

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA
Y TECNOLOGÍA AVANZADA
ÁREA ALIMENTOS

"EXTRACCIÓN, ESTABILIZACIÓN

y

EVALUACIONES ANALÍTICAS DEL CARMÍN"

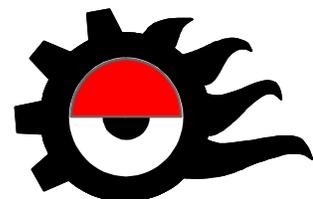


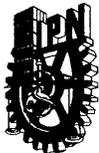
Presenta

Ing. Mónica María Centeno Álvarez

México, D. F.

2003





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CGPI-14

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 11:15 horas del día 25 del mes de septiembre del 2003 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN para examinar la tesis de grado titulada:
"EXTRACCIÓN, ESTABILIZACIÓN Y EVALUACIONES ANALÍTICAS DEL CARMÍN"

Presentada por el alumno:

CENTENO

Apellido paterno

ALVAREZ

materno

MÓNICA MARÍA

nombre(s)

Con registro:

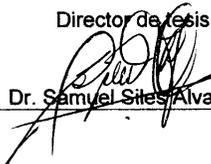
9	9	1	0	0	3
---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN TECNOLOGIA AVANZADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

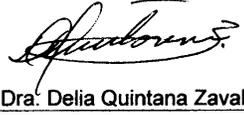
LA COMISION REVISORA

Director de tesis


 Dr. Samuel Sites Alvarado


 Dr. Eduardo San Martín Martínez




 Dra. Delia Quintana Zavala


 Dr. Reynaldo Pless Elling

CENTRO DE INVESTIGACION
 EN CIENCIA APLICADA Y
 TECNOLOGIA AVANZADA


 Dr. Javier Pérez Villaseñor

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


 Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSTRADO E INVESTIGACION

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 6 del mes noviembre del año 2003, el (la) que suscribe Centeno Alvaraz Mónica María alumno (a) del Programa de Tecnología Avanzada con número de registro 991003, adscrito a CICATA-IPN, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Samuel Siles Alvarado y cede los derechos del trabajo intitulado "Extracción, Estabilización y Evaluaciones Analíticas del Carotín", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección mcenteno@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Mónica Centeno A.

Nombre y firma

El presente trabajo de tesis se realizó en los Laboratorios de Investigación y Apoyo Analítico del Centro de Investigación de Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, bajo la Dirección del Doctor Samuel Siles Alvarado.

A Carla, Omar y Ana Emilia

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias de manera muy especial al Director de mi Tesis, el Dr. Samuel Siles Alvarado, por su confianza, comprensión y apoyo durante la realización de este trabajo. Por haberme facilitado sus conocimientos, sus enseñanzas han contribuido grandemente a mi formación profesional.

A mis compañeros del Laboratorio:

Geo, Cuco, Gil y Lichita, por su ayuda sincera e incondicional, así como por su valiosa amistad.

Al Ing. Ignacio J. del Río y Dueñas, por adentrarme en este mundo maravilloso de la Granacochinilla y los colorantes naturales.

A Tlapanochestli, por las facilidades brindadas en el trabajo de campo, además de proporcionar la materia prima utilizada en esta investigación.

A los miembros del Jurado: Dra. Delia Quintana Zavala, Dr. Javier Pérez Villaseñor, Dr. Reynaldo Pless E. y al Dr. Eduardo San Martín, por el interés y dedicación a la revisión de mi tesis.

Al personal del Programa de Posgrado en Tecnología Avanzada del CICATA- Legaria, por apoyarme siempre en los trámites académicos.

Al todo el personal del CICATA-Legaria, que directa o indirectamente contribuyen en la elaboración de éste trabajo.

Al CICATA-IPN, por darme todas las facilidades.

ÍNDICE GENERAL

<i>Índice General</i>	<i>i</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de Tablas</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de Esquemas Operativos</i>	<i>vii</i>
<i>Glosario de Términos</i>	<i>viii</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>ix</i>
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	4
II.1.	ANTECEDENTES HISTÓRICOS	4
II.2.	LA GRANA O COCHINILLA DEL CARMÍN	6
II.2.1.	Taxonomía	
II.2.2.	Ciclo Biológico	
II.2.3.	Morfología	
II.2.4.	Composición Proximal	
II.3.	PROCESAMIENTO DE LA GRANA	11
II.3.1.	Recolección	
II.3.2.	Sacrificio	
II.3.3.	Secado	
II.3.4.	Limpieza y Clasificación	
II.3.5.	Desgrasado	
II.3.6.	Molienda	
II.3.7.	Almacenamiento	
II.4.	EXTRACCIÓN DEL COLORANTE	16
II.4.1.	Solvente de Extracción	
II.4.2.	Temperatura de Extracción	
II.4.3.	Tiempo de Extracción	
II.4.4.	Número de Extracciones	
II.4.5.	Tamaño de Partícula	
II.5.	PRINCIPIO COLORANTE	18
II.5.1.	Ácido Carmínico	
II.5.2.	Extracto de Cochinilla	
II.5.3.	Laca de Carmín	
II.5.4.	Estabilidad del Colorante	
II.6.	PREPARACIÓN DE LACAS	26
II.6.1.	Otros Complejos Metálicos	
II.6.2.	Colores Encapsulados	

II.7.	PROPIEDADES Y CUANTIFICACIÓN DE COLOR	29
II.7.1.	Fundamentos Básicos	
II.7.2.	Transiciones Electrónicas	
II.7.3.	Estructura Y Absorción	
II.7.4.	Cuantificación de Ácido Carmínico	
II.8.	APLICACIONES	37
III.	JUSTIFICACIÓN	39
III.1.	JUSTIFICACION TÉCNICA	39
III.2.	JUSTIFICACIÓN DE MERCADO	39
IV.	OBJETIVOS	44
IV.1.	OBJETIVO GENERAL	44
IV.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	45
V.1.	MATERIALES	45
V.1.1.	Materia Prima	
V.1.2.	Reactivos	
V.1.3.	Equipo	
V.2.	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	47
V.2.1.	Preparación de la Muestra	
V.2.2.	Análisis Proximal de La Grana	
V.2.2.1.	<i>Humedad</i>	
V.2.2.2.	<i>Cenizas</i>	
V.2.2.3.	<i>Proteína</i>	
V.2.2.4.	<i>Ácido Carmínico</i>	
V.2.2.5.	<i>Arsénico y Plomo</i>	
V.2.2.6.	<i>Salmonella</i>	
V.2.3.	Influencia del Solvente	
V.2.4.	Influencia de la Temperatura	
V.2.5.	Influencia del Tipo y Cantidad de Base	
V.2.6.	Preparación de Lacas	
V.2.7.	Formulaciones de Carmín con Soportes Orgánicos	
V.3.	EVALUACIONES ANALÍTICAS DEL ÁCIDO CARMÍNICO	55
V.3.1.	Evaluaciones Cuantitativas	
V.3.1.1.	<i>Análisis por UV-VIS</i>	
V.3.1.2.	<i>Curvas de Calibración de Ácido Carmínico</i>	
V.3.2.	Evaluaciones Cualitativas	
V.3.2.1.	Influencia del pH de Análisis	
V.3.2.2.	Espectros de Infrarrojo (IR)	
V.3.2.3.	Espectros de RMN	

V.4.	CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	57
V.4.1.	Extracto Orgánico Total (EOT) Acuo-etanólico	
V.4.2.	EOT Acuo-etanólico con Na_2CO_3 y EDTA	
V.4.3.	Preparación de Columna Cromatográfica	
V.4.4.	Elusión Cromatográfica	
V.4.5.	Detección y Análisis	
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
VI.1.	EXTRACCIÓN DEL COLORANTE	59
VI.1.1.	Análisis Proximal de la Grana	
VI.1.2.	Influencia del Solvente	
VI.1.3.	Influencia de la Temperatura	
VI.1.4.	Influencia del Tipo y Cantidad de Base	
VI.1.5.	Método Optimizado de Extracción	
VI.2.	ESTABILIZACIÓN DEL COLORANTE	78
VI.2.1.	Estequiometría del Proceso	
VI.2.2.	Método Optimizado para la Preparación de Laca	
VI.2.3.	Formulaciones de Carmín con soportes orgánicos	
VI.3.	EVALUACIONES ANALÍTICAS DEL ÁCIDO CARMÍNICO	86
VI.3.1.	Evaluaciones Cualitativas	
VI.3.1.1.	<i>Curvas de Calibración</i>	
VI.3.1.2.	<i>Influencia del pH de Análisis</i>	
VI.3.1.3.	<i>Espectro Infrarrojo</i>	
VI.3.1.4.	<i>Espectro de RMN</i>	
VI.3.2.	Evaluaciones Cuantitativas	
VI.4.	SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS	105
VII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	111
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	113

ÍNDICE DE FIGURAS

II.1	Ubicación Taxonómica del <i>Dactylopius coccus Costa</i>	7
II.2	Ciclo biológico del <i>Dactylopius coccus Costa</i>	8
II.3	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del color en cochinilla	17
II.4	Estructura Química del Ácido Carmínico	18
II.5	Análisis por HPLC del colorante obtenido del <i>Dactylopius coccus Costa</i>	18
II.6	Estructura Química de Laca Carmín	22,78
II.7	Reacciones probables de Degradación del Ácido Kermésico	23
II.8	Reacciones probables del Ácido Carmínico	24,25
II.9	Transiciones Electrónicas	32
II.10	Estructura de base: Antraquinona	33
III.1	Importación de Ácido Carmínico y Laca por la CEE	39
III.2	Exportaciones de Perú, de Grana y Derivados, en 1997	41
III.3	Importaciones Mexicanas de colorantes de origen natural	41
III.4	Importaciones Mexicanas por País de Origen, 1999	42
III.5	Comportamiento de los precios de la grana seca	42
VI.1	Espectro de Absorción del EOT con Solvente I	60
VI.2	Espectro de Absorción del EOT con Solvente II	61
VI.3	Espectro de Absorción del EOT con Solvente III	62
VI.4	Espectro de Absorción del EOT con Solvente IV	63
VI.5	Espectros de Absorbancia a diferentes Temperaturas de Extracción	65
VI.6	Esp. Abs. Acuoso Hidrolizado	66
VI.7	Esp. Abs. Acuoso No-Hidrolizado	66
VI.8	Esp. Abs. AcuoEtanólico-Hidrolizado	66
VI.9	Esp. Abs. AcuoEtanólico-NoHidrolizado	66
VI.10	Extractos Hidrolizados	68
VI.11	Extractos No-Hidrolizados	68
VI.12	Abs = f(T) ; $\lambda = 494$ nm	68
VI.13	Abs = f(T) ; $\lambda = 280$ nm	68
VI.14	Rendimientos con Filtrado Normal	69
VI.15	Rendimientos con Filtrado sobre Cellite	69
VI.16	Rendimientos con Extracción Acuoetanólica No-hidrolizada	69
VI.17	Filtrado Normal ; $\lambda = 494$	70
VI.18	Filtrado sobre Cellite ; $\lambda = 494$	70
VI.19	Filtrado Normal ; $\lambda = 280$	70
VI.20	Filtrado sobre Cellite ; $\lambda = 280$	70
VI.21	Esp. Abs. UV-VIS del AC a diferentes concentraciones entre 10^{-6} y 3×10^{-5} M	86
VI.22	Influencia de la Hidrólisis en Solvente Acuoso	87
VI.23	Influencia del Solvente: Acuoso y Acuoetanólico con Hidrólisis	88
VI.24	Influencia de la Hidrólisis en Solvente Acuoetanólico	90
VI.25	Evaluación comparativa (494 nm)	90
VI.26	Evaluación comparativa (280 nm)	91
VI.27	Evaluación comparativa (280 y 494 nm)	91
VI.28	Espectros de Absorción a diferentes pH (2.0 ; 3.0 ; 4.0 y 5.0)	96
VI.29	Espectros de Absorción a diferentes pH (6.0 ; 8.0 y 10)	96
VI.30	Espectros de Absorción a diferentes pH (12.0 y 12.5)	97
VI.31	Espectros de Absorción a pH básico, con diferentes bases	97

VI.32	Referencia de Espectros de Absorción a diferentes pH	99
VI.33	Comparación de Espectros de IR de AC	100
VI.34	Espectro de RMN- ¹ H del AC	101
VI.35	Espectro de RMN- ¹³ C del AC	102
VI.36	TLC de Cromatografía en Columna, extracto Acuoetanólico neutro	105
VI.37	Placa TLC de las fracciones concentradas	106
VI.38	Espectros UV-VIS de las fracciones concentradas	106
VI.39	TLC de las fracciones de C	107
VI.40	TLC Preparativo de la fracción C ₅	108
VI.41	Espectro IR de la fracción C ₃	108
VI.42	Espectro IR de la fracción C ₄	109
VI.43	TLC de Cromatografía en Columna, extracto Acuoetanólico básico	109

ÍNDICE DE TABLAS

II.1	Composición Promedio de la Grana	10
II.2	Nombres y números que identifican al Ácido Carmínico	19
II.3	Propiedades de Lacas Precipitadas con Diferentes Cationes Metálicos	27
II.4	Efecto Batocrómico de diferentes Substituyentes	33
II.5	Colorantes Naturales Interaliment	37
II.6	Colorantes Alimenticios Naturales Chr. Hansen	37
II.7	Colorantes Naturales Warner Jenkinson	38
III.1	Producción Mundial de Grana Seca: año 1998	40
V.1	% Ácido Carmínico en Granas de diferente procedencia	45
V.2	Tipos de solventes	49
V.3	Tipo y porcentaje de base	51
V.4	% de Na_2CO_3 en el Solvente de Extracción	51
V.5	Soportes Orgánicos	53,84
VI.1	Análisis Proximal de Grana	59
VI.2	Requisitos Generales de Grana Comercial	59
VI.3	Extracción con Solvente I	60
VI.4	Extracción con Solvente II	61
VI.5	Extracción con Solvente III	62
VI.6	Extracción con Solvente IV	63
VI.7	Variación de los Máximos de Absorción	67
VI.8	% AC Extracción en Solución AE de NaOH	71
VI.9	% AC Extracción en Solución AE de Na₂CO₃	71
VI.10	% de AC en Extractos	72
VI.11	% de AC en Sobrenadantes	72
VI.12	% de AC en Lacas	73
VI.13	Rendimientos de Extracción y Precipitación	75
VI.14	Solventes para pruebas de Solubilidad	82
VI.15	Contenido de AC en Lacas Comerciales y Propias	83
VI.16	Comparación de Solubilidades de Lacas	83
VI.17	Solubilidad de Formulaciones con Soportes Orgánicos: pH = 5	85
VI.18	Solubilidad de Formulaciones con Soportes Orgánicos: pH = 10	85
VI.19	AC Patrón: Solución Acuosa, con y sin Hidrólisis	87
VI.20	AC Patrón: Solución Acuosa y Acuoetanólica con Hidrólisis	89
VI.21	AC Patrón: Solución Acuoetanólica, con y sin Hidrólisis	89
VI.22	Absortividad en Solución Acuosa Hidrolizada	92
VI.23	Absortividad en Solución Acuosa No-Hidrolizada	93
VI.24	Absortividad en Solución Acuoetanólica Hidrolizada	93
VI.25	Absortividad en Solución Acuoetanólica No-Hidrolizada	94
VI.26	ϵ en función de las condiciones de análisis	94
VI.27	Espectro de Absorbancia en función del pH	95
VI.28	Cuantificación de AC con diferentes Métodos	103
VI.29	Fracciones del Extracto A, obtenidas por Cromatografía en Columna	105
VI.30	Relación de frentes de las fracciones concentradas	106
VI.31	Relación de frentes de las fracciones C	107
VI.32	Relación de Frentes de las porciones 1 a 14	110
VI.33	Fracciones Concentradas	110

ÍNDICE DE ESQUEMAS OPERATIVOS

II.1	Proceso general de la grana húmeda	15
II.2	Proceso General de Preparación de Laca Carmín	26
V.1	Determinación de Ácido Carmínico en Grana	48
VI.1	Proceso Optimizado de Extracción del Carmín	76
VI.2	Proceso Optimizado de Preparación de Lacas	81
VI.3	Separación de la fracción C	107

GLOSARIO DE TÉRMINOS

GRANA HUMEDA:	Grana recién recolectada.
GRANA BLANCA O PLATEADA:	Insectos adultos que no llegaron a ovipositar.
GRANA SECA:	Es la grana comercial, es decir los cuerpos secos de las hembras adultas antes de ovipositar, clasificadas y embolsadas.
GRANA NEGRA:	Insectos adultos después de ovipositar.
CLADODIO:	Penca o raqueta del nopal <i>Opuntia spp.</i>
PIE DE CRIA:	Hembras adultas en estado de oviposición.
EXTRACTO DE GRANA:	Extracto orgánico total de materia colorante contenido en la grana.
CARMIN:	Materia colorante obtenida por extracción a partir de la grana
LACA DE CARMIN:	Sales Calcio-Alumínicas con aproximadamente 52 % de Ácido Carmínico.
ACIDO CARMÍNICO:	Principal colorante contenido en el Carmín.
COCCERINA:	Cera que recubre el cuerpo de la Grana.

ABREVIATURAS

® :	Marca Registrada
AC :	Ácido Carmínico
AE :	Acuoetanólico
AEHz :	Acuoetanólico Hidrolizado
AENHz :	Acuoetanólico No Hidrolizado
AHz :	Acuoso Hidrolizado
ANHz :	Acuoso No Hidrolizado
AOAC :	Association of Official Analytical Chemists
Art :	Artículo
Cap :	Capacidad
CCF :	Cromatografía Capa Fina
CCP :	Cromatografía de Capa Preparativa
Ed :	Edición
EDTA :	Etileno Diamino Tetracético
EOT :	Extracto Orgánico Total
Esp Abs :	Espectro de Absorción
Extr. :	Extracto
g :	gramos
GI :	Grado Industrial
HOMO :	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO :	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
ITINTEC :	Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas
JB :	J. Baker
Mét :	Método
min :	minutos
ml :	mililitros
Mod :	Modelo
nm :	nanómetros
p :	peso
p.a. :	pro análisis
Pág :	Página
rpm :	Revoluciones por minuto
Solv :	Solvente
TA :	Temperatura Ambiente
TLC :	Thin Layer Chromatography
t :	Tonelada Métrica (1000 Kg)

RESUMEN

En el presente estudio fue evaluado el proceso de extracción de la materia colorante (carmín) contenida en el insecto *Dactylopius coccus Costa*. Dentro de las condiciones ensayadas se encontró que el mejor resultado fue obtenido con una solución acuoetanólica (70:30, v:v) de **Na₂CO₃** (1.9×10^{-2} M) y de **EDTA** (2.97×10^{-3}). La evaluación de la influencia de la temperatura sobre la eficiencia de extracción dio 70 °C como resultado óptimo. Con estos antecedentes, la operación óptima de extracción se realizó por medio de una molienda eficiente en húmedo, seguida de una filtración centrífuga de alta velocidad.

Se estableció una metodología para la estabilización de la materia colorante contenida en el carmín, con diferentes soportes orgánicos sin pasar por la formación de la laca, pero comparándola siempre con la laca obtenida por las técnicas tradicionales.

Se realizó la normalización del método analítico utilizando como muestra patrón el ácido carmínico comercial. La cuantificación fue hecha por medida de la absorbancia y los factores incidentes que se estudiaron fueron: el solvente (acuoso y acuoetanólico, con y sin hidrólisis) y la longitud de onda.

Los límites con un buen comportamiento lineal, se encuentran en el intervalo de concentración de 10^{-6} a 10^{-4} M., mostrando su mejor sensibilidad para concentraciones próximas a 10^{-5} M.

Se registraron los espectros de absorbancia a diferentes valores de pH observando como el cromóforo principal va transformándose; ya sea por el desplazamiento de los equilibrios ácido-base en los que interviene o por que la presencia de otros electrolitos modifican su entorno electrónico molecular.

La cuantificación comparativa del ácido carmínico en los diferentes productos fue hecha a 494 nm; utilizando una curva patrón y las fórmulas descritas en la bibliografía, concluyéndose que los resultados más exactos son los obtenidos con la curva patrón.

ABSTRACT

The present study is an assessment of the procedures used for the extraction of the dyestuff (carmine) contained in the insect *Dactylopius coccus* Costa. Among the various sets of conditions examined, the best results were obtained with an aquo-ethanolic solution (70:30, v:v) of Na₂CO₃ (1.9×10^{-2} M) and EDTA (2.97×10^{-3} M). The assessment about the effect of temperature on the efficiency of the extraction showed that 70°C was the best. Considering these parameters, the best procedure for the extraction consisted in an efficient milling of the humid material, followed by a high-speed centrifugal filtration.

A methodology using different organic supports, without going through lake of carmin preparation, was established for the stabilization of the dyestuff within the carmine, always comparing it with the lake of carmin obtained by traditional techniques.

The analytic method applied was normalized using a commercial sample of carminic acid as a reference. The quantification was based on absorbance measurements, and the parameters studied were the solvent (aqueous and aquo-ethanolic solvents, with and without hydrolysis) and the wavelength of the measurement.

Good linear behaviour was observed in the concentration range from 10^{-6} M to 10^{-4} M, with the best sensitivity found at concentrations around 10^{-5} M.

The absorption spectra obtained at different pH values showed that the main chromophore undergoes a progressive transformation, either because of the shift in its acid-base equilibrium or because the presence of other electrolytes affects its electronic molecular environment.

The comparative spectroscopic quantification of the carminic acid in the various products was carried out at 494 nm, using a standard curve and the equations described in the bibliography. The measurements showed that the most precise results were obtained with the use of the standard curve.

I.- INTRODUCCIÓN

Los alimentos están compuestos principalmente por tres constituyentes esenciales: grasas, proteínas y carbohidratos; de esta manera cubren los requerimientos nutricionales de estructura y energéticos. Sin embargo, para que puedan ser aceptados e ingeridos por el consumidor, deben cumplir requisitos organolépticos muy bien definidos y tipificados por los hábitos alimenticios; esto quiere decir que los atributos de **color, olor, sabor y textura**, serán determinantes en el momento de tomar la decisión de ingerirlos. Ya que a través de ellos podemos inferir las primeras condiciones y características de calidad del alimento. Es a través de estos parámetros organolépticos, establecidos en el primer contacto con el alimento, que podemos evaluar instantáneamente la información que nos permita reconocer y aceptar o rechazar los alimentos.

A partir del momento en que los alimentos son producidos lejos de los centros de consumo, la tecnología alimentaria debe hacer uso de una serie de operaciones unitarias para el procesamiento, traslado y almacenamiento de los alimentos; garantizando su inocuidad, aumentando su vida de anaquel y evitando el deterioro y/o la contaminación. Evidentemente, dependiendo del tipo de tratamiento que se le haya dado a un alimento durante su procesamiento, habrá un mayor o menor grado de deterioro de sus características organolépticas; haciendo que sea necesario la reconstitución de estos valores organolépticos antes de su comercialización y consumo.

Entre las propiedades organolépticas más rápidamente afectadas por el manejo y/o el tratamiento de los alimentos está el color; su deterioro puede ir desde una ligera modificación hasta la pérdida total del mismo. Para poder reestablecer el color natural, modificado o perdido durante el tratamiento, es necesario añadir colorantes que sean capaces de restituir las características organolépticas naturales; sin que esto presente un riesgo para la salud del consumidor. Todo esto dará lugar a la creación de una nueva área de la ciencia, con amplias y continuas necesidades de investigación tecnológica y clínica.

El uso de los colorantes naturales en los alimentos se remonta a tiempos inmemoriales, tanto en el campo doméstico y artesanal como (más recientemente) en el campo industrial. Sin embargo, la investigación sistemática y especializada sobre la inocuidad de estos aditivos es algo reciente, comparativamente hablando.

El primer colorante sintético fue obtenido en 1856, por William Henry Perkin, desencadenando un vertiginoso desarrollo en la síntesis de otros compuestos análogos; gracias a las enormes ventajas comparativas, técnicas y económicas, que tenían sobre los colorantes naturales, es decir: fuerza colorante, brillo, estabilidad, facilidad de obtención, facilidad de aplicación, bajos costos, enormes volúmenes de producción y otros. Pero planteaba la incógnita de su inocuidad a corto, mediano y largo plazo.

La adición de colorantes orgánicos sintéticos en alimentos fue regulada por primera vez en los Estados Unidos en 1886 para su empleo en mantequilla y en 1896 para su adición a ciertos quesos. Para 1907, había cerca de 80 colorantes aprobados para su uso en alimentos ^[1], pero muy pocos habían sido estudiados y/o analizados. El Dr. Bernard Hesse, se dedicó a estudiar la inocuidad de estos colorantes, concluyendo que 16 de los 80 eran más o menos seguros y certificaba solo 7 para su uso general en alimentos. Esta información fue registrada en el Acta de Alimentos y Drogas de 1906.

En 1938, el Acta Federal de Drogas, Alimentos y Cosméticos de los Estados Unidos, establece que todos los colorantes sintéticos empleados como aditivos, deben ser certificados y clasificados de acuerdo a su uso. Se definieron tres términos que tendrían asentamiento legal:

- ❖ **FD&C:** Certifica su uso en alimentos, drogas y cosméticos.
- ❖ **D&C:** Para colorantes y pigmentos considerados seguros en drogas y cosméticos, que estén en contacto con mucosas o sean ingeridos.
- ❖ **D&C Externos:** Aconsejado para uso en drogas y cosméticos de aplicación externa.

Posteriormente y con el objeto de clasificar e identificar los colorantes, la "Society of Dyers and Colorist" en Inglaterra y la "American of Textile Chemists and Colorist" en Estados Unidos, desarrollaron el sistema clasificación e identificación llamado Color Index (CI); de esta manera, a cada colorante se le dio un número y un nombre CI. Pero actualmente, estos compuestos químicos pueden también ser identificados por su número de registro en el "Chemical Abstracts Service"(CAS).

Una serie de estudios realizados por las instituciones de salud en los Estados Unidos, evidenciaron que en 1950 aumentaron los reportes de niños enfermos por consumir dulces que contenían grandes cantidades de colorante. La FDA repitió los análisis de toxicidad en animales, aumentando los niveles de dosis y el tiempo de análisis, antes de emitir cualquier resultado. Los resultados fueron desfavorables para **FD&C Orange N°1**, **FD&C Orange N°2**, y **FD&C Red N°32**, eliminándose de la lista.

En 1960, el departamento de Salud propone una nueva legislación, especificando dos grupos de colorantes^[1]:

- ❖ **Aditivos de color certificados.** (Contiene los 7 colorantes sintéticos FD&C, mas dos de uso restringido)
- ❖ **Aditivos de color exentos de certificación.** (Contiene 26 colorantes)

Y se define el término de "**aditivos de color**", incluyendo dos cláusulas para su uso: la primera prohíbe el uso en alimentos, de colorantes que se haya demostrado que producen cáncer en humanos o animales; la segunda, permite el uso provisional de ciertos colorantes, mientras alguna investigación científica completa demuestre que pueden ser empleados de forma permanente.

También es regulado el uso de "**colorantes naturales**", los cuales requieren un análisis toxicológico previo a su comercialización. Sin embargo, quedan exentos de certificación para la especificación de pureza.

A través de los años, el uso de los colorantes sintéticos para alimentos se ha ido incrementando; sin embargo, los resultados de análisis toxicológicos adversos han obligado a retirar muchos de ellos del mercado, haciendo que las industrias, principalmente las de alimentos y cosméticos retomen los colorantes de origen natural en sus procesos. De esta manera respaldan la inocuidad de sus productos y explotan comercialmente estos atributos. Los requerimientos de colorantes en la industria principalmente alimenticia y de cosméticos es realmente muy grande y variada, a la par de la diversidad de productos que elaboran.

Uno de los colorantes naturales más admirables por su amplia aplicabilidad, conocido desde la época precolombina, es el **Carmín**, obtenido de los cuerpos secos de las hembras de la **Grana** o **Cochinilla** (*Dactylopius coccus*.Costa) que es un insecto hospedero del nopal.

A partir del momento que el colorante es obtenido por un proceso controlado y reconocido dentro de las normas vigentes, su uso ya no tiene restricciones ni es limitado; haciendo que se convierta en un producto de interés técnico y comercial para la industria de alimentos, farmacéutica y de cosméticos.

II.- ANTECEDENTES

II.1.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El carmín es un producto rojo natural obtenido de los cuerpos desecados de las hembras del insecto, *Dactylopius coccus*.Costa, que se desarrolla en algunas especies de opuntias. Este colorante era muy apreciado por las antiguas culturas mesoamericanas, desde la época prehispánica, que lo empleaban como colorante en: alimentos (panes ceremoniales), textiles (prendas de la alta sociedad), plumas de adorno, códices, para el decorado corporal y otros ^a.

Su explotación era muy bien conocida ya que diferenciaban entre las dos variedades más comunes: la grana fina ó cultivada a la que los *Mexicas* llamaban **Nocheztli** (Sangre de Tuna) y la grana silvestre llamada **Ixquimilihuqui**. La grana fina se la conoció también como **Induco** entre los *Mixtecos* y como **Bi-aa** entre los *Zapotecos* ^[2,3].

La domesticación y el cultivo de la grana se remonta a épocas que no pudieron ser determinadas con exactitud. Se estima sus orígenes durante el período Tolteca, alrededor del siglo X d.c., indicando como probable zona de origen la Mixteca mexicana, es decir los actuales estados de Oaxaca, Puebla y Guerrero. Se reporta que en 1480, Moctezuma recibió como tributo anual del estado de Oaxaca, 20 sacos de cochinilla. Gracias al Códice Mendocino, se sabe de zonas productoras en la Mixteca Alta: Miahuatlán, Cuicatlán, Nejapa de Madero, Ejutla y Ocotlán; sin embargo se tiene conocimiento que las civilizaciones Chancay, Paracas, Aymara y Queshwa de América del Sur también empleaban la grana desde épocas precolombinas.

Al llegar los españoles al nuevo mundo, se dan cuenta rápidamente de la importancia económica y cultural que tenía este colorante en las poblaciones aborígenes. Constatan la aceptación y el valor de este tinte en los mercados europeos y establecen las bases de producción necesarias para desarrollar un comercio que lograron monopolizar rápidamente ya que su industria textil, constituida esencialmente de lana y seda, requería de otros insumos, sobre todo tintes de color rojo para diversificar su producción. Gracias a su extraordinaria calidad y viveza de color el tinte del carmín se impuso en los centros textiles europeos, convirtiéndose en la mercancía más preciada de América, después de los metales preciosos ^[4]; es así que para el año 1530 la grana era incorporada al sistema de Tributos Reales.

Para el año 1550 el mercado de Puebla se transforma en un centro de acopio abastecido por los centros productores de Tlaxcala, Cholula, Tepeaca, Tecamachalco y otros pueblos, llegando a comercializar grana por valores de hasta 200 000 pesos en oro por año. Herrera consigna que en esta época se enviaba anualmente a Europa 32,000 @ de grana seca ^b con un valor aproximado de medio millón de libras esterlinas ^[5].

Para el año 1560 los requerimientos ibéricos de grana seca fueron superados, exportando su excedente a los Países Bajos. El comercio de grana en Europa se había generalizado y continuó su uso durante el siglo XVII.

^a El rojo representaba la sangre, los rayos del sol, el fuego y a varios de sus Dioses principales atribuían este color.

^b 1@ equivalía a 25 libras en peso aproximadamente 11.506 Kg.

Dada su gran importancia económica la adulteración de la grana era una costumbre generalizada y para evitar el fraude en 1572 se creó el cargo de **"Juez de la grana"** y toda la grana seca que se enviaba a España debía ser registrada en dos puntos: primero en Puebla de los Ángeles y después en Veracruz, antes de ser embarcada para Sevilla.

Para 1760 ya existían en Oaxaca los **"corredores de grana"** que se encargaban de llevar los precios del día a los comerciantes ^[5].

Debido a los saqueos por parte de navíos piratas, el Rey emite en 1793 un decreto en donde prohíbe que el Oro, la Plata y la Grana se embarquen en navíos mercantes dificultando su comercio entre 1793-1796 ya que los comerciantes debían esperar a los navíos de guerra para embarcar sus productos. A pesar de esto, es en el siglo XVIII cuando alcanza su mayor auge comercial, período comprendido entre 1745-1854 ^[5].

El derrumbe del monopolio español sobrevino cuando el cultivo y conocimiento de la grana se extendió a otros países. La introducción de la grana en las Islas Canarias fue en el año 1820.

Finalmente, la aparición de los colorantes sintéticos a fines del siglo XIX, marcará un factor determinante para la prácticamente total desaparición de este cultivo en México, ya que a partir de 1858 la producción empezó a declinar. Aunado a esto se sumaron otros factores como la Guerra de Independencia en México y el cambio de las grandes extensiones de nopales por cultivos alimenticios.



Ontecpanxiquipilli nocheztlī

40 talegas de grana cochinilla

dos zurrones de grana

II.2. LA GRANA O COCHINILLA DEL CARMÍN

Los términos grana, cochinilla ó carmín han sido empleados indistintamente para describir al colorante natural ya extraído o a su materia prima. El producto de partida para la extracción del colorante está constituido por los cuerpos secos de las hembras del insecto ***Dactylopius coccus Costa***, el cual vive y se desarrolla adherido a las pencas de diferentes variedades de nopal. Según algunos autores, los nopales en los que se cultivó la cochinilla fueron: Castilla (***Opuntia ficus indica***), San Gabriel (***Opuntia tomentosa***) y ***Nopalea coccinifera***. (cochenillifera) ^[2].

Pertenece a la familia monogénica Dactylopiidae, cuyo género, según De Lotto comprende nueve especies:

Dactylopius austrinus spec. nov.
Dactylopius ceylonicus (Green, 1896)
Dactylopius coccus (Costa, 1835)
Dactylopius confertus spec. nov.
Dactylopius confusus (Cockerell, 1893)
Dactylopius opuntiae (Cockerell, 1896)
Dactylopius salmianus spec. nov.
Dactylopius tomentosus (Lamarck, 1801)
Dactylopius zimmermannii spec. nov.

De las cuáles ***Dactylopius coccus*** es la especie que se sigue utilizando para obtener el carmín, debido a que contiene un mayor porcentaje de Ácido Carmínico en su composición; su cubierta cerosa es de tipo harinoso, fácil de eliminar. Es la única conocida como grana cultivada o fina, ya que el resto de las especies forman un grupo denominado **granas silvestres** independientemente de la especie de la que se trate [Portillo, 1992], distinguiéndose éstas últimas por que la cera que las cubre es de tipo algodonoso, difícil de eliminar, y además por ser depredadoras de su hospedero.

II.2.1. Taxonomía

En algunas referencias todavía se llega a encontrar como ***Coccus cacti***, debido a la clasificación hecha por el naturalista sueco, Linneo (1758). A pesar de la precisión y la profundidad de los trabajos de Linneo, 141 años después, Cockerell (1899) al estudiar y consultar los dibujos hechos por De Geer, copiados de ejemplares de la misma procedencia que utilizó Linneo, se dio cuenta que no se trataba de la grana sino de un monoflébido. Actualmente ***Coccus cacti***.**Linneo**, se refiere a un coccido perteneciente a la familia *Monophlebinae* (Margonodiade) del genero *Protortoria* ^[2,6]. La clasificación vigente es la propuesta por el coccidólogo italiano Costa y publicada en 1835 (Anterior a la descripción hecha por Burmeister, 1839); esta clasificación nos permite la ubicación taxonómica del ***Dactylopius coccus Costa*** y de otros coccidos de interés. (Fig. II.1).

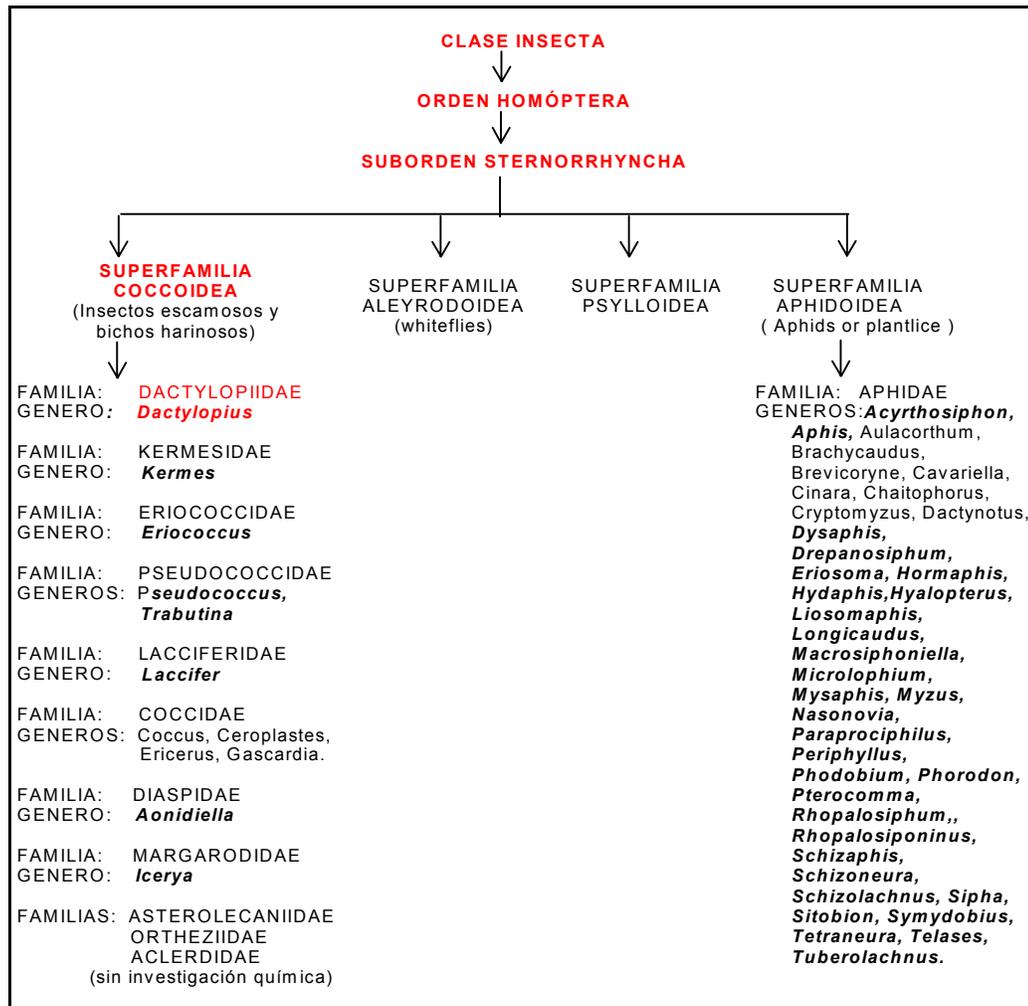


Fig. II.1 Ubicación taxonómica del *Dactylopius coccus* Costa
Fuente: K.S. Brown. The chemistry of aphids and scale insects ^[7]

II.2.2. Ciclo Biológico

La hembra y el macho son similares en los dos primeros estados: huevo y ninfa I; la diferenciación comienza en la etapa de ninfa II donde las hembras mudan para transformarse en adultas, mientras que los machos elaboran un capullo del que emergen como adultos ^[8].

