



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTANDARIZACION DE UN PROCESO
DE EXTRACCION PARA LA OBTENCION
DE ACIDO CARMINICO A PARTIR
DE GRANA COCHINILLA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
SELENE ENRIQUETA CORONA GUTIERREZ

Director de Tesis: Dra. Sara E. Valdés Martínez

Asesor: I. A. Laura Vilorio Montoya

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ALIMENTACION Y EL COLOR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: Estandarización de un proceso de extracción para la obtención de ácido carmínico a partir de grana cochinilla.

que presenta la pasante; Selene Enriqueta Corona Gutiérrez con número de cuenta: 9057040-1 para obtener el TITULO de Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Iscalli, Edo. de Méx., a 11 de Marzo de 1996

PRESIDENTE	I.B.Q. Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en C. Rosa M. Arriaga Ortuella	
SECRETARIO	Dra. Sara E. Valdés Martínez	
PRIMER SUPLENTE	Q.F.B. S. Patricia Miranda Castro	
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Gloria Cruz León	

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología de Calidad de Alimentos en la unidad de postgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-campo I. Apoyado por la Fundación UNAM mediante el Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación.

I.Q. Ignacio del Río Dueñas por la grana cochinilla y el estándar de ácido carmínico proporcionado para la realización del presente trabajo.

M.C. Andrés Romero Rojas por la donación de las enzimas usadas en este trabajo.

Dra. Susana Mendoza E; p.M.C. Carolina Moreno R. y p.M.C. Edgar Aguilera C., por su apoyo, amistad y facilidades brindadas para la realización de esta tesis.

Q.F.B. Rocío Castro, por su ayuda en la realización del análisis de cromatografía líquida de alta presión.

Comisión Estatal de Agua y Saneamiento en especial al I.Q. Cuahutemoc Carreño por el apoyo brindado para la realización de determinación de metales pesados.

M.V.Z. Horacio Lara y al M.C. Jorge Bermúdez por ayudarme en el manejo de los paquetes estadísticos.

A mis amigas: Miriam, Claudia, Ana Luisa, Ana Xius, Nancy y Ma. Luisa por su amistad, ayuda y por todos los momentos agradables que hemos pasado.

I.A. Laura Vilorio M., por su amistad y la gran ayuda proporcionada en todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al jurado: I.B.Q. Francisco Montiel Sosa., M.C. Rosa M. Arriaga Orihuela., Q.F.B. S. Patricia Miranda Castro. y Q.F.B. Gloria Cruz León., por sus comentarios tan valiosos y el tiempo dedicado en la revisión de la tesis.

Ph. Dra. Sara Valdés Martínez, no sólo por la aportación de sus conocimientos y el tiempo dedicado para el desarrollo de este trabajo sino también por su confianza, ayuda y amistad brindadas durante todo este tiempo.

Gracias Dios por todo lo que me has dado.

A mi madre porque con su amor y apoyo he podido realizar una de las metas trazadas en mi vida, la cual constituye la mejor herencia que un ser humano pueda recibir.

Gracias.

A Enrique, por el amor y comprensión que me has demostrado.

Te Amo.

Un agradecimiento especial a todas las personas que han tenido confianza en mí.

INDICE GENERAL

Índice general.	1
Índice de figuras y gráficas.	4
Índice de cuadros.	5
Nomenclatura.	7
Resumen	9
Introducción.	10
Objetivo general.	12
Objetivos particulares.	12
Capítulo I GENERALIDADES.	
1. Color y su medición	13
1.1. Definición de color.	13
1.1.1. Atributos del color.	13
1.2. Escalas de medición.	16
1.3. Definición de colorantes.	21
1.4. Clasificación.	22
1.5. Importancia del empleo de colorantes en alimentos.	26
1.6. Legislación.	27
Capítulo II ASPECTOS GENERALES SOBRE EL COLORANTE DE COCHINILLA.	
2.1. Historia.	30
2.2. Características de la grana.	35
2.3. Productos derivados de la grana cochinilla.	38
2.3.1. Ácido carminico.	38
2.3.2. Extracto de cochinilla.	40
2.3.3. Carmin.	40
2.4. Aplicaciones de los derivados de la grana.	44
2.5. Aspecto comercial de la grana y de sus derivados.	45

2.5.1. Mercado mundial.	45
2.5.2. Situación actual en México.	46
Capítulo III DISEÑO EXPERIMENTAL.	
3.1. Parámetros fisicoquímicos.	49
3.1.1. Estabilidad al pH.	49
3.1.2. Punto de equilibrio del ácido carmínico y longitud de onda de máxima absorbancia.	50
3.1.3. Coeficiente de extinción molar.	50
3.2. Métodos de extracción de ácido carmínico.	51
3.3. Determinación del porciento de rendimiento de ácido carmínico.	59
3.4. Determinación del porciento de ensayo (libre de sales).	59
3.5. Determinación de las características colorimétricas.	60
3.6. Determinación del número de etapas de extracción.	62
3.7. Determinación de las características físicas, químicas y microbiológicas de los extractos.	62
3.7.1. Análisis de los extractos por cromatografía líquida de alta presión.	63
Capítulo IV ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	
4.1. Parámetros fisicoquímicos.	64
4.1.1. Estabilidad al pH.	64
4.1.2. Punto de equilibrio del ácido carmínico y longitud de onda de máxima absorbancia del mismo.	70
4.1.3. Coeficiente de extinción molar.	72
4.2. Métodos de extracción de ácido carmínico.	75
4.3. Análisis de las características colorimétricas de los extractos.	80
4.4. Determinación del número de etapas de extracción de los métodos seleccionados.	83
4.5. Determinación de las características físicas, químicas y microbiológicas de los extractos.	85
4.5.1. Cromatografía líquida de alta presión.	89
Conclusiones.	94

Recomendaciones.	95
Bibliografía.	96
Anexo 1	102
Anexo 2	104
Anexo 3	105

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

1. Cilindro de color.	16
2. Diagrama de color C.I.E.	19
3. Diagrama de color Hunter-lab.	20
4. Diagrama de color C.I.E.L.A.B. en tres planos.	21
5. Estructura del ácido carmínico.	39
6. Principales países productores de grana cochinilla.	45
7. Exportaciones de carmín en Perú.	46
8. Importaciones de carmín realizadas por México.	47
9. Porcentaje de pigmento remanente del colorante de cochinilla en función del tiempo de contacto a diferente pH.	66
10. Efecto sobre el tono en función del tiempo de contacto del colorante de cochinilla a diferente pH.	67
11. Diagrama de color C.I.E.L.A.B. en dos planos.	68
12. Efecto sobre brillantez en función del tiempo de contacto del colorante de cochinilla a diferente pH.	69
13. Efecto sobre la saturación en función del tiempo de contacto del colorante de cochinilla a diferente pH.	70
14. Punto de equilibrio del ácido carmínico.	71
15. Barrido espectrofotométrico del ácido carmínico a pH neutro.	71
16. Coeficientes de extinción molar del ácido carmínico a diferente pH.	72
17. Absorbancia en función de la concentración del ác. carmínico.	74
18. Brillantez en función de la concentración para el estándar del ác. carmínico.	74
19. Cromaticidad (saturación - tono) del estándar de ác. carmínico.	75
20. Brillantez de los extractos obtenidos.	82
21. Cromaticidad de los extractos obtenidos.	82
22. Cromatograma del ác. carmínico.	92
23. Estructura del ác flavokermésico.	92
24. Estructura del ác. Kermésico.	93

ÍNDICE DE CUADROS

1. Relación entre la absorción de la luz y el color.	14
2. Clasificación de colorantes hidrosolubles sintéticos de uso en alimentos	23
3. Clasificación de los colorantes naturales.	24
4. Colorantes naturales permitidos en alimentos por la S.S.A. en México, F.D.A. y por la Comunidad Económica Europea.	29
5. Clasificación taxonómica de la grana cochinilla.	36
6. Grados de calidad para la comercialización de la grana.	38
7. Presentaciones comerciales del carmín.	41
8. Coloraciones adquiridas por el carmín dependiendo de la sal metálica empleada.	42
9. Usos de los derivados de la grana.	44
10. Cuadro Metodológico de la tesis.	48
11. Diagrama de bloques del método de referencia para la obtención de extracto de cochinilla.	54
12. Diagrama de bloques de los diferentes métodos de extracción (2.0 - 4.17) para la obtención de ácido carmínico.	56
13. Diagrama de bloques para la obtención de ácido carmínico empleando enzimas.	57
14. Diagrama de bloques para la obtención de ácido carmínico empleando solventes.	58
15. Arreglo factorial propuesto para el análisis estadístico de los métodos de extracción.	61
16. Longitud de onda de máx. absorbancia en función del pH para el ác. carmínico.	65
17. Coeficientes de Extinción molar.	73
18. Resultados de los diferentes métodos de extracción empleados. (% ensayo, % rendimiento y características colorimétricas).	76
19. Resultados de las diferentes etapas de extracción y características colorimétricas.	83
20. Resultados de las pruebas especificadas por la F.D.A. de los extractos seleccionados como óptimos.	85
21. Contenido de arsénico y plomo en los reactivos usados para la extracción.	87

22. Resultados de las pruebas bioquímicas de identificación de microorganismos.	88
23. Comparación de los resultados de las técnicas usadas para cuantificar el contenido de ácido carnínico en los extractos.	89

NOMENCLATURA

G = Grana Entera
T = Grana en Polvo (0.7 mm de diámetro promedio de partícula).
A = Alcalino.
S = Neutro.
H = Ácido.
R = NaCl = Cloruro de sodio.
N = Na₂CO₃ = Carbonato de sodio.
E = EDTA
M = Mezcla (EDTA y carbonato de sodio).
D = Etanol.
P = Papaina.
K = Proteínasa K.
1 = 25°C
2 = 110°C
B = Baja concentración.
C = Alta concentración.
Abs = Absorbancia.
F.C.C. = Food Chemical Codex.
HPLC = Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
RRT = Tiempo de retención (min).
a = Saturación.
b = Tono.
L = Brillantez.
l = Longitud de onda (nm)
ε = Coeficiente de absorción molar (L mol⁻¹ cm⁻¹).
S.T. = Sólidos totales.
r = Coeficiente de regresión.
ND = No determinado.
ppm = Partes por millón.
mM = milimolar.
mcg. = µg = microgramos.

