido de potasio al 2%, siendo esta extracción alcalina la más favorecedora en la obtención de colorantes contenidos en el achiote - seguido por la extracción con etanol de 80° y 40°- sin embargo se requiere el uso de ácidos para poder precipitar el colorante. Posteriormente se debe eliminar los ácidos para obtener un colorante libre de sustancias corrosivas.
2. El rendimiento de bixina en el achiote (*Bixa orellana L.*) estuvo dado por la mayor concentración de bixina determinada por UHPLC, esta fue de 587,43 mg/100g, producto de la interacción de la variedad verde con etanol de 80°.
3. La variedad verde presentó el mayor porcentaje de humedad en sus semillas, con 44,77%, estas fueron secadas a 50°C para preservar el contenido de bixina durante el proceso.
4. La mayor cantidad de cenizas presentes en el extracto de achiote fue de 6,54 (g/100g), resultado de la interacción variedad verde-etanol 40°.

RECOMENDACIONES

- Promover el cultivo de las diferentes variedades de achiote en la Región San Martín con el fin de preservar su amplia variabilidad genética.
- Las semillas deben ser extraídas de sus cápsulas en ambientes con luz indirecta y dentro de las 72 horas posteriores a su cosecha.
- Extraer el colorante del achiote empleando como solución extractante el etanol de 80°, implica una metodología más rápida, económica y segura en su procesamiento, sin embargo no es la que genera mayor rendimiento del colorante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

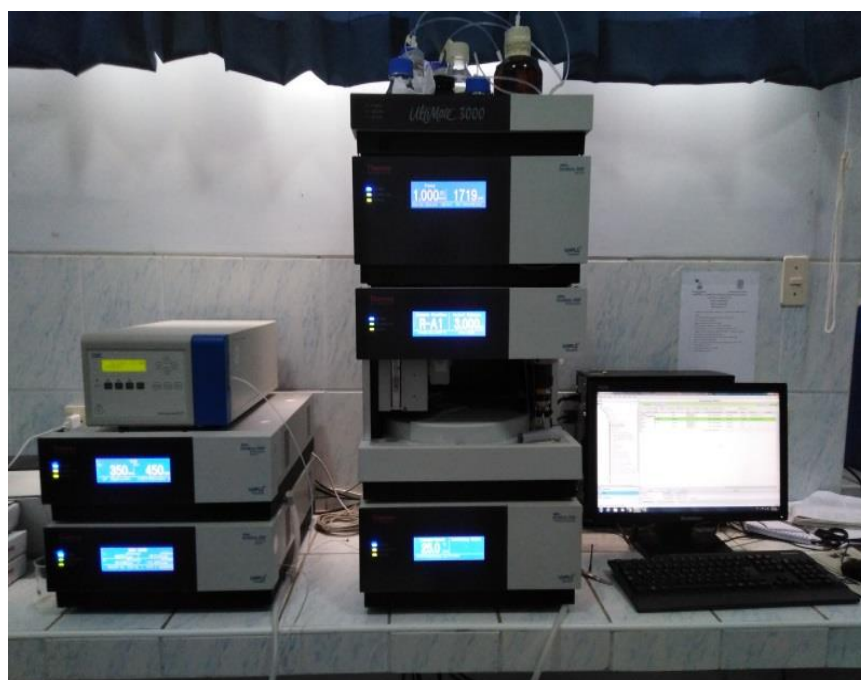
- A.O.A.C. (1984). *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists.* (14^a Ed.).
- Agner A. et al. (2004). *Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. Food Chem Toxicol.*
- Arce. (1990). *Recomendaciones para el cultivo del achiote. Bixa orellana.* Programa mejoramiento de cultivos tropicales, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba.
- Arce. (1999). *El achiote. Bixa orellana L. Cultivo promisorio para el trópico.* Escuela de Agricultura del Trópico Húmedo (EARTH). Mercedes de Guácimo: Editorial Guácimo.
- Bioderivados.(s.f). *Bio derivados.* Obtenido de http://www.bioderivados.com.mx/colorantes_bixina.html
- Bonilla. (2009). *Manual del cultivo del achiote. Proyecto de Desarrollo de la Cadena de Valor y Conglomerado Agrícola,* 07, 16. Nicaragua.
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, (. (2009). *Manual Técnico. El cultivo del achiote, Bixa orellana L.,* 15-16. Obtenido de [http://www.cich.org/publicaciones/3/CNTAF- Manual-Tecnico-del-Achiote.pdf](http://www.cich.org/publicaciones/3/CNTAF-Manual-Tecnico-del-Achiote.pdf)
- Devia & Saldarriaga (2002). *Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (Bixa orellana).* *Revista Universidad EAFIT,* 10, 12-13.
- Diario Gestión. (2015). *Producción de achiote en el Perú se reduce y requiere promoción para reactivarla.* Obtenido de <http://www.gestion.pe/>
- Eroski consumer. (2008). *Eroski consumer, el diario del consumidor.* Obtenido de Sitio web de Eroski Consumer: http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/infancia_y_adolescencia/2008/01/15/53977.php
- Figueroa. (1995). *Colección y caracterización de diferentes materiales de achiote (Bixa orellana L.) en los departamentos de Suchitepéquez y Retalhuleu.* Trabajo de graduación, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía.
- García et al. (2008). *Efecto de los parámetros en la extracción alcalina de colorante de bija. Parte I* (Vol. 18). Habana.
- González. (1992). *Colección y mantenimiento de germoplasma de Achiote (Bixa orellana L) en la amazonía peruana* (Vol. 4). Loreto.