El notable dimorfismo sexual se debe a que las hembras llevan a cabo una metamorfosis incompleta, en tanto que los machos son de metamorfosis holometábola, por lo que los estados inmaduros de estos últimos deberían llamarse larvas ^[2] (**Fig. II.2**).

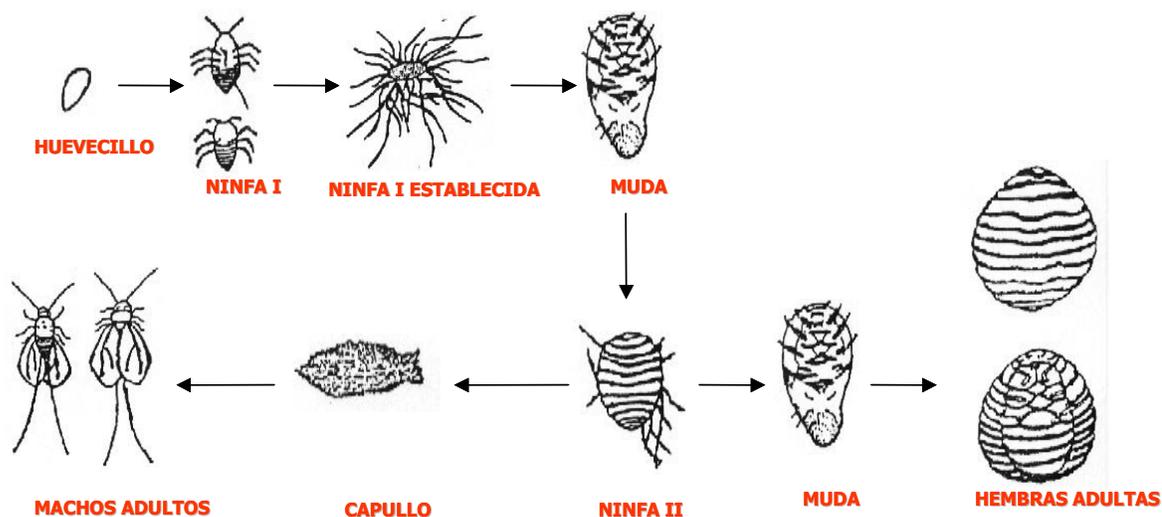


Fig. II.2 Ciclo biológico del *Dactylopius coccus* Costa. ^[9]

Las ninfas recién nacidas, que ya presentan un tinte ligeramente rosado, permanecen cerca de la madre y empiezan a cubrirse de cera junto con otras ninfas (fase de ninfa estacionaria); posteriormente se dispersan, período de ninfa migrante (en Oaxaca las llaman "cocoyuchi" ^[2]), en esta fase son atraídas por la luz, aunque buscan lugares sombreados para establecerse (período de ninfa establecida) ^[10]. Pueden presentar movilidad de 1 a 5 días y luego se fijan sobre el cladodio del nopal para alimentarse, permaneciendo en esa posición hasta completar su desarrollo.

Después de 28 a 30 días se presenta la primera muda dando origen a la ninfa II, en éste estado se va cubriendo de cera blanca en forma de polvo fino. Después de 8-10 días se inicia el dimorfismo sexual.

En el caso de las hembras la ninfa II muda para dar lugar a la hembra adulta. La cópula tiene lugar aproximadamente a los 57 días. A partir de ese momento la hembra aumenta de volumen y sus patas se retraen, conjuntamente con las antenas. El período de preoviposición puede variar grandemente, entre 30 a 50 días. Se le da el nombre de oviplena cuando está a punto de parir. La eclosión tiene lugar de pocos minutos a 2-6 horas después de la oviposición ^[2,10].

La bibliografía menciona que la hembra pone entre 100-350 huevecillos ^[2,10]. Al terminar, el cuerpo de la hembra se contrae hasta que muere, a ésta grana que seca en los nidos se le llama **grana negra**.

En el caso del macho la ninfa II forma un capullo, comúnmente llamado cocón, con las secreciones cerosas en forma de filamentos, el cuál se convertirá en la prepupa y posteriormente en pupa; estos estadios pueden durar entre 15 a 30 días. A continuación emerge el macho adulto, el cuál tiene un promedio de vida de 3 días.

El ciclo de vida y el comportamiento de la grana dependen de diferentes factores ambientales como; la humedad, la luz y la temperatura, siendo esta última la que mayor efecto tiene sobre la duración del ciclo biológico ^[10], que puede variar entre 90 a 120 días. Se considera que las hembras deben ser recolectadas antes de que se produzca la oviposición, ya que sería el momento en el que tienen el mayor porcentaje de colorante.

II.2.3. Morfología

Macho

Es mas pequeño que la hembra, tienen cabeza, tórax y abdomen bien diferenciados; este último termina en dos largos filamentos; un par de alas y antenas bien desarrolladas, carecen de órganos bucales y son de vida muy corta. Proporcionalmente el número de machos es menor que el de hembras.



Hembras adultas

Las hembras carecen de alas, son de forma oval plano convexas (región dorsal convexa y ventral plana) y claramente segmentadas, su tamaño puede variar entre 4 y 6 mm de largo por 3 a 4 mm de ancho, dependiendo esencialmente de las condiciones de su cultivo y del período de reproducción. La boca tiene un pico o probóscis formado por el lábium, dentro del cuál hay cuatro estiletes, con los que se fijan al cladodio y se alimentan. Su cutícula es delgada y flexible^[10]. Están cubiertas de una cera de color blanco y de consistencia pulverulenta. Cuando se encuentran adheridas al cladodio, pueden estar en forma individual o formando colonias; a medida que sus individuos crecen forman una capa cerosa común, tan grande que en algunos casos puede llegar a cubrir la cara entera del cladodio.



Si la oviposición se lleva a cabo en el cladodio, en algunos casos, los huevecillos quedan bajo el cuerpo de la hembra formando una especie de collar.

II.2.4. Composición Proximal

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de la grana varía mucho con las condiciones ambientales, esto quiere decir que la composición es también muy variable, razón por la que sólo se pueden presentar valores promedio, que son los que generalmente se manejan en la bibliografía ^[2]. Desafortunadamente, los datos reportados no siempre especifican si se trata de valores expresados en base seca o en base húmeda, lo que hace diferencias significativas entre los porcentajes ^[2,11,12]; entonces tendremos:

**Tabla II.1 Composición promedio de la grana
(En base húmeda)**

Composición	Porcentaje
Ác. Carmínico	10 - 22
Proteína	40 - 45
Grasa	10 - 12
Carbohidratos	10 - 12
Ceras [*]	2 - 3
Cenizas	3 - 5
Humedad	10 - 12

[*] : La cera esta compuesta principalmente por Coccerina

II.3. PROCESAMIENTO DE LA GRANA

El ciclo biológico de la grana puede variar entre 90 y 120 días, dependiendo de las condiciones ambientales. Una vez que la cochinilla llega a su estado adulto se procede a cosecharla, dejando algunas en el cladodio que servirán como "**Pié de Cría**" para el próximo ciclo.

En este punto la grana cosechada se llama **grana húmeda** y debe ser procesada lo antes posible para evitar una disminución en el contenido de colorante.

Desde el punto de vista biológico, es sorprendente que la grana fina, con las dimensiones que tiene, contenga materia colorante hasta en un 22 % de su peso en seco; contrariamente a la grana silvestre y a otros coccidos de la familia.

Aunque no se conoce exactamente la verdadera función del Ácido Carmínico en el insecto, se ha constatado experimentalmente que el porcentaje de ácido carmínico disminuye en el insecto, cuando éste es desprendido de su fuente de alimentación o cuando es sometido a cambios ambientales bruscos (se ha podido probar que cuando se espera más de 3 horas antes del sacrificio, el % puede disminuir hasta en un 4 %). Estas constataciones hacen pensar que el colorante tiene una función fisiológica muy significativa ya que lo utiliza probablemente como recurso de protección ante sus depredadores, o como promotor de su sistema de defensa. Esto se confirma con el hecho que las larvas de otros 3 insectos; *Hyperaspis trifurcate*, *Leucopis sp* y *Laetilia coccidivora*, se alimentan de grana cochinilla como fuente de ácido carmínico, que lo utilizan posteriormente como componente químico defensivo ante las hormigas ^[13].

II.3.1. Recolección

Si la infestación ha sido bien conducida se obtendrán granas de la misma edad y tamaño uniforme, si no es así se cosechan granas de diversos estadios (jóvenes, maduras y sobre maduras) lo que afecta la calidad del producto.

De una manera general, la cosecha consiste en el desprendimiento del insecto adherido al cladodio, el mismo que puede realizarse mediante diferentes sistemas operativos, entre los cuales tenemos:

Cepillado con brochas de fibras naturales

Permite desprender las granas de los cladodios sin dañarlas o perforarlas, dejándolas caer directamente en un recipiente recolector.

Empleando utensilios de plástico o de hoja metálica

Con los cuáles se vaya desprendiendo la grana evitando al máximo todo daño mecánico y dejándola caer libremente en el recipiente recolector.

Por medio de soplado de aire a presión

Esta técnica permite el desprendimiento de la grana por medio de un soplado con aire a presión. Cada cladodio puede ser soplado independientemente mediante un dispositivo adecuado que permita dirigir el aire. Los insectos pueden ser recolectados en bastidores con malla milimétrica.

II.3.2. Sacrificio

El tratamiento postcosecha consiste básicamente en matar y secar al insecto, lo más rápidamente posible. Desde los sistemas tradicionales hasta los más actuales, los procedimientos operativos han evolucionado poco; independientemente de la escala de trabajo, los métodos generalmente empleados para el sacrificio de la grana son:

Inmersión en agua hirviendo

El insecto es colocado en bolsas de tela bien tupida o en canastos, el recipiente es tapado y sujetado con una cuerda por la parte superior; luego es introducido en un tanque que contiene agua en ebullición. Después de unos minutos se saca para proceder al secado de la grana.

Este procedimiento tiene el inconveniente de la pérdida de materia colorante por disolución en el agua caliente.

Algunas variantes operativas usan bolsas impermeables y las sumergen en agua hirviendo por unos cuantos minutos.

Exposición al vapor de agua

El insecto es colocado en bolsas o canastos que son amarrados a un palo que se lo mantiene en la parte superior de un recipiente que contiene agua hirviendo, de manera que la bolsa no llegue a sumergirse en el agua y las granas sean sofocadas por el vapor.

Otra variante operativa es colocando las granas en una caja con base de malla milimétrica la cuál es colocada dentro de un recipiente con agua hirviendo, justo encima del nivel del agua. Una vez muertas las granas se procede a su secado^[14].

Por congelación

La grana húmeda es sometida a temperaturas de 0° C durante unas 6 horas; posteriormente son secadas al sol hasta la humedad adecuada para su molienda.

Por inmersión en Hexano

El procedimiento es el mismo que el empleado con agua hirviendo, se emplean recipientes herméticos, tiene la ventaja de que se puede eliminar la cera, y además dada la gran volatilidad del Hexano puede ser recuperado y eliminado totalmente de las granas durante el secado.

Independientemente de la técnica de sacrificio empleada, el objetivo es matarlas en el menor tiempo posible para que no disminuya el contenido de materia colorante. Por otra parte se debe evitar el uso de solventes orgánicos u otro tipo de soluciones capaces de dejar residuos que afecten la comercialización de la grana. Por ejemplo para uso en alimentos no deben quedar trazas de Hexano.

II.3.3. Secado

El secado es una de las etapas más importantes porque incide directamente sobre la calidad del producto final. En esta operación se busca obtener un producto que tenga una humedad comprendida entre 8 y 10 % en peso.

Para secar, la grana es extendida en diferentes superficies; lonas de tela , bandejas metálicas, etc. de manera que no rebase más de un centímetro de espesor. Los métodos de secado son muy diversos, entre los que se pueden mencionar:

Exposición al sol directo

Este método es muy usado en zonas rurales, generalmente donde se cultiva la grana. Una vez extendida se deja a la acción directa del sol por períodos de 4 a 5 horas al día y durante 6 días aproximadamente. De esa manera el agua es eliminada evitando así la aparición de hongos ^[14] Este método tiene la desventaja de que toma mucho tiempo.

Exposición al ambiente bajo sombra

Este método utiliza mayor tiempo de secado, entre 25 a 30 días, combinan tiempos en el sol y en la sombra logrando una grana que se comercializa óptimamente ^[14].

En horno

En este método se pueden utilizar hornos de charolas , se regula la temperatura a 65° C. En algunos casos pueden estar provistos de circulación de aire o sistemas de vacío. El tiempo de secado es aproximadamente de 4 horas dependiendo del tamaño de la grana y del volumen a ser procesado. Este método tiene la ventaja de ser muy rápido, pero se debe cuidar que la temperatura no supere los 65 °C ^[14].

La grana húmeda que fue secada al sol se la conoce como grana blanca o plateada, donde aproximadamente 80,000 insectos pesan 1 Kg. Se requieren aproximadamente 130,000 insectos de grana negra para hacer 1 Kg. ^[2].

II.3.4. Limpieza y clasificación

En esta etapa se trata de eliminar los restos de coccerina y otras impureza ligeras empleando diferentes técnicas:

Se pueden usar separadores neumáticos con aire insuflado.

También se pueden utilizar técnicas de abrasión en tambores rotativos inclinados. La ventaja de esta técnica es que al mismo tiempo realiza un pulido eliminando la cubierta cerosa de manera más eficiente.

La clasificación de la grana se realiza por medio de zarandas vibratorias calibradas para clasificar la grana en :

Grana de 1 ^a :	≥ 2 mm
Grana de 2 ^{da} :	1 ≤ Tamaño < 2 mm
Granilla:	< de 1 mm

Una vez secada y clasificada la grana es empacada y almacenada en un lugar seco con ventilación adecuada. A partir de este punto la grana puede ser comercializada como grana seca o continuar siendo procesada para obtener productos con un mayor valor agregado.

II.3.5. Desgrasado

Esta operación permite eliminar los restos de cubierta cerosa que hubieren pasado en las operaciones anteriores. Se realiza por medio de una extracción sólido-líquido empleando solventes orgánicos como hexano, éter de petróleo o éter etílico. Una vez hecha la extracción, el solvente es recuperado hasta su eliminación total. Debido a las restricciones sobre los residuos de solventes orgánicos este tratamiento no es muy utilizado ni recomendado; razón por la cual se prefiere una buena limpieza mecánica para pasar directamente a la molienda.

II.3.6. Molienda

El proceso de molienda puede ser realizado con sistemas que van desde los molinos manuales y artesanales hasta los diferentes sistemas mecánicos existentes en el mercado. El objetivo principal de esta operación es alcanzar la granulometría óptima para una extracción eficiente; esto quiere decir que se debe evitar la producción de polvillo o dejar partículas demasiado grandes ya que en ambos casos disminuye el rendimiento de extracción.

II.3.7. Almacenamiento

Debido a la naturaleza orgánica de la grana, se deberá tener especial cuidado durante su almacenamiento, por lo que se recomienda guardar el producto en sacos completamente limpios y secos elaborados con lienzo u otras fibras naturales, como el yute, de manera que exista circulación de aire, minimizando con ello el riesgo de descomposición por el crecimiento de hongos y/o bacterias. Preferentemente se almacenará en lugares secos, cerrados, con ventilación adecuada. La grana molida se almacena en bolsas de polietileno con cierre hermético.

En resumen podemos decir que una vez sacrificada la grana, el procesamiento de la grana húmeda consta de las siguientes etapas (**Esquema II. 1**).



Esquema II.1 Proceso general de la grana húmeda

II.4. EXTRACCIÓN DEL COLORANTE

Desde los métodos prehispánicos, hasta las técnicas operativas más actuales (**Esquema II.2**); la extracción del colorante a partir de grana seca es siempre un proceso de extracción sólido-líquido, habiéndose ensayado toda una serie de métodos, que varían principalmente en los siguientes factores:

El solvente de extracción
El tiempo de extracción
El número de extracciones
El tamaño de partícula
La temperatura

Generalmente todos estos procesos siempre emplean como insumo de partida la **grana seca y molida**.

II.4.1. Solvente de Extracción

El solvente de extracción más utilizado es el agua; sin embargo, se ha visto también que las mezclas de agua con alcohol (metanol o etanol en diferentes porcentaje) favorecen el rendimiento de extracción y ayudan a la conservación de los extractos. La ventaja con estas mezclas de solventes es que el alcohol puede ser eliminado más fácilmente.

II.4.2. Tiempo de Extracción

El tiempo de extracción ha sido considerado como el factor de menor incidencia en el proceso de obtención de la materia colorante ^[16]. Sin embargo, en los procesos industriales, dependiendo de la técnica empleada y de los volúmenes a tratar, será un factor importante que incidirá en los costos, tanto de operación como de inversión.

II.4.3. Número de Extracciones

Los resultados obtenidos en trabajos recientes de investigación muestran que, en comparación con la Temperatura, Concentración de Metanol y Tiempo de Extracción, el Número de Extracciones es el parámetro más incidente sobre el rendimiento global de extracción del colorante. El análisis estadístico, bajo un diseño experimental factorial a dos niveles, muestra que el manejo de 2 y 3 etapas de extracción, es el que da mejores resultados ^[16].

II.4.4. Tamaño de Partícula

La granulometría tendrá una gran importancia en el rendimiento total de la extracción; cuanto mayor es el tamaño de partícula menor es el rendimiento, ya que la superficie total de contacto con el solvente es menor; cuanto menor es el tamaño de partícula, la extracción es mayor debido al aumento de la superficie de contacto; sin embargo, se forman lodos que ocasionan grandes problemas durante las operaciones de filtración.

II.4.5. Temperatura de Extracción

Sabemos que conforme se aumenta la temperatura, la extracción es mayor; sin embargo, el incremento de temperatura entre 70 y 100 °C, ya no aumenta significativamente el rendimiento de extracción de la materia colorante y es más significativo el número de extracciones; por lo tanto, debe buscarse un equilibrio donde el gasto energético y el tiempo de operación sea menor.

Si bien se ha tenido información de que en el Perú la extracción se lleva a cabo a temperaturas de ebullición del agua; sin embargo, los trabajos de Kearsley ^[15], donde analiza el efecto de la temperatura sobre la estabilidad del color, muestran que: hasta 50° C la absorbancia se mantiene estable en un tiempo de evaluación máximo de 240 min. A 75 ° C a los 180 min. empieza a disminuir ligeramente y a 100 ° C una disminución considerable de la absorbancia es notoria desde los primeros minutos, bajando así los rendimientos esperados (**Fig.II.3**)

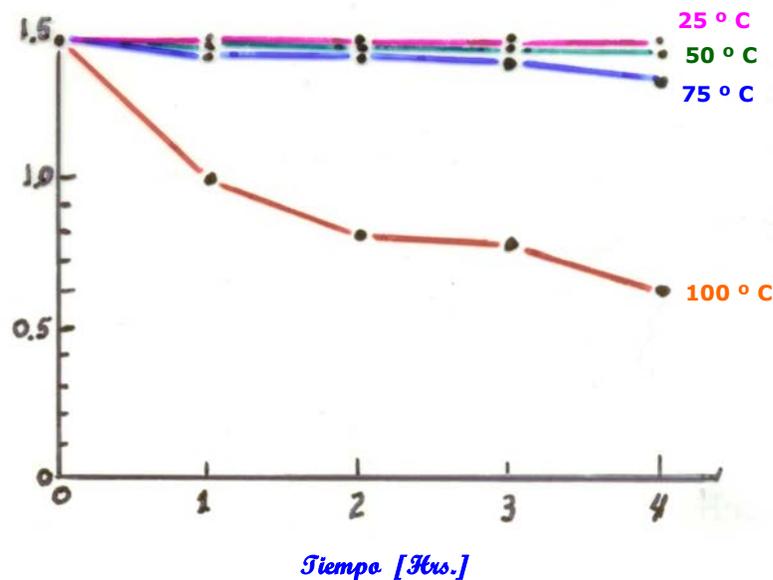


Fig. II.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del color en cochinilla Kearsley y Katsaboxakis. ^[15]

II.5. PRINCIPIO COLORANTE

II.5.1. Ácido Carmínico

Las propiedades tintóreas de la grana se deben esencialmente al **Ácido Carmínico** y su precio es directamente proporcional al porcentaje del mismo (**Fig. II.4**).

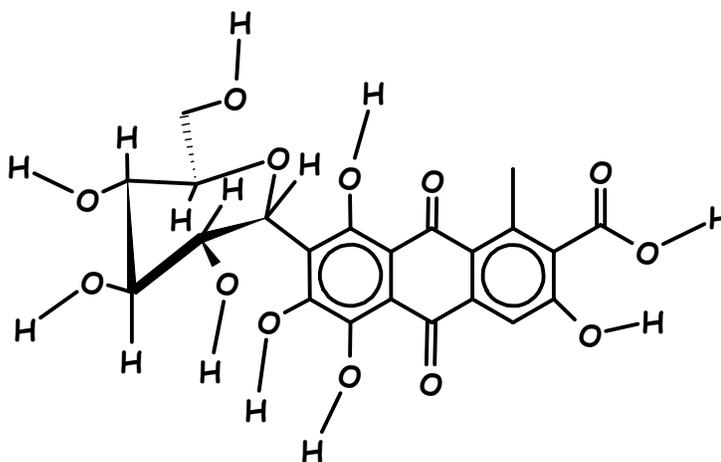


Fig. II.4 Estructura Química del Ácido Carmínico

Investigaciones recientes, mencionan la existencia de otras materias colorantes como el **Ácido Kermésico**, **Ácido Flavokermésico** y 4 especies colorantes aún no identificadas que han sido clasificadas como: dcII, dcIII, dcIV y dcVII. Su determinación fue hecha por HPLC (**Fig. II.5**), usando como fase móvil un gradiente de solventes de agua: metanol: ácido ortofosfórico (5 % en agua). El tiempo total de separación fue de 30 min., con un gradiente de solventes que va de (50:40:10) durante 11 min hasta (0:90:10) con una velocidad de flujo de 1.2 ml/min y una presión de 200 N/m². En este punto la separación se mantuvo durante 6 min. adicionales. ^[17,18]

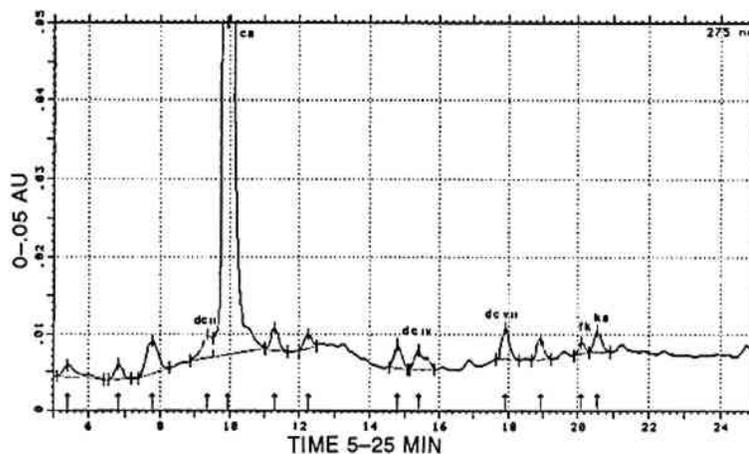


Fig. II.5 Análisis por HPLC del colorante obtenido del *Dactylopius coccus* Costa
Ca: ácido carmínico; fk: ácido flavokermésico; ka: ácido kermésico; y
dcII, dcIV, dcVII: (Wouters and Verhecken 1989a, 1989b) ^[17,18]

El Ácido Carmínico, es soluble en agua, alcohol, ácido sulfúrico concentrado y soluciones alcalinas. Es poco soluble en éter etílico, pero es prácticamente insoluble en éter de petróleo, benceno y cloroformo. Cristaliza en etanol, formando cristales prismáticos de color rojo brillante que se oscurecen a partir de 120 °C y se descomponen a partir de 250 °C ^[11,19].

En solución acuosa toma un color rojo oscuro cuya tonalidad varía en función del **pH**. En medio ácido, hasta pH \approx 4.0, es color naranja; en el intervalo de 5.0 a 6.0 toma una coloración roja y a partir de pH = 6.2, la solución torna una coloración púrpura, cada vez mas intensa, a medida que aumenta el pH. : $\lambda_{\max}(\text{agua}) = 500 \text{ nm} [\epsilon = 6800]$; $\lambda_{\max}(\text{HCl: } 0.02 \text{ N}) = 490\text{-}500 \text{ nm} [\epsilon = 5800]$; $\lambda_{\max}(\text{NaOH: } 0.0001 \text{ N}) = 540 \text{ nm} [\epsilon = 3450]$; $[\alpha]_{654}^{15} = + 51.6^\circ$ (agua) ^[11].

Es importante hacer notar en este punto que cuando el solvente básico contiene un hidróxido alcalino, la solución es también de color púrpura muy intenso, pero se descompone hasta la decoloración total en función del tiempo, el cual es tanto mas corto cuanto mayor es la concentración de la base.

Dependiendo del país y/o la institución, el Ácido Carmínico es conocido por muchos nombres comerciales y/o claves de identificación, (**Tabla II.2**)

Tabla II.2 Nombres y números que identifican al Ácido Carmínico

Denominaciones	Nombres/Números
Sistemático	Ácido 7- α -D-glucopiranosil-9,10-dihidro-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxo-2-antraceno carboxílico
Nombre común	Ácido carmínico
¹ CEE No.	E-120
CEE Denominación	Rojo cochinilla
² CI. No.	75470
C.I. Denominación	Rojo natural No. 4

Nota:

1. E : Es el número asignado al colorante en Europa.
2. CI : Es su **Color Index**, es decir: el numero asignado por la Asociación Americana de textiles y coloristas

El Ácido Carmínico (**AC**) fue aislado por primera vez en forma cristalina en 1858. Su primer estructura fue propuesta por **Otto Dimroth** en 1916 y modificada posteriormente por otros investigadores. La estereoquímica α del enlace C-glucosídico es la que generalmente se considera como específica del (**AC**), aunque también se reportó la existencia del isómero β , sobre todo en el (**AC**) de origen sintético ^[20].

Su estructura es una Carboxi-polifenol-Antraquinona- α -glucosídica cuya particularidad es la existencia de un enlace σ entre el núcleo antraquinona y el carbono anómero de la glucosa en su orientación α . Esto le confiere una resistencia particular contra las hidrólisis ácidas, mientras que sus funciones fenólicas le permiten formar complejos con una gran variedad de cationes metálicos. Esta estabilidad del complejo desplaza su máximo de absorción en el espectro visible, hacia longitudes de onda más elevadas, incrementando la intensidad del color^[21].

Sus propiedades de solubilidad son muy fácilmente comprensibles debido a su multifuncionalidad prótico-polar en la unidad **antraquinona** (1 ácido, 4 fenoles y 2 cetonas) y la presencia de la glucosa como substituyente, con sus varios grupos polares **OH**. Todos estos grupos son capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua o con otros solventes orgánicos polares.

El ácido carmínico disuelto en agua sufre degradación fotoquímica como resultado de la absorción de la luz, en modelos experimentales se encontró que la oxidación degradativa del AC es fuertemente dependiente del valor de pH, de la presión parcial de oxígeno y de la exposición a la luz. La decoloración del carmín se incrementa a medida que el valor de pH aumenta debido a la fotolabilidad de las formas deprotonadas^[22,23].

La degradación oxidativa de colorantes como el **AC**, es de especial interés, ya que su oxidación está asociada con la oxidación de los lípidos en alimentos; bajo ciertas circunstancias son capaces de iniciar la rancidez de los lípidos. Además, la posibilidad de que los colorantes de alimentos actúen como fotosensibilizadores en la oxidación de los lípidos deberá ser considerada y probada en estos productos antes de su uso^[23].

También se ha reportado que el **AC** podría tener una actividad anticancerígena, ya que por su estructura molecular podría ser un pariente distante de los antibióticos carminomicina y carminomicinona^[20].

II.5.2. Extracto de Cochinilla

Es la solución concentrada, obtenida después de eliminar el alcohol de un extracto acuo-etanólico de cochinilla, obtenido a partir de los cuerpos secos de las hembras del insecto **Dactylopius coccus Costa**. Este extracto contiene aproximadamente de 2 a 4 % de Ácido Carmínico

El extracto de cochinilla debe cumplir las siguientes especificaciones: ^[11,25,26]

Arsénico (As):	≤ 1 ppm
Plomo (Pb):	≤ 10 ppm
pH (a 25° C)	5.0 a 5.5
Proteína (N x 6.25):	≤ 2.2 %
Sólidos totales:	5.7 - 6.3%
Alcohol metílico:	≤ 150 ppm
Ácido carmínico:	≥ 1.8 %
Salmonella :	negativo

El extracto debe ser conservado en frío o adicionado de un conservador; es frecuente el uso de benzoato de sodio, para evitar el desarrollo de microorganismos.

Las soluciones acuosas del extracto de grana, dan las siguientes reacciones ^[24]:

Ácidos:	Color anaranjado
Álcalis:	Color violeta
Agua de Cal:	Precipitado color violeta
Alumbre:	Precipitados rojos, que se forman lentamente.
Cloruro de Aluminio:	Precipitado violeta rojizo.
Cloruro de Estaño(II):	Precipitado violeta.
Cloruro de Estaño (IV):	Color escarlata brillante.
Sulfato Ferroso:	Precipitado violeta grisáceo.
Sulfato de Cobre:	Precipitado violeta.
Acetato de Plomo:	Precipitado violeta.
Sulfato de Zinc:	Precipitado violeta.
Ácido Oxálico:	Precipitado rojo.

II.5.3. Laca de Carmín: [CAS Reg. No. 1390-65-4]

Es la sal Aluminica o Calcio-Aluminica obtenida a partir de una extracción acuosa de cochinilla, donde el principio colorante es principalmente el ácido carmínico. La laca de carmín contiene un 50% o más de Ácido Carmínico ^[25].

Químicamente, el **Carmín** es en realidad la materia colorante que se obtiene a partir del extracto acuoso de la cochinilla, después de haber separado las proteínas, grasas y otros constituyentes del insecto que son arrastrados durante el proceso de extracción. Sin embargo, en EUA el término carmín se refiere a la **Laca de Carmín** ^[19], que es la sal de Aluminio o Calcio-Aluminica del Ácido Carmínico (**Fig. II.6**).

La laca de carmín debe cumplir las siguientes especificaciones: ^[11,25,26]

Arsénico (As):	≤	1 ppm (mg/kg)
Plomo (Pb):	≤	10 ppm (mg/kg).
Materia volátil:	≤	20 % (a 135° C por 3 horas).
Cenizas:	≤	12 %
Ácido carmínico:	≥	50 %
<i>Salmonella</i> :		prueba negativa

La laca de carmín es soluble en soluciones alcalinas, poco soluble en agua caliente y prácticamente insoluble en agua fría y ácidos diluidos ^[19]. Antes de su uso en alimentos debe ser pasteurizada y quedar libre de Salmonella.

Los complejos del Ácido Carmínico con ciertos cationes metálicos, producen tonos rojos muy brillantes, estables y exclusivos. Este tipo de derivados son usados principalmente en la industria textil.

Los procesos de elaboración de la laca carmín están generalmente patentados o, por lo menos, son mantenidos en secreto por las empresas manufactureras.

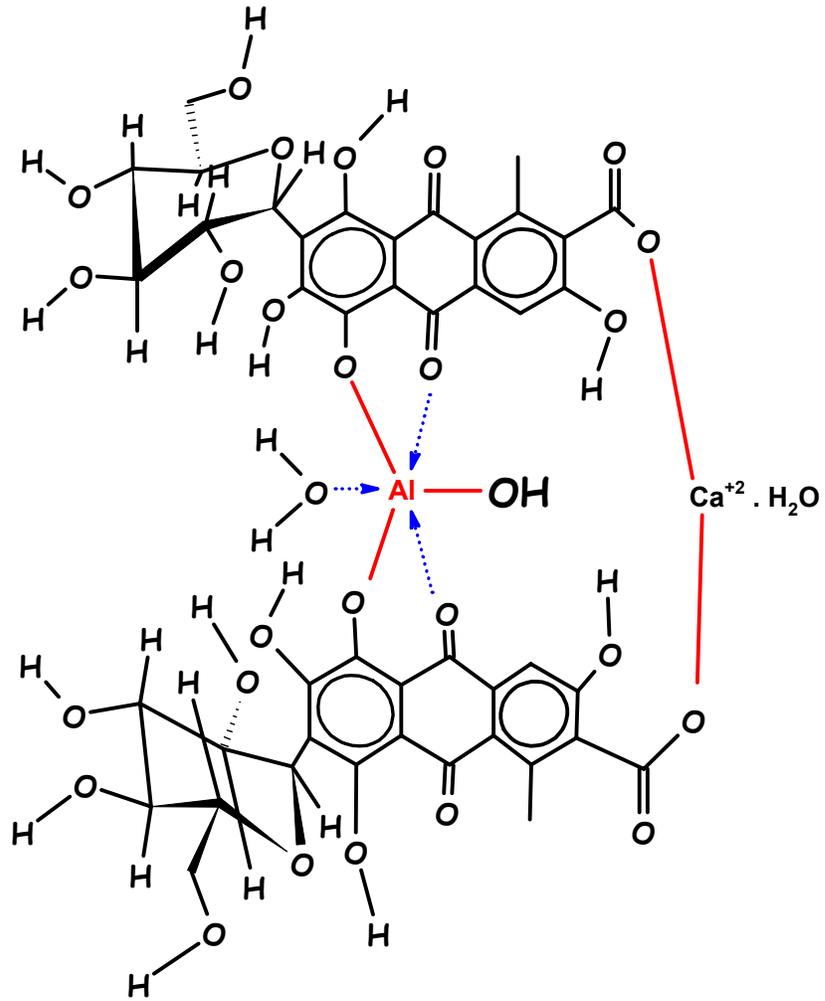


Fig. II.6 Estructura Química de Laca Carmín

II.5.4. Estabilidad del Colorante

Tal cual fue reportado por muchos autores [27,28], aunque no se conocen exactamente los mecanismos de reacción, se ha constatado experimentalmente que el Carmín y el mismo Ácido Carmínico son inestables en medio básico y que su velocidad de descomposición aumenta cuando el pH aumenta. Se pudo evidenciar que el Ácido Carmínico sufre una degradación fotoquímica en medio acuoso como resultado de la absorción de la luz [22,23]; encontrándose que esta labilidad fotoquímica es fuertemente dependiente del pH y de la presión parcial de Oxígeno.

Al igual que en el caso del Ácido Kermésico (**Fig. II.7**).