A continuación se enlistan las abreviaturas con sus respectivos nombres de los diferentes métodos de extracción empleados en el presente trabajo.

NOMENCLATURA
CONDICIONES DE EXTRACCION

TRATAMIENTO

GA1	GRANA ENTERA, P. ALCALINO, A 25°C.
GA2	GRANA ENTERA, P. ALCALINO, A 110°C
GS1	GRANA ENTERA, P. NEUTRO, A 25°C
GS2	GRANA ENTERA, P. NEUTRO, A 110°C
GH1	GRANA ENTERA, P. ACIDO, A 25°C
GH2	GRANA ENTERA, P. ACIDO, A 110°C
TA1	GRANA EN POLVO, P. ALCALINO, A 25°C
TA2	GRANA EN POLVO, P. ALCALINO, A 110°C
TS1	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO, A 25°C
TS2	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO, A 110°C
TH1	GRANA EN POLVO, P. ACIDO, A 25°C
TH2	GRANA EN POLVO, P. ACIDO, A 110°C
GP	GRANA ENTERA, P. PAPAIA.
TP	GRANA EN POLVO, P. PAPAIA
GK	GRANA ENTERA, P. PROTEINASA K.
TK	GRANA EN POLVO, P. PROTEINASA K.
GDB	GRANA ENTERA, P. ETANOL, BAJA CONCENTRACION
TDB	GRANA EN POLVO, P. ETANOL, BAJA CONCENTRACION.
GDC	GRANA ENTERA, P. ETANOL, ALTA CONCENTRACION
TDC	GRANA EN POLVO, P. ETANOL, ALTA CONCENTRACION.
THNB1	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-CLORURO DE SODIO, BAJA CONC. A 25°C
THNC1	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-CLORURO DE SODIO, ALTA CONC. A 25°C
THNB2	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-CLORURO DE SODIO, BAJA CONC. A 110°C
THNC2	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-CLORURO DE SODIO, ALTA CONC. A 110°C
THEB1	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-EDTA, BAJA CONC. A 25°C
THEC1	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-EDTA, ALTA CONC. A 25°C
THEB2	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-EDTA, BAJA CONC. A 110°C
THEC2	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-EDTA, ALTA CONC. A 110°C
THMB1	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-MEZCLA, BAJA CONC. A 25°C
THMC1	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-MEZCLA, ALTA CONC. A 25°C
THMB2	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-MEZCLA, BAJA CONC. A 110°C
THMC2	GRANA EN POLVO, P. ACIDO-MEZCLA, ALTA CONC. A 110°C
TSNB1	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-CARBONATO DE SODIO, BAJA CONC. A 25°C
TSNC1	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-CARBONATO DE SODIO, ALTA CONC. A 25°C
TSNB2	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-CARBONATO DE SODIO, BAJA CONC. A 110°C
TSNC2	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-CARBONATO DE SODIO, ALTA CONC. A 110°C
TSEB1	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-ETDA, BAJA CONC. A 25°C
TSEC1	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-ETDA, ALTA CONC. A 25°C
TSEB2	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-ETDA, BAJA CONC. A 110°C
TSEC2	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-ETDA, ALTA CONC. A 110°C
TSMB1	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-MEZCLA, BAJA CONC. A 25°C
TSMC1	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-MEZCLA, ALTA CONC. A 25°C
TSMB2	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-MEZCLA, BAJA CONC. A 110°C
TSMC2	GRANA EN POLVO, P. NEUTRO-MEZCLA, ALTA CONC. A 110°C
TRB1	GRANA EN POLVO, P. CLORURO DE SODIO, BAJA CONC. A 25°C
TRC1	GRANA EN POLVO, P. CLORURO DE SODIO, ALTA CONC. A 25°C
TRB2	GRANA EN POLVO, P. CLORURO DE SODIO, BAJA CONC. A 110°C
TRC2	GRANA EN POLVO, P. CLORURO DE SODIO, ALTA CONC. A 110°C
TREB1	GRANA EN POLVO, P. CLORURO DE SODIO-ETDA, BAJA CONC. 25°C
TREC1	GRANA EN POLVO, P. CLORURO DE SODIO-ETDA, ALTA CONC. 25°C
TREB2	GRANA EN POLVO, P. CLORURO DE SODIO-ETDA, BAJA CONC. 110°C
TREC2	GRANA EN POLVO, P. CLORURO DE SODIO-ETDA, ALTA CONC. 110°C
REF	METODO DE REFERENCIA.

RESUMEN

La industria alimentaria y farmacéutica cuenta con una gran variedad de productos de color rojo, estudios toxicológicos han demostrado que algunos colorantes rojos sintéticos utilizados por estas industrias son tóxicos, por lo que los diferentes organismos reguladores del empleo de aditivos en el mundo les ha ido retirando la certificación renaciendo el interés por el uso de colorantes de origen natural. Por lo anterior la demanda de los colorantes naturales se ha incrementado en los últimos años, este es el caso del carmin y del extracto de cochinilla ambos derivados de las hembras del insecto *Dactilopius coccus Costa*. En recientes estudios se ha encontrado que en la grana existen diferentes compuestos coloridos siendo el ácido carmínico el principal componente, manejándose en el mercado de colorantes (industria alimentaria y farmacéutica) como ácido carmínico al extracto de cochinilla y carmin a la laca, a pesar de ser una mezcla de colorantes con presencia de proteína, sólidos totales, etc.; es incosteable la obtención de ácido carmínico puro para uso comercial. La grana cochinilla es originaria de México se tiene actualmente una producción mínima y sus derivados son importados.

El objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones de máximo rendimiento de extracción de colorante de cochinilla. Se evaluaron en los extractos las características colorimétricas (tono, brillantez y saturación), se cuantificó el contenido de ácido carmínico y se determinó la presencia de otros componentes coloridos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la extracción se empleó 1 gr. de cochinilla usándose dos tamaños de partícula entera (6 mm) y pulverizada (0.7 mm de diámetro), dos temperaturas de extracción: 25°C con agitación y 110°C, empleando en todos los casos 50 ml de solución extractora. Las condiciones de extracción estudiadas fueron: extracción ácida, alcalina, neutra y salina (usando sales de NaCl, Na₂HPO₄, NaHPO₄, Na₂CO₃, EDTA, así como la mezcla de estas, a dos diferentes concentraciones), enzimática: Papaina a 37°C por 20 min., Proteinasa K a 50°C por 1 hr. y con solventes: usando 200 ml de etanol a 80°C. Se estableció el número de etapas de extracción requeridas para cada una de las condiciones de extracción seleccionados al tener un mayor rendimiento y ensayo (libre de sales), y se determinaron todos los parámetros especificados por la F.D.A. para aceptar al colorante: pH, sólidos totales, contenido de ác. carmínico, presencia de arsénico y plomo, proteína y microorganismos como Salmonella. Para el análisis en HPLC se usó una columna C-18 de 3 mm I.D. X 8 cm, empleando agua-metanol-ác. fosfórico 5% (40:50:10) como fase móvil, con una velocidad de flujo de 1 ml/min., la detección se hizo a 275 nm.

En los diferentes métodos de extracción estudiados se obtuvo que un aumento de temperatura así como la disminución del tamaño de partícula favorecen la extracción del principio activo a excepción de las extracciones con Proteinasa K en donde el tamaño de partícula no muestra diferencia significativa ($p < 0.05$). No hubo diferencia en la brillantez y saturación de los extractos con respecto al estándar a las concentraciones obtenidas pero se observó que los extractos ácidos y en donde hay sodio la tendencia es hacia un tono rojo azul, en tanto que en los otros extractos hay una tendencia hacia el rojo amarillo debido a la presencia de otros compuestos coloridos que aunque en menor proporción que el ácido carmínico están presentes: esto se observó también en el HPLC en donde para el ácido carmínico se tiene un tiempo de retención (RRT) de 1.16, apreciándose en los cromatogramas otros picos correspondientes al ácido flavokermésico y ácido kermésico con un RRT 1.73 y 2.50 respectivamente. Los métodos de extracción en los que se tuvo un mayor rendimiento fueron: proceso alcalino a 25°C con un 24.25%, fosfatos a 25°C con 14.57% y a 110°C con un 15.39% estos rendimientos son mayores al obtenido por el método de referencia el cual es del 14.33%. A 25°C se requieren de tres extracciones y a 110°C de dos.

INTRODUCCION

El color está en todo lo que nos rodea y constituye una propiedad importante, ya que sugiere diferentes características de los objetos que lo poseen acrecentando o disminuyendo el gusto de las personas hacia ellos (7, 8).

Esto mismo sucede con los alimentos que se consumen pues ya tenemos ideas de su apariencia, sabor, textura y olor, y para que los alimentos puedan concordar con las percepciones se permite agregarles colorantes a fin de hacerlos más atractivos, teniéndose también una rápida identificación del producto, y la aceptación de los mismos por parte del consumidor (11,13).

El uso de colorantes naturales o artificiales va a modificar, acentuar o igualar el color de los productos. Los colores empleados en alimentos para lograr los efectos antes mencionados se clasifican en certificados (artificiales) y no certificados (naturales). Los primeros son producidos por síntesis química y están reglamentados para utilizarse en concentraciones límite en alimentos, medicamentos, bebidas, cosméticos, etc.; mientras que los colorantes naturales al ser obtenidos de vegetales, animales o minerales, se encuentran exentos de reglamentación o certificación, ya que se asume por ser naturales que no provocan daños a la salud (16, 30,37).