- Gonzáles. (2011). *Colección y mantenimiento de germoplasma de achiote (Bixa orellana L.) en la amazonia peruana*. (Vol. 4).
- Imbarex. (2017). *Imbarex Natural Colors & Ingredients*. Obtenido del sitio web: <https://www.imbarex.com/es/colorantes-naturales-en-la-industria-alimentaria/>
- Instituto Nacional de Innovación Agraria. (2009). Achiote (Bixa orellana). En E. M. Céspedes, *Accesiones promisorias. Banco de Germoplasma de la SUDIRGEB - INIA* (Vol. 1, págs. 10-13). Lima, Perú.
- Narciso. (2012). “*Manual para la producción del achiote (Bixa orellana L.)*”. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Reyes. (2015). *Extracción y evaluación del colorante natural de achiote (Bixa orellana L.) como sustituto del colorante E-102 amarillo No. 5 (tartracina) en la elaboración de un yogurt*. Trabajo de graduación , Universidad de San Carlos de Guatemala , Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química.
- Rueda et al. (2004). *Diseño de una planta piloto para la producción de bixina a partir de achiote*. Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físicoquímicas.
- Saavedra. (2015). “*Caracterización de suelos con fines de manejo y conservación, en el Distrito de Lamas - Provincia de Lamas –Región San Martín*”. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero en Recursos naturales renovables, mención conservación de suelos y agua. Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Tocchini & Mercadante (2001). *Extração e determinação por CLAE de bixina e norbixina em coloríficos*. Campinas, Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas.
- Ysla. (2016). *El Comercio*. Obtenido de <https://elcomercio.pe/economia/dia-1/peru-apunta-liderar-mercado-colorantes-naturales-mundo-270706>

ANEXOS



Anexo A. Preparación de muestras, enraizado con metanol.



Anexo B. Identificación de bixina por UHPLC.

Información de nivel de clase			
Clase	Niveles	Valores	
Repeticiones	3	1	2 3

Anexo C. Procedimiento ANOVA

- Número de observaciones leídas : 9
- Número de observaciones usadas : 9

Agrupamiento de Duncan	Media	N	Variedades
A	41,667	3	3
B	21,333	3	2
B	9,000	3	1

Anexo D. Prueba del rango múltiple de Duncan para NSC en variedades de achiote.

Variedades	Número de semillas/cápsula
Verde	9
DS	6
Valor min	3
Valor máx	15
Amarillo	21
DS	4,
Valor min	18
Valor máx	26
Rojo	42
DS	20
Valor min	20
Valor máx	60
R2	0,874
CV	37,34
X	24

Anexo E. Número de semillas por cápsula de variedades de achiote en 250 g de muestra.

Información de nivel de clase		
Clase	Niveles	Valores
Variedades	3	1 2 3
Soluciones extractantes	3	1 2 3
Tratamientos	9	T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8 T9

Anexo F. Procedimiento ANOVA.

dónde:

T1= Variedad verde y etanol de 40°

T2= Variedad verde y etanol de 80°

T3= Variedad verde y KOH al 2%

T4= Variedad amarilla y etanol de 40°

T5= Variedad amarilla y etanol de 40°

T6= Variedad amarilla y KOH al 2%

T7= Variedad roja y etanol de 40°

T8= Variedad roja y etanol de 40°

T9= Variedad roja y KOH al 2%

- Número de observaciones leídas : 27
- Número de observaciones usadas : 27

Agrupamiento de Tukey	Media	N	Tratamientos
A	7,80114	3	T3
A	7,79082	3	T6
B	7,53998	3	T9
C	6,76958	3	T8
DC	6,66336	3	T5
DC	6,63126	3	T2
DC	6,55869	3	T7
DC	6,55333	3	T4
D	6,53622	3	T1

Anexo G. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para rendimiento.

dónde:

T1= Variedad verde y etanol de 40°

T2= Variedad verde y etanol de 80°

T3= Variedad verde y KOH al 2%

T4= Variedad amarilla y etanol de 40°

T5= Variedad amarilla y etanol de 40°

T6= Variedad amarilla y KOH al 2%

T7= Variedad roja y etanol de 40°

T8= Variedad roja y etanol de 40°

T9= Variedad roja y KOH al 2%

Agrupamiento de Tukey	Media	N	Tratamientos
A	587,43	3	T2
B	471,78	3	T1
C	287,17	3	T8
C	285,73	3	T5
DC	210,70	3	T9
DE	169,33	3	T4
E	108,03	3	T7
F	0,00	3	T6
F	0,00	3	T3