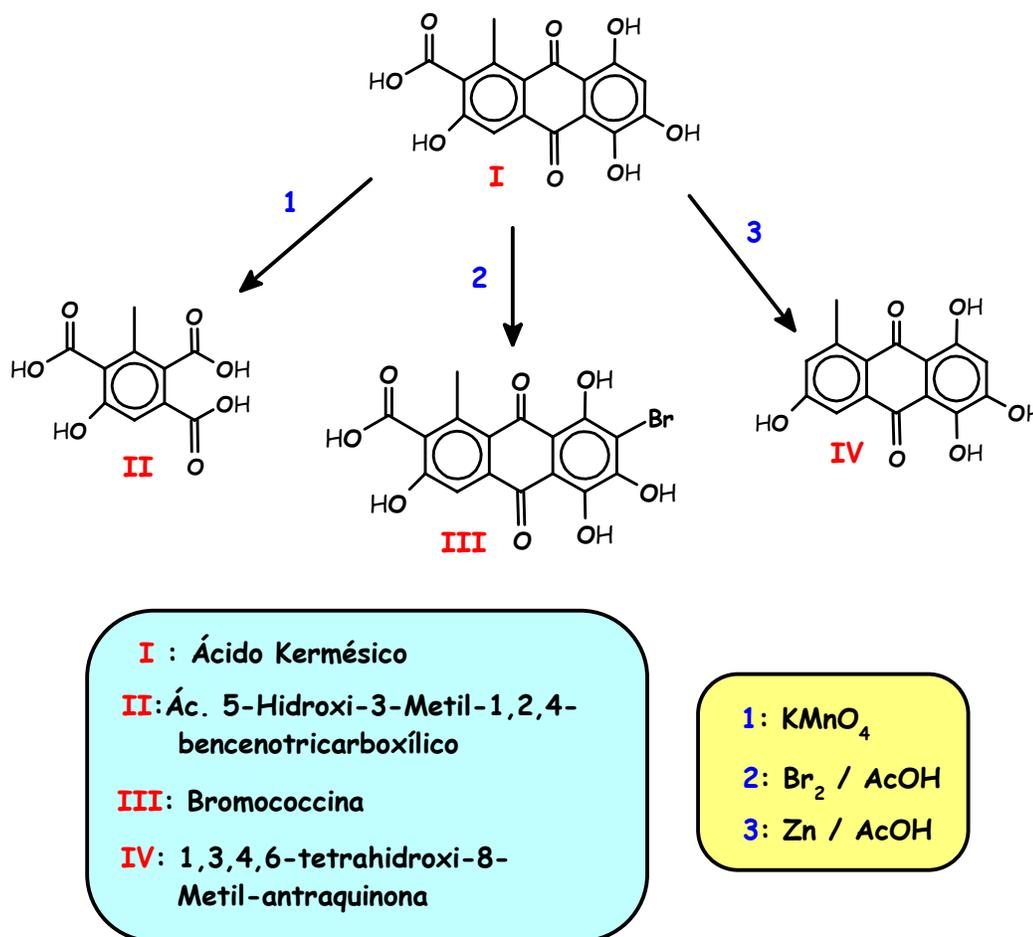
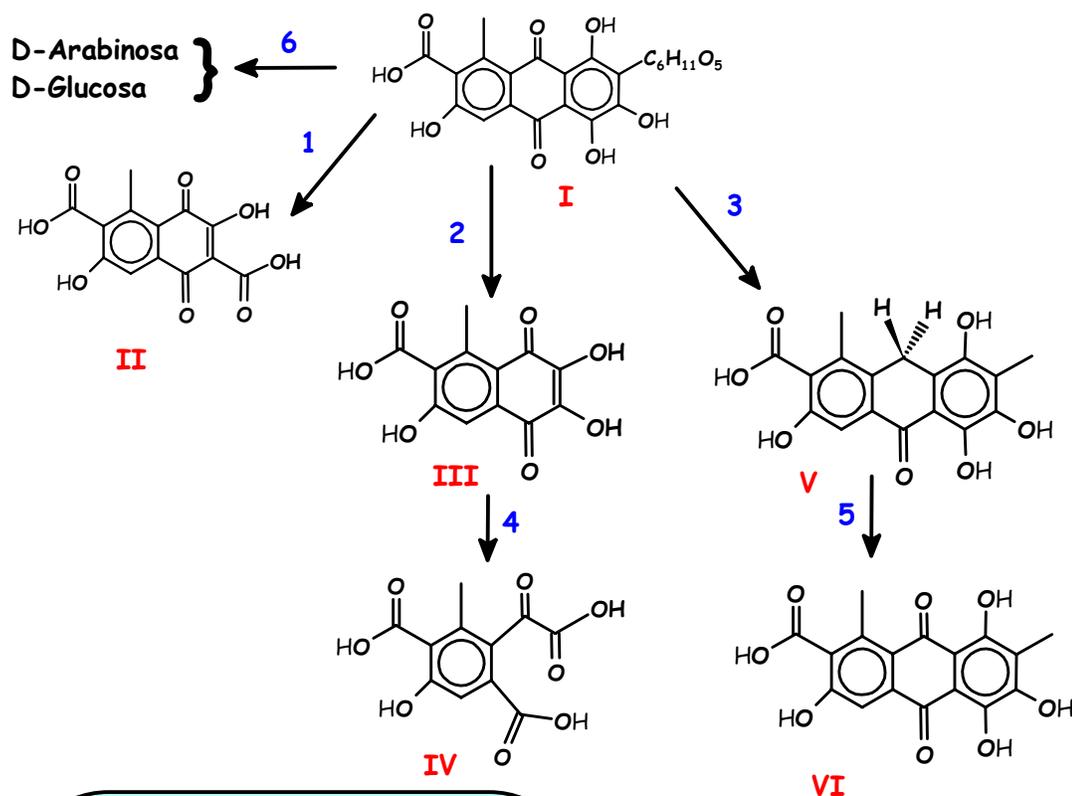


Fig. II.7 Reacciones probables de Degradación del Ácido Kermésico^[27]

El examen de los productos de degradación propuestos ^[27] nos permiten explicar en cierta medida la destrucción del cromóforo, lo que justificaría la pérdida del color (**Fig. II.8**). Estos fenómenos que también fueron observados en otros derivados antraquinónicos pueden ser resumidos como sigue:



I : Ácido carmínico

II: Ác.8-Metil-2,6-dihidroxi-naftoquinon-1,4-dicarboxílico-3,7

III: Carminazarina

IV: Ác.2-Oxalil-3-metil-5-hidroxi-dicarboxílico-1,4

V: Coccinina (incolora)

VI: Coccinona (roja)

1: H_2O_2

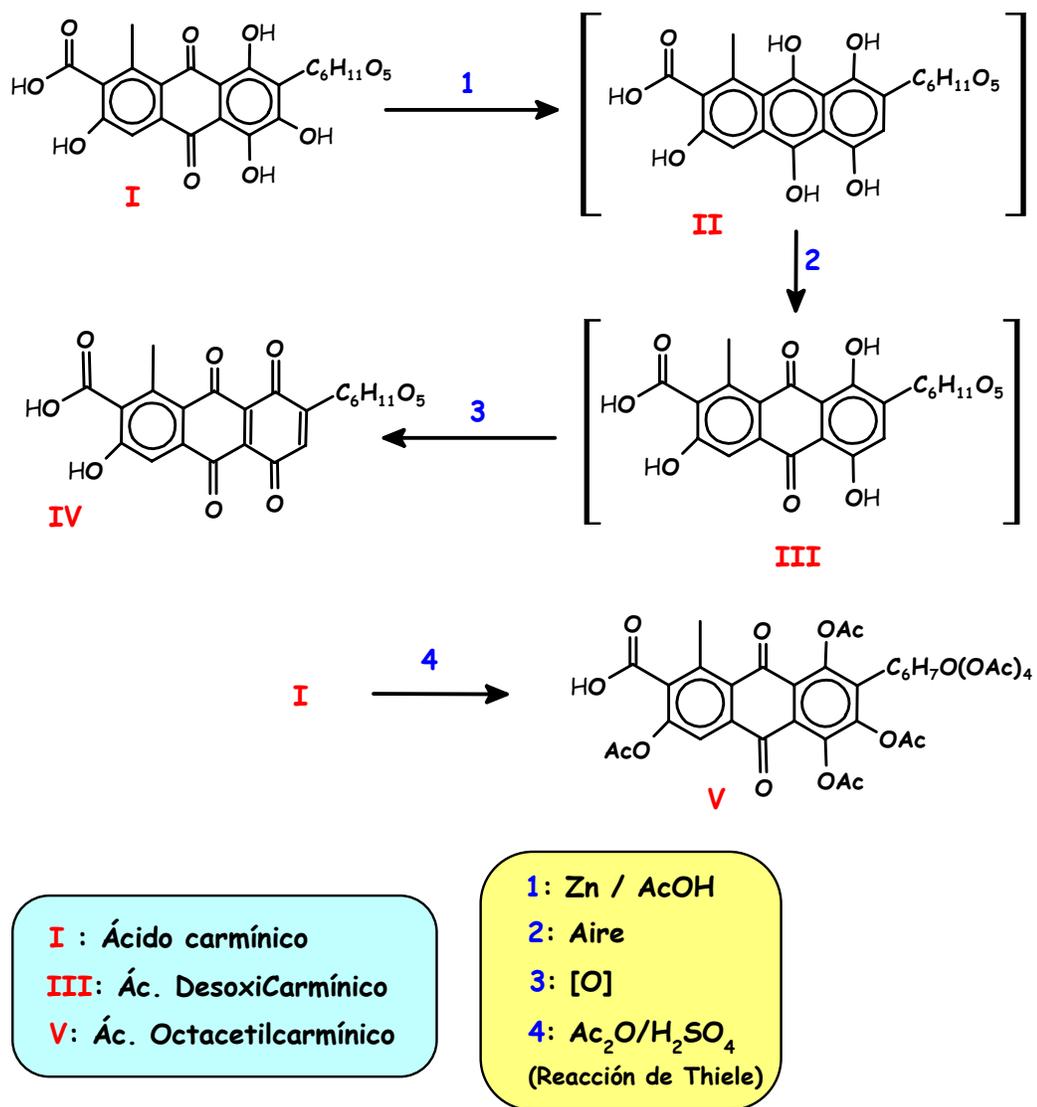
2: $KMnO_4 / H_2SO_4 / 0\ ^\circ C$

3: Fusión con KOH

4: NaOH, aire

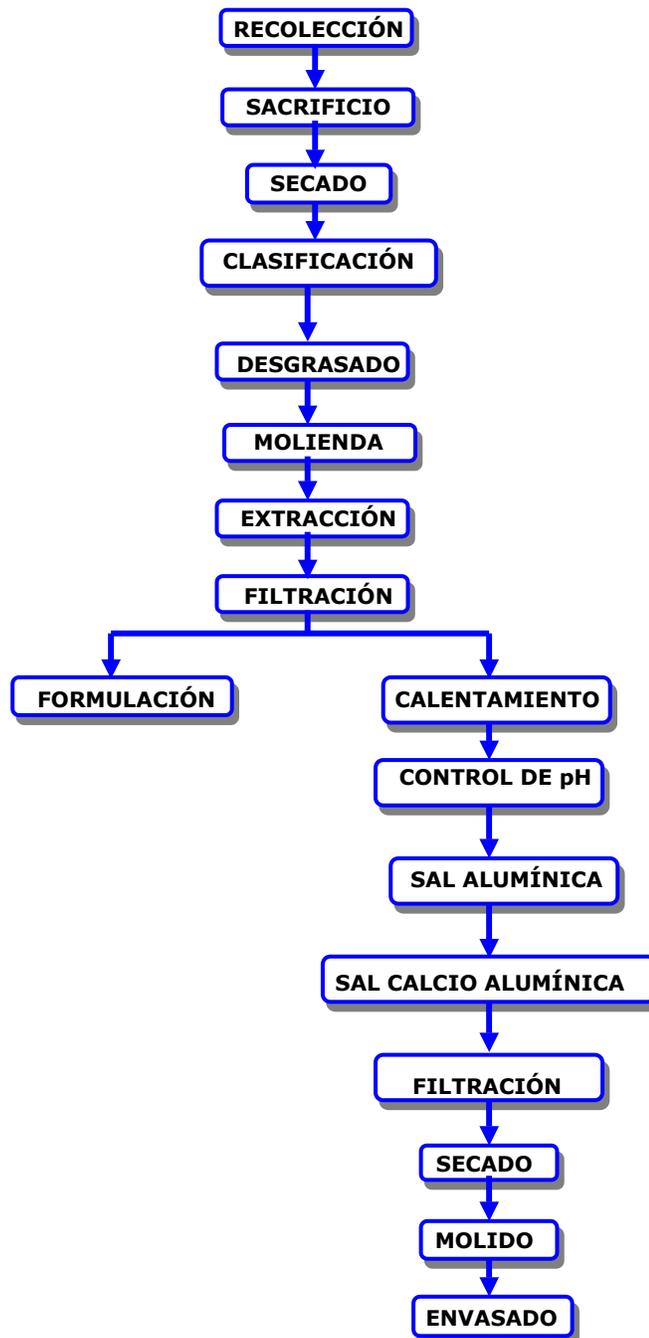
5: NaOH, aire

6: O_3

Fig. II.8 Reacciones probables del Ácido Carmínico^[27]

II.6 PREPARACIÓN DE LACAS

Independientemente de los adelantos tecnológicos, la preparación de lacas continúa realizándose con apego a los fundamentos básicos tradicionales, es decir según el esquema siguiente (**Esquema II.2**):



Esquema II.2 Proceso General de Preparación de Laca Carmín

De una manera general podemos decir que el proceso consiste en poner a hervir el extracto de grana en una solución de Alumbre de Potasio. Después de unos 15 minutos de ebullición se añade una suspensión acuosa de Calcita y se mantiene la ebullición por media hora mas. La presencia de los cationes Calcio y Aluminio permitirán la formación y el crecimiento de los quelatos Calcio-Alumínicos hasta lograr su precipitación. Se deja enfriar lentamente, permitiendo la sedimentación del precipitado formado. Después de filtrar, se procede al secado y posteriormente a la molienda de la laca, para su posterior comercialización.

El control de pH, temperatura, agitación e insumos fueron optimizados sistemáticamente, dando lugar a una serie de patentes celosamente protegidas.

II.6.1. Otros Complejos Metálicos

El Ácido Carmínico puede también formar complejos con otro tipo de cationes, dando lugar a la formación de complejos con diferentes coloraciones y propiedades (**Tabla II.3**):

Tabla II.3. Propiedades de Lacas Precipitadas con Diferentes Cationes Metálicos ^[28,29]

METAL	COLORACIÓN	ESTABILIDAD	
		ÁCIDO	BÁSICO
Al	Carmesí	Estable	Inestable
Cu	Púrpura	Estable	Inestable
Pb	Rojo Parduzco	Estable	Inestable
Th	Azul	Estable	Estable
Zr	N.R.	n.d.	n.d.
Al-Sn	Escarlata	n.d.	n.d.
Ba	Violeta Opaco	n.d.	n.d.
Cr	Púrpura	n.d.	n.d.
Fe	Púrpura	n.d.	n.d.
Mg	Rosa	n.d.	n.d.
Hg	Escarlata	n.d.	n.d.
Sn	Escarlata	n.d.	n.d.
U	Verde	n.d.	n.d.
Zn	Carmesí	n.d.	n.d.

Nota: **n.d.** = no determinado
N.R. = no presenta reacción

Estudios espectroscópicos de estos compuestos órgano-metálicos establecieron que los complejos del Ácido Carmínico con Cu^{2+} y Pb^{2+} eran estables en agua y en soluciones ácidas; sin embargo, en soluciones alcalinas la coloración iba desapareciendo progresivamente. Por su parte los derivados de Th^{4+} dan una coloración azul que permanece estable en presencia de álcalis, lo que permite pensar que el Torio forma una verdadera sal con el ácido carmínico y no un complejo coordinado como los dos primeros cationes. Finalmente concluyen que aparentemente el Zr^{4+} no reacciona en estas condiciones ^[28].

II.6.2. Colores Encapsulados

La micro-encapsulación es una técnica que ha tenido un rápido desarrollo y aceptación en las industrias farmacéuticas y alimentarias. La función principal de este proceso es el de incrementar la vida de anaquel de aquellos productos susceptibles a la degradación ambiental. Como bien sabemos, los colorantes naturales son compuestos que cuando se los aísla de su matriz natural se vuelven vulnerables a la degradación ambiental, es decir que en muchos casos se vuelven sensibles a la humedad, al oxígeno y a la luz. Por estas razones, la micro-encapsulación, con el uso de proteínas y carbohidratos grado alimenticio como matrices, se presenta como una técnica de grandes perspectivas para el uso y la aplicación de colorantes, particularmente en alimentos; asegurando su dispersión y protegiendo a las partículas de color contra la degradación química. Esta tecnología ha sido aplicada con muy buenos resultados a la mayor parte de los colorantes utilizados en alimentos como son el carmín, la bixina, norbixina, antocianinas y otros.

II.7. PROPIEDADES Y CUANTIFICACIÓN DEL COLOR

II.7.1. Fundamentos Básicos

La emisión y transmisión de la energía a través del espacio es un proceso dual ondulatorio-corpúscular, esto permite explicar el comportamiento de los haces de electrones y otras partículas elementales discretas que son portadoras de paquetes ondulatorios de energía, que está asociada a su frecuencia y que al interactuar con la materia generan una gran variedad de fenómenos que están asociados a la absorción y emisión de esta energía radiante.

Cuando una fuente de energía de estas características interacciona con una especie química, sus moléculas absorberán parte de esa energía incidente incrementando fuertemente su energía interna y produciendo una serie de fenómenos que pueden ir desde un simple incremento en su energía cinética hasta fenómenos de disociaciones electrónicas con ruptura de enlaces; pasando por todas las posibilidades de excitaciones electrónicas a estados de alta energía.

Evidentemente, una molécula no podrá permanecer por mucho tiempo en un estado electrónico excitado por lo que liberará inmediatamente su energía en exceso, pero siempre por medio de procesos bien definidos y exclusivos.

A partir del momento que la interacción de esta energía radiante se manifiesta a nivel molecular, estos fenómenos de absorción y emisión de energía serán propios y exclusivos a una especie química, propiedad utilizada por la ciencia para la caracterización y/o identificación de las especies químicas, gracias al estudio de los fenómenos generados como consecuencia de esta su interacción con la energía radiante.

Con estos antecedentes podemos ahora recordar que entre estos fenómenos de absorción-emisión, las propiedades ópticas de los colorantes también están determinadas por transiciones electrónicas entre los diferentes estados electrónicos de energías cuantificadas y diferentes, que pueden ocupar sus orbitales moleculares, es decir que son únicos para cada especie química.

Esta propiedad óptica se define con los términos^[30]:

Color

Está determinado por las diferencias de energía entre los orbitales moleculares.

Intensidad

Llamada también fuerza o saturación del color, está determinada por la probabilidad de las transiciones electrónicas.

Brillantez

Llamada también pureza del color, depende principalmente de la amplitud del intervalo de longitudes de onda (amplitud o ancho de banda) absorbido.

Durante una transición electrónica por absorción, una molécula puede ser promovida desde cualquier subnivel (estados rotacionales-vibracionales) de un estado fundamental S_0 , hacia cualquier otro subnivel (estados rotacionales-vibracionales) de un estado electrónico excitado S_1 . El resultado de este proceso son bandas anchas de absorción, que dependen de la energía incidente y que pueden ser registradas en un espectro. Estos espectros pueden describirse convenientemente en función de la posición del máximo de banda ($\lambda_{\text{máx.}}$) y de la intensidad de tal absorción que se expresa generalmente por su coeficiente de extinción molar, ϵ (o $\log \epsilon$), deducido de la ley de Lambert-Beer^[31,32]:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad \Longrightarrow \quad \epsilon = \frac{\log \left(\frac{I_0}{I} \right)}{c \cdot b}$$

Donde:

- I_0** Es la intensidad de la luz incidente
- I** La intensidad de la luz transmitida
- A** Es la absorbancia
- c** Es la concentración molar
- b** Es el camino recorrido por el rayo a través de la solución expresado en cm.

Sabemos que la magnitud de ϵ de una absorción es directamente proporcional a la probabilidad de la transición electrónica:

$$\epsilon \rightarrow \alpha \cdot P \quad \text{Ec. II.2}$$

Donde:

- α Es la Sección Transversal de captura
- P** La Probabilidad de transición electrónica absorbente

Es así que para las transiciones permitidas, generalmente tenemos:

Bandas fuertes:

$$10^4 \leq \epsilon < 10^5 \quad \text{con} \quad 0.1 \leq P < 1.0$$

Bandas medias:

$$10^3 \leq \epsilon < 10^4 \quad \text{con} \quad 0.01 \leq P < 0.1$$

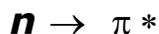
Bandas bajas o prohibidas:

$$\epsilon < 10^3 \quad \text{con} \quad P < 0.01$$

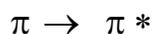
La energía, probabilidad y distribución de las transiciones electrónicas dependen fundamentalmente de la estructura química de las moléculas.^[30]

II.7.2. Transiciones Electrónicas

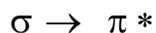
Si una molécula absorbe radiación correspondiente a la diferencia energética entre orbitales enlazantes y antienlazantes, uno de los electrones pasará de un estado electrónico de baja energía (S_0), a un estado electrónico de mayor energía (S_1), entonces estamos en presencia de una "**transición Electrónica**". Dependiendo de los orbitales involucrados en las transiciones tendremos los siguientes casos (**Fig. II.9**) ^[31,32]



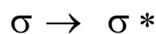
Es la más favorable de las transiciones, se presenta en aquellas moléculas cuyo HOMO está ocupado por el par de electrones no enlazantes de un heteroátomo (N, O, S, etc...) que serán promovidos al LUMO que es un orbital π^* .



Es cuando el HOMO de la molécula está ocupado por electrones π que serán promovidos al LUMO π^* correspondiente. Esta transición es menos favorable que la anterior por que la energía requerida es mayor.



Esta transición es menos favorable que las anteriores ya que la transición electrónica se efectúa entre el HOMO que es un orbital σ y el LUMO que es un π^* .



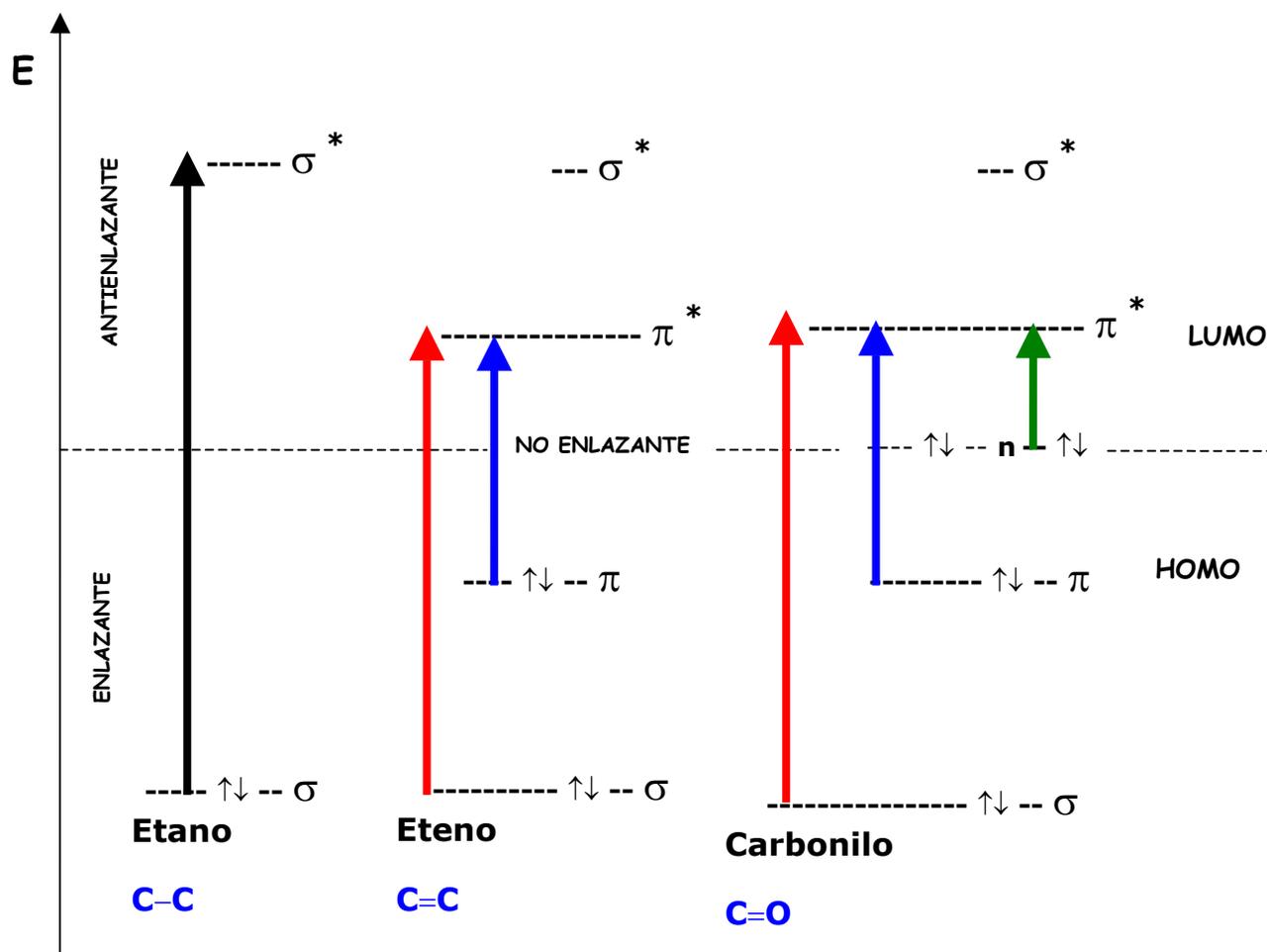
Finalmente tenemos la transición menos probable entre todas las posibles. Es aquella en la que el HOMO es un σ y cuyos electrones son promovidos a un LUMO que es un σ^* . Como los enlaces sigma son generalmente muy fuertes, la separación entre los orbitales σ y σ^* es también muy grande y la energía necesaria para esta transición será muy elevada.

HOMO

Orbital molecular ocupado más alto energía (Highest Occupied Molecular Orbital)

LUMO

Orbital molecular vacío más bajo en energía (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)



Probabilidad	Etano	Eteno	Carbonilo
Muy poco favorable	$\sigma \rightarrow \sigma^*$		
Poco favorable		$\sigma \rightarrow \pi^*$	$\sigma \rightarrow \pi^*$
Favorable		$\pi \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$
Muy favorable			$n \rightarrow \pi^*$

Fig. II.9 Transiciones Electrónicas

Como la mayor parte de las moléculas que constituyen los colorantes tienen siempre estructuras heteroatómicas y multifuncionales, sus espectros de absorción presentarán prácticamente todas estas transiciones, las unas con mayor intensidad que las otras y dependiendo de su estructura, razón por la que cada espectro será siempre característico de cada compuesto, dependiendo de la precisión con la que se observe el fenómeno.

II.7.3. Estructura y Absorción

El conjunto de enlaces conjugados de una molécula que absorbe radiación visible o ultravioleta se conoce como cromóforo. Cada cromóforo absorbe radiación a una longitud de onda e intensidad característica y bien definida. Cuando una serie de compuestos poseen el mismo cromóforo, todos ellos absorben aproximadamente a la misma longitud de onda, salvo si existen peculiaridades estructurales capaces de modificar este comportamiento general como ser heteroátomos, grupos insaturados conjugados u otro tipo de sustituyentes ligados a este segmento de la molécula.

Por ejemplo, los colorantes naturales conocidos más antiguos pertenecen al grupo de las Antraquinonas. Son compuestos cuyo cromóforo principal es un par de enonas conjugadas con enlaces π . Aunque la estructura de base (**Fig. II.10**) que tiene un λ_{\max} = 327 nm en CH_2Cl_2 , el cuál se extiende en el visible produciendo un color amarillo, en realidad no es un verdadero colorante, como los otros de la serie^[30].

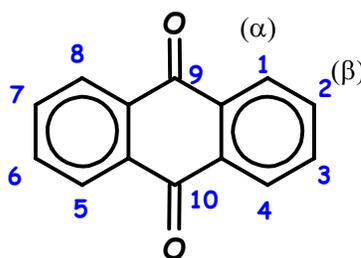


Fig. II.10 Estructura de base: Antraquinona^[30]

Nota:

Los átomos 1, 4, 5 y 8 son llamadas posiciones α

Los átomos 2, 3, 7 y 6 son llamadas posiciones β

La introducción de sustituyentes donantes de electrones sobre la estructura de base genera desplazamientos batocrómicos (desplazamiento hacia longitudes de onda más grandes) del máximo de banda (**Tabla II.4**). Dependiendo de las características del sustituyente y de la o las posiciones en las que se encuentren, los efectos serán más o menos incidentes. Es así que podemos ver que cuanto mayor es el efecto donante de electrones, mayor será su efecto batocrómico. Por otra parte, dependiendo de la Posición y del número de sustituyentes, estos efectos son también aditivos.

Tabla II.4 Efecto Batocrómico de diferentes Sustituyentes^[30]
en la antraquinona de base

Sustituyente	λ_{\max} [nm]
Hidrógeno	327
1- Hidroxi	405
1- Amino	465
1- Metilamino	508
1- hidoxi- 4 amino	520
1, 4- diamino	550
1,5- diamino	480
1, 4, 5, 8 - tetraamino	610
1, 4- dianilino	620

II.7.4. CUANTIFICACIÓN DE ACIDO CARMÍNICO

La revisión bibliográfica nos muestra una diversidad de métodos analíticos normalizados para la cuantificación de la materia colorante, expresado en porcentaje (%) de ácido carmínico, en diferentes productos como materia prima, productos intermedios y productos acabados.

La determinación de ácido carmínico en la materia prima (grana), es de gran importancia, es la base de su comercialización y por lo tanto para el **productor-cultivador de grana** deben ser muy claros los factores que intervienen en su determinación.

La descripción de estos diferentes métodos y/o aplicaciones inducen rápidamente a una confusión en el uso de fórmulas por parte del analista, además de mecanizar el procedimiento y no reflexionar en los aspectos básicos que influyen en esta determinación como son; el pH y el solvente. Es así que tenemos:

Food Chemical Codex (FCC), 1981^[19].

“Pesar exactamente **30 mg** de la muestra, disolver en 30 ml de HCl 2 N en ebullición y enfriar. Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1lt, aforar con agua y mezclar. Determinar la absorbancia de la solución en una celda de 1 cm y hacer la lectura en su longitud de onda máxima, alrededor de 494 nm, con un espectrofotómetro, usando HCl 0.06N como blanco. Sí al hacer la lectura la absorbancia no esta en el intervalo de 0.20 a 0.25, preparar otra solución y ajustar el peso. Calcular el % de ácido carmínico con la siguiente fórmula”:

$$[\%] = \frac{15 \times A \times 100}{0.262 \times W} \quad \text{Ec. II.3}$$

Donde:

- A** es la absorbancia de la muestra en solución
0.262 es la absorbancia de una solución de ácido carmínico con una concentración de 15 mg/1000 ml
W es el peso de la muestra en mg.

Nota:

No se especifica el tiempo de calentamiento y/o si la solución debe ser filtrada. Además el intervalo absorbancia de 0.20-0.25 es muy estrecho.

Por otra parte, el FCC menciona otro procedimiento analítico como **“método de identificación”**:

Mezclar 333 mg de carmín con:

- 44 ml de agua.
- 0.15 ml de una solución (1 en 10) de NaOH
- 0.2 ml de NH₄OH

Calentar para disolver, transferir a un matraz volumétrico de 500 ml y aforar con agua. Tomar 10 ml. con pipeta volumétrica, de la solución y poner en un matraz volumétrico de 250 ml, diluir al volumen con agua y mezclar.

Cuando el análisis es hecho con espectrofotómetro adecuado, usando una celda de cuarzo de 1 cm. de recorrido y agua como blanco, la solución resultante da una absorción máxima a 520nm y 550 nm, pero la absorbancia a 520 nm no debe ser menor de 0.30 .

Food Chemical Codex (FCC), 1996^[33].

En la edición de esta norma, se propone exactamente el mismo método que en la norma anterior, cuando se trata de muestras normales en general; pero además viene descrito el método de análisis para el carmín, de la siguiente manera:

Carmín(*):

“Pesar **81 mg** de carmín en polvo y disolver en 30 ml de HCl 2N, calentar hasta ebullición durante 30 seg. y enfriar. Pasar a un matraz volumétrico de 1000 ml y aforar con agua destilada. Usando una celda de 1 cm., determinar la absorbancia de la solución a una longitud de onda máxima alrededor de 494 nm, con un blanco de HCl 2N (1: 3). Calcular el % de ácido carmínico con la siguiente fórmula”:

$$[\% \text{ AC}] = \frac{0.1 \times A \times 100}{13.9 \times W_m} \quad \text{Ec. II.4}$$

Donde:

A	Es la absorbancia de la muestra
W_m	Es el peso de la muestra en mg
100	Factor de conversión a %

(*) Considera al carmín como una laca aluminica o calcio-aluminica sobre un sustrato de hidróxido de aluminio.

Handbook of U.S. colorants for food, drugs and cosmetic. Marmion, 1983^[25].

Extracto de Cochinilla

Transferir 1 g de muestra a un matraz volumétrico de 500 ml con 30 ml de HCl 2N en ebullición. Enfriar y aforar a 500 ml con agua desionizada. Filtrar, una porción de la solución con papel filtro (*) Whatman # 1. Determinar la absorbancia de la solución, corregida con el blanco, a una longitud de onda máxima alrededor de 494 nm.

$$\% \text{ de colorante puro} = \frac{A \times 100}{a \times b \times c} = \frac{A \times 100}{13.9 \times 1 \times 2} \quad \text{Ec. II.5}$$

Carmín (Ácido Carmínico)

Disolver 0.1 g de muestra en 30 ml de HCl 2N en ebullición. Enfriar y diluir a un litro con agua. Usando una celda de 1 cm Determinar la absorbancia de la solución, corregida con el blanco, a una longitud de onda máxima alrededor de 494 nm.

$$\% \text{ colorante puro} = \frac{A \times 100}{a \times b \times c} = \frac{A \times 100}{13.9 \times 1 \times 0.1} \quad \text{Ec. II.6}$$

Donde:

A	Es la absorbancia
a	Es la absortividad en L/g cm
b	Es la longitud de la celda en cm
c	Es la concentración en g/L
% colorante puro	Expresado como ácido carmínico

(*) Si es necesario filtrar, asegurar que el papel filtro esté saturado de colorante antes de pasar la solución de medida.

Como acabamos de ver, dependiendo del tipo de muestras, se aplica uno u otro procedimiento de cálculo, induciendo a posibles errores de interpretación; sin embargo, aunque todos estos procesos analíticos siguen las mismas operaciones químicas, no todos ellos conservan los mismos valores de concentración; ni todos se encuentran dentro de los límites de linealidad de la ley de Lambert- Beer.

Independientemente de la precisión de cálculo durante el procesamiento de los resultados de medición, la determinación de ácido carmínico en alimentos implica otro tipo de problemas como son la extracción y separación cuantitativa del colorante a partir de una matriz determinada. Por esta razón es que se deben seguir procedimientos normalizados, para cada tipo de alimento.

El análisis de Ácido Carmínico y otros colorantes como la α y β bixina y α y β norbixina fue también realizado por HPLC ^[34], en diferentes tipos de muestras, usando una fase móvil **isocrática [metanol-AcOH (6% en agua) 40:60, v/v]**. En este tipo de análisis (bebidas de frutas, dulces y yogurt), el límite de detección de AC es de aproximadamente 100 ng/g (0.1 mg/Kg).

Para remover las impurezas de soluciones acuosas de cochinilla o de extractos a partir de alimentos que contienen este colorante, proponen el uso de filtros de membrana de celulosa que no absorban el AC, por ejemplo (Sartorius minisart RC15, cubierta de polipropileno, membrana de celulosa regenerada, hidrofílica, medida de poro 0.45 μ m). Ya que algunos filtros comerciales de membrana no son adecuados para las soluciones de carmín; ya que absorben el colorante.

Durante la determinación de **AC** en yogurt ^[35], el mayor problema analítico consiste en la liberación del colorante desde la matriz del alimento. Esto se debe a la gran afinidad de los colorantes por las proteínas. En tales casos se utiliza papaína para hacer la digestión enzimática de las proteínas, seguido de una purificación en columna de poliamida. El análisis se realiza por cromatografía de líquidos con un detector de arreglo de diodos.

II.8 APLICACIONES

Por ser productos de extracción 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 a través de procesos de refinación se llega al aislamiento del producto puro y en algunos casos se estabilizan, emulsifican o se mantienen en dispersión líquida.

Las aplicaciones más comunes de la laca del carmín son la coloración de alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos. Este colorante es más resistente a la temperatura, que sus análogos sintéticos; es también menos susceptible al ataque de agentes oxidantes o reductores. Estas características lo hacen especialmente adecuado para su uso en alimentos y cosméticos. La laca del carmín es el único pigmento orgánico natural que es permitido en las preparaciones de maquillaje para ojos.^[29]

Las presentaciones más comunes que se ofertan en el mercado son^[36] :

Tabla II.5 Colorantes Naturales Interaliment

Producto	Presentación	% AC	Nivel de uso	Color	Estabilidad al pH
Carmín	Polvo	22-52	0.001-0.005 %	Rojo pálido - Rojo intenso	2.5 - 12.5
Solución carmín	Líquido	3 y 5	0.05 - 2 %	Rosa pálido - Rojo intenso	2.5 -12.5

Tabla II.6 Colorantes Alimenticios Naturales Chr. Hansen

Producto	Presentación	% Producto activo o aplicación	Nivel de uso	Color	Estabilidad al pH
Carmín	Polvo	Lácteos, bebidas, rellenos, escarchados, jarabes, confitería y productos cárnicos	0.01 - 1.2 %	Rojo escarlata	3.5 - 8
Carmín	Líquido	Bebidas a base de leche, rellenos, escarchados y confites	0.01 - 1,2 %	Rojo escarlata	3.5 - 8
Carmín	Micro-encapsulado	Cereales, prod. Extruidos, Cárnicos, salsas, natillas, sopas, confitería.	0.001 - 0.1 %	Rojo escarlata	2.5 - 8.0

Tabla II.7 Colorantes Naturales Warner Jenkinson

Producto	Forma	% AC	Tono	Estabilidad			Aplicaciones comunes	Dosis %
				a pH	a Temp.	a la luz		
Laca Carmín	Polvo	52	Rosa magenta	3.5 - 8	Excelente	Excelente	Cosméticos, lácteos.	0.05 - 1 farmacéuticos
Extracto de carmín hidrosoluble	Líquido	3 -3.5	Rosa magenta	3.5 - 14	Excelente	Excelente	Yogurt, bebidas, dulces, helados, concentrados de frutas, mermeladas	0.05- 0.2
Extracto de carmín hidrosoluble	Polvo	20 -50	Rosa magenta	4.0 - 14	Excelente	Excelente	Jamones, chorizos, salchichas, lácteos	0.001-0.2

También se ha reportado un amplio uso del carmín gracias a su estabilidad oxidativa, por ejemplo, como colorante en el procesamiento de carne de puerco^[23].

Debido a la inestabilidad térmica del AC, no se recomienda su uso en la fabricación de dulces, ya que durante estos procesos se pueden alcanzar temperaturas por encima de los 100 ° C.

III. JUSTIFICACIÓN

III.1 JUSTIFICACIÓN TÉCNICA

Ante los riesgos probados que presentan los colorantes sintéticos, promover el uso de colorantes naturales inocuos, sobre todo cuando estos son empleados como aditivos alimenticios, hace necesario un estudio técnico-científico que permita una explotación más amplia para su aplicación en el campo industrial.

III.2 JUSTIFICACIÓN DE MERCADO

La evaluación rápida de un estudio de mercado, proporcionado por el Consejo Mexicano del Nopal y Tuna A.C. nos permite observar primeramente la **Demanda Mundial** de la Grana seca y del Ácido Carmínico; las importaciones de la Unión Europea (**UE**), la oferta mundial sostenida principalmente por solo tres países, el comportamiento histórico de los precios a nivel global y la posición de México en este mercado de producción y consumo.

EUROPA

68% Grana seca
45% Ac. Carmínico

ÁSIA

16 % Grana seca
7% Ac Carmínico

N y C AMÉRICA

2 % Grana seca
32% Ac Carmínico

DEMANDA

La principal región demandante es la UE con el 68 % de la Grana seca y el 45 % del Ácido Carmínico. El análisis de las importaciones en esta misma región (período 1994 a 1998) nos permite ver que la demanda de Lacas aumentó de 521 a 985 TM y de **AC** de 198 a 207 TM. (Fig. III.1)

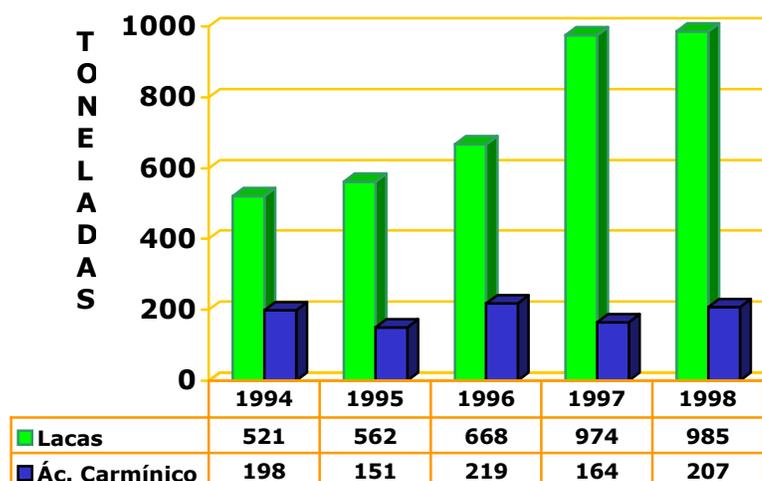


Fig. III.1 Importación de Ácido Carmínico y Laca por la CEE

Como podemos ver en las regulaciones de la FDA y de la **UE**, los colorantes permitidos en la industria alimentaria son:

Naturales

Rojo Remolacha (E-162)
 Antocianinas (E-163)
 Ácido Carmínico (E-120)
 Capsantina, capsorrubina (E-160 C)
 Licopeno (E-160 D)

Sintéticos

Eritrosina (E-127)
 Rojo cochinilla A o Rojo Ponceau 4R (E-124)
 Amaranto (E-123)
 Azorrubina o Carmocina (E-122)

De la misma manera el uso de los colorantes **Azo** esta cada vez más restringido en la industria textil y otras aplicaciones.