La evidencia toxicológica adversa a los colorantes artificiales ha conducido a que se les retire la certificación pues conllevan a enfermedades como el cáncer, trastornos nerviosos, problemas cardiovasculares y de mutagenicidad entre otros; esta situación se ha presentado con mas fuerza en los colorantes rojos sintéticos, razón por la cual tienen restricciones para su uso (21). Lo anterior ha propiciado que renazca el interés por los colorantes naturales, los cuales habían sido desplazados por los sintéticos, pues estos últimos presentan diversas propiedades funcionales como mayor tonalidad y homogeneidad y son considerablemente más baratos y estables (35, 77).

Actualmente hay una tendencia muy definida por parte de los consumidores hacia los productos sanos y libres de aditivos, siendo los colorantes parte de este interés (30, 37).

Como una alternativa para sustituir a los colorantes rojos certificados que han sido prohibidos como aditivos en alimentos se han empleado: extracto de cochinilla y carmín de

cochinilla los cuales son obtenidos del insecto femenino *Dactylopius coccus* Costa o grana cochinilla (52, 59).

La tendencia por consumir productos naturales está en su apogeo por lo que la demanda por este tipo de colorantes se ha incrementado considerablemente en los últimos años.

La cochinilla es un insecto originario de México y su producción en el país es mínima, los principales proveedores de la grana y de sus productos a nivel mundial son Islas Canarias y Perú. En México en el estado de Oaxaca, mediante el apoyo de ciertas instituciones como la SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos), del INI (Instituto Nacional Indigenista) y la COPRODEO (Comité Promotor de Desarrollo Socioeconómico del Estado de Oaxaca), han elaborado programas para el rescate de la grana cochinilla, más aún no se tiene establecido en México ningún proceso para la obtención de los diversos productos de este insecto, su obtención se sigue haciendo de la forma tradicional lo que origina que haya altibajos en el rendimiento y variaciones en la calidad del producto final (63).

La metodología para la obtención de los derivados de la grana se ha descrito y publicado en raras ocasiones y nunca detalladamente, debido a que cada industria los guarda cuidadosamente.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo tienen como principal objetivo el de establecer un proceso de extracción del colorante de cochinilla (ácido carmínico) con alto rendimiento y pureza.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las condiciones de extracción que ofrezcan un máximo rendimiento del colorante de cochinilla.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer los parámetros fisicoquímicos necesarios para caracterizar el ácido carmínico utilizando un estándar comercial como referencia.
2. Determinar la influencia de las diferentes condiciones de extracción empleadas en el rendimiento, ensayo y características colorimétricas del colorante de cochinilla.
3. Contrastar la eficiencia de los diferentes métodos de extracción con el método de referencia.
4. Determinar el número de etapas de extracción y las características físicas, químicas y microbiológicas de los métodos de extracción que tengan mayor rendimiento y ensayo con respecto al método de referencia.

CAPITULO I
GENERALIDADES

CAPITULO I GENERALIDADES

1. Color y su medición.

1.1 Definición de color.

La palabra color se usa con varias acepciones, para el psicólogo no solo es la sensación producida en el observador humano cuando la retina es estimulada por energía radiante también, el color al estar en todo lo que nos rodea va a influir en el gusto de las personas por los diferentes objetos, muchas veces quedamos desconcertados cuando los colores difieren de lo que nosotros esperamos, si el cielo se pone pardo nos augura un mal tiempo y si nos vestimos de negro denotamos que estamos de luto (40); para el físico el color es un parámetro tridimensional que se compone de aquellas características de la luz, distintas del espacio y el tiempo, siendo la luz aquel espectro de la energía radiante que el hombre percibe a través de las sensaciones visuales que se producen por el estímulo en la retina (8, 11); una definición más completa es la que se tiene en términos fisiológicos, en donde el color se debe al efecto de un estímulo luminoso (con longitudes de onda comprendidas entre 380 y 770 nanómetros) que llega hasta la retina del ojo humano provocando impulsos nerviosos que originan una "respuesta color" a nivel cerebral. El estímulo consiste en el reflejo o transmisión de una luz incidente en un objeto; fenómeno que se conoce como absorción selectiva de la luz siendo el color observado complementario del absorbido. (40, 72).

1.1.1. Atributos del color.

El mundo del color lo componen tres elementos o atributos: tono, brillantez y saturación.

Tono o matiz.- físicamente es el término asociado con la longitud de onda dominante en una mezcla de ondas de luz y depende del fenómeno de absorción selectiva de la luz, estas longitudes de onda dividen al espectro en rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul, indigo y violeta (7, 11).

Fisiológicamente los tonos son respuestas a las señales rojas, verdes y azules enviadas al cerebro por los tres tipos de conos presentes en la retina, con los cuales son compuestos todos los tonos restantes, el color observado es complementario del absorbido y puede representarse físicamente por medio de su curva espectrofotométrica de reflexión o transmisión. (40, 72).

En el cuadro 1 se dan para ciertos tonos las longitudes de onda absorbidas, el color correspondiente y el color complementario observado.

Cuadro 1 Relación entre la absorción de la luz y el color observado.

Longitud de onda λ (nm)	Color absorbido correspondiente	Color observado
< 380	Ultravioleta	-----
380-435	Azul-Indigo	Amarillo
435-480	Azul-verdoso	Anaranjado
480-490	Verde-azuloso	Rojo
490-500	Verde	Púrpura
500-560	Verde-amarillento	Violeta
560-580	Amarillo	Azul
580-595	Anaranjado	Azul-verdoso
595-650	Rojo	Verde-azuloso
650-780	Cerca de Infrarrojo	-----
>780	-----	-----

FUENTE: Wilard, H.II. (1976) Instrumental Methods of Analysis. De. Wadsworth Inc. 8a. edición. USA pag. 33

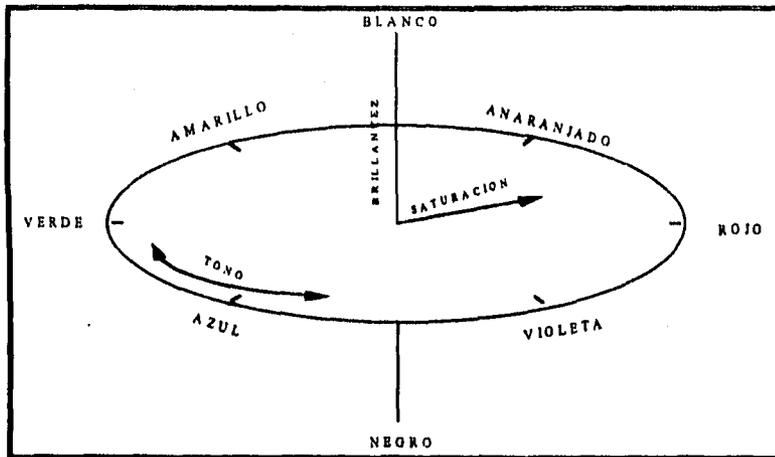
Brillantez .- es la intensidad del color, clasifica a los matices en brillantez u oscuros y es la capacidad que tiene el objeto de reflejar o transmitir la luz que le llega, si la proporción es alta el color es claro y si es baja es oscuro.

Si una superficie es iluminada con luz blanca se verá negra si absorbe totalmente la energía radiante, será blanca si la refleja por completo y gris si lo hace en porcentajes intermedios. El blanco, negro y gris son colores acromáticos que se originan por estimulación de los bastones de la retina y sus curvas espectrales son aproximadamente horizontales pues no se produce el fenómeno de absorción selectiva de la luz (1, 8).

Saturación.- indica si un tono es 100% puro o si está diluido con blanco, gris o negro. Este atributo se relaciona con la concentración de pigmentos presentes en el material; cuanto más puro o saturado es un color, resulta más fuerte o intenso. Este término no debe confundirse con el de brillantez. Al matiz y a la saturación al juntarse se les llama cromaticidad; así un color puede caracterizarse por su brillantez y cromaticidad.

Los tres atributos del color pueden representarse gráficamente en coordenadas cilíndricas como se observa en la figura 1, en este espacio tridimensional pueden ser ubicados todos los colores existentes; la circunferencia externa muestra los tonos 100% puros siguiendo el orden espectral de la luz: rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul y violeta. A lo largo del eje central se tiene la brillantez; observándose en la parte inferior el negro, gris en la intermedia y blanco en la superior. La distancia desde cualquier punto del círculo al centro, mide la saturación; los colores son más oscuros al centro y conforme se va alejando del mismo son más claros.(12, 15).

Figura 1. Cilindro de color.



Dasso, I. (1986) Control de color en alimentos, sistemas numéricos de expresión . La alimentación Latinoamericana. (156) 19-25.

1.2. Escalas de medición.

Hay una amplia e infinita variedad de colores a nuestro alrededor y es entre los atributos sensoriales de los objetos un factor que influye en nuestro gusto por los mismos. La expresión verbal sobre el color en un objeto es complicada, ya que es una percepción que varía de acuerdo a la sensibilidad de cada persona, existiendo además otros factores que influyen en la respuesta a la observación que se haga como son: tipo de luz, ángulo de visualización y tamaño de muestra. Sin embargo, existen lenguajes estándares por los cuales los colores pueden expresarse y entenderse por cualquiera (11, 30, 40). Entre los diversos diagramas de color ideados a lo largo del tiempo tenemos: Disco de Newton, Triángulo de Maxwell, Cubo de Ives, Cono de Ostwalt, etc. (13, 16).