Anexo H. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para bixina.

dónde:

T1= Variedad verde y etanol de 40°

T2= Variedad verde y etanol de 80°

T3= Variedad verde y KOH al 2%

T4= Variedad amarilla y etanol de 40°

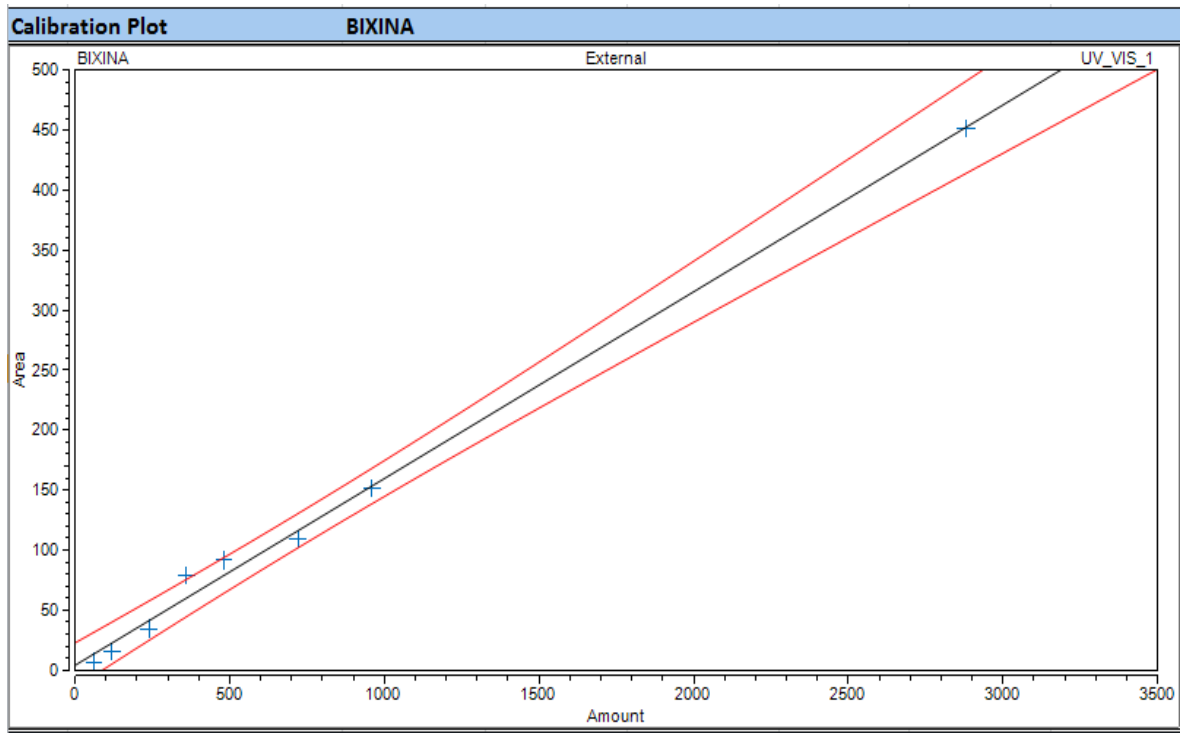
T5= Variedad amarilla y etanol de 40°

T6= Variedad amarilla y KOH al 2%

T7= Variedad roja y etanol de 40°

T8= Variedad roja y etanol de 40°

T9= Variedad roja y KOH al 2%



Anexo I. Curva padrón de bixina

Agrupamiento de Tukey	Media	N	Tratamientos
A	45,2131	3	T3
A	44,8813	3	T2
A	44,2011	3	T1
B	25,7034	3	T4
B	25,0488	3	T5
CB	24,0945	3	T6
C	22,5238	3	T8
C	22,4416	3	T7
C	22,1747	3	T9

Anexo J. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para humedad.

dónde:

T1= Variedad verde y etanol de 40°

T2= Variedad verde y etanol de 80°

T3= Variedad verde y KOH al 2%

T4= Variedad amarilla y etanol de 40°

T5= Variedad amarilla y etanol de 40°

T6= Variedad amarilla y KOH al 2%

T7= Variedad roja y etanol de 40°

T8= Variedad roja y etanol de 40°

T9= Variedad roja y KOH al 2%

Agrupamiento de Tukey	Media	N	Tratamientos
A	6,5417	3	T1
A	6,5385	3	T5
A	6,4264	3	T3
A	6,3490	3	T7
A	6,3376	3	T6
A	6,2193	3	T2
A	6,1386	3	T4
A	6,1158	3	T8
A	5,6458	3	T9

Anexo K. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para cenizas.

dónde:

T1= Variedad verde y etanol de 40°

T2= Variedad verde y etanol de 80°

T3= Variedad verde y KOH al 2%

T4= Variedad amarilla y etanol de 40°

T5= Variedad amarilla y etanol de 40°

T6= Variedad amarilla y KOH al 2%

T7= Variedad roja y etanol de 40°

T8= Variedad roja y etanol de 40°

T9= Variedad roja y KOH al 2%