Es en base a todos estos antecedentes que se podría encontrar una explicación de este crecimiento de las importaciones de colorantes en la UE.

OFERTA

Como podemos ver en el mismo estudio, la **Oferta Mundial** de Grana seca en 1998 fue de **850 Toneladas [t]**, siendo el Perú el principal país productor (**Tabla III.1**)

Tabla III.1 Producción Mundial de Grana Seca: año 1998

País	Cantidad [t]	[%]
Perú	620.5	73
Chile	144.5	17
Islas Canarias	42.5	5
Otros	42.5	5
TOTAL	850.0	100

El análisis de sus exportaciones en 1997 nos muestra que del total de sus exportaciones (441.66 t), el 81,13 % (358.3 t) es comercializado como grana seca, sin ningún procesamiento y el 13.99 % (61.8 t) como Laca de Carmín; el restante, 4.88 % (21.56 t) son otros productos mas elaborados, mostrando así una tendencia a su diversificación comercial (**Fig. III.2**).

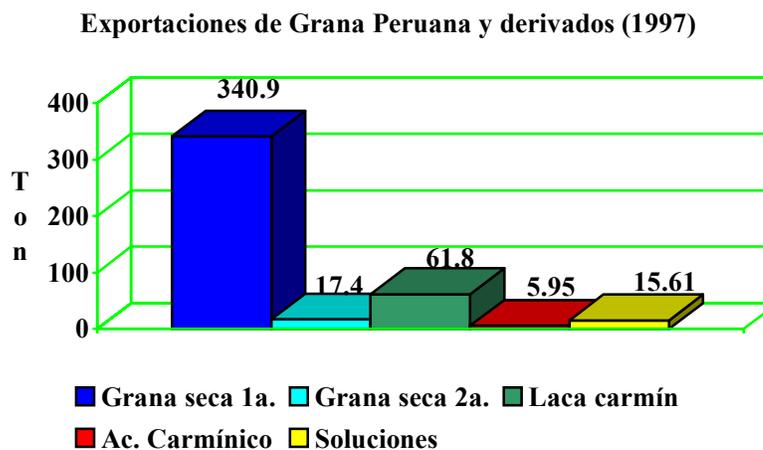


Fig. III.2 Exportaciones de Perú en 1997, de Grana y Derivados.

IMPORTACIONES MEXICANAS

Si analizamos las posición de México en este mercado, vemos que las importaciones de colorantes de origen natural han ido en descenso; mientras que la importación de Lacas muestra una ligera tendencia al aumento (**Fig. III.3**).

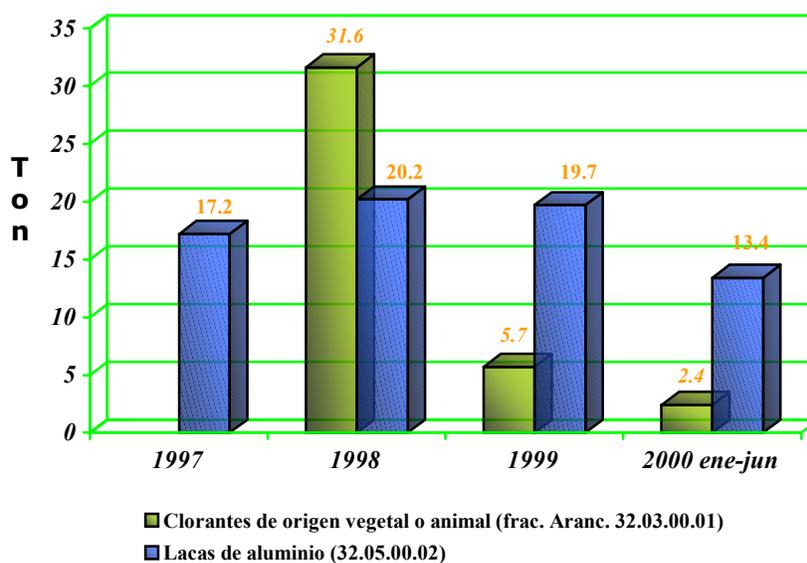


Fig. III.3 Importaciones Mexicanas de colorantes de origen natural

En cuanto al origen de las importaciones Mexicanas, vemos que aproximadamente el 90 % de las Lacas provienen de **EUA** y el 90 % de colorantes naturales (con o sin tratamiento), provienen del **Perú**. (Fig. III.4).

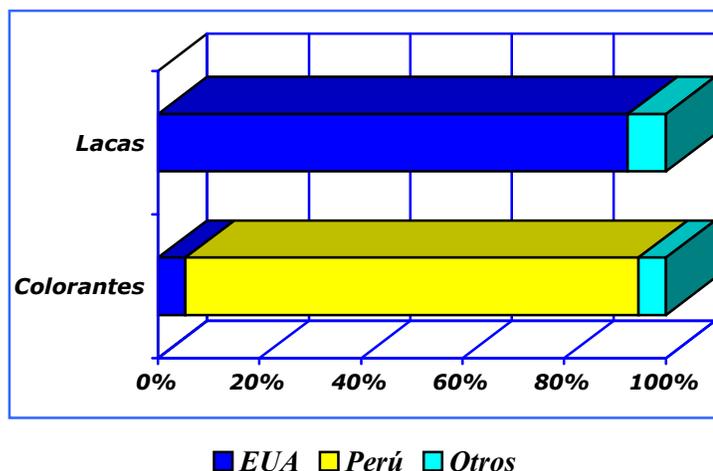


Fig. III.4 Importaciones Mexicanas por País de Origen, 1999

COMPORTAMIENTO MUNDIAL DE LOS PRECIOS

Por último, el análisis de la variación histórica de los precios que ha tenido la grana seca entre 1988 y el 2000 (Fig. III.5), muestra su gran fragilidad económica, debido principalmente a dos factores:

- Los efectos climáticos sobre la producción
- La especulación del mercado

Es importante recordar que en 1988, un bufete de abogados emitió un reporte diciendo que el ácido carmínico tenía efectos alérgicos, lo que provocó la caída del precio.

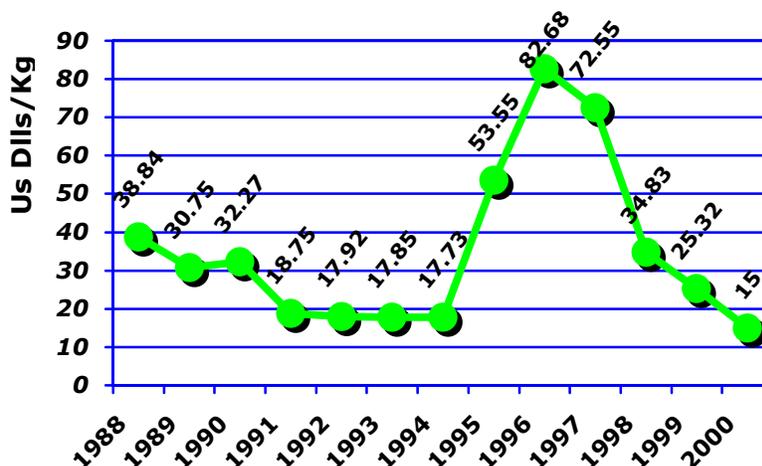


Fig. III. 5 Comportamiento de los precios de la grana seca.

Con esta variación e inseguridad en los precios podemos decir que la producción de grana seca únicamente es una inversión de alto riesgo, mientras que su transformación a derivados industriales con mayor valor agregado representa una alternativa comercial más segura y factible.

Con todos estos antecedentes podemos ver que la posibilidad de implementar la producción de colorantes naturales en el país debería hacer frente a diferentes tipos de dificultades:

A nivel internacional:

- Fuerte competencia con los colorantes sintéticos
- Incrementar la demanda de colorantes naturales
- Variabilidad de los precios de la grana seca
- Necesidad de obtener productos transformados

A nivel nacional:

- Establecer condiciones óptimas para el desarrollo del insecto
- Incrementar el mercado de consumo
- Desarrollar la tecnología para la producción factible de estos colorantes
- Minimizar los costos de producción en escalas industriales
- Investigar sistemáticamente la obtención de derivados con mayor valor agregado

Por lo tanto, se puede afirmar que la investigación técnico-científica sobre el carmín y otros colorantes naturales requiere una atención prioritaria.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Consolidar los conocimientos científicos y técnicos del principio colorante, ácido carmínico, obtenido del *Dactylopius coccus Costa*.

IV. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Estudiar en el proceso de extracción del carmín, el efecto de la temperatura y del tipo de solvente.
- ❖ Estudiar el proceso de elaboración de laca carmín.
- ❖ Evaluar diferentes insumos que permitan la separación del material colorante sin la necesidad de la formación de laca.
- ❖ Evaluar y optimizar las condiciones de extracción para la obtención de laca que reúna las condiciones de una laca comercial.
- ❖ Estudiar los factores que inciden en la determinación espectroscópica del Ácido Carmínico.
- ❖ Estudiar la separación cromatográfica del carmín.
- ❖ Realizar los espectros de RMN, IR, UV-VIS del Ácido Carmínico de referencia.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1. MATERIALES

V.1.1. Materia Prima

Para poder seleccionar la grana de trabajo, se analizaron una serie de muestras de grana seca, considerando el contenido de **AC** como principal parámetro de selección (**Tabla V.1**). Las muestras de diferente origen fueron proporcionadas por el Ing. Ignacio del Río y Dueñas, Director de la Fundación Tlapanochestli.

Tabla V.1 % Ácido Carmínico en Granas de diferente procedencia

Procedencia	% A.C.
Islas Canarias	19.9
Perú	19.0
Oaxaca (Tlapanochestli)	17.7
Morelos	21.6
Jalisco	19.7
Querétaro	19.9

Sobre la base de estos resultados se escogió como material de trabajo la grana procedente de Morelos

V.1.2. Reactivos

Productos de referencia

- ❖ Ácido carmínico, Merck 1.00211, Pureza: 98%, **p.a.** para microscopía.
- ❖ Carmin, Aldrich 19,970-2, Laca carmín, estándar.

Soluciones Preparadas

- ❖ **Solvente A** (H₂O:EtOH) 70:30 (v/v)
- ❖ Solución Ácido cítrico Saturada (Solv. H₂O , T.A.)
- ❖ Solución de NaOH 1.0 % (**Solv. A**)
- ❖ Solución de HCl pH 3 (**Solv. A**)
- ❖ Solución de NH₄OH pH 12 (**Solv. A**)
- ❖ Solución de HCl 2 N (Solv. H₂O)
- ❖ Solución de HCl 0.06 N (Solv. H₂O)
- ❖ Solución de HCl 0.06 N (**Solv. A**)
- ❖ Solución Na₂CO₃ + EDTA (ver **Tabla V.4**)

Reactivos Generales

- ❖ EDTA
- ❖ Agua desionizada
- ❖ Etanol (G.I)
- ❖ Carbonato de sodio (G.I)
- ❖ Sulfato de Aluminio
- ❖ Cloruro de Calcio
- ❖ Carbonato de Calcio
- ❖ Hidróxido de sodio (G.I)
- ❖ Bromuro de potasio (Uvasol®;Merck 1.04907.0100)
- ❖ Butanol (J.B.)
- ❖ Ácido Acético (J.B.)
- ❖ Celite®545
- ❖ Silica Gel 60 Merck 1.07733.1000 (0,2 – 0.5 mm)
- ❖ Cromatoplasmas para CCF, 5 x 10 Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck 1.05719.
- ❖ Cromatoplasmas para CCF, 20 x 20 Sílica gel 60, Merck 1.05721.
- ❖ Ácido Acético (J.B.)

V.1.3. Equipo

Equipo General de Laboratorio:

- ❖ Balanza analítica: OHAUS Explorer. Cap. máx. 210 g.
- ❖ Potenciómetro: Conductronic, mod. 10
- ❖ Parrilla de calentamiento con agitación: Thermolyne 1000, serie 1138. Rango de Temperatura 40°- 370° C y agitación hasta 1200 rpm.
- ❖ Molino de Laboratorio
- ❖ Centrífuga: Internacional IEC, mod. K 3000 rpm.
- ❖ Horno: Thermolyne, serie 9000 con circulación de aire.
- ❖ Digestor y Destilador Microkjeldahl: LABCONCO.
- ❖ Mufla: Ind. Sola Basica. LINDBERG
- ❖ IKA-Ultra-Turrax® T25 Basic. Rango de velocidad 8000-24,000 rpm
- ❖ Stereo Microscopio: NOVA ST 620.
- ❖ Lámparas UV: 365 y 254 nm. ColeParmer 9818-serie darkroom.
- ❖ Micropipeta: Eppendorf, 100 a 1000 µl. Serie 2000

Equipo Analítico:

- ❖ **Espectrofotómetro UV – VIS** : VARIAN, modelo Cary 50.
- ❖ **Espectrofotómetro de IR** : PerkinElmer, mod. Spectrum One. Rango de detección desde 7800 a 370 cm⁻¹, Resolución máx. 0,5 cm⁻¹.
- ❖ **Espectrómetro de RMN**, Jeol mod. Eclipse-270
- ❖ **Espectrofotómetro de Absorción Atómica**: PerkinElmer, mod. 3300

V.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En esta primera etapa se realizarán las extracciones sólo a partir de grana seca; sabiendo que este proceso puede también ser aplicado a la grana húmeda.

Las pruebas de laboratorio para la validación de los métodos propuestos, se realizaron siguiendo los procedimientos generales descritos a continuación; cambiando según los casos, las condiciones operativas en cada etapa.

V.2.1. Preparación de la muestra

Para efectuar los análisis y las pruebas de extracción se utilizaron tres tipos de grana según las siguientes denominaciones:

Grana limpia

Grana a la que se le eliminan impurezas y exceso de coccerina por medio de zarandeo .

Grana desgrasada

Grana a la que se le ha eliminado la coccerina con Hexano.

Grana molida

Grana molida en un mortero y tamizada a una malla de 0.1mm

V.2.2. Análisis proximal de la grana:

Para la determinación de los parámetros proximales de composición se utilizaron los métodos descritos en la bibliografía, particularmente las normas Peruanas y según siguiente detalle^[12].

V.2.2.1. Humedad

Método gravimétrico. A.O.A.C. 31.005 pág. 573 (14th Ed.)
Norma: ITINTEC N° 11.207 . Febrero 1982 (Lima-Perú)

V.2.2.2. Cenizas

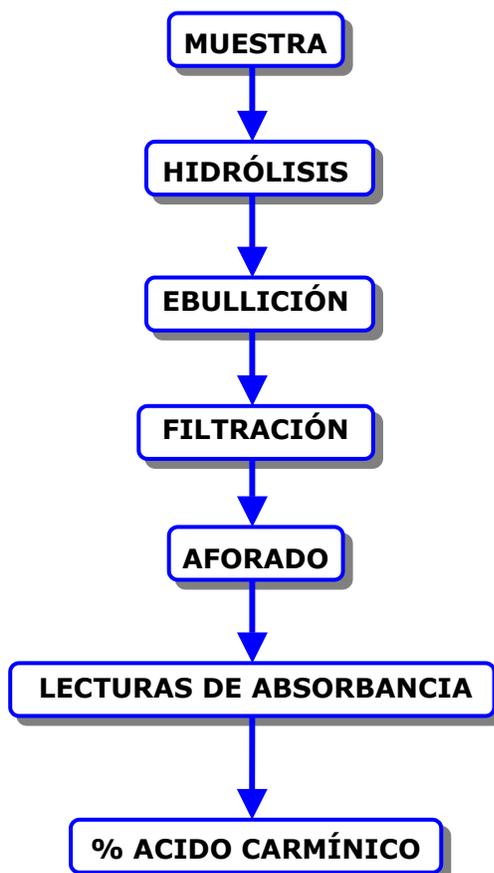
Método gravimétrico, previa calcinación a 550 °C.
Mét. A.O.A.C. 30.006 pág. 563 (14th Ed.)
Norma: ITINTEC N° 11.206 . Febrero 1982 (Lima-Perú)

V.2.2.3. Proteína

Método Volumétrico de Kjheldal.
Mét. A.O.A.C. 2.062 pág. 17 (14th Ed.)

V.2.2.4. **Ácido Carmínico** ^[25,26]

Para la determinación de **AC** se procedió según el esquema siguiente



Donde:

Peso de muestra:	0.1 g (grana seca y molida)
	1.0 g (extractos y soluciones)
Hidrólisis Ácida:	30 ml de HCl 2N
Ebullición:	5 min.
Filtrado:	Papel filtro corriente
Afore:	A 1 Lt con agua desionizada
Absorbancia:	$\lambda = 494 \text{ nm}$; $l_{\text{celda}} = 1.0 \text{ cm}$
Blanco:	HCl 0.06 N
Cálculos:	Ecuaciones II-5 y II-6 (Párrafo II.7.4)

Esquema V.1 Determinación de Ácido Carmínico en Grana

V.2.2.5. *Arsénico y Plomo*

Método por Absorción Atómica de acuerdo a NOM-117-SSA1-1994

V.2.2.6. *Salmonella spp*

Método por combinación de la prueba de inmunoensayo ELISA (Enzyme-Immunoabsorbent Assay) con cromatografía de capa fina; empleando el sistema de prueba Reveal (AOAC tested, N° de licencia 960801).

V.2.3. *Influencia del Solvente*

Para determinar la influencia del solvente sobre la eficiencia de extracción se ensayaron una serie de solventes (**Tabla V.2**), según el procedimiento siguiente.

Tabla V.2 Tipos de solventes

Ensayo	Solvente	pH
I	Solución acuoetanólica 70:30 al 1% de NaOH (p/v)	12.6
II	Solución acuoetanólica 70:30 (acidificada con HCl)	3.0
III	Solución acuoetanólica 70:30 al 20% de Na ₂ CO ₃ - EDTA 1%	10.7
IV	Solución acuoetanólica 70:30 (alcalinizada con NH ₄ OH)	12

Nota:

La evaluación cualitativa de estos extractos permitió escoger los solventes más adecuados para la extracción del colorante.

Procedimiento:

- ❖ En un tubo para centrífuga se colocaron 0.1g de grana limpia y molida.
- ❖ Adicionar 20 ml de solvente
- ❖ Agitar con Vortex durante tres minutos para homogeneizar la mezcla y favorecer la extracción.
- ❖ Centrifugar por 5 minutos (3000 r.p.m.).
- ❖ Separar el extracto del residuo con el uso de una pipeta Pasteur cuidando de no tocar el sedimento en el fondo del tubo.
- ❖ Adicionar al residuo 5 ml de solvente nuevo, agitar y centrifugar (repetir las extracciones hasta agotamiento total del residuo).
- ❖ Juntar las extracciones para obtener el Extracto Orgánico Total (**EOT**).

La eficiencia de extracción fue evaluada cualitativamente midiendo la absorbancia en cada una de las etapas de extracción y para cada solvente.

V.2.4. Influencia de la Temperatura

Tomando en cuenta que durante los procesos de extracción sólido líquido, la temperatura es un parámetro que incide directamente en la eficiencia del proceso, después de haber establecido el solvente más adecuado para la extracción, por medio de pruebas sucesivas a temperatura ambiente; se realizaron una serie de pruebas usando un solo proceso de extracción, variando la temperatura del solvente y manteniendo los otros parámetros constantes.

Procedimiento General

- ❖ Pesar 1 g. de grana limpia y molida, colocar en un vaso de precipitado de 500 ml.
- ❖ Agregar una solución de 0.1 g de Na_2CO_3 y 0.01 g. de EDTA en 300 ml. de **Solvente A**.
- ❖ Calentar la mezcla a la temperatura de ensayo (T.A., 40, 60, 70 y 85 °C)
- ❖ Mantener a esta temperatura durante 15 minutos, bajo agitación permanente.
- ❖ Después de tomar una alícuota para análisis, el EOT fue dividido en tres porciones de 100 ml cada una. Cada una de estas porciones será procesada de manera diferente.

Porción a

Esta porción fue analizada sin ningún tipo de tratamiento posterior.

Porción b

Esta porción fue filtrada a través de un papel filtro normal.

Porción c

Esta porción fue filtrada bajo vacío a través de un lecho de Celite®, de flujo rápido.

- ❖ Analizar el contenido de **AC** en cada porción.
- ❖ Para poder comparar los resultados con aquellos obtenidos con las muestras patrón, los análisis fueron realizados en diferentes condiciones, según el siguiente esquema:

Acuoso Hidrolizado

Este procedimiento es el método normalmente descrito y utilizado en la bibliografía **(ver V.2.2.4)**

Acuoso No-Hidrolizado

Se tomaron 0.1 g del extracto y se aforó a 100 ml con H_2O desionizada, luego se registró su espectro de Absorción entre λ : 230 y 550 nm, para tomar sus valores máximos y determinar la concentración de Ácido Carmínico.

Acuo-Etanólico Hidrolizado

Se tomaron 0.1 g del extracto y se añadió 3 ml de **HCl** 2N, se llevó a ebullición durante 5 min. y se aforó a 100 ml. con el **Solvente A**. Se registró su espectro de Absorción entre λ : 230 y 550 nm, para tomar sus valores máximos y determinar la concentración de Ácido Carmínico.

Acuo-Etanólico No-Hidrolizado

Se tomaron 0.1 g del extracto y se aforó a 100 ml con el **Solvente A**. y se registró su espectro de Absorción entre λ : 230 y 550 nm, para tomar sus valores máximos y determinar la concentración de Ácido Carmínico.

V.2.5. Influencia del Tipo y Cantidad de Base

Después de haber ensayado diferentes solventes de extracción (ver **V.2.3**) y las distintas temperaturas, consideramos que es importante estudiar la influencia del tipo y cantidad de base utilizada en la extracción, ya que el **AC** al ser un polifenol con un grupo carboxílico en su estructura la presencia de una base disociaría el compuesto facilitando su disolución en medio acuoso o acuo-etanólico.

Sobre la base de los resultados obtenidos anteriormente se escogieron dos bases para ser estudiadas en un proceso global hasta la obtención de la laca. Lo que se pretende en este punto es poder evaluar la influencia que tiene: primeramente el tipo de base en la eficiencia de extracción y luego en la preparación de la laca (**Tabla V.3**).

Tabla V.3 Tipo y porcentaje de base

Base	[%]
NaOH	1.0
Na ₂ CO ₃	20

Para poder mantener constante la relación de base y **AC**, los porcentajes de base son calculados en relación al peso de grana seca.

En segundo término, después de haber seleccionado la base más adecuada, se procedió a ver la influencia de la cantidad de base en el solvente de extracción. Para poder evaluar las posibles ventajas del uso de una mezcla de solventes, era necesario ver las incidencias que podría tener esta modificación sobre la preparación directa de las lacas.

Procedimiento:

- ❖ Pesar 1 g de grana limpia y molida.
- ❖ Adicionar 50 ml de **Solvente A**, con diferentes concentraciones de carbonato (**Tabla V.4**)
- ❖ La extracción del colorante y la obtención de lacas fue realizada según el método descrito en el **párrafo V.2.6**.
- ❖ Determinar el % de ácido carmínico en lacas y sobrenadantes. (**método V.2.2.4**).

Tabla V.4 % de Na₂CO₃ en el solvente de extracción (peso en relación al peso de grana seca)

Ensayo	Na ₂ CO ₃ (%)
a	1
B	2
c	5
d	10
e	20
f	30
g	40
h	50
i	100

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió que cantidad de Na₂CO₃ es la más adecuada para la obtención del mejor extracto y posteriormente la mejor laca.

V.2.6. Preparación de Lacas

Para la preparación de Lacas se utilizaron los extractos obtenidos únicamente con los solventes **I** y **III (Tabla V.2)**, ya que las soluciones II y IV son menos favorables para la extracción.

Solución I: acuoetanólica 70:30 al 1% de NaOH

Solución III: acuoetanólica 70:30 al 20% de Na_2CO_3 (2g) y al 1% de EDTA (0.2g).

Extracción:

- ❖ Pesar 10 g de grana limpia/molida y colocarla en un vaso de precipitado de 1 lt.
- ❖ Agregar 500 ml de Solvente
- ❖ Calentar a 70 °C y mantener por 15 min., bajo agitación.
- ❖ Llevar a pH 8 con una solución de ácido cítrico.
- ❖ Filtrar a través de Celite® con vacío
- ❖ Una vez obtenido el extracto de Carmín, se toma una alícuota para determinar su contenido de Ácido Carmínico.

Precipitación de la Laca:

- ❖ Este extracto de carmín fue nuevamente calentado a 70° C y ajustado a pH 8.
- ❖ Adicionar **1.3 g de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$** manteniendo la agitación constante durante 15 minutos.
- ❖ Añadir **0.9 g de CaCl_2** y ajustar el pH a 4 con la solución de ácido cítrico.
- ❖ Mantener el calentamiento y la agitación por 50 minutos.
- ❖ Enfriar y reposar durante algunas horas para favorecer la precipitación de la laca.
- ❖ Filtrar las lacas y separarlas de los sobrenadantes.
- ❖ Secar la laca en estufa a 45° C
- ❖ Determinar el porcentaje de ácido carmínico en las lacas y en los sobrenadantes obtenidos.

La determinación del % de ácido carmínico en lacas es de suma importancia ya que las especificaciones comerciales de este producto marcan que su contenido no debe ser menor al 50%.

V.2.7. Formulaciones de Carmín con Soportes Orgánicos

Con el fin de diversificar las posibilidades de comercialización del colorante, se hicieron una serie de pruebas para estabilizar el colorante con diferentes soportes orgánicos (**Tabla V.5**). El objetivo sería el de obtener productos sólidos que sean totalmente solubles en medio acuoso neutro, sin tener que pasar por Laca del Carmín.

Empleando las mismas condiciones de extracción, se prepararon extractos que después de haber reducido su volumen, se añadió 1.1 equivalentes del soporte orgánico.

Tabla V.5 Soportes Orgánicos

Ensayo	Soporte	Relación
I	-----	-----
II	Ácido Cítrico	1
III	Citrato de Sodio	1
IV	Dextrina Blanca : Citrato	1:1
V	Dextrina Blanca : Ácido Cítrico	1:1
VI	Dextrina Blanca : Ácido Cítrico : Citrato	1:1:1

Procedimiento:

Extracción

- ❖ Pesar 50 g de grana seca entera
- ❖ Se realizó la extracción (3x500 ml.) con una solución de: **Na₂CO₃** al 10 % y **EDTA** al 3 % en **Solvente A**. Mediante un proceso de molienda-extracción con Ultraturax® durante 8 min. a 80 °C.
- ❖ Filtrar por malla cada una de las extracciones y lavar el residuo con 100 ml del **Solvente de extracción** a 80 °C.
- ❖ Juntar todos los extractos y filtrar bajo vacío a través de Celite®, lavando el filtro con el solvente de extracción
- ❖ Aforar a 1800 ml., medir el **pH** y dividir en tres fracciones de 600 ml cada una.

Formulación con soportes y preparación de Laca

Cada una de las fracciones fue procesada de la siguiente manera:

Fracción 1

- ❖ Calentar el extracto, nuevamente a 80 °C y ajustar su **pH** a 5.0 con una solución saturada de Ácido Cítrico.
- ❖ Dividir en seis porciones de 100 ml cada una.
- ❖ Evaporar el solvente, en rotavapor a 40 °C, hasta reducir a un cuarto de su volumen inicial.
- ❖ Añadir el soporte orgánico (**Tabla V.5**) y agitar en caliente 5 minutos adicionales.
- ❖ Evaporar el solvente a 35 °C, en una estufa con circulación de aire, hasta sequedad.

Fracción 2

- ❖ Calentar el extracto, nuevamente a 80 °C y ajustar su **pH** a 10.0 con una solución de **Na₂CO₃** 1 M.
- ❖ Dividir en seis porciones de 100 ml cada una.
- ❖ Evaporar el solvente, en rotavapor a 40 °C, hasta reducir a un cuarto de su volumen inicial.
- ❖ Añadir el soporte orgánico (**Tabla V.5**) y agitar en caliente 5 minutos adicionales.
- ❖ Evaporar el solvente restante a 35 °C, en una estufa con circulación de aire, hasta sequedad.

Fracción 3

- ❖ Calentar el extracto, nuevamente a 80 °C y ajustar su **pH** a 8.0 con una solución saturada de Ácido Cítrico.
- ❖ Añadir una solución de 1.25 equivalentes de **Al₂(SO₄)₃** en 10 ml de agua a 80 °C y mantener la agitación a 70 °C durante 15 min.
- ❖ Manteniendo la agitación, ajustar el **pH** a 5.0 con una solución saturada de Ácido Cítrico a 80 °C.
- ❖ Añadir una solución de 1.25 equivalentes de **CaCl₂** en 10.0 ml de agua a 80 °C y mantener la agitación a 70 °C durante 1.0 hr.
- ❖ Dejar enfriar y decantar hasta la precipitación completa a temperatura ambiente.
- ❖ Filtrar el precipitado, bajo vacío, a través de papel filtro de alto flujo.
- ❖ Secar la laca a 40 °C bajo circulación de aire.

Determinar el porcentaje de ácido carmínico en los productos sólidos y en los sobrenadantes obtenidos.

V.3. EVALUACIONES ANALÍTICAS DE ÁCIDO CARMÍNICO

Tal como se pudo verificar en la información bibliográfica, todos los métodos analíticos normalmente utilizados emplean un medio acuoso, tanto para la hidrólisis de la muestra como para el aforado a un volumen exacto.

Puesto que en el proceso optimizado de extracción se emplea una mezcla acuo-etanólica como solvente, se consideró necesario estudiar el comportamiento y la respuesta del método analítico en medio acuo-etanólico utilizando soluciones patrón. De esta manera se obtendrán curvas de referencia que permitan hacer la cuantificación de muestras desconocidas en diferentes productos. Las lecturas de absorbancia se realizaron con o sin hidrólisis ácida previa de las muestras.

Para poder lograr estos objetivos se utilizó un patrón certificado de ácido carmínico (Merck, 98%), para preparar una solución de partida ($10^{-2} M$) a partir de la cual se hicieron las diluciones correspondientes.

La evaluación analítica se realizó por medio de curvas de referencia, considerando dos tipos de solventes en su elaboración.

V.3.1. Evaluaciones cuantitativas

Para la determinación cuantitativa del colorante se empleó la técnica de las curvas de referencia; midiendo la Absorbancia de las muestras desconocidas para cuantificarlas por dos procedimientos diferentes: por cálculo con las fórmulas correspondientes y por cálculo gráfico analítico.

V.3.1.1. Análisis por UV-VIS

En este punto se comenzó por determinar la Absorbancia en función de la longitud de onda, de donde se obtuvieron las longitudes de onda de los máximos de absorbancia. Posteriormente, se midió la absorbancia de las soluciones patrón en función de la concentración, en los λ_{max} encontrados anteriormente. De esta manera se obtiene la sensibilidad del método y el dominio de linealidad de las curvas.

Para la determinación de los valores de absorbancia se usó un espectrofotómetro UV- VIS, marca Varian modelo Cary 50.

V.3.1.2. Curvas de calibración de Ácido Carmínico

Método Acuoso Hidrolizado según bibliografía

Utilizando un patrón certificado de Ácido Carmínico al 98% de pureza, se prepararon **soluciones acuosas** de concentración conocida en un intervalo de 10^{-2} a $10^{-7} M$, hidrolizadas con HCl 2N (**ver punto V.2.2.4.**) y aforadas con agua desionizada.

Método Acuo-etanólico Hidrolizado

Utilizando un patrón certificado de Ácido Carmínico al 98% de pureza, se prepararon **soluciones acuo-etanólicas (70:30, v/v)** de concentración conocida en un intervalo de 10^{-2} a 10^{-7} M, hidrolizadas con HCl 2N (**ver punto V.2.2.4.**), y aforadas con la solución acuo-etanólica (70:30 v/v).

Método Acuo-etanólico No Hidrolizado

Utilizando un patrón certificado de Ácido Carmínico al 98% de pureza, se prepararon **soluciones acuo-etanólicas (70:30, v/v)** de concentración conocida en un intervalo de 10^{-2} a 10^{-7} M y aforadas con la solución acuo-etanólica (70:30 v/v).

V.3.2. Evaluaciones cualitativas

Para la caracterización y/o identificación de los diferentes componentes de color, se comenzó estudiando el comportamiento del Espectro de Absorción [**Abs=f(λ)**] del Ácido Carmínico en función del pH de la solución de análisis. Posteriormente se analizaron los productos de referencia por medio de dos técnicas espectroscópicas.

V.3.2.1. Influencia del pH de análisis

Para poder estudiar la influencia del pH de la solución de análisis sobre el Espectro de Absorción, se tomó una solución de Ácido Carmínico patrón 1×10^{-5} M y se determinó la variación de su absorbancia en función de la longitud de onda, en soluciones a diferentes pH (2.0 a 10.0).

Para ajustar las soluciones a pH ácido se empleó una solución diluida de Ácido Cítrico y para ajustar a pHs básicos se utilizó una solución diluida de **Na₂CO₃**.

V.3.2.2. Espectro Infrarrojo

Las pastillas de análisis fueron preparadas homogeneizando una pequeña cantidad de muestra patrón (**AC** o **Laca**) con **KBr** y **Nujol**.

La mezcla fue comprimida hasta formar una película muy delgada y translúcida; posteriormente fue colocada en el dispositivo de análisis y el espectro fue registrado para su posterior evaluación.

V.3.2.3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y de $^{13}\text{C-RMN}$, del producto de referencia, fueron realizados usando **DMSO-D₆** como solvente.

V.4. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

V.4.1. Extracto Orgánico Total (EOT) Acuo-Etanólico

Siguiendo el procedimiento general de extracción; la muestra a ser cromatografiada fue preprocesada de la siguiente manera:

- ❖ Grana en polvo: 1 g.
- ❖ Solvente: H₂O:EtOH, 70:30 (100 ml).
- ❖ Extracción: 2 x 50 ml a 70 °C; 15 min. c/u.
- ❖ Centrifugación: 3000 r.p.m. por 5 min.
- ❖ Sobrenadante: Recuperado por sifonación.
- ❖ Concentración: Estufa con circulación de aire, a 40 °C, 8 hrs.

V.4.2. EOT Acuo-Etanólico con Na₂CO₃ y EDTA

- ❖ Grana en polvo: 1 gr
- ❖ Solvente: H₂O:EtOH, 70:30 (100 ml), al 10% de Na₂CO₃ y al 1% de EDTA.
- ❖ Extracción: 2 x 50 ml. a 70 °C; 15 min. c/u.
- ❖ Centrifugación: 3000 r.p.m. por 5 min.
- ❖ Sobrenadante: Recuperado por sifonación.
- ❖ Concentración: Estufa con circulación de aire, a 40 °C, 8 hrs.

V.4.3. Preparación de la columna cromatográfica

Se utilizó una columna de vidrio de 90 cm de largo y diámetro variable cada 30 cm, (la parte superior de 1.6 cm, la parte media de 1.2 cm y la parte inferior 0.8 cm de diámetro). Volumen total 109 cm³. Protegida en su salida inferior, con un tapón de lana de vidrio (lavada y secada).

La columna fue llenada con una suspensión de 50 g de **Silicagel 60** (0.2 – 0.5 mm: Merck: N° de art. 107733) en 250 ml del eluyente **Butanol:Ácido Acético:Agua (3:1:1)**. La suspensión fue vertida a través de un embudo y asentada con ayuda de un tubo de hule blando hasta alcanzar unas 20 gotas por minuto. La parte superior de la columna fue protegida con un poco de arena de cuarzo, previamente lavada y secada.

V.4.4. Elusión cromatográfica

El extracto concentrado fue introducido en la parte superior de la columna, lentamente con la ayuda de una pipeta Pasteur, para asegurar una migración de frente horizontal. La introducción de la muestra fue completada por la adición de 15 ml del eluyente.

La elusión fue hecha hasta recuperar 40 fracciones de 10 ml cada una, proceso que fue seguido por cromatografía de capa delgada. Concluida la recolección de fracciones, la columna fue lavada con 1 x 100 de solvente básico **Butanol:Hidróxido de Amonio:Agua (3:1:1)**.

V.4.5. Detección y Análisis

Las fracciones recolectadas fueron analizadas por cromatografía de capa delgada (TLC), sobre placas de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck Art. 105719), usando como eluyente una mezcla **Butanol: Ácido Acético:Agua (5:2:3)** y como referencia externa una solución acuosa 10⁻⁴ M del patrón de Ácido Carmínico (Merck Art. 100211).

Las placas de TLC fueron reveladas con una lámpara UV a 365 nm (Cole-Parmer Mod. M014778).

Sobre la base de las observaciones en capa fina, las 40 porciones obtenidas fueron agrupadas en 8 fracciones, de las cuáles se tomaron sus Espectros de Absorbancia. Estas fracciones fueron concentradas, analizadas sobre placas de TLC y en algunos casos se tomaron sus espectros **IR**. A partir de estos datos se procedió a aplicar diferentes secuencias de separaciones analíticas según los casos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 EXTRACCIÓN DEL COLORANTE

VI.1.1. Análisis Proximal de la Grana

Para poder caracterizar bien el producto de partida que fue usado en este trabajo se realizaron los análisis de composición correspondientes; habiéndose obtenido los resultados siguientes:

Tabla VI.1 Análisis Proximal de Grana

Tipo de Análisis	%
Ácido carmínico	21.6
Proteínas	50.5
Humedad	8.4
Cenizas	5.7
Arsénico	< 1 ppm
Plomo	< 10 ppm
Salmonella	Negativo

En estos resultados (**Tabla VI.1**) se puede ver que la grana limpia, molida y tamizada (1 mm) con la que se trabajó tiene una composición promedio normal, es decir que está dentro de los límites de composición de los productos comerciales mas comunes.