En 1860, Maxwell propuso una construcción geométrica llamada "triángulo de los colores", en el cual cualquier color puede ser especificado en términos de cantidades relativas de rojo,

verde y azul necesarias para producirlo dentro del mismo; dichas cantidades se conocen como "valores tristímulo". En todo caso, se ha encontrado conveniente expresar estos valores como fracciones de un total, las cuales se conocen como "coordenadas cromáticas," designadas como r , v y a (rojo, verde y azul, los colores primarios).

Para simplificar, dichos valores se pueden obtener matemáticamente de la siguiente manera:

$$v = v/v+r+a \quad r = r/v+r+a \quad a = a/v+r+a$$

donde $v+r+a = 1$

Lo anterior puede generalizarse para todos los colores, obteniéndose así la calidad cromática (matiz e intensidad) características de cada uno.

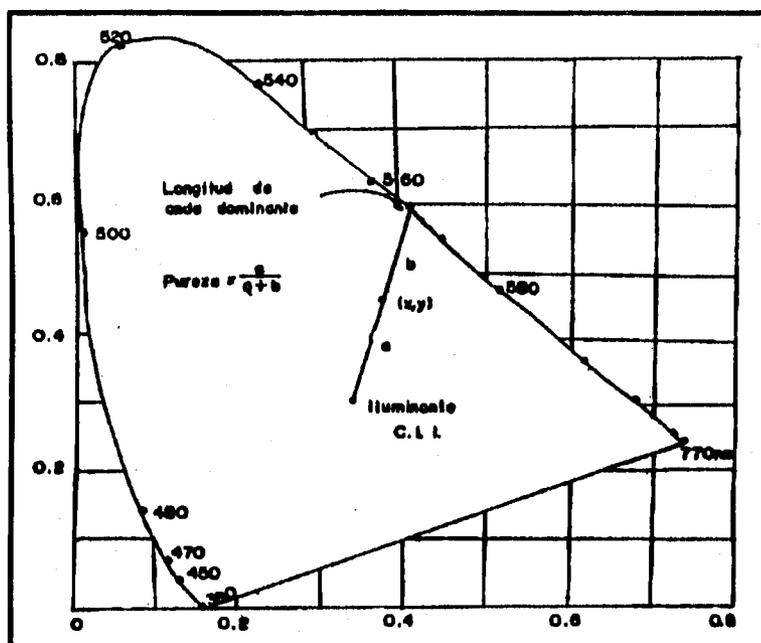
Por otra parte, se observa que la calidad del color resultante queda definida solo en un plano dimensional, no quedando clara la tercera característica de color "brillantez". Para calcular la brillantez de un color, Grassman propone la teoría de que la brillantez producida por una mezcla de un cierto número de fuentes luminosas, es la suma de la brillantez producida por separado de cada una de estas fuentes. Lo que significa que la suma de las fracciones apropiadas de luz roja, verde y azul producirán luz blanca, cuya luminosidad será proporcional a la suma algebraica de las luminosidades respectivas de los tres colores .

La naturaleza tridimensional del color involucra el uso de cantidades negativas de color que complican la manipulación matemática de las unidades de color. Por esta razón la Comisión Internacional de Iluminación (C.I.E.) decidió que, aunque el sistema r , v , a , es apropiado para definir las respuestas color no es versátil su empleo (13, 40).

En 1931 la C.I.E. definió el espacio físico de colores como tridimensional basándose en admitir que todo estímulo coloreado es la mezcla aditiva de tres estímulos fundamentales:

rojo, verde y azul con longitudes de onda de 700, 546 y 436 nanómetros respectivamente, y que se cuantifican por los valores triestímulos X, Y, Z; que mediante su suma permite reconstruir el color correspondiente en una cantidad energética unitaria, la cual se resuelve matemáticamente por integración. El espacio C.I.E. es un espacio irregular cuya sección transversal (plano y,x) tiene forma de lengua (figura 2). Sobre la curva se ubican los colores 100% puros o espectrales, desde 380 a 700 nm, y en la línea recta las combinaciones no espectrales de azul y rojo. Para interpretarlo físicamente, se traza una línea recta desde el punto que representa la cromaticidad de la muestra hasta intersectar la longitud de onda dominante que se encuentra en el espacio espectral, se sabe, por la geometría de la figura, que la combinación adecuada de longitud de onda y de iluminante igualarán el color propio de la muestra. De esta manera, la longitud alcanzada sobre la línea de iluminante a través de la muestra da idea de la intensidad del color. El cociente de la distancia del iluminante a la muestra entre la distancia del iluminante a la longitud de onda se le conoce como pureza del color de la muestra, el color es más intenso cuanto más se acerca a los bordes de la lengua. La tercera dimensión de este espacio se visualiza trazando una perpendicular al plano yx, la que constituye el eje Y de las luminosidades; Y varía linealmente entre cero y cien, en tanto que x y y lo hacen entre cero y uno. El inconveniente de este método además de la complejidad de los cálculos y del tiempo de análisis, es que el diagrama C.I.E. es un espacio irregular en forma de lengua, y al no ser uniforme dificulta la interpretación del color (11, 13).

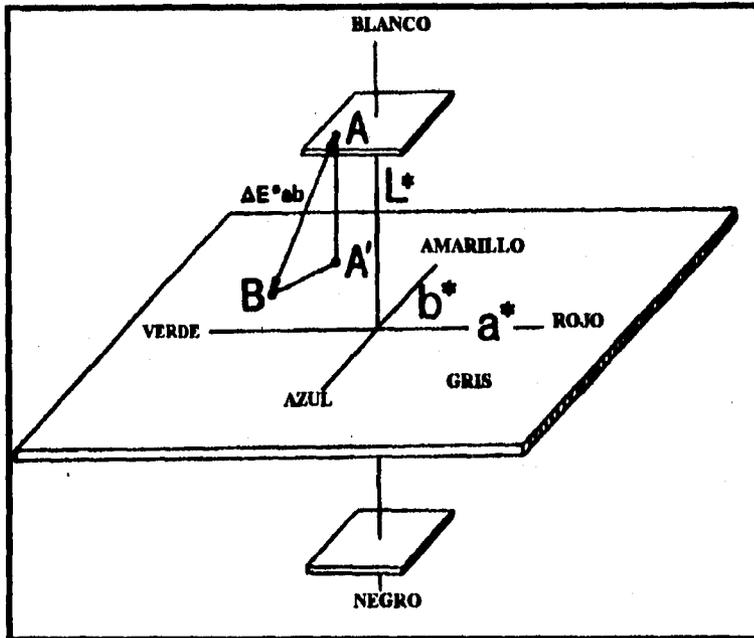
Figura 2. Diagrama de color C.I.E.



Fuente: Dasso, I. (1986) Control de color en alimentos, sistemas numéricos de expresión. La alimentación Latinoamericana. (156) 19-25.

Entre 1950 y 1966 R.S.Hunter trata de regularizar el espacio C.I.E. basándose en la teoría de los colores opuestos, la cual postula la existencia de una especie de "interruptor" entre los receptores de la retina y el nervio óptico, de esta forma las respuestas rojas (dimensión a^{*+}) son comparadas contra los colores verdes (dimensión a^{*-}), las respuestas amarillas (dimensión b^{*+}) contra las azules (b^{*-}), y las blancas contra las negras (dimensión L). La figura 3 muestra el diagrama de color Hunter Lab donde se observa que el espacio de color tiene la forma de un prisma rectangular (8. 15).

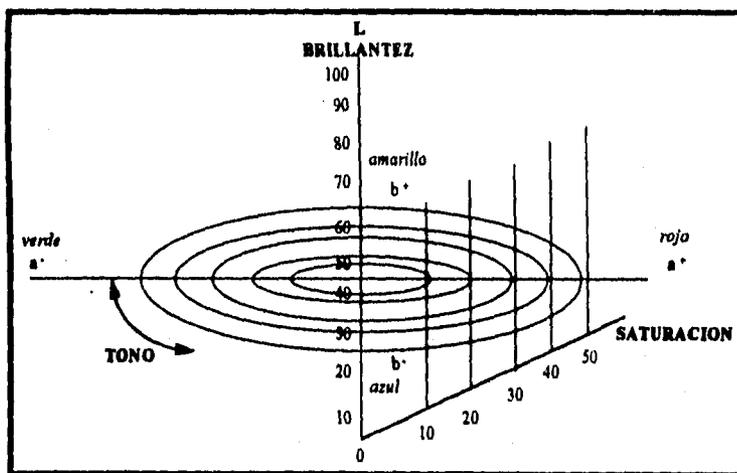
Figura 3. Diagrama de color Hunter Lab



Fuente: Minolta (1994). Manual de colorimetría, el color, sistemas de medición. Minolta Co.

En 1976 al existir deformaciones en el sistema Hunter Lab en la región de los colores amarillo-azul, C.I.E.L.A.B. cambia las coordenadas cartesianas a cilíndricas, volviéndose así el sistema de color más representativo a la sensibilidad del ojo humano. El espacio nuevo de color adopta el nombre C.I.E.L.A.B., donde intervalos iguales en el diagrama representan las mismas diferencias percibidas por el ojo. Al igual que en el sistema Hunter Lab, (L) es la brillantez y "a" y "b" son las coordenadas de cromaticidad. Lo anterior se muestra en el esquema 4.(8, 13, 40).

Figura 4. Diagrama de color C.I.E.L.A.B en tres planos.



Fuente: Minolta 1994. Manual de colorimetría, el color, sistemas de medición. Minolta Co.

También en 1976 L.C.H° utiliza el diagrama de C.I.E.L.A.B. sin embargo, éste expresa el color en forma diferente, "L" es la brillantez, "C" la cromaticidad y "H°" el ángulo de tono. Un tono rojo está representado por un ángulo de 0°, un amarillo por uno de 90° y el azul por uno de 270° (40).

1.3. Definición de colorantes.

Los colorantes son todas aquellas sustancias obtenidas a partir de vegetales, animales, minerales, microorganismos o por síntesis química, que imparten o acentúan el color; presentando cierta estabilidad dependiendo de su origen, estructura química, sustrato en el que se aplican, etc. (35,47,48).