Según la clasificación hecha por el ITINTEC, los requisitos generales de la grana comercial son:

Tabla VI.2 Requisitos Generales de Grana Comercial ^[12]

Requisitos	Cochinilla	
	Primera calidad	Segunda calidad
Humedad (máx.)%	11	11
Cenizas (máx.)%	5	12
Ácido carmínico (mín.)%	20	15
Impurezas (máx.)%	5	8

Tomando en cuenta que los valores de composición están dados en base húmeda, es normal que una pequeña variación en el porcentaje de humedad pueda traer variaciones significativas en el contenido de colorante.

VI.1.2. Influencia del solvente

Durante las pruebas para establecer la influencia del solvente sobre la eficiencia de extracción, se obtuvieron los siguientes resultados:

Solvente I: Acuo-etanólico 70:30 al 1 % NaOH (p/v) pH 12.6

Tabla VI.3 Evaluación Cualitativa de la Extracción con Solvente I

Extracto	Vol. (ml)	PH	Abs. 531 (nm)	Abs. 567 (nm)	Observaciones
1	20	12.6	0.8560	1.0117	El extracto es de color púrpura muy intenso y un residuo color púrpura muy intenso.
2	5	12.5	0.7542	0.8832	El extracto es de color púrpura muy intenso y un residuo color púrpura.
3	5	12.5	0.1827	0.2149	El extracto es de color púrpura y un residuo color púrpura más claro
4	5	12.4	0.0764	0.0866	El extracto es translúcido color púrpura claro y un residuo color blanco con morado. Se puede observar en el residuo gránulos pequeños de grana que no se disolvieron.
5	5	12.4	-	0.0337	El extracto es totalmente transparente con una tonalidad púrpura y un residuo color blanco con pequeños gránulos color púrpura que no se disolvieron.
6	10	12.5	-	-	El extracto es totalmente transparente con un residuo color blanco con pequeños gránulos color púrpura que no se disolvieron.
EOT	50	12.6	0.8434	0.9955	Extracto total color púrpura muy intenso, es inestable ya que presenta decoloración al paso de los días. Residuo total color café, al adicionarle HCl no se presenta ninguna coloración.

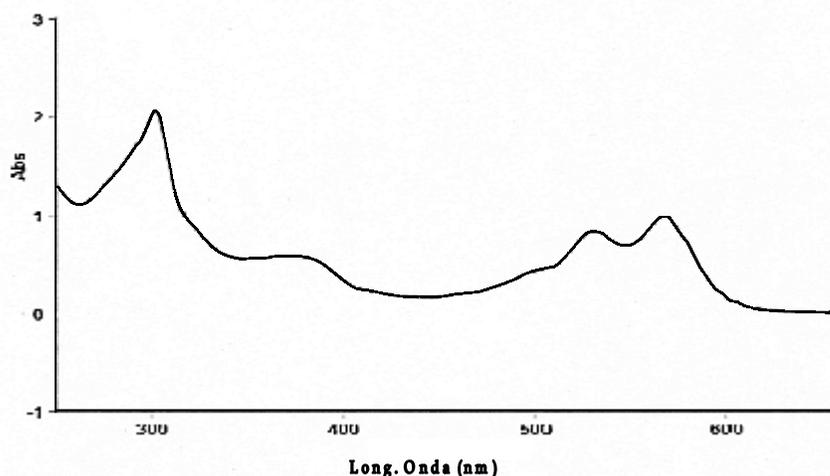


Fig. VI.1 Espectro de Absorción del EOT con Solvente I

Solvente II: Acuo-etanólico 70:30 acidificado a pH 3 con HCl

Tabla VI.4 Evaluación Cualitativa de la Extracción con Solvente II

Extracto	Volumen del solvente (ml)	pH	Abs 494 nm	Observaciones
1	20	4.8	0.4610	Extracto color rojo muy intenso y un residuo color rojo muy intenso.
2	5	3.8	0.3114	Extracto color naranja fuerte y residuo rojo intenso.
3	5	3.4	0.2941	Extracto color naranja y residuo color rojo.
4	5	3.2	0.2487	Extracto color naranja y residuo color rojo.
5	5	3.1	0.1426	Extracto color naranja claro y residuo color café rojizo.
6	10	3.1	0.2535	Extracto color naranja claro y residuo café rojizo.
EOT	50	4.2	0.4469	Extracto total presenta coloración rojo intenso y estable. Residuo total presenta una coloración café rojizo, al adicionarle NaOH presenta coloración púrpura.

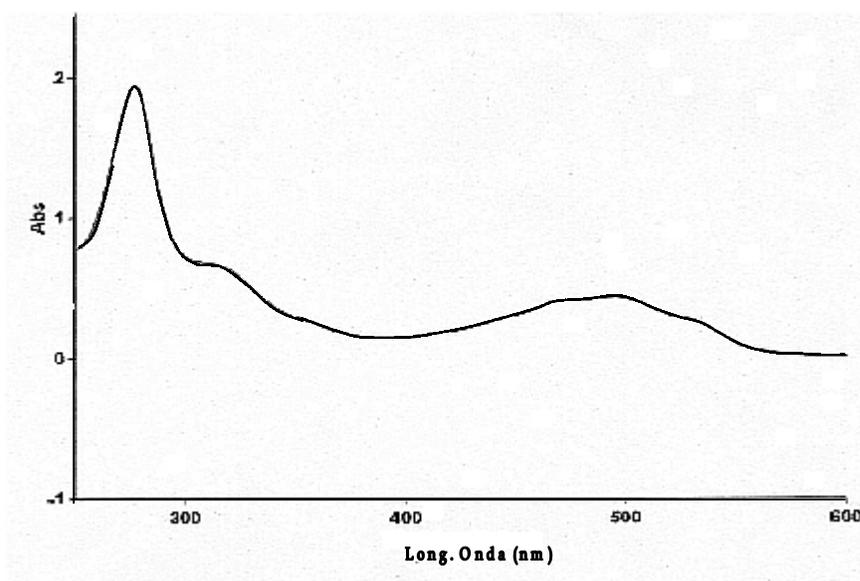


Fig. VI.2 Espectro de Absorción del EOT con Solvente II

Solvente III: Acuo-etanólico 70:30 al 20% de Na₂CO₃ y 1% de EDTA

Tabla VI.5 Evaluación Cualitativa de la Extracción con Solvente III

Extracto	Volumen del solvente (ml)	pH	Abs 565 nm	Observaciones
1	20	10.6	0.9897	Extracto color púrpura muy intenso y un residuo color púrpura
2	5	10.6	0.7653	Extracto color púrpura muy intenso y un residuo color púrpura
3	5	10.7	0.3844	Extracto color púrpura y residuo color morado con café.
4	5	10.7	0.0321	Extracto color púrpura claro y residuo blanco con café.
5	5	10.8	-	Extracto casi incoloro y residuo color blanco con café.
6	----	----	-	-----
EOT	50	10.7	0.8992	Extracto total color púrpura muy intenso y estable. Residuo final es de color blanco con café y al adicionarle HCl no presenta coloración.



Fig. VI.3 Espectro de Absorción del EOT con Solvente III

Solvente IV: Acuo-etanolica 70:30 (alcalinizada con NH₄OH) pH 12

Tabla VI.6 Evaluación Cualitativa de la Extracción con Solvente IV

Extracto	Volumen del solvente (ml)	pH	Abs 570 nm	Observaciones
1	20	12.1	0.8079	Extracto color púrpura intenso y un residuo color púrpura.
2	5	12.0	0.2272	Extracto color púrpura intenso y un residuo color púrpura claro.
3	5	12.0	0.0232	Extracto color púrpura y un residuo color rosa claro.
4	5	12.2	-	Extracto color claro y un residuo color blanco con café.
5	5	12.1	-	Extracto casi incoloro y residuo color blanco con café.
6	----	----	-	-----
EOT	40	12.0	0.8298	Extracto total color púrpura intenso estable y residuo total color blanco con café. El residuo al adicionarle HCl no presenta ninguna coloración. Olor intenso al estar realizando la extracción.

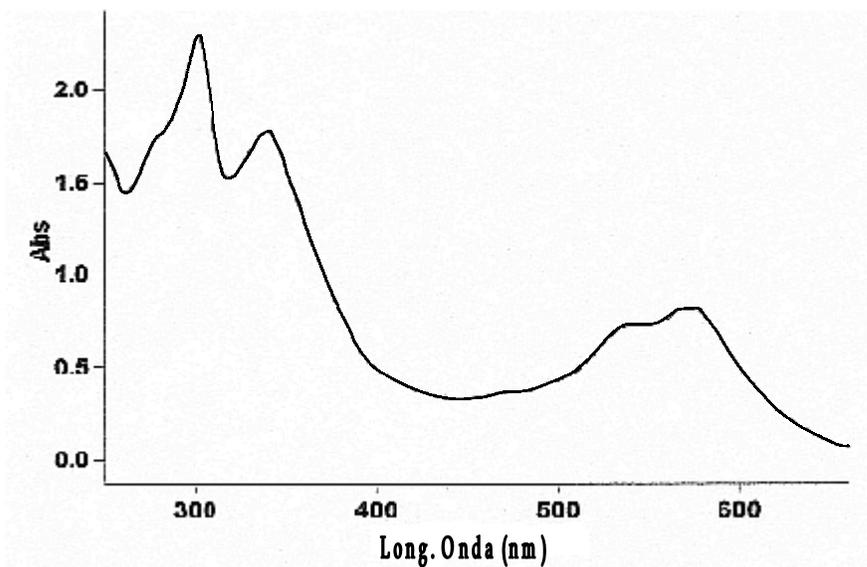


Fig. VI.4 Espectro de Absorción del EOT con Solvente IV

Los resultados en este punto muestran las siguientes diferencias entre los solventes ensayados:

Solvente I

Con este solvente se extrae prácticamente la totalidad del colorante entre la 2^{da} y 3^{era} extracción, lo cual se comprueba al adicionar el **HCl** en el residuo sólido final. Sin embargo al paso del tiempo se observa en los extractos una decoloración que puede ser detenida al acidificar el extracto.

Considerando este fenómeno, se realizaron también 3 pruebas confirmativas modificando el contenido de **NaOH** en un intervalo de 1 a 3.5 %, observándose que la inestabilidad del color es directamente proporcional a la concentración del hidróxido; es decir, a mayor concentración de **NaOH**, más rápida es la decoloración.

Solvente II

En esta extracción, realizada con solución acuoetanólica acidificada con **HCl** hasta pH 3, fue muy notoria la velocidad moderada a la que se va extrayendo la materia colorante, ya que después de las 6 etapas de extracción, aún no se había extraído la totalidad del colorante; puesto que el residuo sólido final presentaba una coloración intensa al adicionar el **NaOH**. Esto significa que se requiere una mayor cantidad de solvente ácido para completar la extracción.

Sin embargo, es muy importante hacer notar que el extracto obtenido tiene una coloración rojo brillante mucho mas estable que el púrpura obtenido con el solvente básico anterior.

Solvente III

En esta prueba, en que la extracción se la realiza con un solvente alcalinizado con **Na₂CO₃**, la materia colorante es recuperada entre la 2^{da} y 3^{era} extracción, obteniéndose un extracto total de color púrpura intenso (el residuo sólido resultante no presenta coloración al adicionar **HCl**).

Aquí también debemos hacer notar que, a diferencia del extracto obtenido con el solvente I (pH=12.4), Este **EOT** cuyo pH final fue de 10.7 se mantiene estable, sin sufrir ninguna decoloración con el tiempo.

Solvente IV

La extracción realizada con solución acuoetanólica 70:30 alcalinizada con **NH₄OH** también es muy eficiente. La totalidad de materia colorante se extrae prácticamente en las dos primeras etapas; sin embargo, aunque es un poco más estable que el extracto obtenido con la solución de **NaOH**, también presenta problemas de decoloración.

Considerando las características del **NH₄OH**, en lo referente a su dificultad de eliminación y su posibilidad de promover la descomposición del color, se optó por continuar las pruebas con dos solvente básicos I y III, descartando el solvente IV.

VI.1.3. Influencia de la Temperatura

Tomando en cuenta que el **AC** comienza a oscurecerse a partir de 120 °C y que su temperatura de descomposición es de 250 °C, así como las condiciones operativas normalmente manejadas para su extracción; después de haber definido el solvente mas adecuado para la extracción (Acuo-etanólico con Carbonato de Sodio), se realizaron ensayos de extracción a 5 temperaturas diferentes (**Fig. VI.5**). Sobre la base de los resultados obtenidos podemos concluir en una primera aproximación que cuando la temperatura aumenta, la eficiencia de la extracción aumenta, tanto en tiempo como en rendimiento.

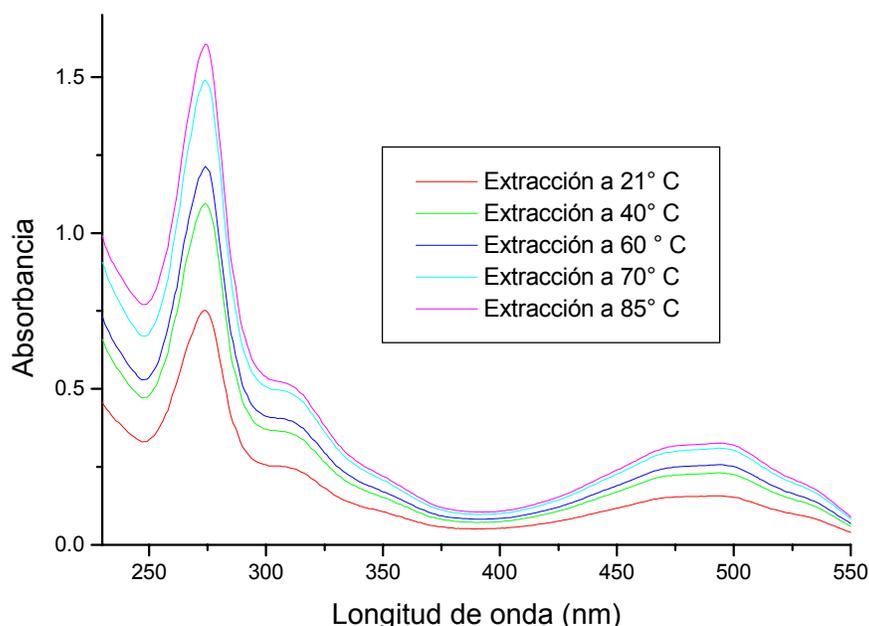


Fig. VI.5 Espectros de Absorbancia a diferentes Temperaturas de Extracción

Para poder hacer una evaluación comparativa de las diferentes condiciones de operación y de análisis, se tomaron los espectros de absorción del extracto acuo-etanólico, en diferentes condiciones de análisis (**Párrafo V.2.4**), tomando como punto de referencia el comportamiento de la extracción según el método clásico de análisis (acuoso hidrolizado). Sobre la base de estos resultados (**Fig. VI.6 a VI.9**) se puede decir que:

Los espectros de las **muestras no-hidrolizadas**, tanto en medio acuoso como acuo-etanólico . ponen en evidencia la presencia de un cromóforo con un λ_{max} cerca de 330 nm; que muy probablemente se trata de otro componente extraído, ya que el **AC** de referencia no presenta este máximo en las mismas condiciones de análisis.

También se puede ver que los otros componentes que pudieron haber sido extraídos, tienen un efecto batocrómico sobre el espectro del **AC**, efecto que es mucho mas significativo en el visible (Acuoso: 494 a 527 nm) que en el UV (Acuoso: 274 a 280 nm), efecto también observado en solvente acuo-etanólico (VIS: 496 a 531 nm y UV: 276 a 282 nm) (**Tabla VI.7**).

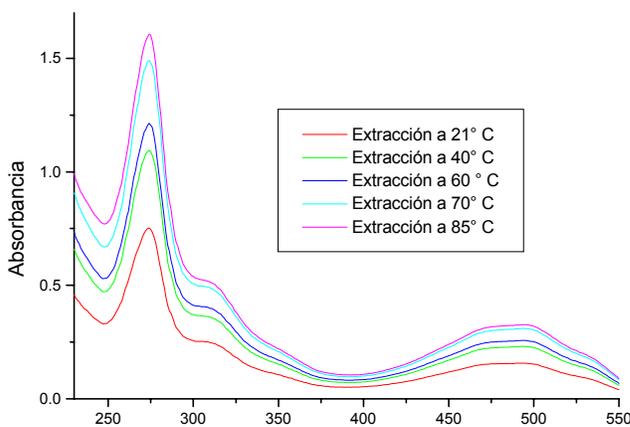


Fig. VI.6 Esp. Abs. Acuoso Hidrolizado

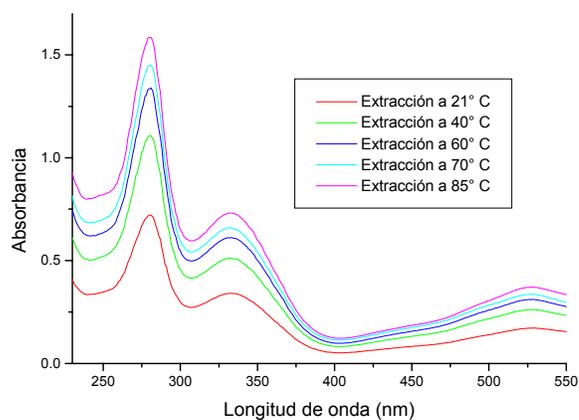


Fig. VI.7 Esp. Abs. Acuoso No-Hidrolizado

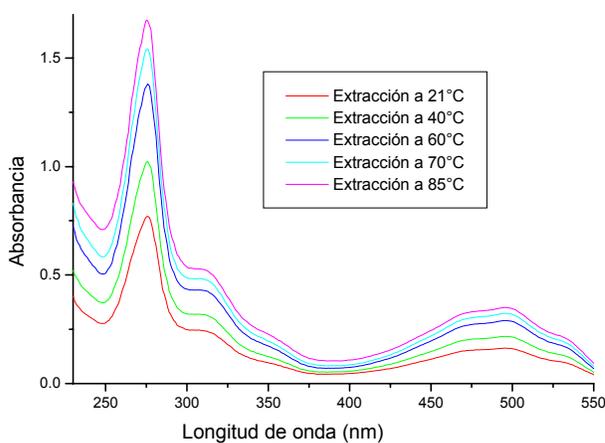


Fig. VI.8 Esp. Abs. AcuoEtanólico-Hidrolizado

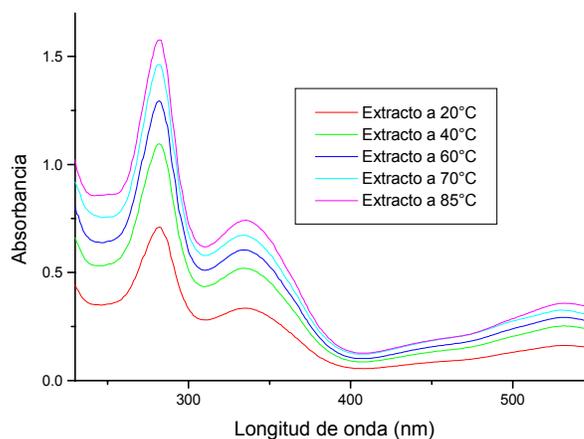


Fig. VI.9 Esp. Abs. AcuoEtanólico-NoHidrolizado

El uso de la mezcla acuoetanólica como solvente de aforo, también tiene un ligero efecto batocrómico sobre el espectro del **AC**, efecto que es más notorio en el visible que en el UV.

Por otra parte, al analizar los resultados de Absorbancia en función de la Temperatura, se puede observar que la absorbancia de las muestras a 280 nm (superiores a 0.6) es mucho mayor que a 494 nm (inferiores a 0.4), tanto para las muestras hidrolizadas como para las no-hidrolizadas, independiente del solvente utilizado para el aforado (**Fig. VI.10 y Fig. VI.11**).

También se puede observar que a 494 nm, la absorbancia de las muestras hidrolizadas es mayor que la de las no-hidrolizadas, mientras que a 280 nm son las muestras no hidrolizadas las que tienen valores superiores (**Fig. VI.12 y Fig. VI.13**), independiente del solvente utilizado para el aforado. Esto se debe principalmente al hecho que a 494 nm tenemos una absorción específica para el **AC**, mientras que a 280 nm muchos de los componentes extraídos pueden también absorber.

Tabla VI.7 Variación de los Máximos de Absorción

Temp. Extr.	HIDROLIZADO				NO-HIDROLIZADO			
	Acuoso		Acuo-Etanólico		Acuoso		Acuo-Etanólico	
	λ	Abs.	λ	Abs.	λ	Abs.	λ	Abs.
21	274.06	0.7527	275.95	0.7703	280.03	0.7214	282.08	0.7099
					332.98	0.3417	335.01	0.3353
	493.05	0.1574	495.93	0.1631	529.99	0.1720	531.95	0.1631
40	274.06	1.0960	275.95	1.0233	280.98	1.1071	282.08	1.0956
					332.98	0.5818	334.08	0.5200
	493.96	0.2307	495.93	0.2173	526.07	0.2620	531.05	0.2529
60	274.06	1.2141	275.95	1.3809	280.98	1.3384	282.08	1.2937
					332.98	0.6122	332.98	0.6047
	493.96	0.2573	495.02	0.2900	528.03	0.3110	531.95	0.2925
70	274.06	1.4905	275.95	1.5431	280.03	1.4493	280.98	1.4622
					332.98	0.6598	334.08	0.6725
	493.96	0.3102	495.93	0.3234	526.07	0.3363	529.99	0.3260
85	274.06	1.6055	275.00	1.6748	280.03	1.5846	280.08	1.5759
					332.98	0.7317	335.01	0.7419
	495.02	0.3266	495.93	0.3502	526.97	0.3709	531.95	0.3581
	274		276		280		282	
					333		334	
	494		496		527		531	

Como se había observado inicialmente y se reconfirma después, la absorbancia de los extractos aumenta cuando la temperatura de extracción aumenta. Sin embargo, después de realizados los cálculos de cuantificación, podemos constatar que los rendimientos de extracción de los procesos globales tiene un comportamiento un tanto diferente (**Fig. VI.14 a VI.16**) en las diferentes condiciones de preparación de muestras y de análisis.

La evaluación de estos resultados nos permite ver que si bien la eficiencia de extracción aumenta con la temperatura, en realidad existe un límite operativo a partir del cual el tratamiento térmico prolongado (incluso, aún por debajo de la temperatura de oscurecimiento) hace que los rendimientos globales de extracción vayan disminuyendo. Experimentalmente constatamos que cuando se dejan enfriar los extractos obtenidos a 85 °C, observamos la formación de pequeños flóculos que son retenidos por los sistemas de filtración (especialmente Celite®), fuera de los problemas operativos de la filtración en caliente. Estos pequeños flóculos suspendidos podrían ser estructuras policondensadas de **AC** tal como están descritas en la bibliografía [38].

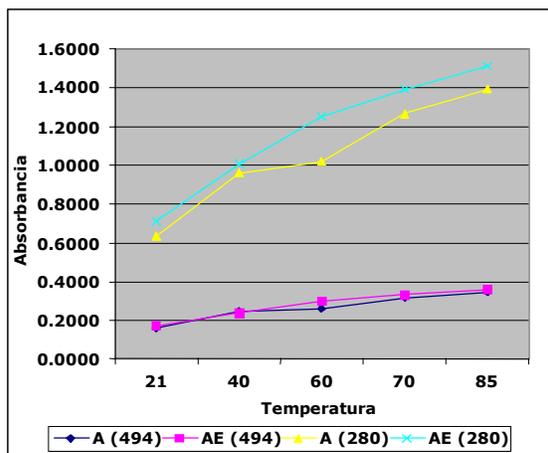


Fig. VI.10 Extractos Hidrolizados

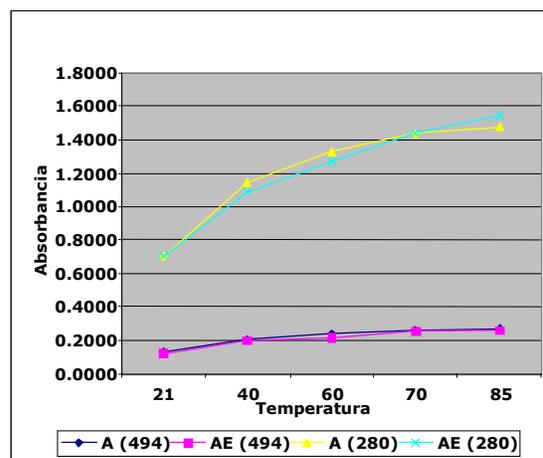
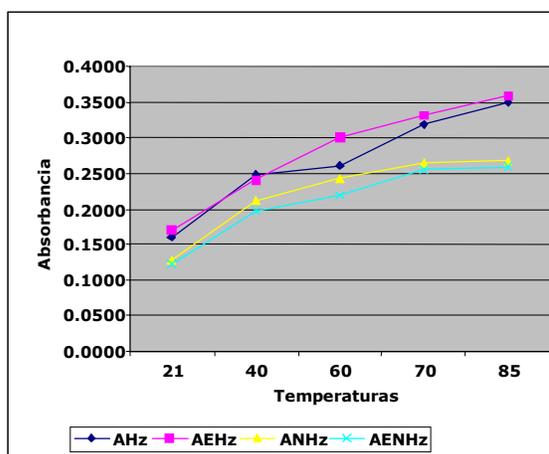
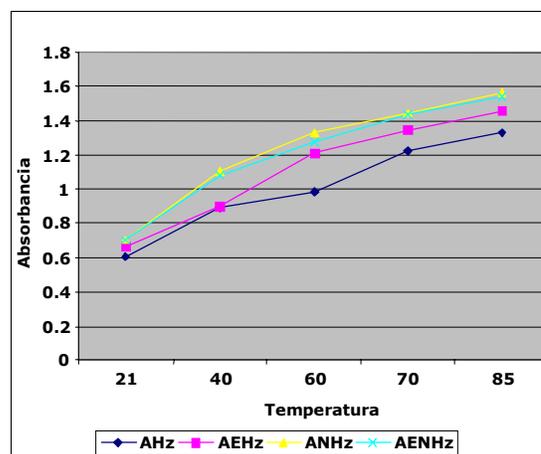


Fig. VI.11 Extractos No-Hidrolizados

Fig. VI.12 Abs = f(T) ; $\lambda = 494$ nmFig. VI.13 Abs = f(T) ; $\lambda = 280$ nm

También se puede observar que las condiciones de filtrado tendrán una gran influencia sobre las características de estabilidad de los extractos, así como sobre el comportamiento de los **Rendimientos de Extracción (Fig. VI.17 a VI.20)**. Como podemos observar gráficamente: independientemente del tratamiento de la muestra para el análisis (hidrolizado o no hidrolizado) o de la longitud de onda de las lecturas (494 o 280 nm), el filtrado sobre Celite® nos permite postular que entre la temperatura ambiente y 40 °C, el comportamiento de la extracción es el esperado, mientras que entre 40 y 60 °C el rendimiento de extracción ya no varía significativamente cuando el filtrado es normal, pero disminuye cuando el extracto obtenido a 40 °C es filtrado por Celite®, mucho más que en los extractos obtenidos a 60 y 70 °C. También se puede constatar que entre 60 y 70 °C hay un incremento rápido y significativo del rendimiento de extracción; mientras que a partir de 70 °C hay una rápida disminución del rendimiento.

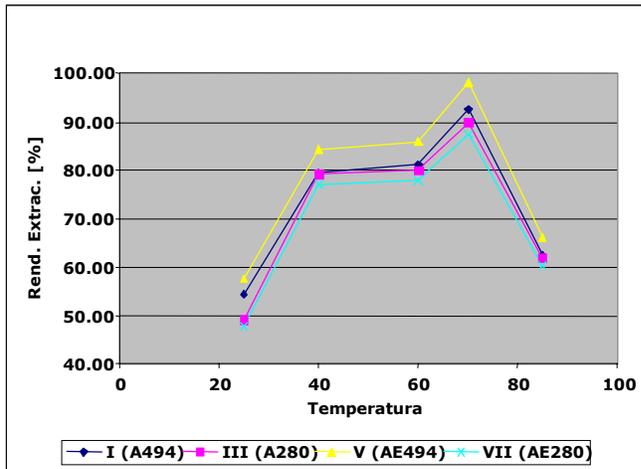


Fig. VI.14 Rendimientos con Filtrado Normal

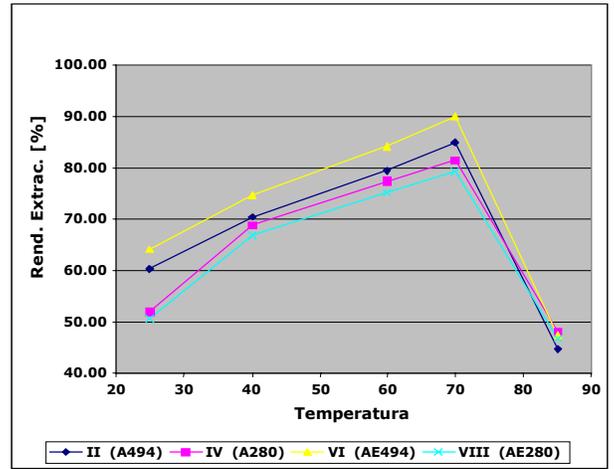


Fig. VI.15 Rendimientos con Filtrado sobre Celite

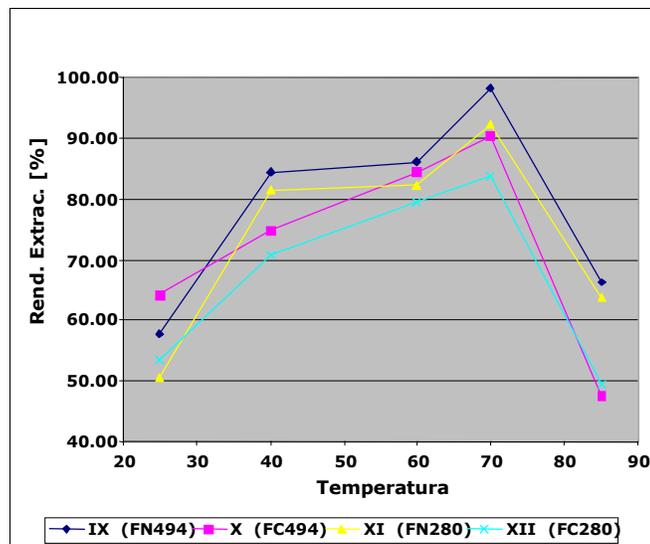


Fig. VI.16 Rendimientos con Extracción Acuoetanólica No-hidrolizada

Todo esto se puede explicar por la composición de los extractos obtenidos a diferentes temperaturas:

Mientras a bajas temperaturas se extrae principalmente el colorante libre o muy poco asociado, a partir de 40 grados se extrae un **AC** mucho mas asociado a diferentes macromoléculas bioorgánicas, en particular proteínas, por las que tiene una afinidad particular; esto hace que la velocidad sea un poco mas lenta.

A partir de 60 °C ya se tendría una energía suficiente como para producir la hidrólisis de estos complejos macromoleculares y liberar el material colorante, facilitando su extracción. Si bien los mejores rendimientos fueron obtenidos a 70 °C, vemos que a partir de esta temperatura, el tratamiento térmico prolongado comienza a promover las reacciones de policondensación y/o esterificación élica del **AC**, lo que conlleva a la disminución de los rendimientos de extracción.

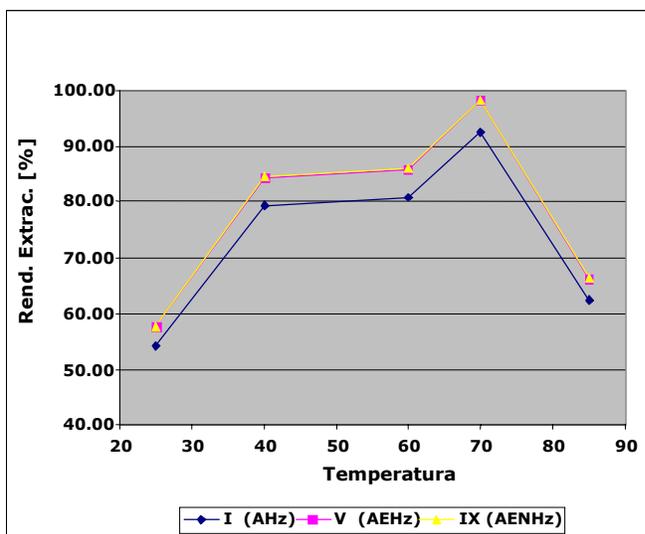


Fig. VI.17 Filtrado Normal ; $\lambda = 494$

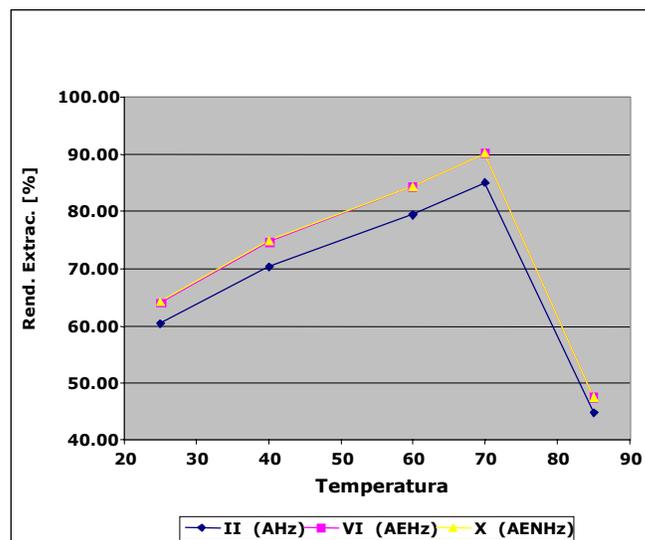


Fig. VI.18 Filtrado sobre Celite ; $\lambda = 494$

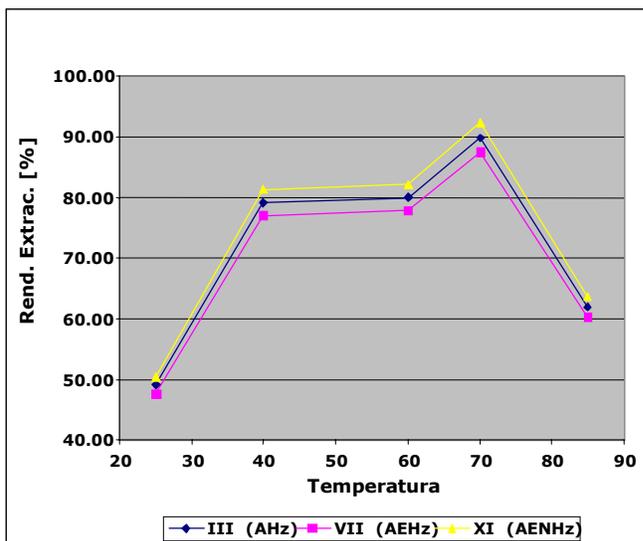


Fig. VI.19 Filtrado Normal ; $\lambda = 280$

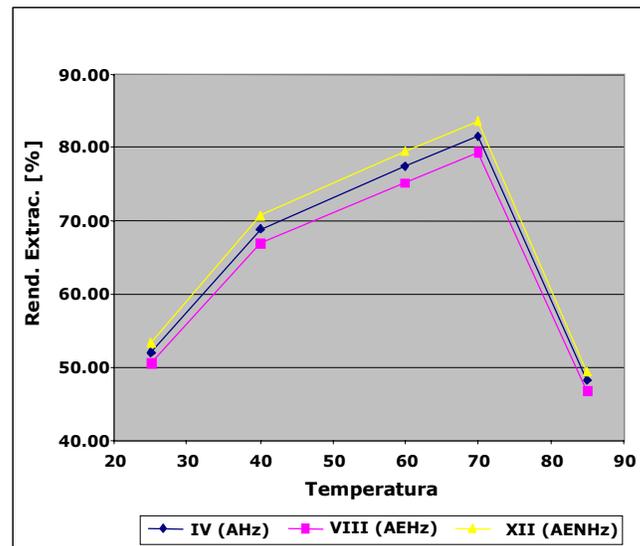


Fig. VI.20 Filtrado sobre Celite ; $\lambda = 280$

VI.1.4 Influencia del tipo y cantidad de base

Como acabamos de ver, las extracciones alcalinas son las que presentan los mejores resultados de extracción; sin embargo, la decoloración observada en ciertos extractos, nos conduce a corroborar experimentalmente: por una parte la influencia del tipo de base tomando dos de los solventes anteriores (**Na₂CO₃** y **NaOH**) y por otra parte, la concentración de la base seleccionada.

Para poder tener una evaluación global de la influencia de la base, este ensayo se realizó desde la extracción hasta la elaboración de sus lacas correspondientes (**V.2.6.**); proceso que debe ser realizado de manera continua para minimizar la decoloración del extracto y para ver la influencia de la base sobre la formación y precipitación de la Laca.

Tabla. VI.8 % de AC en Extracción con Solución Acuoetanólica de NaOH* (1% p/V)

Muestra	Peso de la muestra (g)	Absorbancia (λ 494 nm)	% Ácido Carmínico
Extracto	0.5246	0.1113	0.3815
Laca	0.0264	0.4206	28.65
Sobrenadante	0.5529	0.1096	0.3565

* El % de NaOH está calculado en relación a peso del volumen total de solvente

Tabla. VI.9 % de AC en Extracción con Solución Acuoetanólica de Na₂CO₃ (20% + 1 % EDTA)

Muestra	Peso de la muestra(g)	Absorbancia (λ= 494 nm)	% Ácido Carmínico
Extracto	1	0.1066	0.3836
Laca	0.0267	0.6483	43.67
Sobrenadante	0.5104	0.0558	0.0390

Analizando los resultados anteriores (**Tablas VI.8 y VI.9**), se constata que tanto los solventes con carbonato así como con hidróxido de sodio dan prácticamente el mismo porcentaje de Ácido Carmínico en los extractos (**0.3836 y 0.3815 % respectivamente**); sin embargo, es durante la preparación y precipitación de la laca que la diferencia entre ambos solventes es notoria. Efectivamente, durante la precipitación de las lacas a partir de los extractos obtenidos con carbonato, el sobrenadante queda prácticamente incoloro (0.0390% **AC**) y la laca obtenida tiene 43.67 % de **AC**; mientras que en el caso de los extractos obtenidos con Hidróxido el sobrenadante tiene una coloración mucho más significativa (0.3565% **AC**) y la laca obtenida 28.65 % de **AC**. Esto quiere decir que la formación de la laca se ve desfavorecida por la presencia del **NaOH** en la solución.

Una vez establecidas las ventajas del Carbonato como base de extracción, se estudió la influencia de la concentración de base en el solvente, tanto en la extracción del colorante como en la preparación de la laca, tratando de igualar las características de los productos comerciales.

**Tabla VI.10 Extracción con Solución Acuoetanólica de Na_2CO_3 :
% de AC en Extractos
(muestra 0.5 g)**

Cantidad de Na_2CO_3 (%)	Absorbancia ($\lambda = 494 \text{ nm}$)	% Ácido Carmínico
1	0.0464	0.1669
2	0.0502	0.1822
5	0.0564	0.1998
10	0.0629	0.2254
20	0.0620	0.2208
30	0.0674	0.2420
40	0.0665	0.2321
50	0.0885	0.2513
100	0.0543	0.1906

**Tabla VI.11 Extracción con Solución Acuoetanólica de Na_2CO_3 :
% de AC en Sobrenadantes
(muestra 0.5 g)**

Cantidad de Na_2CO_3 (%)	Absorbancia ($\lambda = 494 \text{ nm}$)	% Ácido Carmínico
1	0.0114	0.0158
2	0.0485	0.0694
5	0.0334	0.0480
10	0.0013	0.0018
20	0.0305	0.0416
30	0.0488	0.0686
40	0.0549	0.0754
50	0.0721	0.0992
100	0.1397	0.1998

**Tabla VI.12 Extracción con Solución Acuoetanólica de Na₂CO₃ :
% de AC en Lacas
(muestra 0.025 g)**

Cantidad de Na ₂ CO ₃ (%)	Laca total obtenida (g)	Absorbancia $\lambda= 494 \text{ nm}$	% de ácido carmínico
1	0.1717	0.2542	73.15
2	0.1490	0.2642	74.54
5	0.2100	0.1708	64.67
10	0.4142	0.1505	43.31
20	0.4185	0.1294	37.24
30	0.4418	0.1264	35.94
40	0.4360	0.2406	33.95
50	0.4511	0.2342	33.57
100	0.2656	0.1388	19.81

Como podemos ver en los resultados anteriores (**Tabla VI.10**), cuando la concentración de Carbonato aumenta en el solvente de extracción, el porcentaje de Ácido carmínico aumenta en los extractos; desde un 0.1699 % para 1 % de Carbonato, hasta 0.2513 % para 50 de Carbonato.

Durante la preparación de lacas se pudo constatar que el producto que más se aproxima a los requerimientos comerciales (50% de **AC**) es aquel preparado a partir del extracto que se obtuvo con 10 % de Carbonato en el solvente de extracción. La laca preparada con este extracto tiene 43.31 % de **AC** generando un sobrenadante con solo 0.0018 % de **AC**. Esto quiere decir que tenemos un rendimiento de conversión del orden de 97.76 %.

Finalmente diremos que: si bien las lacas obtenidas con 1, 2 y 5 % de Carbonato presentan las concentraciones mas elevadas en **AC**, las características fisico-químicas de estos productos son muy desfavorables, ya que presentan un elevado grado de compactación, lo que hace pensar hasta en un cierto grado de polimerización; lo que evidentemente incide, por una parte en sus propiedades de solubilidad y por otra en los rendimientos globales de conversión en laca.

Rendimientos de Extracción

Para calcular los rendimientos globales de extracción se tomó el promedio de las pruebas con 10, 20 y 30 % de Carbonato en el solvente de extracción (**Tabla VI.10**); entonces tendremos:

$$AC_{\text{prom.}} = 0.2294 \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ ml}} \right]$$

Partiendo de 1 g. de grana y habiendo obtenido 80 ml de extracto, la cantidad total de **AC** en el extracto será:

$$0.1835 \text{ g}$$

Tomando en cuenta que la grana seca utilizada tiene:

$$[\% \text{ AC}] = 21.62$$

La cantidad teórica de **AC** será:

$$\begin{array}{rcl} 21.62 \text{ g} & \rightarrow & 100 \text{ g} \\ X \text{ g} & \rightarrow & 1 \text{ g} \end{array}$$

$$X = 0.2162 \text{ g}$$

Entonces el rendimiento de extracción será:

$$\begin{array}{rcl} 0.2162 \text{ g} & \rightarrow & 100 \% \\ 0.1835 \text{ g} & \rightarrow & X \% \end{array}$$

$$X = 84.9 \%$$

De la misma manera, podemos calcular el rendimiento de preparación de la laca del Carmín; para esto tomamos las mismas pruebas con 10, 20 y 30 % de Carbonato. Tomando en cuenta que el peso promedio de la laca obtenida es:

$$P_{\text{prom.}}^{\text{Laca}} = 0.4248 \text{ g}$$

y cuyo contenido promedio de **AC** es:

$$[\% \text{ AC}]_{\text{prom.}}^{\text{Laca}} = 38.83$$

Esto quiere decir que hemos recuperado:

$$\begin{array}{rcl} 38.83 \text{ g AC} & \rightarrow & 100 \text{ g Laca} \\ X \text{ g AC} & \rightarrow & 0.4248 \text{ g Laca} \end{array}$$

$$X = 0.1649 \text{ g AC}$$

Esto quiere decir que el rendimiento de preparación de la laca, en relación al **AC** extraído, es:

$$0.1835 \text{ g} \rightarrow 100$$

$$0.1649 \text{ g} \rightarrow X$$

$$X = 89.86 \%$$

Finalmente, podemos ver que el rendimiento global del proceso, es decir en relación al **AC** contenido en la grana seca, será:

$$0.2162 \text{ g} \rightarrow 100$$

$$0.1649 \text{ g} \rightarrow X$$

$$X = 76.3 \%$$

Para poder hacer una evaluación comparativa, y siguiendo el mismo procedimiento de cálculo, podemos determinar el rendimiento individual de cada uno de los tratamientos anteriores; en cada una de sus fracciones (**Tabla VI.13**).

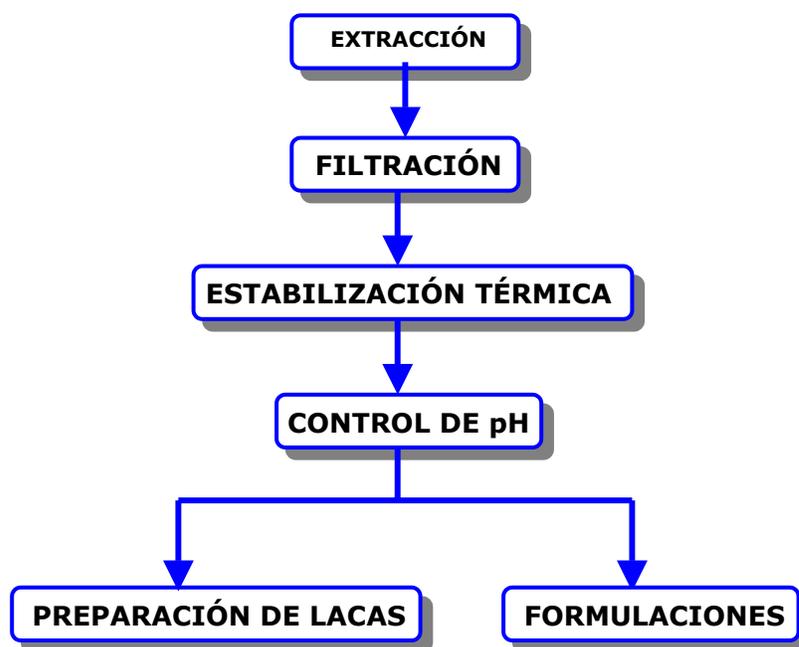
Tabla VI.13 Rendimientos de Extracción y Precipitación

Rendimiento	10% Na₂CO₃	20% Na₂CO₃	30 % Na₂CO₃
Extracción (%)	83.40	81.70	89.54
Sobrenadante (%)	0.0018	0.0416	0.0686
Precipitación (%)	99.49	88.23	82.01
GLOBAL (%)	82.98	72.06	73.45

VI.1.5. Método Optimizado de Extracción

La fase experimental de este trabajo fue dirigida principalmente a la extracción del colorante y a la preparación de formulaciones de fácil aplicabilidad, tratando de alcanzar un proceso óptimo. En este entendido, las pruebas realizadas permitieron estudiar los parámetros operativos más incidentes sobre el proceso como son: molienda, solvente, temperatura y filtración.

Sobre la base de los resultados experimentales se logró establecer un procedimiento de extracción del colorante (**Esquema VI.1**), que presenta ventajas comparativas sobre los procedimientos tradicionales (**Párrafo II.6**). Cuando se pretende optimizar y escalar los procesos a un nivel industrial es necesario considerar el mínimo de operaciones unitarias con el máximo de eficiencia, para poder así incrementar los rendimientos y minimizar los costos.



Esquema VI.1 Proceso Optimizado de Extracción del Carmín

Procedimiento propuesto:

La grana comercial seca, entera y limpiada por zarandeo, fue sometida a un tratamiento de molienda extracción con un solvente acuo-etanólico (70:30, v:v) a 70 °C, con 10 % de **Na₂CO₃** y 3 % de **EDTA** (porcentajes calculados en peso, en relación a la grana seca).

Después de 15 min. de molienda extracción se procedió a una centrifugación-filtración, en un sistema rotativo vertical, dotado de uno o dos canastillos cilíndricos, recubiertos con malla fina (un canastillo) o con un par de mallas, grueso al interior y fino al exterior (dos canastillos). El solvente utilizado fue dividido en dos porciones, la primera para la extracción y la segunda para el lavado de los residuos, directamente en el canastillo y en continuo.

Después de la filtración se puede observar que el residuo sólido es prácticamente incoloro (Foto adjunta), lo cual nos muestra que la extracción líquido-sólido es eficiente.

El extracto recuperado fue medido (vol y pH) y aforado a un volumen determinado, para luego ser dividido en función de los requerimientos de las etapas siguientes. Los extractos obtenidos pueden pasar directamente a la elaboración de Lacas o ser concentrados para su posterior estabilización, con diferentes soportes orgánicos.

Las porciones obtenidas sirvieron para preparar laca y/o para la estabilización del colorante con diferentes soportes orgánicos comerciales

El solvente es eliminado y el residuo es evaluado en sus propiedades de estabilidad y solubilidad en diferentes tipos de solventes, temperaturas y condiciones de pH.



Cuerpos y Residuos sólidos, filtrados después de la extracción

VI.2. ESTABILIZACIÓN DEL COLORANTE

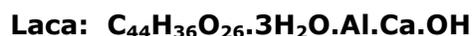
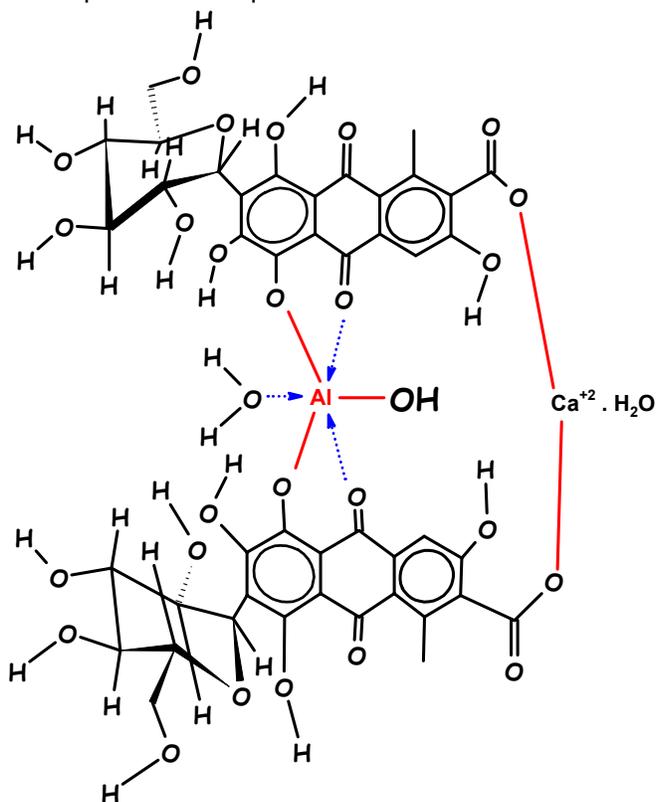
Tomando en cuenta los requerimientos del mercado en formulaciones comerciales y las características físico-químicas de los extractos, la preparación de lacas es siempre el procedimiento más usual para la estabilización y comercialización del colorante de Carmín. Experimentalmente se pudo observar que dependiendo del tipo y cantidad de base empleada en el solvente de extracción del colorante, las características físico-químicas y los rendimientos de preparación de las lacas podía variar significativamente; lo que condujo a estudiar este comportamiento.

En el presente trabajo se realizaron pruebas sistemáticas para proponer nuevas formulaciones que permitan estabilizar el Carmín, sin tener que pasar por laca Calcio-Alumínica.

Para la realización de estas pruebas es necesario definir la estequiometría del proceso con rendimientos operativos aproximados y luego calcular la cantidad de insumos requeridos en cada una de las diferentes pruebas. Finalmente, las relaciones de cálculo permitirán determinar los rendimientos en cada caso.

VI.2.1. Estequiometría del Proceso

En esta sección calcularemos la cantidad de los diferentes insumos que serán empleados para la preparación de Lacas Calcio-Alumínicas (**Fig. II.6**) o de las formulaciones con soportes orgánicos; esto quiere decir que se trata de cálculos de una estequiometría de preparación del producto.



El AC representa el 88 % en peso, en relación a la Laca.

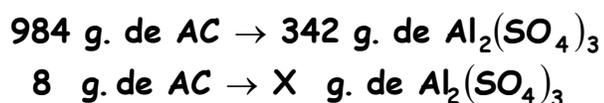
Fig. II.6 Estructura Química de Laca Carmín

Insumos para Lacas

Partiendo de 50 g. de "grana seca" entera, con 10 % de humedad, 20 % de **AC** y 80 % de eficiencia de extracción, tendremos:

8 g. de **AC**

Si consideramos que se necesitan dos moléculas de **AC** para la formación de una molécula del complejo Calcio-Alumínico.



Entonces:

$$X = \frac{8 \cdot 342}{984} = P_{ACg} \cdot \frac{342}{984}$$

De una manera general tendremos:

$$P_{ACg} = P_g \cdot \frac{[\%AC]}{100} \quad (\text{Ec.V.1})$$

Finalmente, tomando en cuenta un exceso del 25 % tendremos:

$$P_{Al_2(\text{SO}_4)_3} = P_g \cdot [\%AC] \cdot 4.34 \times 10^{-3} \quad (\text{Ec.V.2})$$

De la misma manera, para el **CaCl₂** tendremos:

$$P_{CaCl_2} = P_g \cdot [\%AC] \cdot 1.41 \times 10^{-3} \quad (\text{Ec.V.3})$$

Y para el **CaCO₃** tendremos:

$$P_{CaCO_3} = P_g \cdot [\%AC] \cdot 1.27 \times 10^{-3} \quad (\text{Ec.V.4})$$

Insumos para Formulaciones Hidrosolubles

Partiendo de 50 g. de "grana seca" entera, con 10 % de humedad, 20 % de **AC** y 80 % de eficiencia de extracción, se tienen:

8 g. de AC

Considerando que la formulación de colorante tenga un 50 % de **AC** en peso, con un rendimiento de recuperación del 90 %; la cantidad de soporte (**Tabla V.5**) que se debe añadir al extracto será, es decir 1.1 equivalentes en peso:

8.8 g de Soporte orgánico

VI.2.2. Método Optimizado para la Preparación de Laca

La siguiente metodología es el resultado de todas las pruebas realizadas para optimizar el proceso para la preparación de Lacas (**Esquema VI.2**).

- ❖ El **EOT** a 70 °C es ajustado a pH=8 por la adición de una solución acuo-etanólica de Ácido Cítrico a 70 °C; para luego añadir 1.25 equivalentes de una solución acuo-etanólica de $Al_2(SO_4)_3$ a 70 °C.
- ❖ Después de 15 min. de agitación a 70 °C el pH es nuevamente ajustado a 5.0 con una cantidad adicional de la solución de Ácido Cítrico.
- ❖ Una vez alcanzado el pH deseado, añadir una solución acuo-etanólica de $CaCl_2$ o $CaCO_3$ a 70 °C (1.25 equivalentes).
- ❖ Mantener una agitación suave y constante a 70 °C hasta precipitación completa.
- ❖ Dejar enfriar hasta temperatura ambiente, filtrar y secar en rotavapor, bajo vacío y en un baño a 40 °C.
- ❖ El producto obtenido es evaluado en sus propiedades de estabilidad en diferentes tipos de solventes, temperaturas y condiciones de pH.

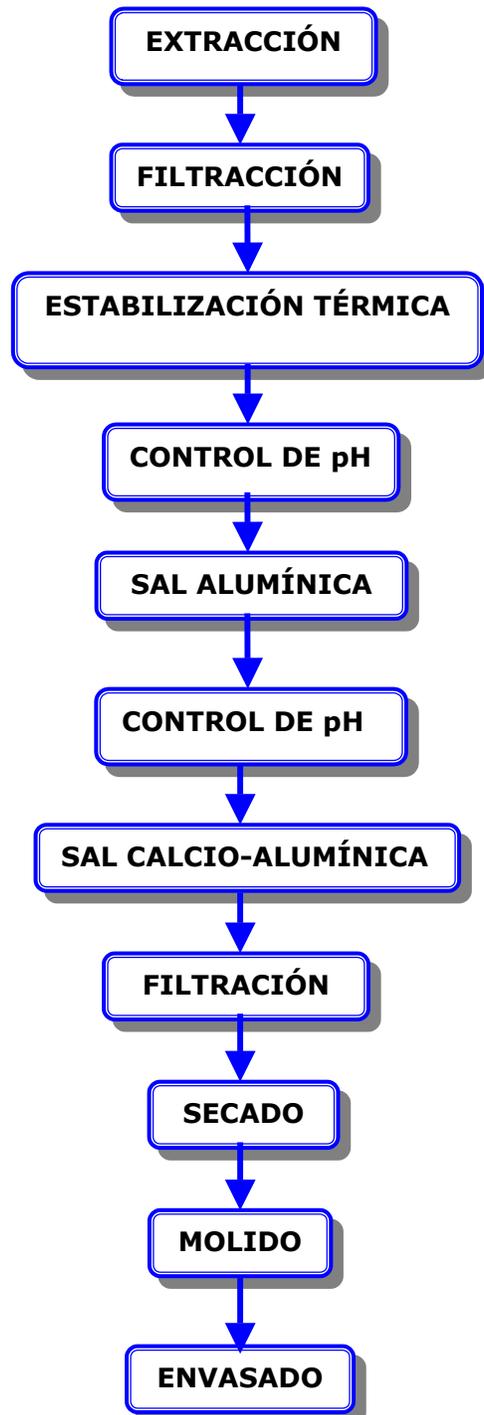
Nota:

Los equivalentes de las sales inorgánicas fueron calculadas en función de la cantidad teórica de colorante, obtenida con un rendimiento de extracción del 80 %.

La eliminación del solvente debe ser realizada con un control minucioso de la temperatura del baño y del tiempo de secado; combinando el rotavapor con una estufa eléctrica de laboratorio, con circulación de aire.

Sobre la base de los resultados obtenidos se pudo constatar que:

Durante la preparación de Lacas, cuando el ácido empleado para regular el pH, antes de la adición de las sales inorgánicas correspondientes, es un ácido fuerte como el **HCl** ; la laca obtenida tiene un tinte más oscuro y sus propiedades de solubilidad se ven fuertemente disminuidas, esto quiere decir que la presencia de un ácido fuerte en el medio podría promover la polimerización del colorante o de algunos de sus componentes .



Esquema VI.2 Proceso Optimizado de Preparación de Lacas

Cuando la base empleada para la extracción del colorante es una base fuerte como el **NaOH**, los rendimientos de preparación de lacas disminuye de manera significativa, mientras que al usar carbonato los rendimientos son mucho mayores. Entonces podemos suponer que la formación del complejo **Alumino-Carminato** se ve desfavorecida, ya sea por secuestro del catión o por que el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la disociación. Por otra parte, también se debe tomar en cuenta que las especies químicas disociadas del **AC** son diferentes en medio OH^- o en medio $(\text{CO}_3)^{-2}$, lo que también influiría en el rendimiento global de formación de la Laca.

Es muy importante hacer notar que cuando la extracción se realiza empleando **NaOH** como base (0.25 M), el pH final del extracto es aproximadamente 13; mientras que cuando la extracción se hace con $(\text{CO}_3)^{-2}$ (3.8×10^{-2} M) el pH final esta próximo a 10. Esto significa que cuando se debe ajustar el pH a 8.0 con ácido Cítrico, la cantidad de ácido añadido será mayor en el primer caso, haciendo que la fuerza iónica del sistema aumente considerablemente; lo que por lógica consecuencia tendrá una incidencia negativa en la formación del complejo o en su estabilidad.

Las características comerciales más aceptadas para la laca son evidentemente la finura del polvo y sobre todo un color rojo brillante estable. Estos requisitos son alcanzados de manera satisfactoria cuando la base de extracción es el $(\text{CO}_3)^{-2}$ y cuando la concentración de EDTA en la solución de extracción es del 3 % en peso, en relación a la grana seca. Cuando la base empleada es el **NaOH** y/o cuando la concentración de EDTA es menor, el polvo escarlata, obtenido inicialmente, se oscurece rápidamente en contacto con el aire haciendo que la solubilidad disminuya, incluso en medio básico.

Finalmente diremos que las condiciones de secado de la laca obtenida es muy importante para preservar las características físico-químicas del producto. El secado debe hacerse a baja temperatura y lo mas rápidamente posible; ya que si el secado dura demasiado tiempo, incluso a bajas temperaturas comienza el oscurecimiento y la polimerización.

Para hacer una evaluación comparativa de las propiedades de solubilidad de las lacas obtenidas se tomaron dos tipos de solventes en tres condiciones de pH según el esquema siguiente:

Tabla VI.14 Solventes para pruebas de Solubilidad

Solvente	Composición	Relación	pH
1	H ₂ O	100 [v]	Neutro
2	H ₂ O:EtOH	70:30 [v:v]	
3	H ₂ O:Na ₂ CO ₃	100:5 [v:p]	Alcalino
4	H ₂ O:EtOH:Na ₂ CO ₃	70:30:5 [v:v:p]	
5	H ₂ O:Ác. Cítrico	100:5 [v:p]	Ácido
6	H ₂ O:EtOH:Ác. Cítrico	70:30:5 [v:v:p]	

Los resultados de solubilidad obtenidos con una Laca obtenida según el método optimizado, fue comparada con dos productos comerciales provenientes del Perú y que tienen las siguientes características (**Tabla VI.15**):

Tabla VI.15 Contenido de AC en lacas comerciales y propias.

Producto	[% A.C.]
LK-500	50
LK-650	65
CICATA	43.3

La evaluación comparativa de sus solubilidades (**Tabla VI.16**) nos muestra que:

Tabla VI.16 Comparación de Solubilidades de Lacas

Laca	1		2		3		4		5		6	
	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C
LK-500	+	++	+	++	++	++	++	++	-	+	-	+
LK-650	-	+ *	-	+ *	+	++	++	++	-	+ *	-	+ *
CICATA	=	-	-	+	+	+	+	++	-	+	-	+

Donde:

1-6 : Tabla VI.14

F : Frío

C : Caliente

= : Insoluble

- : Poco soluble

+ : Soluble

++ : Muy solubles

* : Cuando la solución se enfría, se observa un precipitado mas o menos abundante

Nota:

Es muy importante notar que la laca CICATA es la sal Calcio-Alumínica pura, preparada por el método optimizado (**Párraf. VI.2.2**), mientras que los productos de referencia, comercializados como productos hidrosolubles, son sales Calcio-Alumínicas cuya solubilidad fue modificada por la adición de algunos soportes orgánicos.

Debemos recordar que los productos comerciales, que son sales Calcio-Alumínicas, requieren soluciones básicas (generalmente amoniacales) para su solubilización y posterior aplicación. Por estas razones es que los productores buscan diferentes formulaciones o tratamientos que permitan obtener un producto hidrosoluble.

VI.2.3. Formulaciones de Carmín con soportes Orgánicos

Al igual que en los casos anteriores, la siguiente metodología es el resultado de todas las pruebas realizadas para optimizar el proceso de preparación de las formulaciones hidrosolubles.

- ❖ El **EOT** es obtenido según el procedimiento optimizado (**párraf. VI.1.5**), fue procesado de acuerdo a la metodología **V.2.7**.
- ❖ El extracto es concentrado hasta un cuarto de su volumen inicial, bajo vacío en un evaporador rotativo con baño de agua a 40 °C.
- ❖ Añadir el soporte orgánico, a temperatura ambiente, bajo agitación suave y constante (1.1 equivalentes en peso).
- ❖ Mantener la agitación durante 15 min.
- ❖ Eliminar el solvente en rotavapor, bajo vacío y en un baño a 40 °C, casi a sequedad.
- ❖ Secar el producto en una estufa a 40 °C con circulación de aire.
- ❖ El producto obtenido es recuperado y molido antes de su almacenamiento.

Nota:

Los equivalentes de los soportes inorgánicas fueron calculadas en función de la cantidad teórica de colorante, obtenida con un rendimiento de extracción del 80 %.

En este caso también la eliminación del solvente debe ser realizada con un control minucioso de la temperatura del baño y del tiempo de secado; combinando el rotavapor con una estufa con circulación de aire.

Para seleccionar los soportes orgánicos (**Tabla V.5**) se tomaron en cuenta las propiedades físico-químicas de estos soportes normalmente empleados en las industrias de alimentos.

Tabla V.5 Soportes Orgánicos

Ensayo	Soporte	Relación
I	-----	-----
II	Ácido Cítrico	1
III	Citrato de Sodio	1
IV	Dextrina Blanca : Citrato	1:1
V	Dextrina Blanca : Ácido Cítrico	1:1
VI	Dextrina Blanca : Ácido Cítrico : Citrato	1:1:1

Además de su conocida estabilidad, era muy importante saber cual era el comportamiento de solubilidad de estos soportes en los solventes de estudio (**Tabla VI.14**). Los ensayos de solubilidad de los soportes nos permite ver que:

La dextrina Blanca es la que presenta una mejor solubilidad en medio neutro y/o básico, tanto en frío como en caliente.

También sabemos que el Citrato de Sodio y el Ácido Cítrico se caracterizan por su doble acción, como soportes con alta solubilidad y como conservantes; independientemente del tipo de solvente.

Sobre la base de los resultados obtenidos se pudo constatar que:

La combinación de Dextrinas, Ácido Cítrico y Citrato de Sodio, permitió mostrar que es posible obtener formulaciones potencialmente comercializables, particularmente para su uso en medio neutro o alcalino. Para poder considerar las aplicaciones en medio ácido, se puede ver que las combinaciones de Dextrinas, con Citrato de Sodio o Ácido Cítrico, constituyen un soporte interesante para la estabilización del colorante extraído, sin necesidad de pasar por la preparación de la Laca Calcio-Alumínica.

Tabla VI.17 Solubilidad de Formulaciones con Soportes Orgánicos: pH = 5

Soporte	1		2		3		4		5		6	
	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C
I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IV	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VI	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

F= frío, C= caliente

Tabla VI.18 Solubilidad de Formulaciones con Soportes Orgánicos: pH = 10

Soporte	1		2		3		4		5		6	
	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C
I	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
II	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
III	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
IV	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
V	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
VI	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+

F= frío, C= caliente

Como podemos ver en las tablas anteriores, la estabilización del colorante a partir de un extracto básico, con los soportes orgánicos escogidos, nos permite obtener productos sólidos cuya solubilidad es menor que la obtenida con los productos sólidos a partir de los extractos ácidos.

VI.3. EVALUACIONES ANALÍTICAS DEL ÁCIDO CARMÍNICO

La revisión bibliográfica nos muestra dos procedimientos que admiten implícitamente la validez de la ley de Lambert-Beer, pero difieren por la selección de la solución de referencia: uno de ellos se refiere a una solución que contiene **15 mg/l de AC**, de **Absorbancia 0.262**; el otro se refieren a una solución de **100 mg/l de AC** y **Absorbancia 1.39**. Sin embargo, dadas nuestras condiciones de trabajo, se juzgó necesario hacer un estudio mas detallado sobre los intervalos de concentración donde se podría aplicar adecuadamente esta regla en sus λ_{\max} respectivos.

VI.3.1. Evaluaciones Cualitativas

Para poder conocer el comportamiento de las curvas de absorción en las diferentes condiciones de análisis, primeramente se observó la variación de la **absorbancia en función de la longitud de onda**, haciendo un barrido entre 230-550 nm , a diferentes concentraciones de trabajo.

Se observó el espectro de absorción UV-VIS del Ácido Carmínico patrón, identificando sus **máximos de absorción**, y considerando como promedio: **280 nm** , en el ultravioleta y **494 nm** en el visible (**Fig. VI.21**)

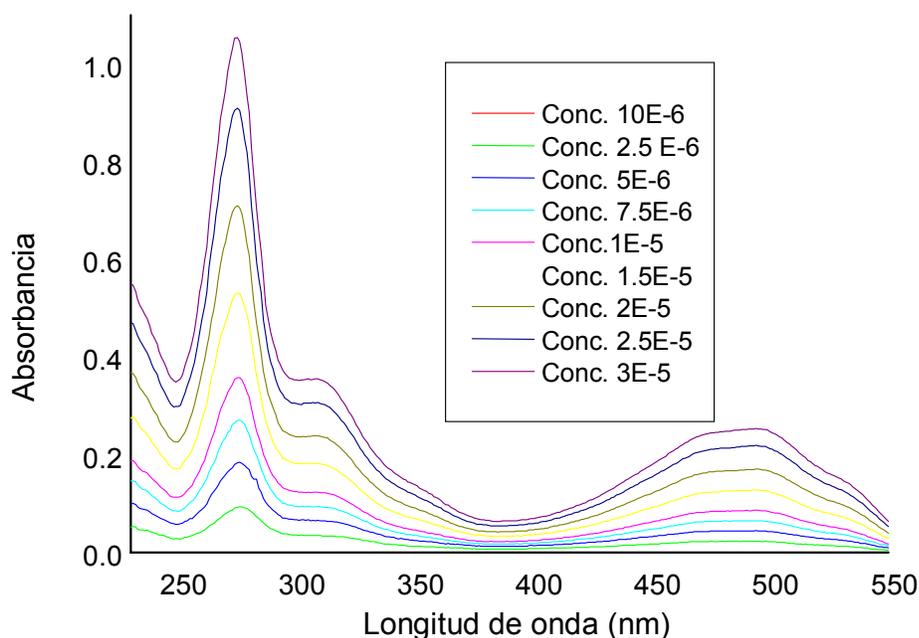


Fig. VI.21 Esp. Abs. UV-VIS del AC a diferentes concentraciones entre 10^{-6} y 3×10^{-5} M

Una vez establecidos experimentalmente los máximos de absorción, se procedió a la elaboración de curvas de calibración, relacionando la absorbancia en función de la concentración en esos λ_{\max} . De esta manera se establecieron los límites óptimos de concentración para la determinación de Ácido Carmínico, en el intervalo establecido por la ley de Lambert-Beer, (absorbancia, entre 0-1)

Los límites con un buen comportamiento lineal, se encuentran en el intervalo de concentración de 10^{-4} a 10^{-6} M., mostrando su mejor sensibilidad para concentraciones próximas a 10^{-5} M.

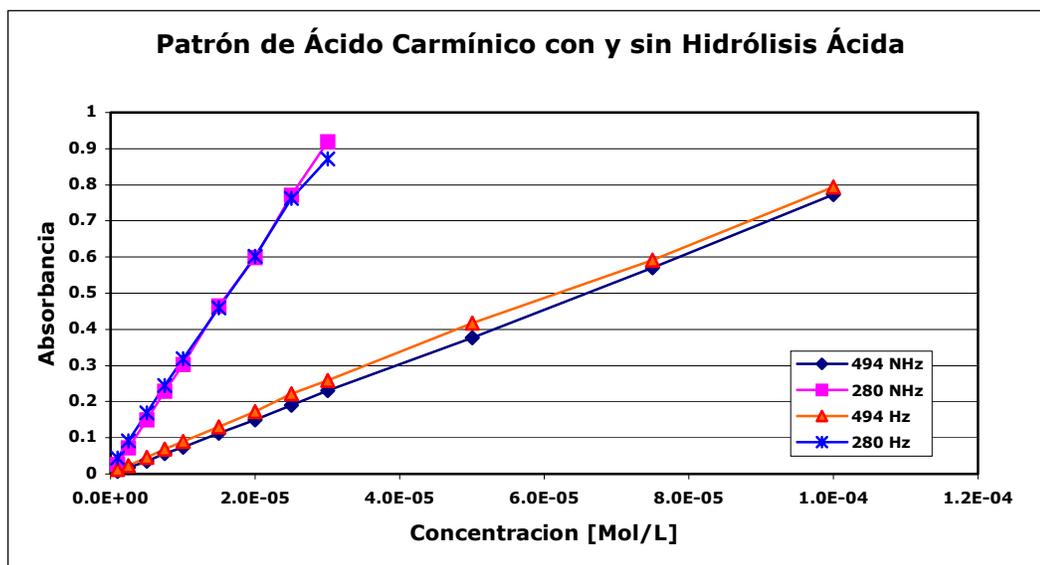


Fig. VI.22 Influencia de la Hidrólisis en Solvente Acuoso.

$$494 \text{ Hz} : y = (7868)X + 0.0120 \quad (r = 0.9994)$$

$$280 \text{ Hz} : y = (28857)X + 0.0240 \quad (r = 0.9994)$$

$$494 \text{ NHz} : y = (7700)X - 0.0027 \quad (r = 0.9999)$$

$$280 \text{ NHz} : y = (30744)X - 0.0036 \quad (r = 0.9998)$$

Tabla VI.19 Absorbancia de Ácido Carmínico Patrón.
(Solución Acuosa con y sin Hidrólisis)

Concentración	Hidrolizado		No Hidrolizado	
	494 [nm]	280 [nm]	494 [nm]	280 [nm]
1.0E-06	0.0131	0.0441	0.0067	0.0259
2.50E-06	0.0229	0.0920	0.0174	0.0723
5.00E-06	0.0461	0.1691	0.0356	0.1505
7.50E-06	0.0688	0.2450	0.0557	0.2295
1.00E-05	0.0894	0.3182	0.0741	0.3036
1.50E-05	0.1305	0.4596	0.1132	0.4648
2.00E-05	0.1732	0.6019	0.1491	0.5981
2.50E-05	0.2221	0.7617	0.1905	0.7705
3.00E-05	0.2580	0.8717	0.2305	0.9189
5.00E-05	0.4174		0.3773	
7.50E-05	0.5916		0.5711	
1.00E-04	0.7946		0.7721	

Según la ecuación **II.1**, podemos observar que a 280 nm el Epsilon (ϵ) es tan grande que a pequeñas variaciones o incrementos de concentración los valores de absorbancia aumentan rápidamente, saliendo de los rangos de linealidad establecidos por la ley de Lambert-Beer. Sin embargo la sensibilidad del método a 280 nm es mucho mejor y se podrían leer concentraciones muy bajas de **AC**, siempre y cuando **no** haya otras impurezas insaturadas.

Tomando en cuenta estas observaciones, estudiamos el comportamiento de la Absorbancia en las diferentes condiciones de análisis.

VI.3.1.1. Curvas de Calibración

Como se mencionó anteriormente, todos los métodos analíticos con hidrólisis ácida emplean un medio acuoso, tanto para la hidrólisis como para el aforado a un volumen exacto; como nosotros hacemos la extracción del colorante en medio Acuoetanólico, juzgamos necesario estudiar el comportamiento del método analítico en las mismas condiciones; en la preparación de las soluciones patrón y en la lectura de muestras problema.

Comparación de Acuoso y Acuoetanólico Hidrolizados

En primer término se vio la influencia de la mezcla acuoetanólica sobre el método clásico de análisis, es decir en **medio acuoso hidrolizado**. La comparación de ambas curvas (**Fig. VI.23**) nos permite ver que las soluciones acuoetanólicas dan valores de absorbancia ligeramente superiores (**Tabla VI.20**), aunque para concentraciones menores a; $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, este efecto no es perceptible.

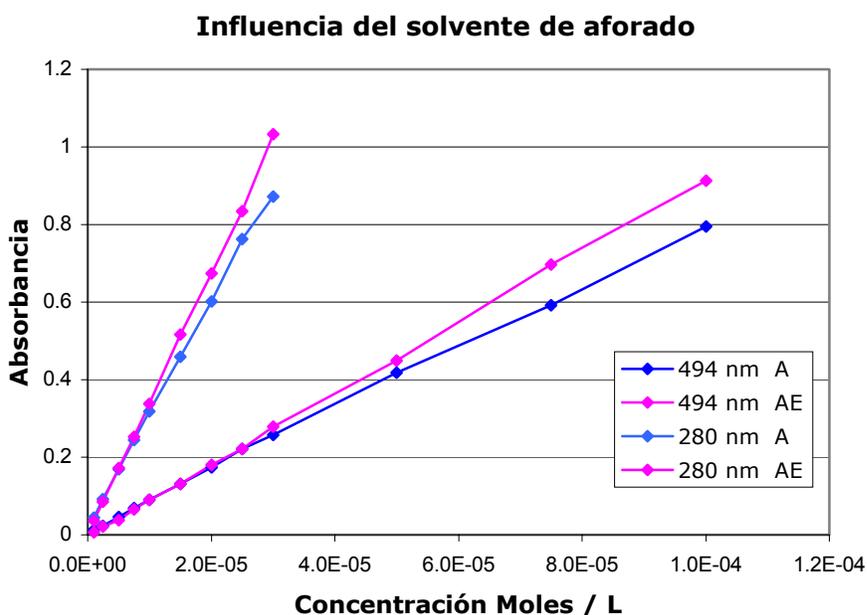


Fig. VI.23 Influencia del Solvente: Acuoso y Acuoetanólico con Hidrólisis.