Los colorantes presentan en su estructura química grupos funcionales que reciben el nombre de cromóforos (del griego Khroma, color) siendo éste, la principal unidad estructural de un colorante el cual absorbe la luz visible a determinada longitud de onda y es por esta capacidad de absorber la luz que aparecen como sustancias coloridas, ejemplos de estos grupos son: nitrado, nitrosado, etilénico, azo, azoxi, carbonilo, imino y quinónico (1).

Los compuestos que tienen uno o varios cromóforos reciben el nombre de cromógenos es decir, son capaces de engendrar materias colorantes.

Existen también grupos funcionales denominadas auxocromos, que son grupos sustituyentes que influyen en el tono o intensidad del color; el auxocromo puede cambiar la banda de absorción del cromóforo y tomar parte en la unión del colorante con el sustrato que va a colorear (1, 70, 69) ejemplos de éstos son grupo: hidroxilo, ácido carboxílico, sulfato ácido, carboxilo, amina primaria y amina terciaria

1.4 Clasificación.

Los colorantes empleados en alimentos se clasifican de acuerdo a su origen en sintéticos y naturales; y por su mecanismo de coloración en pigmentos y lacas (22, 47, 48, 60).

Sintéticos.- Llamados también colorantes certificados, son producidos por síntesis química, presentan alta pureza, son de bajo costo, presentan mayor estabilidad a la luz y a la temperatura ofreciendo colores variados y uniformes; la mayor parte de los colorantes sintéticos usados como aditivos alimentarios son del tipo azo y triarilmetano. Sin embargo, para su certificación requieren la aprobación de la Secretaría de Salud en México y en el caso de otras naciones de las instituciones correspondientes. En el cuadro 2 se presenta la clasificación de acuerdo al grupo químico al que pertenecen de colorantes certificados de uso en alimentos (31, 60).

Cuadro 2 Clasificación de colorantes hidrosolubles sintéticos de uso en alimentos.

NOMBRE COMUN	SINONIMO	CLASE QUIMICA	COLORACION
Amarillo No. 5	Tartrazina	Monoazo	Amarillo
Amarillo No. 6	Amarillo Ocaso	Monoazo	Naranja
Rojo No. 2	Amaranco	Monoazo	Rojo Azulado
Rojo No. 5	Carmosina	Monoazo	Rojo Azulado
Rojo No. 6	Ponceau 4R	Monoazo	Rojo Amarillo Brillante
Rojo No. 40	Rojo Aljura	Monoazo	Rojo Amarillo Brillante
Rojo No. 3	Eritrosina	Xanteno	Rosa Amarilloso
Azul No. 2	Indigo Carmin	Indigoide	Azul
Azul No. 1	Azul Brillante FCF	Triarilmetano	Azul Brillante
Café HT	Café Chocolate HT	Diazolico	Café Rojizo
Negro Brillante BN	Negro PN	Diazolico	Negro Azulado
Verde No. 3	Fast Green FCF	Triarilmetano	Azul Verdoso

Fuente: Santiago J. 1995 Colorantes para alimentos. Tecnología de Alimentos 30 (4) 30-31

Naturales.- Llamados también colorantes no certificados, son obtenidos de fuentes naturales ya sean vegetales, animales, minerales o microorganismos; debido a que se consideran inocuos están exentos de certificación (4, 7, 41). Una clasificación general de estos colorantes se muestra en el cuadro 3, en donde también se indica el origen, coloración que imparten y aplicaciones.

ANIMALES Ac. Carmínico	<i>Decylopius coccus</i>	Amarillo, rojo y púrpura.	Confitería, repostería, gelatinas, productos cárnicos, pescados, bebidas, aderezos.
Ac. Kermesico	<i>Kermes vermilio</i>	Rojo púrpura	Confitería, pastas, productos cárnicos
Rojo Armenia	<i>Porphyrophysa hamali</i>	Rojo	
MICROBIANOS Monascus	Monascus o linde de arroz malleado.	De amarillo a rojo	
INORGÁNICOS Dióxido de Titanio	Minerales: anatasa, ortohidrita, brookita, ilmenita.	Bianco brillante	Confitería, productos lácteos, aderezos, mayonesa, betunes, bebidas, repostería, harinas.
Negro Carbón	Carbón mineral.	Negro	Galletas, betunes, granito de chocolate, pastas.
Caramelo	Mezcla de CHOS: dextrosa, azúcar invertido, lactosa, jarabe de malta, miel de ploncillo, almidones hidrolizados. Todos tratados con calor.	Café perleuco.	Vinos, licores, cervezas, helados, repostería.

Fuente: (35, 57, 61, 77).

Los colorantes a su vez se clasifican en base a su solubilidad en pigmentos y lacas:

Pigmentos.- Compuesto hidrosoluble que imparten su color por disolución, son solubles en solventes polares y no polares, interaccionan con el medio, su rango de pureza comprende del 85 al 93%, presentan problemas de estabilidad, cada forma tiene las especificaciones necesarias para su uso siendo normalmente su rango de 0.01-0.03%, su tamaño de partícula corresponde al intervalo de las mallas 12 - 200, su poder tintorial es proporcional al contenido de colorante puro, entre las presentaciones comerciales están los gránulos, líquidos y pasta (9, 27, 60).

Lacas.- Son los productos elaborados por combinación, suspensión, precipitación y extensión del colorante o pigmento en un sustrato fijo como: alúmina blanco brillante, arcilla, dióxido de titanio, óxido de zinc, talco, resina, benzoato de aluminio, carbonato de calcio o cualquier combinación de dos o más de estos ingredientes, imparten su color por dispersión no interaccionando con el medio. Son más estables frente a factores físicos como

la luz y la temperatura, producen tonos más fuertes en el producto final pero tienden a la coalescencia, su tamaño de partícula corresponde a la malla 50. Son más costosos, su intervalo de uso es del 0.1 al 0.3% y su pureza está entre el 10 - 52%. Presentan una gran variedad de colores y en general son usadas en productos con base aceitosa (9, 27, 60).

1.5. Importancia del empleo de colorantes.

Entre los atributos sensoriales de los alimentos, el color es un factor que influye fundamentalmente en la aceptabilidad de los mismos, pues el consumidor tiene ya una idea de su apariencia, sabor y olor. Para que los alimentos puedan concordar con estas percepciones se permite adicionarles colorantes para hacerlos más atractivos (4, 13, 26).

Diversos estudios han demostrado que si los alimentos no tienen su color característico "no saben bien"; esto se demostró, cuando a un grupo de personas se les dieron a probar helados de color blanco pero con sabores de naranja, uva, grosella y limón, el resultado encontrado fue que la gran mayoría de las personas no pudieron identificar los sabores correctamente (11, 18, 30). Lo anterior indica que el color de un producto no solamente influye en la habilidad del consumidor para identificar el sabor sino también en su estimación de la calidad, ejemplo de esto último es en la recolección de los productos hortofrutícolas (por su grado de maduración), o al verificar si hay formación de pigmentos o pérdidas en la intensidad del color durante la elaboración y almacenamiento de los diversos alimentos. También es importante para mantener la uniformidad de color de un producto de lote a lote, ayuda a la protección de un sabor y de las vitaminas sensibles a la luz durante el almacenamiento debido a los efectos del sol y también ayuda a proporcionar apariencia atractiva a los alimentos que no lo tienen como un ejemplo de esto podemos citar a las gelatinas (23, 38).

Para asegurar la calidad homogénea de los alimentos se permite el uso de aditivos colorantes; sin embargo, un colorante no deberá emplearse para enmascarar algún defecto de fabricación, descomposición u otro. Para ser adicionado a un alimento el colorante debe cumplir con ciertas características: (19, 22, 23, 70)

- No ser tóxico a los niveles utilizados.
- Ser insaboro e inoloro.
- Tener estabilidad aceptable a la luz, pH, oxidación, reducción y actividad microbiana.
- Tener elevado poder tintóreo.
- No debe presentar problemas de reacción con algún componente del alimento en que se usa.

1.6. Legislación.

Los colorantes como cualquier otro aditivo para su uso en alimentos están sujetos a restricciones diferentes en cada país, los estudios a que se someten se llevan a cabo independientemente, por lo que cada país es libre de permitir o rechazar un determinado colorante que en otro país es aprobado o prohibido por las instituciones de salud correspondientes.

La aprobación de un colorante para su uso en alimentos está supeditada al resultado de una serie de estudios toxicológicos realizados con animales de laboratorio, entre los cuales están los de toxicidad aguda y toxicidad crónica señalándose en ambos casos si es a corto o a largo plazo; las investigaciones para dichas reglamentaciones son amplias, constantes y generan listas de aceptación y rechazo que son publicadas periódicamente. La F.D.A. (organismo regulador en U.S.A.) señala que todo colorante certificado debe cumplir con las siguientes pruebas toxicológicas: (5, 60, 70)

- Estudio subcrónico de alimentación por un periodo de 90 días en una especie no perteneciente a los roedores, generalmente perros.
- Estudios cruciales de toxicidad en ratas.
- Estudios crónicos de alimentación por lo menos en dos especies animales, por un periodo de 24 a 30 meses.
- Estudios teratológicos.
- Estudios de reproducción multigeneracional en ratones.
- Pruebas de mutagenicidad.

Las organizaciones más importantes que realizan investigaciones sobre el tema son la F.D.A. (Food and Drug Administration), C.E.E. (Comunidad Económica Europea), O.M.S. (Organización Mundial de la Salud) y la F.A.O. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), en México la Secretaría de Salud es quien regula el uso de los diversos aditivos (4, 15, 17, 53).