A 494 nm : $y = (9211)X - 0.0040$ ($r = 0.9997$)

A 280 nm : $y = (33960)X + 0.0001$ ($r = 0.9998$)

Nota: Estos datos de la recta corresponden a la curva acuoetanólica hidrolizada

Donde: A: Normal (acuoso Hidrolizado)

AE: Acuoetanólico Hidrolizado

Tabla VI.20 Absorbancia de Ácido Carmínico Patrón.
(Solución Acuosa y Acuoetanólica con Hidrólisis)

Concentración	Absorbancia 494		Absorbancia 280	
	Acuoso	Acuo-EtOH	Acuoso	Acuo-EtOH
1.0E-06	0.0131	0.0072	0.0441	0.0360
2.50E-06	0.0229	0.0216	0.0920	0.0858
5.00E-06	0.0461	0.0371	0.1691	0.1714
7.50E-06	0.0688	0.0662	0.2450	0.2522
1.00E-05	0.0894	0.0897	0.3182	0.3384
1.50E-05	0.1305	0.1311	0.4596	0.5162
2.00E-05	0.1732	0.1798	0.6019	0.6741
2.50E-05	0.2221	0.2215	0.7617	0.8346
3.00E-05	0.2580	0.2793	0.8717	1.0320
5.00E-05	0.4174	0.4495		
7.50E-05	0.5916	0.6962		
1.00E-04	0.7946	0.9129		

Comparación Acuoetanólico Hidrolizado y No-Hidrolizado

Después de haber visto la influencia del solvente, también era importante ver la influencia de la hidrólisis ácida en los solventes acuoetanólicos, durante el tratamiento de la muestra antes de sus análisis, sobre la Absorbancia (**Fig. VI.24**). Los resultados obtenidos nos permiten ver que los valores de absorbancia de las soluciones hidrolizadas y aforadas con solución acuoetanólica dan valores ligeramente superiores que sus homólogos no Hidrolizados (**Tabla VI.21**), sobre todo a 494 nm y a partir de 10^{-5} M en adelante.

Tabla VI.21 Absorbancia de Ácido Carmínico Patrón.
(Solución Acuoetanólica, con y sin Hidrólisis)

Concentración	Absorbancia 494		Absorbancia 280	
	Sin Hidrolizar	Hidrolizado	Sin Hidrolizar	Hidrolizado
1.0E-06	0.0093	0.0072	0.0313	0.0360
2.5E-06	0.0207	0.0216	0.0807	0.0858
5.0E-06	0.0418	0.0371	0.1583	0.1714
7.5E-06	0.0665	0.0662	0.2557	0.2522
1.0E-05	0.0818	0.0897	0.3212	0.3384
1.5E-05	0.1250	0.1311	0.4916	0.5162
2.0E-05	0.1604	0.1798	0.6363	0.6741
2.5E-05	0.2055	0.2215	0.8109	0.8346
3.0E-05	0.2486	0.2793	0.9935	1.0320
5.0E-05	0.4419	0.4495		
7.5E-05	0.6769	0.6962		
1.0E-04	0.8475	0.9129		

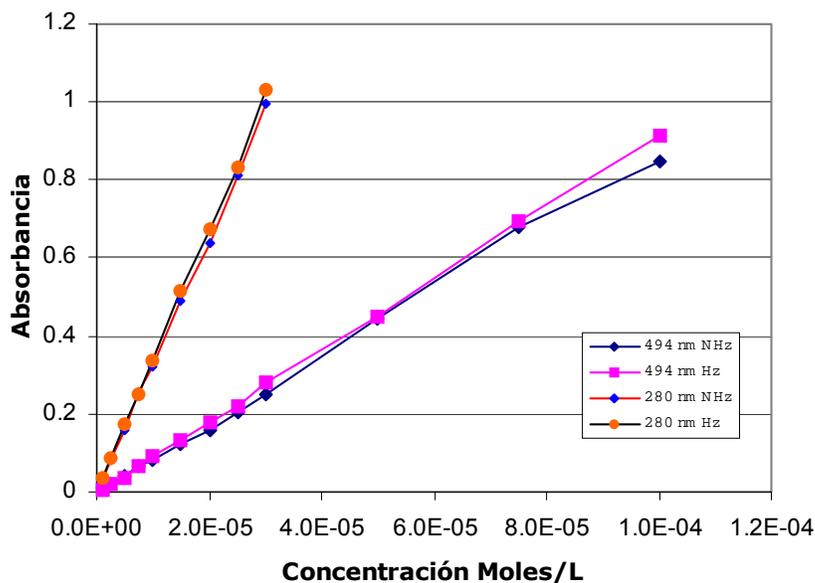


Fig. VI.24 Influencia de la Hidrólisis en Solvente Acuoetanólico

A 494 nm : $y = (8700)X - 0.0034$ ($r = 0.9990$)

A 280 nm : $y = (32746)X - 0.0021$ ($r = 0.9996$)

Nota:

Estos datos de la recta corresponden a la curva acuoetanólica no hidrolizada

Haciendo la evaluación comparativa de las 3 curvas a cada longitud de onda, constatamos que para una misma concentración, corresponden absorbancias diferentes debido a la modificación del coeficiente de absorptividad (**epsilon**, ϵ); aunque este efecto no es tan significativo a bajas concentraciones ($< 3 \times 10^{-5}$: **Fig. VI. 25** o $< 1 \times 10^{-5}$: **Fig. VI. 26**), independientemente del solvente o la hidrólisis.

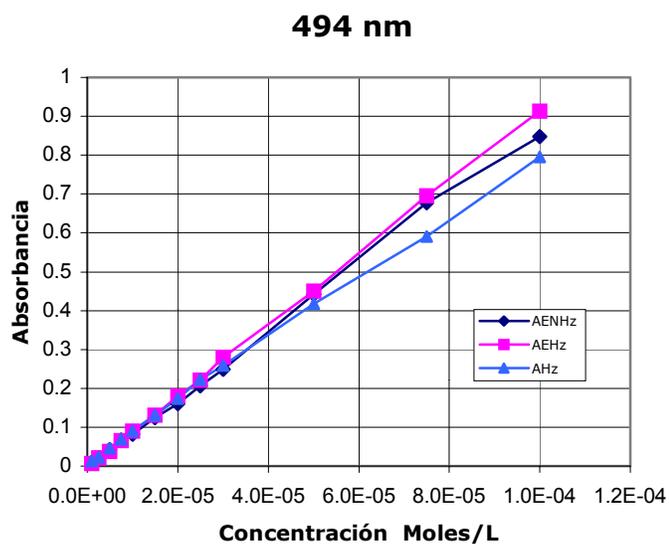


Fig. VI.25 Evaluación comparativa (494 nm)

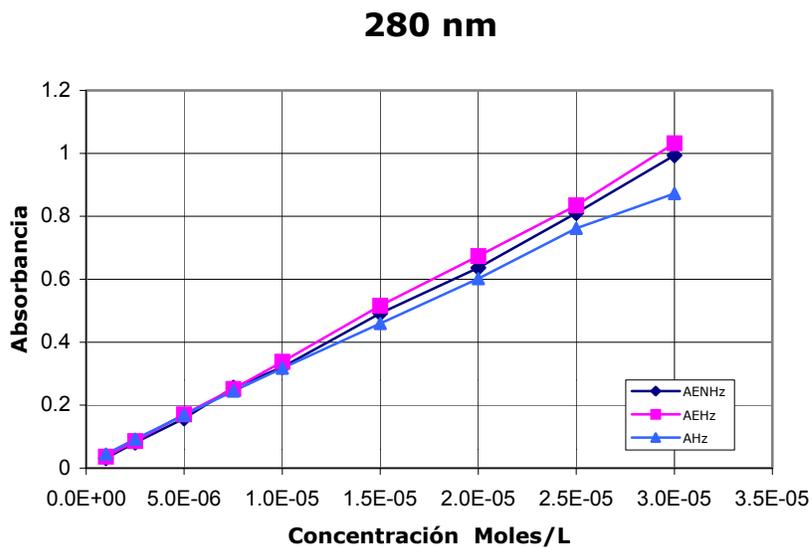


Fig. VI.26 Evaluación comparativa (280 nm)

Finalmente, la representación global de la influencia de la hidrólisis y del solvente de aforado, nos permite apreciar la variación de la pendiente de la curva entre 280 y 494 nm (**Fig. VI.27**).

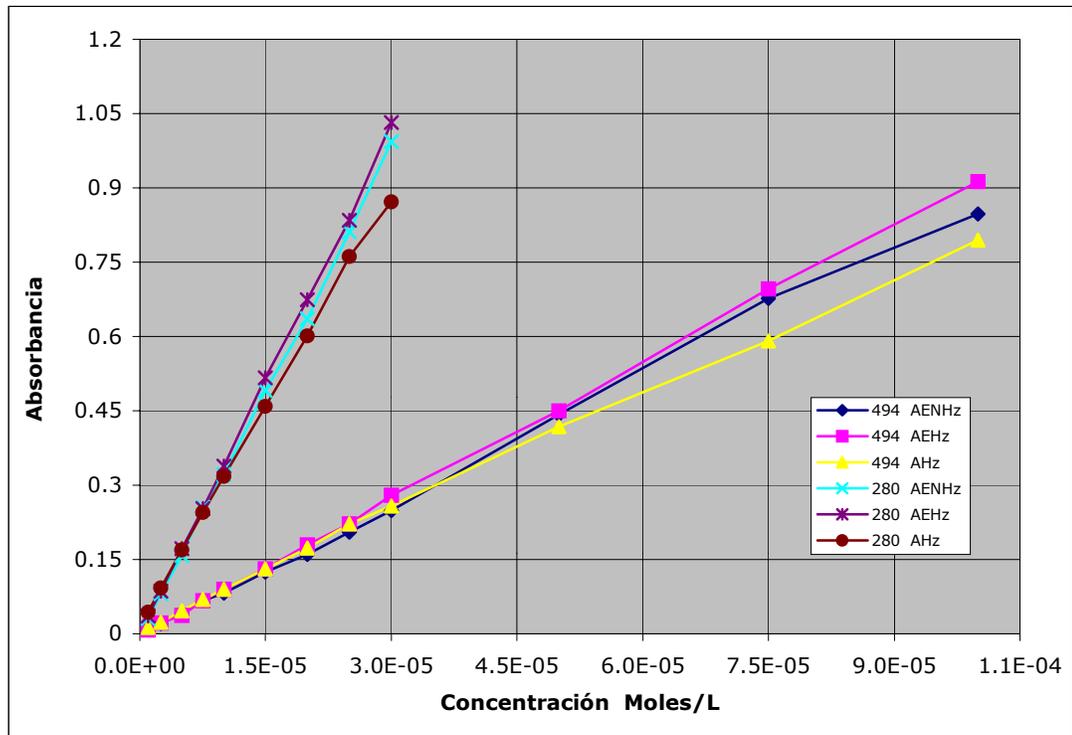


Fig. VI.27 Evaluación comparativa (280 y 494 nm)

Independientemente de la longitud de onda de lectura, la linealidad es muy buena, dentro del intervalo de concentración estudiado; sin embargo, se ve que a 494 nm, la curva tiene una tendencia asintótica para concentraciones elevadas. Por otra parte a 280 nm, la absorbancia aumenta mucho más rápidamente que la concentración, pero como la linealidad es muy buena, a esta longitud de onda se podrían leer concentraciones mucho más bajas.

Al observar la influencia de la hidrólisis sobre los valores de absorbancia, los resultados obtenidos nos permiten ver que los valores de absorbancia de las soluciones hidrolizadas y aforadas con solvente acuoetanólico, dan valores ligeramente superiores a partir de 10^{-5} M. Sin embargo, independientemente de la longitud de onda, del solvente o de la hidrólisis, entre 10^{-6} y 3×10^{-5} , las variaciones de absorbancia son muy poco significativas (**Fig. VI.27**).

Haciendo la evaluación comparativa de las tres curvas, para cada λ_{\max} , tenemos que la solución acuoetanólica hidrolizada presenta lecturas mayores de absorbancia. También podemos ver claramente que para una misma concentración tenemos absorbancias diferentes por que cada curva tiene un coeficiente de Absortividad (ϵ) diferente; debido a la longitud de onda de lectura (280 y 494 nm) o en una misma longitud de onda debido a la diferencia de tratamiento y/o de solvente.

Como se mencionó anteriormente (**ecuación II.1**), la absorbancia es directamente proporcional a (ϵ); entonces tenemos:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

por lo tanto:

$$\epsilon = \frac{A}{b \cdot c}$$

Tomando en cuenta las cuatro condiciones de análisis tendremos:

Tabla VI.22 Variación de Absortividad en Solución Acuosa Hidrolizada

Concentración	494 [nm]		280 [nm]	
	Abs.	ϵ	Abs.	ϵ
1.0E-06	0.0131	13100	0.0441	44100
2.50E-06	0.0229	9160	0.0920	36800
5.00E-06	0.0461	9220	0.1691	33820
7.50E-06	0.0688	9173	0.2450	32667
1.00E-05	0.0894	8940	0.3182	31820
1.50E-05	0.1305	8700	0.4596	30640
2.00E-05	0.1732	8660	0.6019	30095
2.50E-05	0.2221	8884	0.7617	30468
3.00E-05	0.2580	8600	0.8717	29057
5.00E-05	0.4174	8348		
7.50E-05	0.5916	7888		
1.00E-04	0.7946	7946		
PROMEDIO		9052		33274

Tabla VI.23 Variación de Absortividad en Solución Acuosa No-Hidrolizada

Concentración	494 [nm]		280 [nm]	
	Abs.	ϵ	Abs.	ϵ
1.0E-06	0.0067	6700	0.0259	25900
2.50E-06	0.0174	6960	0.0723	28920
5.00E-06	0.0356	7120	0.1505	30100
7.50E-06	0.0557	7427	0.2295	30600
1.00E-05	0.0741	7410	0.3036	30360
1.50E-05	0.1132	7547	0.4648	30987
2.00E-05	0.1491	7455	0.5981	29905
2.50E-05	0.1905	7620	0.7705	30820
3.00E-05	0.2305	7683	0.9189	30630
5.00E-05	0.3773	7546		
7.50E-05	0.5711	7615		
1.00E-04	0.7721	7721		
PROMEDIO		7400		29802

Tabla VI.24 Variación de Absortividad en Solución Acuoetanólica Hidrolizada

Concentración	494 [nm]		280 [nm]	
	Abs.	ϵ	Abs.	ϵ
1.0E-06	0.0072	7200	0.036	36000
2.50E-06	0.0216	8640	0.0858	34320
5.00E-06	0.0371	7420	0.1714	34280
7.50E-06	0.0662	8827	0.2522	33627
1.00E-05	0.0897	8970	0.3384	33840
1.50E-05	0.1311	8740	0.5162	34413
2.00E-05	0.1798	8990	0.6741	33705
2.50E-05	0.2215	8860	0.8346	33384
3.00E-05	0.2793	9310	1.032	34400
5.00E-05	0.4495	8990		
7.50E-05	0.6962	9283		
1.00E-04	0.9129	9129		
PROMEDIO		8697		34219

Tabla VI.25 Variación de Absortividad en Solución Acuoetanólica No-Hidrolizada

Concentración	494 [nm]		280 [nm]	
	Abs.	ϵ	Abs.	ϵ
1.0E-06	0.0093	9300	0.0313	31300
2.50E-06	0.0207	8280	0.0807	32280
5.00E-06	0.0418	8360	0.1583	31660
7.50E-06	0.0665	8867	0.2557	34093
1.00E-05	0.0818	8180	0.3212	32120
1.50E-05	0.1250	8333	0.4916	32773
2.00E-05	0.1604	8020	0.6363	31815
2.50E-05	0.2055	8220	0.8109	32436
3.00E-05	0.2486	8287	0.9935	33117
5.00E-05	0.4419	8838		
7.50E-05	0.6769	9025		
1.00E-04	0.8475	8475		
PROMEDIO		8515		32399

Lo que en resumen nos da:

Tabla VI.26 Variación de ϵ en función de las condiciones de análisis

Long. Onda [nm]	Acuoso		AcuoEtanólico	
	Hidrolizado	No-Hidrolizado	Hidrolizado	No-Hidrolizado
494	9052	7400	8697	8515
280	33274	29802	34219	32399

VI.3.1.2. Influencia del pH de Análisis

Para poder observar el comportamiento del espectro de absorción en función del pH de análisis, se tomó una solución patrón de análisis (10^{-5} M) y se registraron los espectro de absorbancia a diferentes valores de pH.

Tabla VI.27 Variación del Espectro de Absorbancia en función del pH

PH	Máximo [nm]	Absorbancia
2.0	493.6	0.0781
	275.1	0.3870
3.0	493.6	0.0809
	275.1	0.3290
4.0	493.6	0.0751
	275.1	0.3090
5.0	493.6	0.0854
	275.1	0.3710
6.0	520.7	0.0810
	280.9	0.3300
	331.2	0.1420
8.0	526.5	0.0806
	279.0	0.3125
	333.1	0.1450
10.0	551.6	0.0660
	282.8	0.2120
	333.1	0.1920
12.0	567.1	0.1370
	532.3	0.1150
	300.2	0.3170
	337.0	0.1960
12.5	567.1	0.1839
	532.3	0.1489
	300.2	0.3379

Sobre la base de los resultados obtenidos podemos decir que en medio ácido (hasta pH 5.0), el espectro no cambia significativamente (**Fig. VI.28**) ya que los máximos de absorbancia se mantienen (**Tabla VI.27**) pero se comienza a percibir la aparición de un máximo de absorbancia próximo a 330 nm.

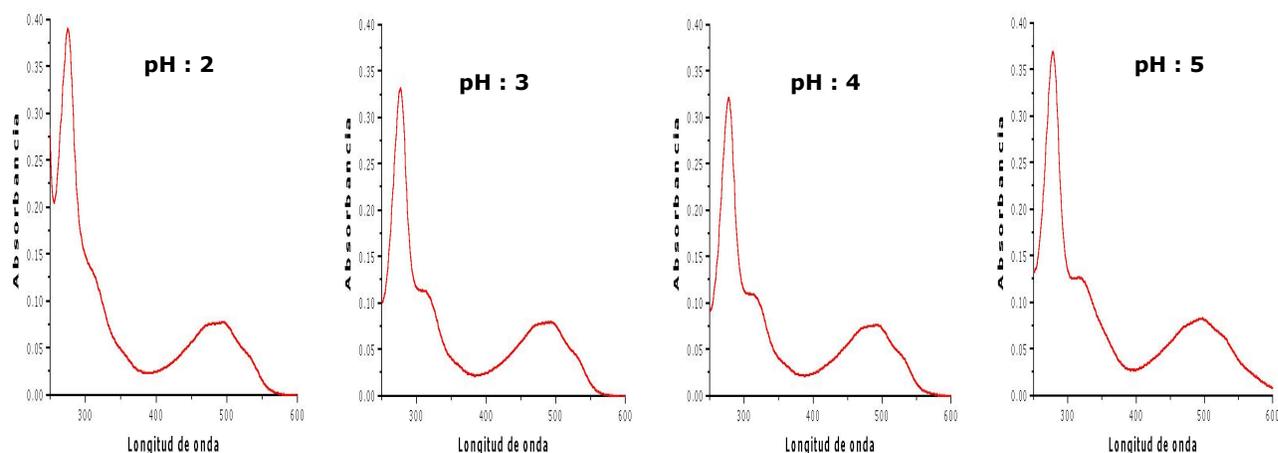


Fig. VI.28 Espectros de Absorbancia a diferentes pH (2.0 ; 3.0 ; 4.0 y 5.0)

A partir de pH 6.0 y hasta pH 10.0, en presencia de Na_2CO_3 , la aparición de un máximo de absorbancia a 331 nm se hace evidente y su intensidad aumenta con el pH (**Fig. VI.29**); a pH 10.0 llega a tener la misma intensidad que la banda a 280 nm. En este rango de pH, también se observa un efecto batocrómico de los máximos de absorción; este fenómeno es mucho mas evidente en el visible que en el UV.

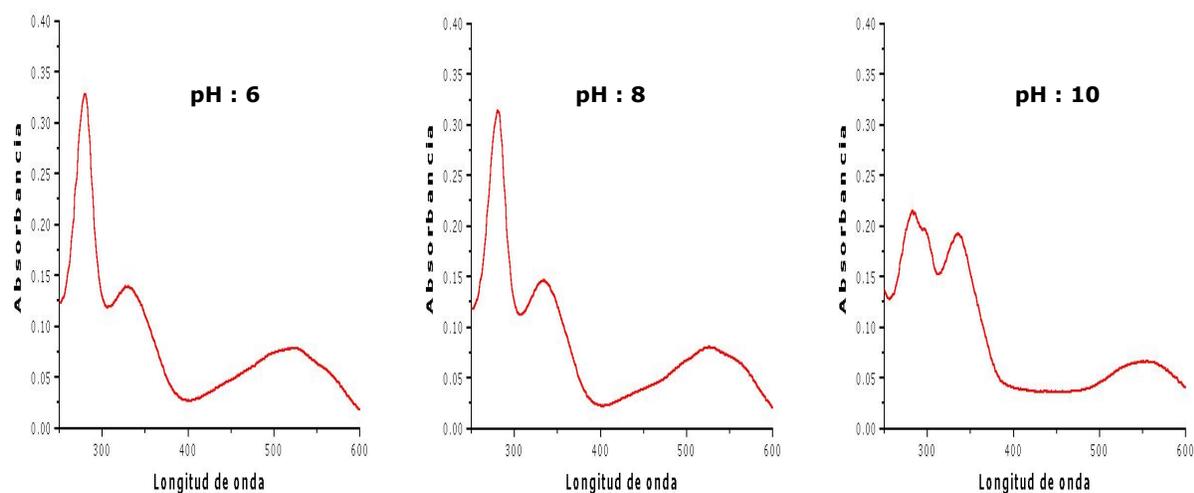


Fig. VI.29 Espectros de Absorbancia a diferentes pH (6.0 ; 8.0 y 10)

A partir de pH 12, en presencia de **NaOH**, las características del espectro de absorción cambia muy significativamente (**Fig. VI.30**), ya que el efecto batocrómico se vuelve tan importante que los máximos a 280 y 330 llegan a fusionar cerca de 300 nm. En el visible, se observa la aparición de otro máximo de absorbancia cerca de 530 nm, que a pH 12.5 tendrá casi la misma intensidad que el máximo a 567 nm.

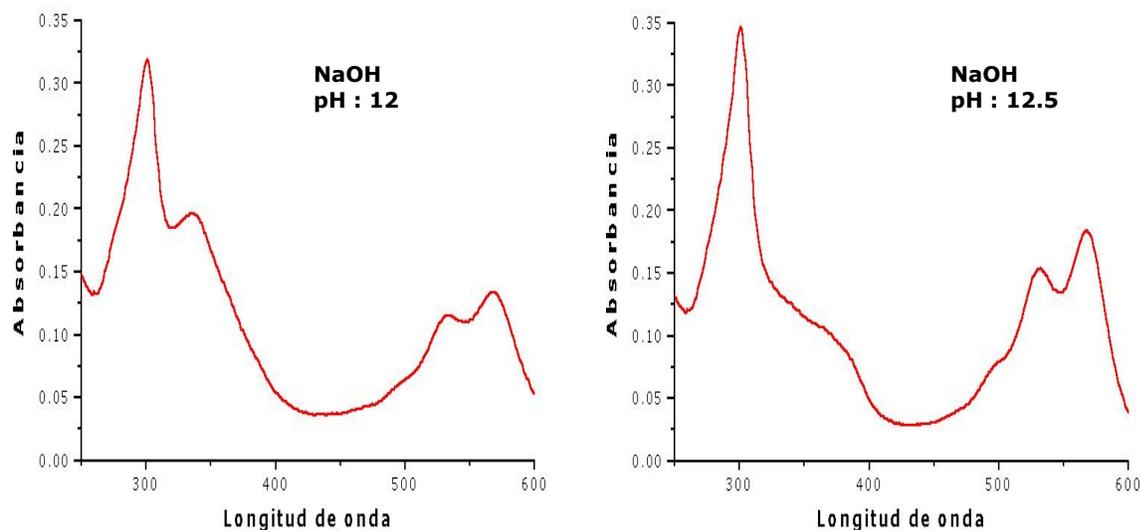


Fig. VI.30 Espectros de Absorbancia a diferentes pH (12.0 y 12.5)

También se ve que independientemente del tipo de base empleada, las características del espectro de absorbancia (**Fig. VI.31**) no cambian, efectivamente, a pH 10 tenemos los mismos máximos tanto con **Na₂CO₃** que con **NaOH**. De la misma manera podemos ver que en pH 11.0 en UV, aún se observa los dos máximos bien diferenciados; a pH 12.0 ya comienza a presentarse el fenómeno de colapso de bandas por el efecto batocrómico, generado por el cambio de pH.

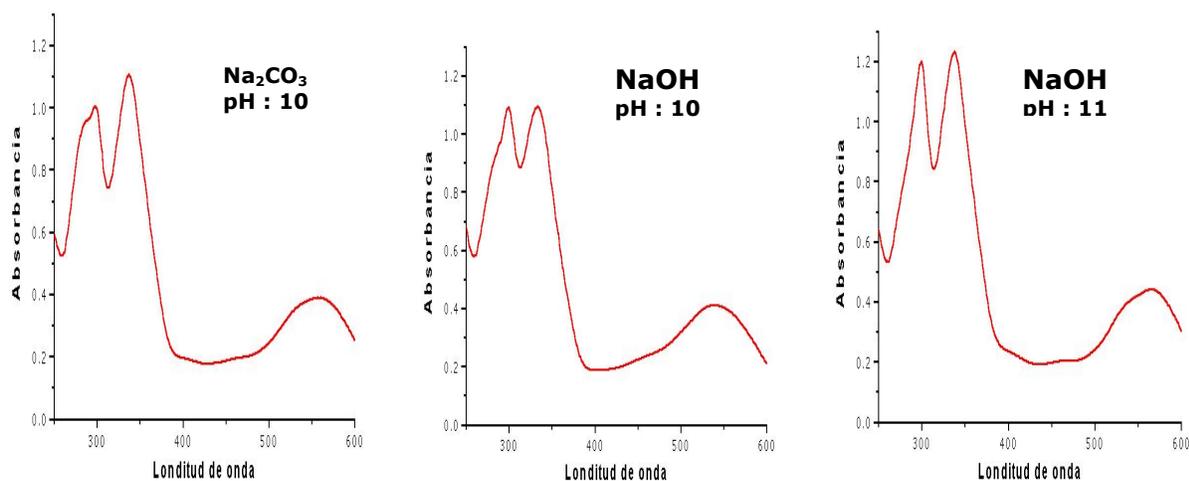


Fig. VI.31 Espectros de Absorbancia a pH básico, con diferentes bases

Todo esto nos lleva a pensar que el cromóforo principal va transformándose; ya sea por el desplazamiento de los equilibrios ácido-base en los que interviene o por que la presencia de otros electrolitos modifican su entorno electrónico molecular. Efectivamente, tal como se reporta en la bibliografía^[22,38], el **AC** se comporta como un ácido trivalente con $pK_1 = 2.91$; $pK_2 = 5.62$ y $pK_3 = 8.30$ que corresponden a la disociación del grupo carboxílico en la posición 2 y de los fenoles en las posiciones 5 y 8 respectivamente; es decir:



Donde:

LH_3 : Es la forma totalmente protonada

$LH_2^-; LH^{-2}$ y L^{-3} : Son las diferentes especies disociadas

Es de esta manera que a pH 3 y 4 tendríamos las especies LH_3 y LH_2^- (**Fig. VI.32**), de color naranja. A pH 4.2 tenemos únicamente la especie LH_2^- , mientras que a pH entre 4.5 y 6.5 tendríamos las especies LH_2^- y LH^{-2} , con una coloración roja característica. A pH 6.96 tenemos únicamente la especie LH^{-2} . Finalmente, a pH entre 7.5 y 9.5 tendríamos, las mezclas de LH^{-2} y L^{-3} , con una coloración púrpura oscuro. A partir de aproximadamente pH 9.5, tenemos únicamente la especie L^{-3} . En estas condiciones el espectro de absorción cambia completamente, lo que muestra la formación de una o varias especies nuevas que podrían ser las formas condensadas u otras.

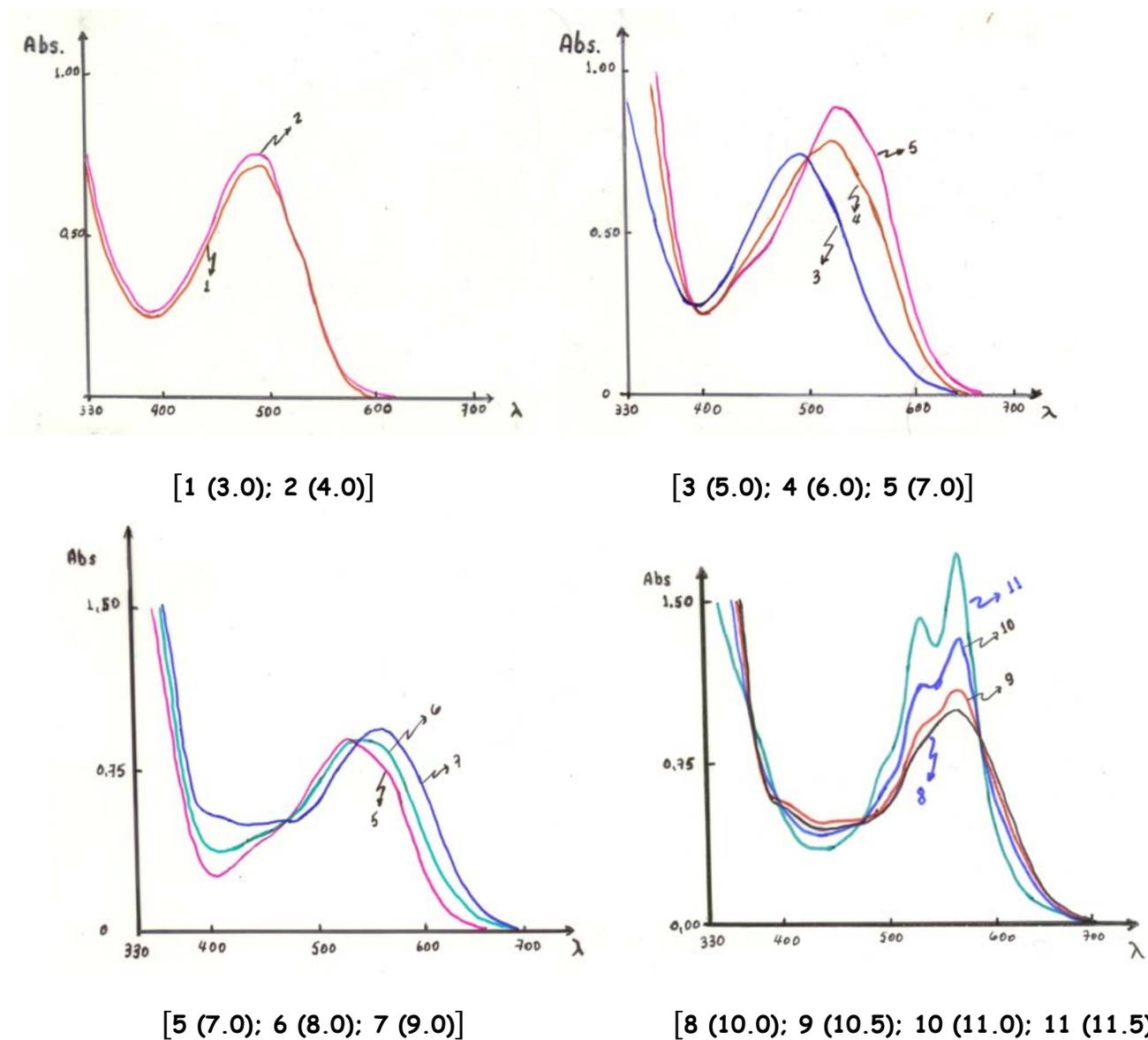


Fig. VI.32 Referencia de Espectros de Absorbancia a diferentes pH

[Núm. Espectro (pH)] [38]

Aunque los resultados reportados por la bibliografía fueron obtenidos con una solución de **AC** 10^{-3} M, y nuestros resultados con 10^{-5} M, vemos que el comportamiento general del **AC** en función del pH del medio es exactamente el mismo. Por todo esto, pensamos que sería de mucho interés continuar el estudio con soluciones más concentradas, pues vemos que la naturaleza de la especie disuelta podría también variar con la concentración.

VI.3.1.3. Espectro InfraRojo

El espectro obtenido muestra bien las bandas características del **AC** de referencia (**Fig. VI.33**), es decir:

3450; 3030; 2940 y 2630:

Vibraciones de valencia **O-H** ; **C_{sp}³-H** ; **C_{sp}²-H** y **O-H** en carboxilos condensados

1640:

Vibración de valencia de **C=O** en cetonas aromáticas, forma enol

1450:

Vibración de valencia **C=C** en el plano

1410; 1300; 1250 y 1090

Vibraciones de valencia de **C-O** de fenoles y esterres aromáticos, vibración de deformación **O-H** en el plano y vibración de deformación de **C-H** aromático en el plano.

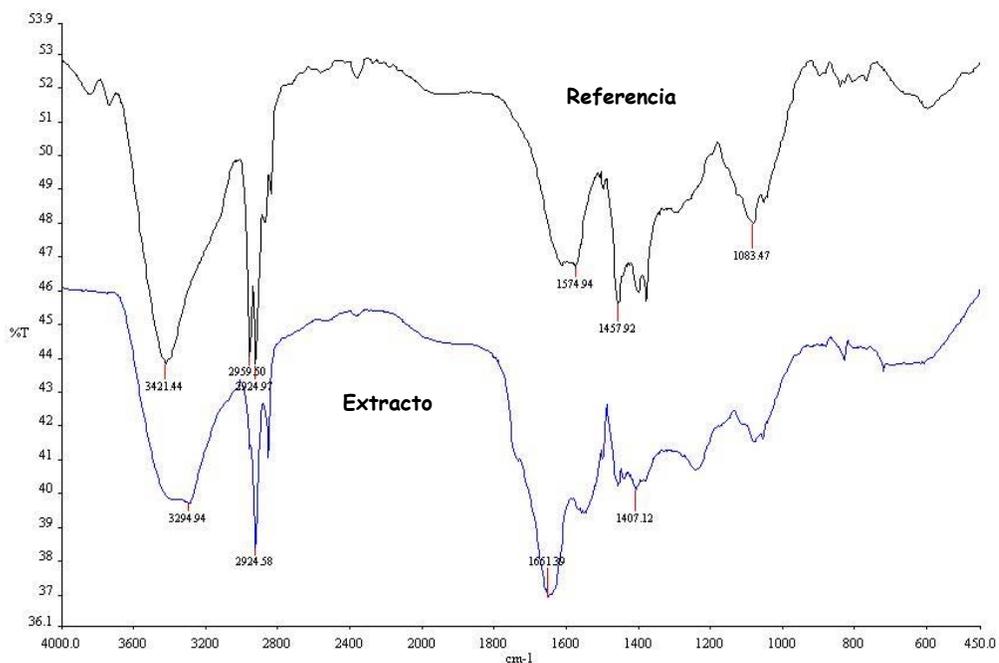


Fig. VI.33 Comparación de Espectros de IR de AC

VI.3.1.4. Espectro RMN

Los productos fueron analizados por RMN-¹H y por RMN-¹³C; los espectros registrados fueron comparados con los reportados en la bibliografía^[20]. De esta manera podemos constatar que la Resonancia de Protón (**Fig. VI.34**) muestra tres regiones bien diferenciadas; entre 3.0 y 4.7 el núcleo glucosídico, entre 4.5 y 5.7 los fenoles y finalmente por encima de 7.0 la parte aromática y el carboxilo, es decir:

- δ : **2.68 ppm** Es el grupo metilo que se encuentra sobre **C-1**
- δ : **3.0 a 4.2 ppm** Estructura de la glucosa
- δ : **4.69 y 4.73 ppm** Un doblete correspondiente al hidrógeno sobre el carbono anómero de la glucosa
- δ : **4.5 a 5.7 ppm** Banda ancha que corresponde a los hidrógenos ácidos de los fenoles
- δ : **7.69 ppm** Hidrógeno aromático sobre **C-4**
- δ : **11.5 ppm** Banda ancha que corresponde al hidrógeno carboxílico

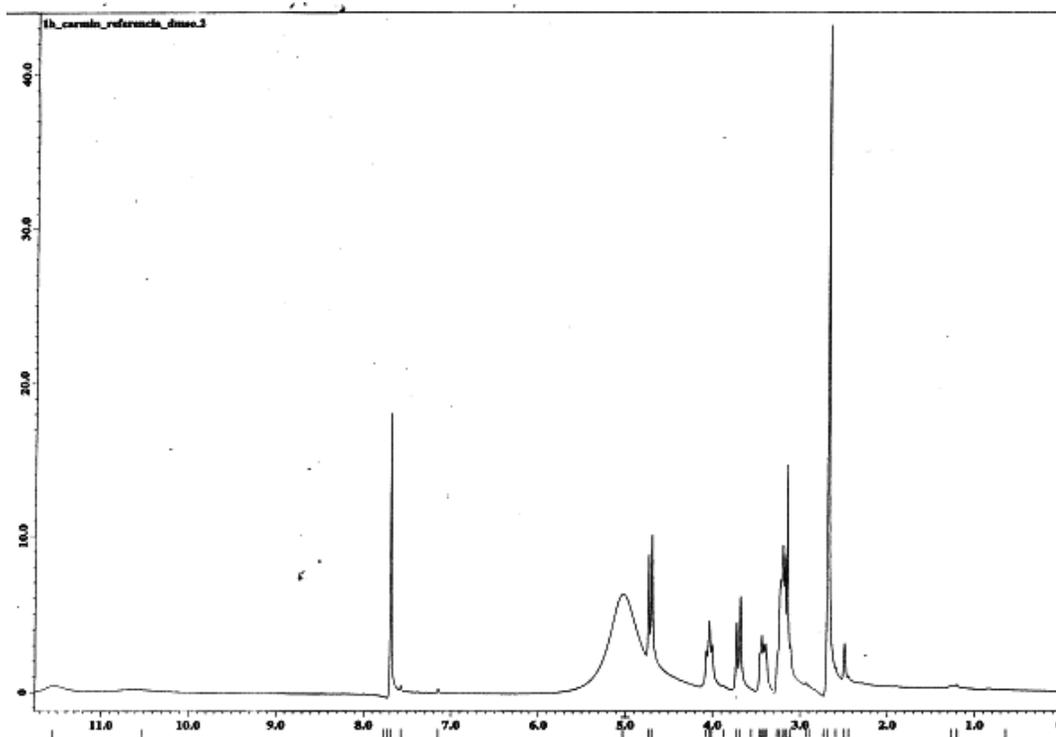


Fig. VI.34 Espectro de RMN-¹H del AC

Por otra parte, el espectro de Resonancia del Carbono (**Fig. VI.35**) nos muestra también dos regiones bien distintas; entre 60 y 85 ppm la estructura glucosídica, entre 104 y 162 ppm la fracción aromática de la estructura antraquinona y finalmente entre 166 y 187 los carbonilos cetónicos del carboxilo, es decir:

- δ : **20.5 ppm** Es el grupo metilo que se encuentra sobre **C-1**
- δ : **de 60 a 85 ppm** Estructura de la glucosa
- δ : **de 104 a 162 ppm** Son los 12 carbonos correspondientes a la parte aromática del núcleo Antraquinona.
- δ : **de 166 a 187 ppm** Se encuentran: el carbono del grupo carboxílico y los dos carbonos cetónicos de la estructura Antraquinona.