En el cuadro 4 se mencionan los colorantes orgánico e inorgánico naturales que se permiten en alimentos por el Reglamento de la Ley General de Salud en nuestro país (S.S.A.), los permitidos por la F.D.A., y por la C.E.E., observándose que hay colorantes que aún siendo naturales como es el caso de las clorofilas, la F.D.A. no permite su uso y la C.E.E. sí; esta diferencia en las legislaciones se debe también a problemas de tipo político-económico entre las diferentes naciones. (21, 35, 47, 48, 49).

CUADRO 4. COLORANTES NATURALES PERMITIDOS EN ALIMENTOS POR LA S.S.A., F.D.A. Y C.E.E.

COLORANTE	S.S.A.	F.D.A.	C.E.E.
ACEITE DE ZANAHORIA	SI	SI	NO
ACHIOTE(BIXINA, NORBIXINA)	SI	SI	SI
AZAFRAN (ANNATO)	SI	SI	SI
BETA-APO8CAROTENAL	SI	SI	SI
BETABEL DESHIDRATADO	SI	SI	SI
BETA CAROTENO	SI	SI	SI
CANTAXANTINA	SI	SI	SI
CARAMELO	SI	SI	SI
CLOROFILAS	NO	NO	SI
COCHINILLA	SI	SI	SI
E. COCHINILLA	SI	SI	SI
E. COLOR UVA	SI	SI	NO
E. TUGMENTO UVA	SI	SI	NO
HARINA DE SEMILLA DE ALGODON	SI	SI	NO
JUGO DE FRUTAS	SI	SI	NO
JUGO DE VEGETALES	SI	SI	NO
PIMENTON(PAPRIKA, CAPSANTINA)	SI	SI	SI
OLEORRESINA DE PAPRIKA	SI	SI	SI
RIBOFLAVINA	SI	SI	SI
RIBOFLAVINA 5 FOSFATO	SI	SI	SI
EXTER APOCAROTENICO	SI	NO	NO
XANTOFILAS	SI	NO	NO
DIOXIDO DE TITANIO	SI	SI	SI
GLUCONATO FERROSO	NO	SI	NO
OXIDO FERROSINTETICO	NO	SI	SI
ACEITE DE ENDOSPERMO DE MAIZ	NO	SI	NO
OLEORRESINA DE CURCUMA	NO	SI	SI
TARZANINA	NO	NO	SI
AMARANT	NO	NO	SI
COMPLEJOS DE COBRE DE CLOROFILAS	NO	NO	SI
CARAMELO SULFITO CAUSTICO	NO	NO	SI
CARAMELO AMONIA	NO	NO	SI
CARAMELO SULFITO DE AMONIA	NO	NO	SI
CARBON VEGETAL	NO	NO	SI
LICOPENO	NO	NO	SI
ETIL ESTER B- APO 8-AC CAROTENOICO	NO	NO	SI
LUTEINA	NO	NO	SI
BETAINAS	NO	NO	SI
ANTOCIANINAS	NO	NO	SI
CARBONATO DE CALCIO	NO	NO	SI
HARINA DE ALGAS SECAS	NO	NO	SI
TAGETES (AZTEC MARIGOLD)	NO	NO	SI
S.S.A. SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA			
F.D.A. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION			
C.E.E. COMUNIDAD ECONOMICA EUROPEA			

CAPITULO II

**ASPECTOS GENERALES SOBRE EL
COLORANTE DE COCHINILLA**

2. ASPECTOS GENERALES SOBRE EL COLORANTE DE COCHINILLA.

2.1. Historia.

El origen geográfico de la grana cochinilla se basa en dos teorías, en una sitúan su origen en la zona Mixteca del estado de Oaxaca, de donde los nopales hospederos del insecto fueron llevados a Perú durante el siglo XVII, la segunda teoría indica que fue en Perú donde se originó y fue traída a México antes de la conquista (52); otras investigaciones basadas en el estudio de los textiles de las culturas preincaicas que son más antiguas que las culturas mixteca y zapoteca de nuestro país explican que el cultivo y uso de la cochinilla surgió en ambos países antes de la llegada de los españoles (51).

La cría de la grana cochinilla en México fue iniciada desde la época de los toltecas (siglo X), principiando con la recolección de la grana fina en nopales silvestres para cultivarlas posteriormente. Las regiones y grupos relacionados con el cultivo del insecto en nuestro país comprendían: la Mixteca Alta, Zapoteca, Náhuatl y Mixteca de la Costa; la Zapoteca de Miahuatlán, la Zapoteca - Mixteca del Valle de Oaxaca; Huaxtepec y Cuahnahuac (Cuernavaca, Edo. de Morelos); los Cuicatecos y Chianatecos de la región de La Cañada y Tuxtepec; la zona de Cholula y Huejotzingo en el estado de Puebla. Los pobladores de estos lugares empleaban la cochinilla para pintar esculturas, edificios públicos y religiosos, elaboración de panes ceremoniales y coloración de telas (5, 9).

En tiempos de la conquista, el cultivo de la grana comprendía los estados de Guerrero, Tlaxcala y Oaxaca; a partir del siglo XVI el cultivo del insecto se intensificó notablemente, pues se extendió hacia Tlaxcala, Puebla, Michoacán, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Guatemala y

Nicaragua. El colorante obtenido a partir de la grana por su brillantez y diversidad de tonos constituyó en Europa un símbolo de poder, se usó para teñir lanas y sedas, las capas de los altos eclesiásticos, los ropajes de aristócratas, los uniformes del ejército de Napoleón, así como las casacas rojas del imperio británico. Se empleó también para colorear medicamentos, cosméticos, pasteles, bebidas, dulces y pinturas para artesanías (28).

Para la Nueva España la producción de cochinilla fortaleció su comercio exterior ya que fue el tercer producto de exportación después del oro y la plata. En 1572 el virrey designó un magistrado de la grana dada la importancia del producto y su comercialización, para 1575 el cultivo de la grana cochinilla era la actividad más importante del nuevo mundo, propiciando con ello prosperidad entre las comunidades dedicadas a ello. La gran demanda de cochinilla provocó que se empezara a adulterar el producto, mezclando con grana silvestre, ceniza, harina y otras sustancias promulgándose en 1590 leyes que castigaban dichos actos (9, 28).

Para el siglo XVIII en la Nueva España un 16% de la tierra quedó en manos de los indígenas, quienes producían ahí grandes volúmenes de grana como actividad complementaria a la agricultura; en tanto que las grandes extensiones de tierras ocupadas por los españoles eran dedicadas al cultivo del café, cacao y azúcar, entre otros. Para los españoles criollos y peninsulares, la grana fue un medio de enriquecimiento en tanto que para los indígenas era un medio para pagar su tributo correspondiente a la corona. A fin de conservar su monopolio, los españoles denominaban a la grana semilla o preciado fruto, logrando así la confusión en toda Europa sobre el origen del preciado colorante, pues se creía que era de origen vegetal. En Guatemala los españoles introdujeron el cultivo de la grana en Suchitepec y Amatitlán siendo entre los años de 1825 y 1870 el principal producto

de exportación de este país. A la par de estos años, la cochinilla fue llevada a otras partes de Centroamérica sin ningún éxito. También fue llevada a Cádiz y a las Islas Canarias entre 1824 y 1827, constituyendo con el tiempo para este último país una gran industria, continuando su producción hasta nuestros días.

Varios países europeos en su afán de romper el monopolio español enviaron diferentes personas para que clandestinamente estudiaran y llevaran el cultivo de la grana de Oaxaca a otros países. Durante el siglo XVIII y principios del XIX los holandeses intentaron introducir la grana de Cádiz a Java, la India, Ceylán, Sudáfrica y Australia sin ningún éxito (52, 56).

En la primera mitad del siglo XIX hubo un aumento en la oferta de la grana propiciado por Guatemala, Perú e Islas Canarias los cuales entraron al mercado mundial sumando su producción a la de México (el cual para ese momento había dejado de ser el primer productor al finalizar la colonia), lo que propició una disminución de los precios en los mercados internacionales del producto. Por otro lado en Alemania en 1845, hacen su aparición a escala industrial los tintes químicos o sintéticos derivados de las anilinas desplazando a los colorantes naturales como la rubia en Europa, el índigo en la India y a la grana cochinilla.

La disminución en los precios y demanda de la grana continuó hasta 1908, durante las primeras décadas del siglo XX el producto llegó a ser incosteable para sus productores a pesar de que estos hicieron lo posible por bajar los costos de producción. El desplazamiento del colorante de cochinilla por los colorantes sintéticos fue un proceso lento, ya que la calidad y firmeza del teñido obtenido con la grana nunca fue superado por la anilinas que a

fin de cuentas resultaron más baratas y de uso generalizado. La demanda de la grana se limitó a uso artesanal y al consumo interno de los países productores; ya que la industria textil, de cosméticos, alimentaria y farmacéutica hizo uso de los colorantes rojos sintéticos. Oaxaca fue la entidad más afectada con el decaimiento del mercado del colorante, ya que su economía giraba en torno a la producción y comercialización del mismo, pasando así a una economía de subsistencia y autoconsumo (9, 28, 56, 59).

El resurgimiento del colorante de cochinilla (*Dactylopius coccus-Costa*) se da a principios de la segunda mitad de este siglo, al descubrirse la toxicidad de algunos colorantes rojos sintéticos que se venían usando como:

- Las investigaciones realizadas con animales de laboratorio para el rojo No. 1 demostraron que el Ponceau 3R causa daño hepático cuyo efecto es mortal o provoca daños irreparables (23).
- El rojo congo o rojo No. 28, que es un derivado de la bencidina, y cuyo uso ha sido prohibido en la industria de alimentos debido a su posible teratogenicidad y carcinogenicidad; pues la bencidina producto de la reducción de los azotíntes induce el cambio en la secuencia del DNA in vitro en hepatocitos primarios de rata a muy bajas concentraciones (23).
- El rojo No. 40 contiene p-cresidina, compuesto base para su manufactura; al realizar estudios del mismo en ratas y ratones se observó la presencia de tumores cancerígenos en algunos roedores, por lo que constituye un riesgo para el ser humano (17).

- La F.D. A. en 1990 restringe el uso de la laca o rojo No. 3 al considerarse nocivo para la salud, pues causó cáncer en los roedores en cuya dieta era suministrado (15).

El panorama anterior coloca a las industrias alimentaria y farmacéutica en una situación difícil ya que los colorantes rojos son muy utilizados en diversos productos elaborados por estas industrias. Se considera que los colorantes naturales por su origen y por los niveles utilizados no son tóxicos, además de que no se han encontrado indicios de que provoquen daños a la salud (19, 21).

Con base en lo anterior, el colorante que se obtiene de la grana cochinilla, fue objeto de diversas investigaciones sobre su toxicidad; dentro de los estudios más recientes, destacan los de Mori H en 1991 y Loprieno G. en 1992, en donde reportan que el colorante de cochinilla no produce daños mutagénicos ni carcinogénicos en roedores; resultados que confirman los estudios realizados por otros investigadores (31, 42). Este colorante natural está permitido por los organismos reguladores de aditivos a nivel nacional e internacional siendo denominado (35, 48, 49) :

- Rojo natural No. 4 (Secretaría de Salud en México).
- E - 120 (Comunidad Económica Europea).
- Extracto de cochinilla, carmín. 73100 (F. D. A.).

2.2. Características de la grana.

La cochinilla es un insecto homóptero, denominado científicamente con el nombre de *Dactylopius coccus Costa* (32), vive como parásito en diferentes especies cactáceas de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, en su forma silvestre habita sobre el llamado nopal Castarrita (*Opuntia pilifera*), especie con una amplia distribución en la región mixteca. En México para su cultivo se emplean el nopal de Castilla (*Opuntia ficus indica*) y el nopal de San Gabriel (*Opuntia tormentosa*). No todas las especies de nopales pueden ser utilizados para el cultivo del insecto, el *Opuntia ficus indica* es el más apropiado para la explotación de la grana dada la succulencia de las pencas así como su fácil manejo en la infestación y cosecha del insecto ya que es la que menos espinas posee.

Dentro de las necesidades de la planta huésped están: temperaturas cálidas y precipitaciones superiores a los 200 mm anuales para poder desarrollarse, es bastante tolerante a la sequía, debido a su fuerte y extenso sistema radicular es poco exigente en la calidad de suelo desarrollándose en terrenos arcillosos cuyo pH esté entre 6 a 8.5 en presencia de materia orgánica (39).

La cochinilla es un insecto que se caracteriza por su aparato bucal modificado para la introducción del mismo en la planta y la absorción de los jugos vegetales. Dentro del orden Homóptera pertenece a la superfamilia Coccoidea, en la que también se incluyen la cochinilla algodonosa y las lapillas. Dentro de la superfamilia Coccoidea pertenece a la familia Dactylopiidae, formada por nueve especies de un solo género *Dactylopius*; previamente había sido incluida en la familia Coccidae y Pseudococcidae, hasta que en 1902 Cockerell restringió el uso del término *Dactylopius* a las cochinillas semejantes a las del carmín (39).

Costa en 1835 fue quien denominó a la cochinilla *Dactylopius coccus* siendo este el nombre que prevalece en nuestros días (56). Su clasificación taxonómica se muestra en el cuadro 4.

Cuadro (4) Clasificación taxonómica de la grana cochinilla.

Clase:	Insecta
Orden:	Homóptera.
Suborden:	Sternorrhyncha
Superfamilia:	Coccoidea
Familia:	Dactylopiidae.
Género:	Dactylopius.
Especie:	Coccus

FUENTE: (5, 51, 56)

En la cochinilla se da un gran dimorfismo sexual. En la hembra se producen dos mudas antes de llegar al estado adulto en el que pueden alcanzar los 6 mm de longitud, su cuerpo es más o menos globoso - ovalado, está compuesto de una serie de anillos, presenta pliegues intersegmentales en la porción que corresponde al abdomen; tiene antenas de 6 a 7 artejos pequeñas y cortas; sus patas son cortas; la abertura anal consiste de una hendidura transversal cuyo borde anterior presenta una banda esclerosada, esta banda no tiene aspecto celular; carece de alas y sus órganos bucales (estiletas) están conformados para recibir una alimentación líquida de las pencas de los nopales a los cuales se inserta fuertemente y viven fijadas en las superficies de estos. Su metamorfosis es incompleta. La hembra *Dactylopius coccus* se diferencia de las otras especies del mismo género, porque su cubierta cerosa es de forma pulverulenta, fácilmente desprendible, en contraste a la cubierta de las otras especies que es filamentosa como algodón y difícil de desprender.

El macho sufre tres mudas antes de llegar al estado adulto; en el que se asemeja a una mosca blanca grande (*Trialeurodes vaporariorum*), de unos 2.5 mm. Tiene un solo par de alas blanquecinas, alargadas con escasa venación. Cuerpo de color carmín con cabeza, tórax y abdomen bien diferenciados; tiene antenas largas, moniliformes con diez artejos; abdomen que termina en dos largos cercos y en cuya extremidad posterior se inserta la armadura genital, formada por un estilete filamentosos; en estado adulto carece de trompa y estiletes por lo que no toma alimento siendo su vida muy corta, la cual termina después de verificar la cópula.

A partir del comienzo de la oviposición la hembra puede vivir unos 30 días mientras que el macho adulto al no alimentarse vive tan solo 3 días, durante los cuales puede fecundar a varias hembras. Durante su desarrollo la grana o cochinilla pasa por los estados de huevo, ninfa y adulto; el estado de huevo y el de ninfa I son iguales tanto para la hembra como para el macho y es en el estado de ninfa II cuando comienzan a diferenciarse. (3, 9, 52).

La grana como producto está formada por los cuerpos secos de las hembras adultas; pues es solo de éstas de donde se obtiene un tinte carmín; su aspecto es granular y su color varía entre el gris y el negro, se distinguen dos tipos de cochinilla, la fina que es cultivada para obtener el colorante y la silvestre la cual crece sin ser cultivada. La función biológica de la grana es ignorada, aunque se le ha atribuido el papel de repulsivo de los parásitos en las plantas donde crece, así como el de reserva energética.

Una característica del género *Dactylopius* es la presencia en todas las especies de ácido carmínico en distintas proporciones. Este ácido es el constituyente esencial del carmín y de otros colorantes preparados de amplio uso en alimentos, cosméticos y fármacos.

El cuerpo del insecto esta compuesto de tres capas: epicutícula (constituida fundamentalmente de proteína endurecida y que contiene también ceras), exocutícula (capa gruesa formada por quitina y proteínas impregnadas por compuestos fenólicos que dan como resultado un material duro que es el que proporciona a la cutícula su rigidez) y endocutícula (capa más gruesa se conserva blanda y flexible, también contiene quitina y proteínas) (6, 14). El mayor contenido en ácido carmínico se da en la especie *Dactylopius coccus*, siendo aproximadamente de un 10 a un 20%, también ésta presenta un 40% de materia proteica, 10% de grasas, 2% de ceras y un 2% de cenizas (59, 62). La quitina es un polisacárido nitrogenado que supone desde el 25 hasta el 60% del peso seco de la cutícula (6, 14). En el comercio mundial se manejan dos grados de calidad para la cochinilla seca, los cuales se basan en los requisitos del cuadro 6 (5, 52, 59).

Cuadro 6. Grados de calidad para la comercialización de la grana.

	1a. Calidad	2a. Calidad
Humedad (máx)	11%	11%
Cenizas (máx)	5%	12%
Ac. Carmínico (mín.)	20%	15%
Impurezas (máx.)	5%	8%

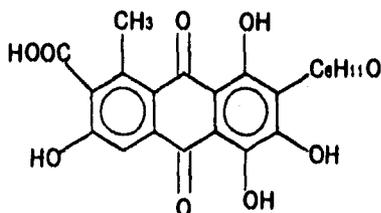
FUENTE: (52, 59)

2.3. Productos derivados de la grana cochinilla.

2.3.1. Acido Carmínico.

El ácido carmínico, es el principio activo del colorante y es una antraquinona derivada la cual está ligada a una molécula de glucosa, esta unión en común con otros compuestos C-glucosídicos le transfiere resistencia a la hidrólisis ácida; se considera que la ligadura C-glucosil es la que le confiere la habilidad al ácido carmínico para formar complejos con una gran variedad de metales para dar lugar al carmín como se verá en el punto 2.3.3.; su peso molecular es de 492.4 gr./mol y su estructura se muestra en la figura 5:

Figura 5. Estructura del ácido carmínico:



FUENTE: (36, 44).

El ácido carmínico presenta las siguientes características físicas y químicas:

- Buena solubilidad en agua y etanol.
- Soluble en otros alcoholes, éster, ácido sulfúrico concentrado y soluciones alcalinas.
- Insoluble en éter de petróleo, benceno y cloroformo.
- Comienza a tornarse café a 135°C y se descompone a 205°C.
- Es estable a la luz y al calor.
- A pH de 4.8 presenta una coloración rojo-amarillo, rojo magenta a pH neutro y rojo azulado o violeta a pH alcalino.
- En forma pura es fácilmente dializable.

La obtención del ácido carmínico puro, involucra un proceso muy costoso y se puede realizar formando un complejo insoluble con plomo por tratamiento con una solución acuosa de enzimas proteolíticas en presencia de un adecuado agente surfactante, realizándose la purificación por cromatografía de intercambio iónico. Por la toxicidad y el costo de este proceso no se emplea el ácido carmínico puro en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmetológica. (24, 44, 62, 68).