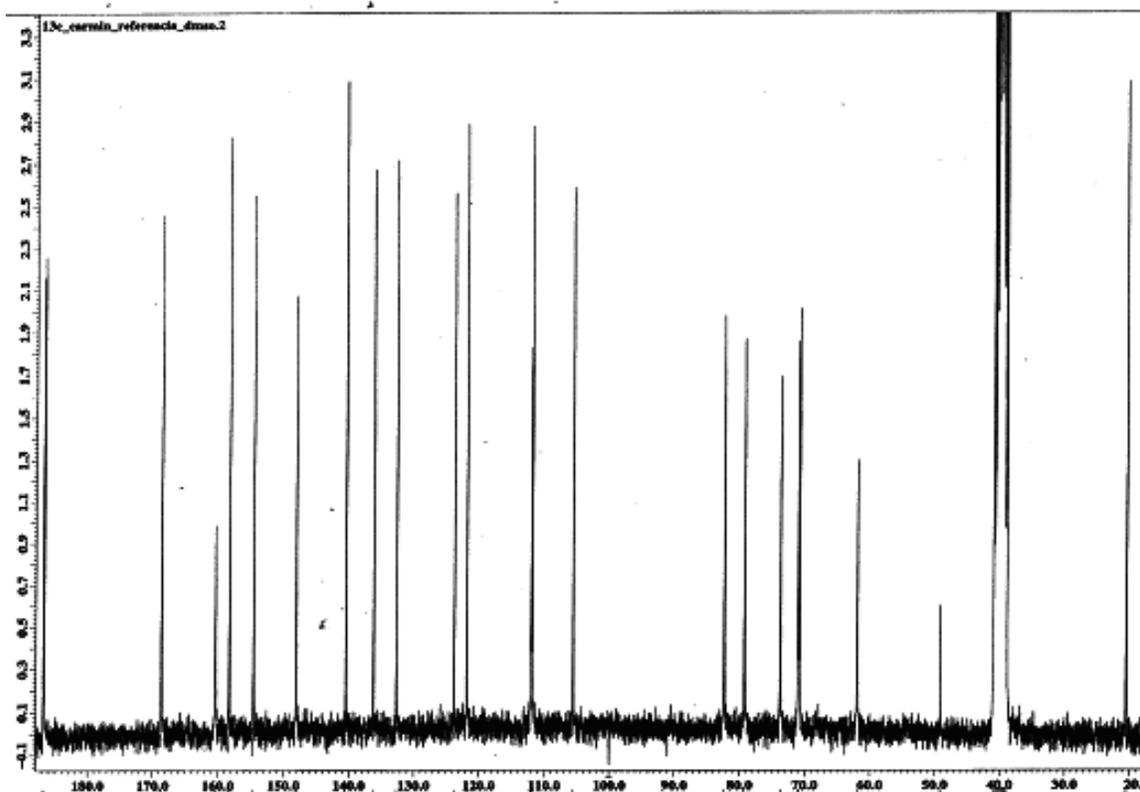


Fig. VI.35 Espectro de RMN-¹³C del AC

VI.3.2. Evaluaciones Cuantitativas

Después de haber estudiado cualitativamente la incidencia de los diferentes factores operativos durante el análisis del **AC**, se observó también de que manera estos factores incidían en la cuantificación del **AC**, durante el análisis de diferentes tipos de muestras (grana, extracto y laca) y en diferentes condiciones de análisis (**Tabla VI.28**). Para este efecto se tomó un extracto obtenido por el método optimizado y se midió la absorbancia en medio acuoso con hidrólisis ácida. Este valor de absorbancia fue leído en las diferentes curvas patrón para poder realizar la evaluación comparativa.

Tabla VI.28 Cuantificación de AC con diferentes Métodos

Análisis	Conc. AC	Grana [0.1 g]	Extracto [1.0 g]	Laca [100 mg]
Abs.		0.3076	0.1066	0.6483
Fórm. I	[%]	22.13	0.38	46.64
Fórm. II	[%]	17.61	0.31	37.12
A-Hz	Mol/L	3.76E-05	1.20E-05	8.09E-05
	[%]	18.48	0.30	39.79
A-NHz	Mol/L	4.03E-05	1.42E-05	8.45E-05
	[%]	19.83	0.35	41.60
AE-Hz	Mol/L	3.38E-05	1.20E-05	7.08E-05
	[%]	16.64	0.30	34.84
AE-NHz	Mol/L	3.57E-05	1.26E-05	7.49E-05
	[%]	17.59	0.31	36.85

$$\text{Formula I : } [\%AC] = \frac{A \times 100}{13.9 \times 1 \times c}$$

$$\text{Formula II: } [\%AC] = \frac{15 \times A}{0.262 \times W} \times 100$$

Donde: **c** : concentración en g/l.
W : peso de la muestra en mg.

La evaluación comparativa de los resultados nos permite constatar que:

Los porcentajes calculados con las fórmulas muestran que los valores obtenidos con la fórmula I son superiores a los encontrados con la fórmula II. Tal como fue reportado por la bibliografía^[38], esta diferencia se debe al comportamiento asintótico de la curva de Absorbancia en función de la concentración de **AC**, esto quiere decir que en el caso de la fórmula I, la Absorbancia leída (13,9) sería menor que la prevista por la Ley de Lambert-Beer haciendo que, independiente del tipo de muestra, el % de **AC** calculado sea mayor que el real, en aproximadamente un 25 %.

Tomando en cuenta esta diferencia de valores y el hecho que la muestra analizada tuvo una hidrólisis ácida previa, ahora debemos comparar los resultados obtenidos con la fórmula II y los valores obtenidos con la curva de referencia hecha con el patrón hidrolizado en medio acuoso, es decir la técnica normal. Cuando nosotros hacemos esta comparación vemos que los resultados obtenidos con la curva patrón son ligeramente superiores a los obtenidos por cálculo con la fórmula II, sobre todo con la grana y la laca. Esto puede explicarse por el hecho que una curva patrón es el resultado de por lo menos 6 mediciones, mientras que las fórmulas son el resultado de una sola medición donde se ha forzado el paso por el punto (0,0); es decir que una curva patrón describe de manera mas real el comportamiento de la absorbancia en función de la concentración, en condiciones similares de análisis.

Es muy importante hacer notar que el valor de absorbancia (0.262) de una solución que tiene 15 mg/L (3.05×10^{-5} M) , utilizado en la fórmula II; fue corroborado experimentalmente (0.258) para una concentración de 3.00×10^{-5} M (**Tabla VI.19**).

Tal como se vio anteriormente (**Fig. VI.22**), la curva del patrón No-hidrolizado tiene una pendiente ligeramente inferior a la del patrón hidrolizado; esto quiere decir que cuando se lee una absorbancia determinada en la curva del patrón No-hidrolizado, la concentración obtenida es siempre ligeramente superior a la obtenida en una curva de patrón hidrolizado. Este mismo fenómeno es observado cuando el solvente de afore es la mezcla acuo-etanólica (**Fig. VI.24**).

Por otra parte podemos ver que la pendiente de las curvas patrón obtenidas en medio acuoso, independientemente de la hidrólisis, tienen siempre una pendiente menor que las tomadas en medio acuo-etanólico. Esto quiere decir que probablemente sea el mayor grado de solvatación del cromóforo el que disminuye la eficiencia de absorción de la luz incidente (**Fig. VI.25**).

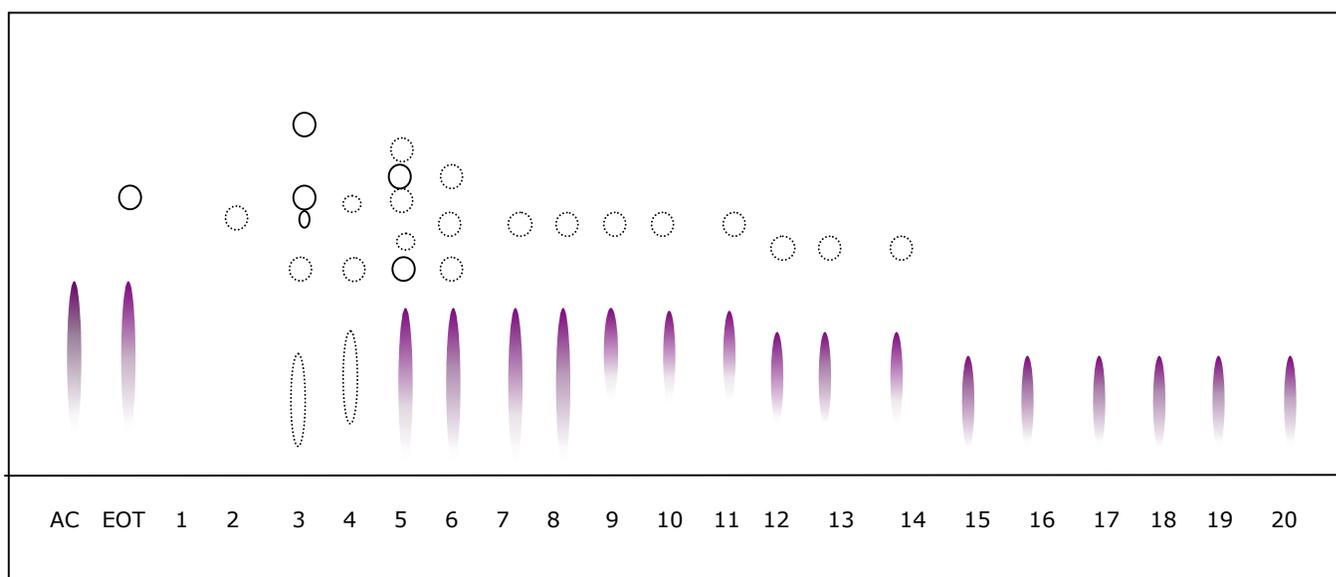
Finalmente se puede señalar que los resultados de porcentaje de **AC** obtenidos con las curvas patrón, son similares o ligeramente superiores a los valores obtenidos con la fórmula II; pero son ligeramente inferiores a los valores obtenidos con la fórmula I

VI.4. SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS

EOT :Acuoetanólico (Párrafo V.4.1)

Como resultado de la separación cromatográfica en columna se obtuvieron 40 porciones de 10 ml cada una y una porción final de lavado de 100 ml.

Lo primero que se pudo observar (**Fig. VI.36**) es que la mayor parte de los componentes del extracto salen en las cinco primeras porciones (1-5) y de ahí en adelante se obtienen solutos que tienen todas las características del ácido carmínico (6 - fin) y/o de alguno de sus isómeros.



AC: ácido carmínico, EOT: extracto orgánico total.

Fig. VI.36 TLC de Cromatografía en Columna, extracto Acuoetanólico neutro.

Tomando en cuenta el color de las porciones y la distribución de solutos UV-activos en las mismas, decidimos agruparlas en 8 fracciones (**Tabla VI.29**).

Tabla VI.29 Fracciones de la Cromatografía en Columna

Porción	Coloración	Fracción
1	Amarilla	A
2	Café	B
3	Café- rojizo	C
4	Púrpura	D
5	Rojo púrpura	E
6 a 15	Naranja	F
16 a 40	Naranja claro	G
Final	Naranja claro	H

Todas y cada una de las fracciones (A-F) fueron concentradas a temperatura ambiente durante 1 día para realizar los análisis correspondientes (**Fig. VI.37** y **VI.38**). Las fracciones G y H fueron concentradas en una estufa con circulación de aire a 35° C durante una noche.

La cromatografía en placa, de estas fracciones concentradas (**A-G**) (**Fig. VI.37**), muestra que las fracciones **A** y **B** pueden ser desechadas mientras que la fracción **C** presenta cinco compuestos, tres de los cuales son abundantes y bien definidos y los otros dos se presentan como manchas muy difusas.

Tabla VI.30 Relación de frentes de las fracciones concentradas

Fracción	R _{f1}	R _{f2}	R _{f3}	R _{f4}	R _{f5}	R _{f6}
AC	0.33					
EOT	0.34	0.56				
C	0.24	0.38	0.53	0.58	0.68	
D	0.26	0.37	0.54			
E	0.31	0.38	0.45	0.52	0.54	0.57
F	0.33	0.5				
G	0.30					

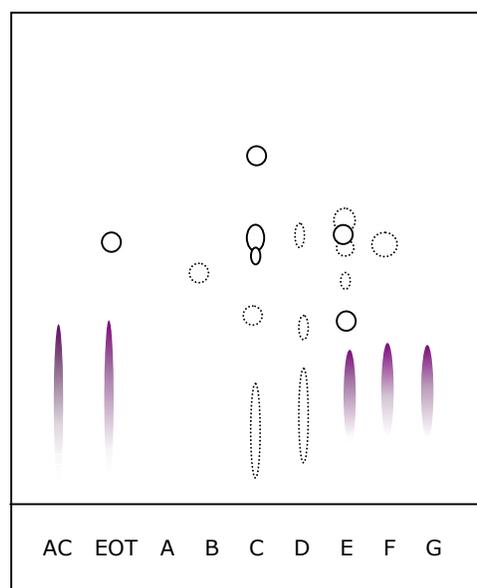


Fig. VI.37 Placa TLC de las fracciones concentradas

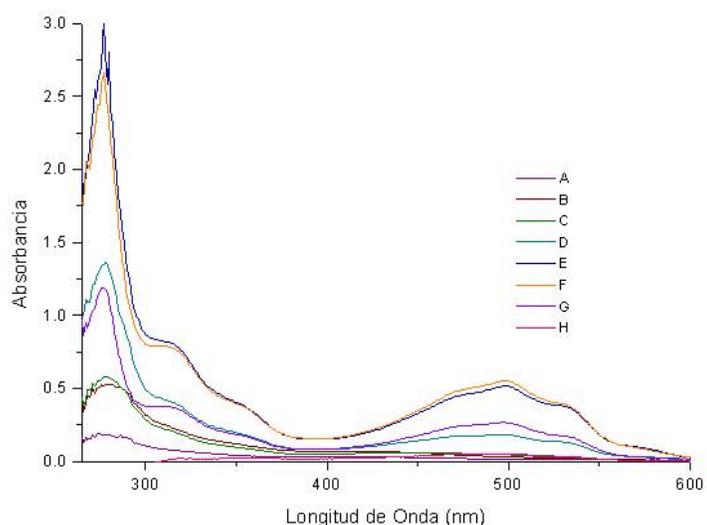
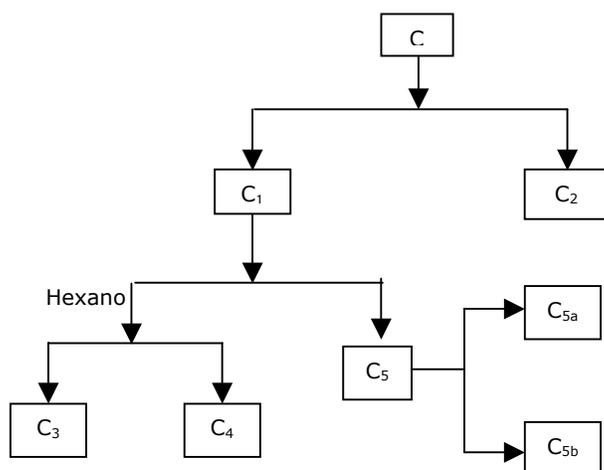


Fig. VI.38 Espectros UV-VIS de las fracciones concentradas

También se pudo constatar que en la fracción **C** concentrada, se forma un precipitado (**C₂**); después de centrifugar y separar ambas fases (**Esquema 3**), se las analizó independientemente por TLC, en las mismas condiciones que las otras fracciones.



Esquema VI.3 Separación de la fracción C

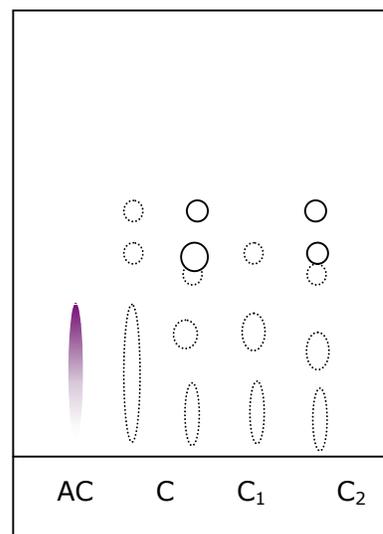


Fig. VI.39 TLC de las fracciones de C

Tabla VI.31 Relación de frentes de las fracciones C.

	R _{f1}	R _{f2}	R _{f3}	R _{f4}	R _{f5}
AC	0.33				
C	0.30	0.458	0.553		
C₁	0.236	0.36	0.514	0.57	0.66
C₂	0.236	0.361	0.555		
C₅	0.236	0.361	0.486	0.57	0.66

Después de realizar los análisis, el sobrenadante (**C₁**) fue dividido en dos porciones:

La primera porción fue tratada con Hexano con el fin de extraer los posibles contaminantes grasos. Sin embargo, al adicionar el Hexano comienza a formarse un precipitado esponjoso de color amarillo (**C₄**), dejando el sobrenadante (**C₃**). Ambas fases fueron separadas y analizadas independientemente por **TLC**.

La segunda porción (**C₅**) fue aplicada sobre una placa cromatográfica (20 x 20 cm) para hacer una separación preparativa y recuperar dos fracciones **C_{5a}** y **C_{5b}**

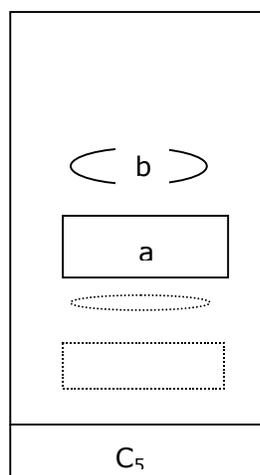


Fig. VI.40 TLC Preparativo de la fracción **C₅**

Las dos fracciones fueron raspadas con espátula y recuperadas con metanol a través de una pipeta Pasteur obstruida con lana de vidrio en la parte inferior y posteriormente fueron analizadas.

El análisis de estos espectros nos permite ver que los compuestos que se mantienen casi siempre en solución presentan las principales funcionalidades características del ácido Carmínico (vibraciones OH, $C_{sp^3} - H$, $C_{sp^2} - H$, C=O, C=C), indicando que éste compuesto y probablemente alguno de sus isómeros se encuentran al estado libre (**Fig.VI.41**). De la misma manera todas aquellas muestras que han sido concentradas o precipitados antes de el análisis muestran en sus espectros un cierto grado de polimerización de los componentes de color (**Fig.VI.42**).

Estos resultados espectrales confirman nuestras observaciones experimentales ya que toda vez que la solución de carmín era evaporada a sequedad los residuos se volvían muy difícilmente solubles.

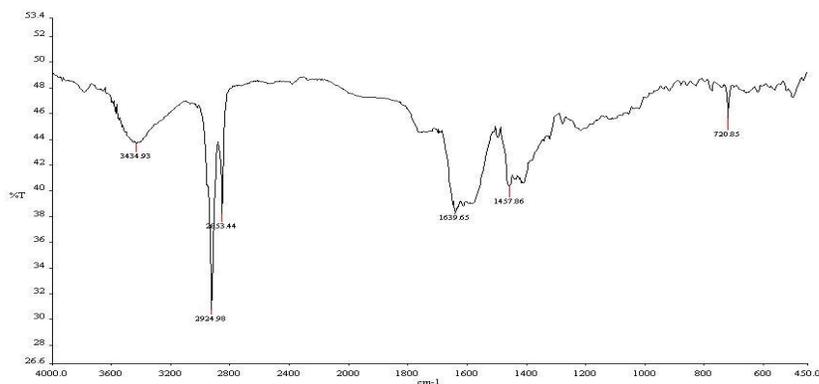


Fig. VI.41 Espectro IR de la fracción **C₃**

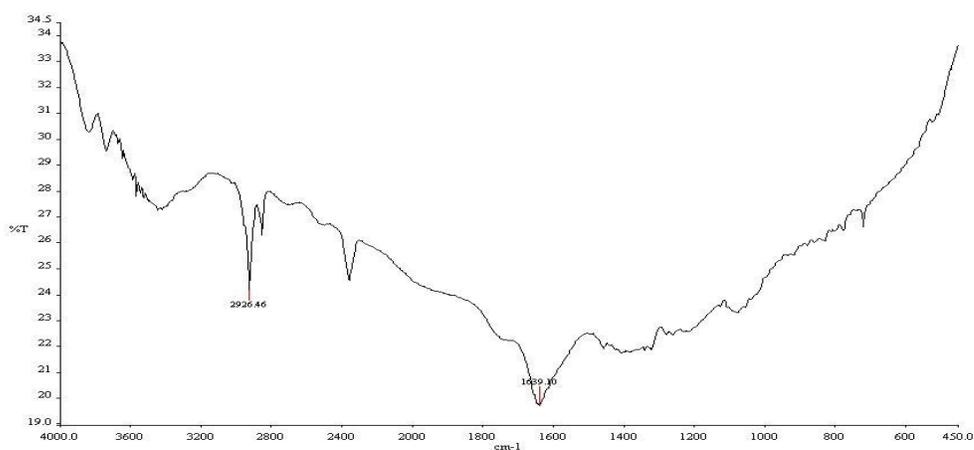


Fig. VI.42 Espectro IR de la fracción C₄

EOT :Acuoetanólico [con Na₂CO₃ y EDTA] (Párrafo V.4.2)

Como resultado de la separación cromatográfica en columna se obtuvieron 40 porciones de 10 ml cada una y una porción final de lavado de 100 ml.

Lo primero que se pudo observar (**Fig. VI.43**) es que la mayor parte de la separación de los componentes del extracto salen en las primeras 8 porciones y de ahí en adelante se obtienen solutos que tienen todas las características del ácido carmínico y/o de alguno de sus isómeros.

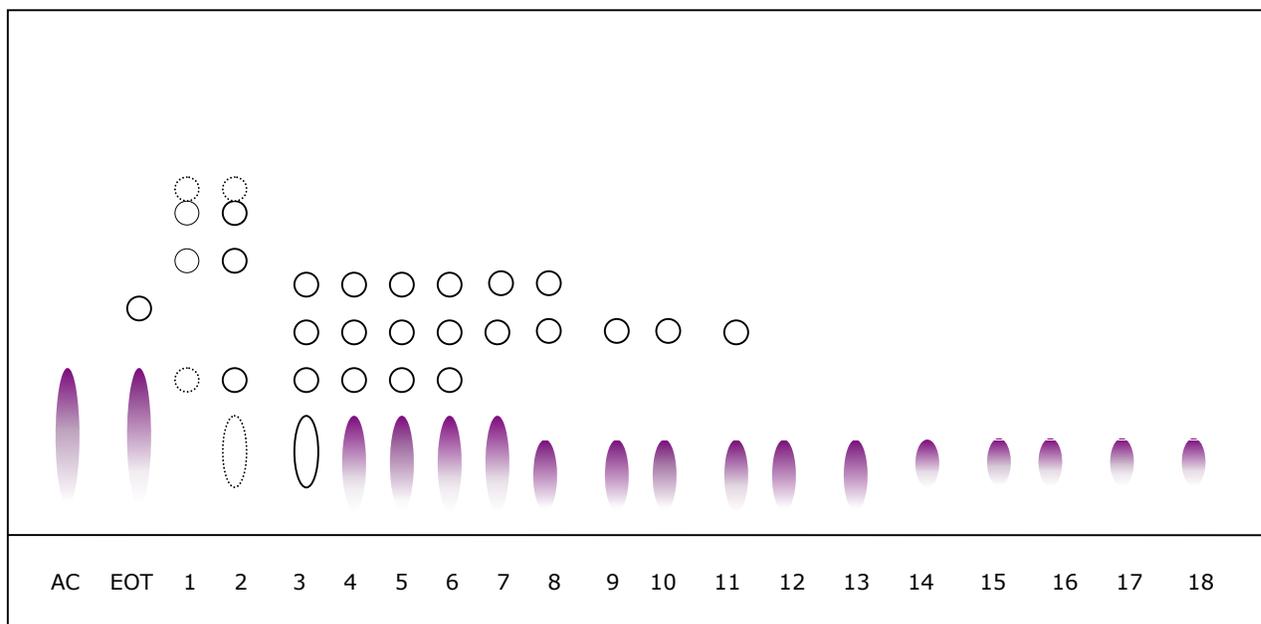


Fig. VI.43 TLC de Cromatografía en Columna, extracto Acuoetanólico Básico.

Tabla VI.32 Relación de Frentes de las porciones 1 a 14

	AC	EOT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rf ₁	0.32	0.31	0.33	0.23	0.27	0.28	0.29	0.28	0.23	0.21	0.21	0.2	0.2	0.2
Rf ₂		0.37	0.57	0.35	0.35	0.36	0.36	0.36	0.41	0.41	0.41	0.41	0.4	
Rf ₃			0.68	0.57	0.45	0.44	0.44	0.44	0.49	0.49				
Rf ₄			0.71	0.68	0.53	0.53	0.53	0.53						
Rf ₅				0.73										

Tomando en cuenta las porciones y la distribución de los solutos UV-Activos en las mismas, decidimos agruparlas en 4 fracciones (**Tabla VI.33**)

Tabla VI.33 Fracciones concentradas

Porción	COLORACIÓN	Fracción
1	Amarilla	eliminar
2	Café	A
3,4,5 y 6	Café- rojizo	B
7,8,9 y 10	Púrpura	C
11 en adelante	Rojo púrpura	D

Sobre la base de las cromatografías de placa (**Fig. VI.36 y VI.43**) podemos ver que, independientemente de que la extracción sea hecha con solvente básico o no, la distribución y composición de las porciones es prácticamente la misma; es decir, la mayor parte de los compuestos extraídos salen en las 12 primeras porciones y en todas las siguientes sale únicamente el **AC**. Por otra parte, podemos constatar que las fracciones 1 a 3 o 4 presentan 5 compuestos que se los pueden poner en evidencia con una lámpara UV a 365 nm, gracias al revelador que contiene la placa, pero no se observa un cromóforo en el visible. Estos resultados son corroborados por los espectros de absorción las diferentes fracciones (**Fig. VI.38**).

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados experimentales se puede ver que la utilización de un solvente acuoetanólico no incide significativamente sobre los resultados cuali-cuantitativos de la extracción; pero tiene un efecto positivo muy importante en la conservación de los extractos.

La utilización de una base para facilitar el proceso de extracción nos permite ver que se deben evitar bases muy fuertes como el **NaOH** (pH superiores a 12) ya que en esas condiciones hay un rápido deterioro del color y una interferencia directa en la formación consecutiva de la Laca.

La concentración óptima de Carbonato, como agente de basificación del solvente de extracción, es el resultado de las pruebas experimentales que nos mostraron que cuando la concentración es menor de 10 %, el colorante extraído se compacta más y el **AC** disponible es menor por que aumentan los insolubles^[39], aunque el análisis de las lacas así obtenidas da porcentajes por encima del 60 %. Cuando la concentración de Carbonato es superior a 10 %, los rendimientos globales no se incrementan significativamente pero los costos se incrementan rápidamente.

La concentración de **EDTA** fue establecida tomando en cuenta que cuando la concentración es muy baja, el producto obtenido se oscurece rápidamente durante las operaciones posteriores y en función del tiempo de almacenamiento.

Con todo lo anteriormente establecido se pudo definir las condiciones operativas de extracción en los siguientes términos:

El solvente de extracción es una solución acuoetanólica (70:30 v:v) de **Na₂CO₃** 1.9×10^{-2} M (10 % en peso, en relación al peso grana seca) y de **EDTA** 2.97×10^{-3} M (3 % en peso, en relación al peso grana seca). La cantidad de la solución utilizada, depende de la cantidad de grana a extraer.

Manteniendo la temperatura del solvente a 70 °C, se suspende el material sólido (grana húmeda, grana seca entera o grana seca molida) en el solvente y la extracción se la realiza directamente por medio de una molinadora mecánica eficiente de alta velocidad.

La filtración es una etapa muy importante del proceso, a nivel piloto se realizó por medio de una centrifugación, en un sistema rotativo vertical. El uso de ayuda filtro, a nivel de laboratorio, como la Celite®, hacen que el proceso sea muy lento ya que la colmatación de la capa filtrante es inmediata.

Tanto para la preparación de soluciones de carmín como para la preparación de formulaciones hidrosolubles, toda vez que sea necesario concentrar los extractos, la operación se debe realizar primeramente en un evaporador rotativo en baño maría que no exceda 40 °C y con alto vacío. El secado final se realiza en una estufa a circulación de aire y cuya temperatura no exceda 35 °C.

El procedimiento tradicional de estabilización, siempre fue la preparación de la laca calcio-alumínica en medio acuoso, obteniéndose un producto seco soluble en medio básico. La utilización de soportes orgánicos, para la estabilización del colorante, previa concentración de los extractos, nos permite obtener productos secos que son totalmente solubles en medio acuoso neutro, alcalino o ácido, ampliando las posibilidades de aplicación.

Los análisis cualitativos de ácido carmínico nos permiten ver que si bien es posible hacer la lectura de absorbancia tanto en el visible como en el ultravioleta, los análisis a 280 nm, no son muy confiables ni reproducibles debido a su elevada Absortividad (Epsilon), ya que para pequeñas variaciones de concentración nos dan valores de absorbancia que salen de los rangos de aplicabilidad de la Ley de Lambert-Beer; sin tomar en cuenta que a esa longitud de onda pueden también absorber muchos otros compuestos, tal cuál constatamos en los análisis de los extractos decolorados en medio básico, que no tienen absorbancia en el visible por la pérdida del cromóforo principal pero mantienen una absorbancia significativa en el ultravioleta; lo que puede conducir a graves errores de cuantificación.

También se observa que el solvente acuoetanólico no incide significativamente en la sensibilidad ni en la linealidad de la absorbancia en función de la concentración; sin embargo, el intervalo de linealidad según la Ley de Lambert-Beer se verifica sólo en un intervalo de concentración que va de 10^{-6} a 10^{-4} M. Para valores de concentración mayores a 10^{-4} M (49.2 mg/l) se verifica una tendencia asintótica de la curva, tal como es reportado en la literatura^[38].

Por otra parte se puede evidenciar que la hidrólisis ácida de la muestra a ser analizada es muy importante para la confiabilidad de los resultados; ya que es de ésta manera que se asegura la preponderancia de una sola especie química, evitando una variabilidad de los máximos de absorción en el visible.

Sobre la cuantificación de **AC** en diferentes productos (**Tabla VI.28**), podemos decir que el uso de las fórmulas propuestas en la bibliografía conduce a resultados bastante diferentes, si bien la fórmula I nos da porcentajes ligeramente superiores, incluso a los valores obtenidos por medio de las curvas patrón; sus resultados no son confiables porque la absortividad de referencia está fuera de los límites de linealidad de la Ley de Lambert Beer.

Aunque el análisis es mucho más largo y costoso, los resultados de concentración obtenidos por medio de las curvas patrón son mucho mas precisos y confiables y como era de esperar son los que más se aproximan a los obtenidos con la fórmula II.

Es importante hacer notar que cuando los análisis del **AC** de referencia son realizados sin hidrolizar se obtienen resultados en exceso.

Dadas las características estructurales de los componentes de color del carmín; la aplicación analítica y preparativa de las técnicas cromatográficas tiene limitaciones significativas. Esto se debe principalmente a que el pH puede ir cambiando durante el proceso de separación, haciendo en éste caso que las especies químicas cambien en función del tiempo, lo que dificulta su aplicabilidad y eficiencia.

Considerando que éste trabajo se basó en la consolidación de los conocimientos científicos y técnicos de este colorante, con el objetivo primordial de mejorar su explotación; como recomendación y seguimiento a este trabajo se considera adecuado el estudio de su aplicación en diferentes productos alimenticios y cosméticos. En el área medica se están realizando estudios de productos anticancerígenos, entre los que esta considerado el Ácido Carmínico; esto quiere decir que un estudio sistemático para su separación y purificación (tanto del **AC** como de los otros componentes) sería fundamental, tanto desde el punto de vista científico como tecnológico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Furia, T.E. **Current Aspects of Food Colorants**. CRC Press. Inc. 1977.
2. Piña, L. I., **La Grana o Cochinilla del Nopal**. Monografías No. 1. LANFI. Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial. México, D. F. 1977.
3. Sahagun, Fr. B de, **Historia General de las Cosas de la Nueva España, Tomo III**, Libro undécimo, de las propiedades de los animales, aves, peces, árboles, yerbas, flores, metales y piedras, y de los colores, Capítulo XI, De las colores, de todas las maneras de colores. Ed. Cien de México, 3era ed., 2000. CONACULTA.
4. Roquero A., Postigo E., **La Cochinilla: Una materia tintórea prehispánica y su Introducción en Europa**.
5. Sarabia, V. M. J., **La Grana y el Añil. Materias Tintóreas en México y América Central**. Publicaciones de la Escuela de Estudios Hispano – Americanos de Sevilla. Fundación El Monte. Sevilla, España. 1994.
6. Macgregor, L. R., **La Grana o Cochinilla del Nopal usada como colorante desde el México antiguo hasta nuestros días**. Cact. Suc. Mex. 21(4): 93 – 99. Mexico, 1976.
7. Brown K. S., **The Chemistry of Aphids and Scale Insects**. Chem. Soc. Rev. 4: 263-288. 1975.
8. Martín, L. R. y Cisneros, V. F., **Biología y Morfología de la Cochinilla del Carmín. Dactylopius coccus Costa (Homóptera: Dactylopiidae)**. Revista Peruana de Entomología 20(1): 115-120. Universidad Nacional Agraria. Perú, 1977.
9. Viguera Guzmán A.L., **Influencia de los macro y micro elementos en el desarrollo, crecimiento y producción de la grana o cochinilla Dactylopius coccus Costa. (Homoptera: Dactylopiidae)**: Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad de Guadalajara, Jal. 1992.
10. Llanderal C. C. y Nieto H. R. **Características Biológicas de la Grana Cochinilla del Nopal. Dactylopius coccus Costa**. Producción de Grana Cochinilla. Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad. 2001.
11. Merck & Co. Inc. **The Merck Index**. 9th ed. Rahway, N. J. 1976.
12. **Norma Técnica**., Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas. ITINTEC- Lima, Perú.
13. Eisner T., et al., **Defensive use of an acquired substance (carminic acid) by predaceous insect larvae.**, Experientia 50 (1994), Birkhäuser Verlag. CH-4010 Basel/Switzerland.
14. Espinosa Montesinos., **Cochinilla del Carmín**. Lima, Perú.

15. Kearsley M., Katsaboxakis K. Z., **Stability and use of natural colours in food. Red beet powder, copper chlorophyll powder and cochineal.** J. Food Technol. 15, 501. 1980.
16. González M., Méndez J., Carnero A., Lobo M. G. and Afonso A., **Optimizing Conditions for the extraction of Pigments in Cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) Using Response Surface Methodology.** J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 6968-6974.
17. Wouters J., **Dyestuff analysis of scale insects by High Performance Liquid Chromatography.** 6th International Symposium of Scale Insect Studies Proc.. ISSIS-VI, Kraków, 1990 part II.
18. Wouters Jan & Noemi R. Chirinos. **Dye Analysis of Pre-Columbian Peruvian Textiles with High-Performance Liquid Chromatography and Diode-Array Detection.**, JAIC 1992, vol. 31, number 2, article 7 (pp. 237 –255)
19. **Food Chemical Codex III**, 3^{era} edición. 1981.
20. Allevi, et al., **Synthesis of carminic acid, the colourant principle of cochineal**, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1998.
21. Lloyd, A. G., **Extraction and Chemistry of Cochineal.** Food Chemistry. 5(1): 91 – 107. Applied Science Publishers Ltd. England, 1980.
22. Jørgensen K. & Skibsted L., **Light Sensitivity of Cochineal. Quantum Yields for Photodegradation of Carminic Acid and Conjugate Bases in Aqueous Solution.** Food Chemistry, 40 (1991) 25-34.
23. Lindberg H., Stapelfeldt H., Bertelsen G. & Skibsted L., **Cochineal as a colorant in processed pork meat. Colour matching and oxidative stability.** Food Chemistry 46 (1993) 265-271.
24. Matthews M., **Application of dyestuffs.** John Wiley & Sons, Inc., N.Y. (1950).
25. Marmion, D. M., **Handbook of U. S. Colorants for Foods, Drugs, and Cosmetics**, 2nd ed. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1984.
26. Norma Oficial Mexicana (NOM-119-SSA1-1994) Bienes y servicios. Materias primas para alimentos. Productos de perfumería y belleza. **Colorantes orgánicos naturales.** Especificaciones Sanitarias.
27. Fieser L.F. & Fieser M., **Química Orgánica Superior.** Ediciones Grijalbo, S.A., vol. 2, 1966.
28. Trilok Chand Jain., **Spectrophotometric Studies of Carminic Acid Complexes.**, Jour. Indian Chem. Soc., vol. 37, No. 11, 1960.
29. Pigment Handbook **Vol. I** Pág. 697
Ed. A. Wiley Interscience Publication (1973)

30. Kirk, R.E., y Othmer, D. F., **Enciclopedia of Chemical Technology**. 3rd ed. V.8. Dyes, Natural. Pp.351-355. Ed. John Wiley & Sons, Inc., USA. 1979.
31. Skoog, D., West D., Holler F., Crouch S., **Química Analítica**. 7a ed., McGraw-Hill.2001.
32. Sellan Ege, **Química Orgánica, Estructura y Reactividad**, 3ra ed. Editorial Reverté, S. A., 1998.
33. Hernández Arévalo O. R., **Aprovechamiento de la grana o cochinilla del Nopal**, Tesis Profesional, ESIQIE., 1998.
34. Lancaster F. E., Lawrence J. F., **High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, α - and β - bixin, and α - and β - norbixin, and the determination of carminic acid in foods**. Journal of Chromatography A, 732 (1996) 394-398. Elsevier Science.
35. Jalón et al., **Color Additives. Liquid Chromatographic Determination of Carminic Acid in Yogurt**. J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 72, No. 2, 1989.
36. Diccionario de Especialidades para la Industria Alimentaria, ediciones PLM, S.A. de C.V., 1999.
37. Estudio de Mercado, proporcionado por el Consejo Mexicano del Nopal y Tuna A.C.
38. Schwing-Weill M. J., **Etude spectrophotométrique de l'acide carminique en solution. Application á son dosage**. Analisis, 1986, v. 14, no. 6, p. 290-295.
39. Marshall P. N. and Horobin R. W., **A Simple Assay Procedure for Carmine and Carminic Acid Samples**. Stain Technology, vol. 49, no. 1. 1974.