2.3.2. Extracto de cochinilla.

Se denomina extracto de cochinilla a la solución concentrada que se obtiene después de eliminar el alcohol que se emplea de un extracto alcohólico acuoso. Presenta buena estabilidad a la luz y a la oxidación, posee una coloración que varía del anaranjado al rojo dependiendo del pH y los niveles de uso que están permitidos son de 25 a 1000 ppm (20, 28, 68).

Las especificaciones químicas para el extracto según F.D.A. son:

pH (a 25°C).	5 - 5.5
Proteínas (N x 6.25).	2.2% máximo
Sólidos totales.	5.7 - 6.3
Alcohol metílico.	150 ppm máximo
Plomo	10 ppm máximo
Arsénico.	1 ppm máximo
Ac. carmínico.	1.8% mínimo
Microorganismos viables de Salmonella	Ninguno.

2.3.3. Carmín.

El carmín es la laca de aluminio del ácido carmínico que se obtiene al formar un complejo entre el ácido y el aluminio, es de color rojo magenta y debe cumplir con las siguientes especificaciones marcadas por F.D.A.:

Material volátil.(135°C por 3 hr.)	20%
Ceniza.	12%
Plomo.	10 ppm máximo
Arsénico	1 ppm máximo
Ac. Carmínico	50% mínimo
Microorganismos viables de Salmonella.	Ninguno

Las presentaciones comerciales del carmín, características y ejemplos de uso se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Presentaciones Comerciales del Carmín.

PRESENTACION COMERCIAL	CARACTERISTICAS	USOS
Carmín ácido estable	Colorante que posee una coloración rojiza clara, ligeramente viscosa, presenta un mínimo de 2.5% de ácido carmínico. Disponible únicamente en polvo.	Se utiliza en productos de pH bajo y en donde la base principal sea agua o alcohol ejemplos: bebidas fermentadas, base para bebidas, aderezos para ensaladas.
Carmín ácido líquido.	Solución color rojo magenta, compuesto por carmín, agua, hidróxido de amonio, sodio y glicerina, contiene como mínimo 3.3% de ácido carmínico.	Diseñado para alimentos con un pH superior a 3.0 ejemplo: yoghurts, malteadas.
Carmín laca	De color rojo magenta, tiene como mínimo 50% de ácido carmínico.	Se puede emplear en productos de base aceitosa independientemente del pH, ejemplo: productos farmacéuticos, cosméticos, confitería.

FUENTE: (54, 66)

La habilidad del ácido carmínico para formar complejos con metales es explotada en la manufactura de carmines, el carmín procesado adquiere diferentes coloraciones dependiendo de la sal metálica a la que esté unido ejemplos de esto se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Coloraciones adquiridas por el carmín dependiendo la sal metálica empleada.

Sal metálica	Color Obtenido
Aluminio	Escarlata
Alumbre	Carmesí
Bario	Violeta mate.
Cromo	Púrpura.
Fierro	Rojo grisáceo
Magnesio	Rosado.
Mercurio	Escarlata.
Plomo	Rojo pardusco.
Uranio	Verde.
Sodio	Rojo
Zinc	Carmesí

FUENTE: (49)

De los complejos formados con las diferentes sales metálicas, aquellas con aluminio son los que en la rama de alimentos, farmacéutica y cosmética se prefieren, los carmines obtenidos por ejemplo con las sales de mercurio o plomo por la toxicidad de dichas sales no son permitidos en productos de uso directo con el hombre.

Estudios hechos por Schul 1992 han demostrado que el carmín es estable en un amplio rango de pH siendo comparable su estabilidad a la del rojo No. 2 en bebidas carbonatadas

(62).

Los carmines pueden ser aislados en forma directamente soluble en solventes base-agua a altas temperaturas o en forma insoluble bajo un pH inferior a 7.0 por adición de una sal de calcio a la solución final.

Han sido publicadas muchas técnicas para la obtención del extracto y carmín de cochinilla, sin embargo es de forma muy general y nunca detalladamente, ya que las condiciones de proceso son celosamente guardadas por cada industria o investigador (1, 20, 68).

2.4. Aplicaciones de los derivados de la grana.

Las aplicaciones de los derivados de la grana cochinilla se han incrementado en los últimos años como ya se explicó en el capítulo anterior dadas las restricciones de uso por los organismos de salud de algunos colorantes rojos sintéticos, en el cuadro 9 pueden observarse la gran variedad de usos para el extracto y el carmín, cabe mencionar que el ácido carmínico al ser una forma más pura que el extracto y la laca, se usa principalmente en análisis de laboratorio y tñido de tejidos histológicos (21,33, 44).

Cuadro 9. Usos de los derivados de la grana.

Producto	Uso
Extracto de cochinilla	Bebidas carbonatadas Productos cárnicos Especias Confiteria Industria Textil
Carmín	Bebidas alcohólicas: sidra, vino. Vermouth Jugos de frutas Bebidas carbonatadas Confituras Jaleas y mermeladas. Frutas en almibar: cerezas, zarzamoras. Vinagres Productos cárnicos Yoghurt Kefir Malteadas Raspados Helados Gelatinas Budines Salsas Recubrimientos de repostería Industria textil
Acido carmínico	Colorante nuclear para cromosomas Tñido de glucógeno Fotografía a color Agente complejante de cationes Indicador químico de reacciones ácido - base y de Oxido - reducción Técnicas microbiológicas Tñido de tejidos nerviosos

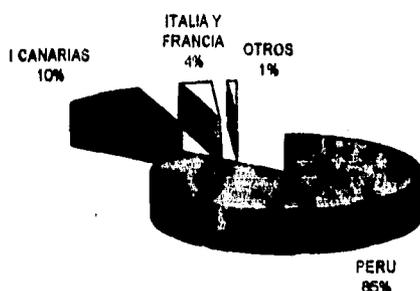
FUENTE: (33, 44)

2.5. Aspecto comercial de la grana y de sus derivados.

2.5.1. Mercado Mundial.

En el mercado internacional países como Francia, Japón e Inglaterra consumen anualmente 125 toneladas de pigmento y laca de cochinilla y en menor proporción 30 toneladas por año, Bélgica, Alemania, Italia y Argentina. Este consumo lo abastecen los países productores quedando todavía demanda por cubrir (28, 63). Actualmente Perú es el principal productor y exportador de grana cochinilla y carmín, en 1993, produjo el 85% del total de cochinilla en el mercado mundial, seguido con un menor porcentaje por Islas Canarias, Francia e Italia; logrando estos últimos tener autosuficiencia en el producto; lo anterior se visualiza en la gráfica 7:

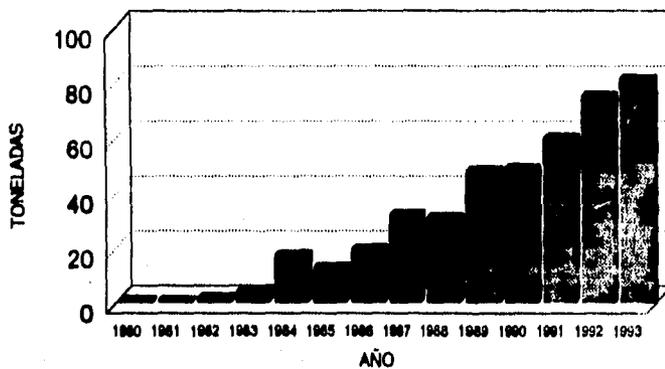
Gráfica 7. Principales países productores de grana cochinilla.



Fuente: Secretaría de Comercio y Fomento Industrial Junio 1995.

En la década de los setentas, año con año Perú había tenido un ligero incremento en las exportaciones del carmín, pero alrededor de los ochentas cuando la F.D.A. prohíbe el uso del colorante rojo No.3 las exportaciones de carmín comienzan a incrementarse considerablemente como se muestra en la gráfica 8:

Gráfica 8. Exportación en Perú de Carmín .



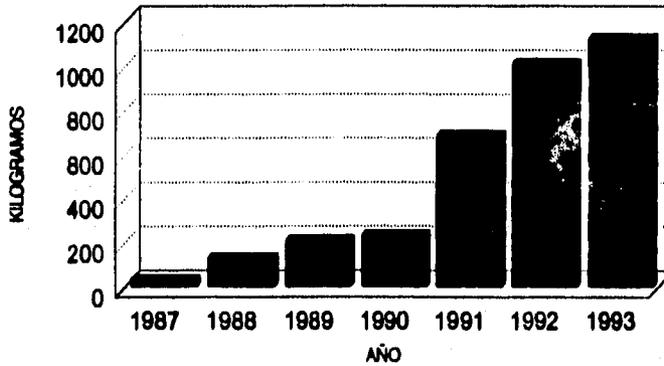
Fuente: Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

Los principales demandantes en los ochentas que absorbieron la producción total de carmin fueron Estados Unidos, Brasil, Alemania y Francia; comprando en menor cantidad Inglaterra, Japón y México, entre otros (45, 63).

2.5.2. Situación actual en México.

La producción de grana cochinilla en nuestro país decayó con la entrada de los colorantes sintéticos; lamentablemente después de que en la época de la colonia era la grana, el tercer producto de exportación después del oro y la plata y de que México era el principal productor mundial de la Nueva España (5, 32), actualmente la producción es muy baja realizándose únicamente en el estado de Oaxaca, siendo los principales demandantes los artesanos de la rama textil. En los últimos años México ha importado el colorante principalmente de Perú, Francia, Estados Unidos y Alemania (63), como se muestra en la gráfica 9.

Gráfica 9. Importaciones de carmín realizadas por México.



Fuente: Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

De esta gráfica se ve que las importaciones van en aumento, los organismos correspondientes en el país deberían de fomentar la producción de la grana y establecer un proceso de obtención del extracto y del carmín a partir de ésta tratando así de sustituir con nuestra producción la demanda nacional que es satisfecha como ya se comentó vía importaciones.

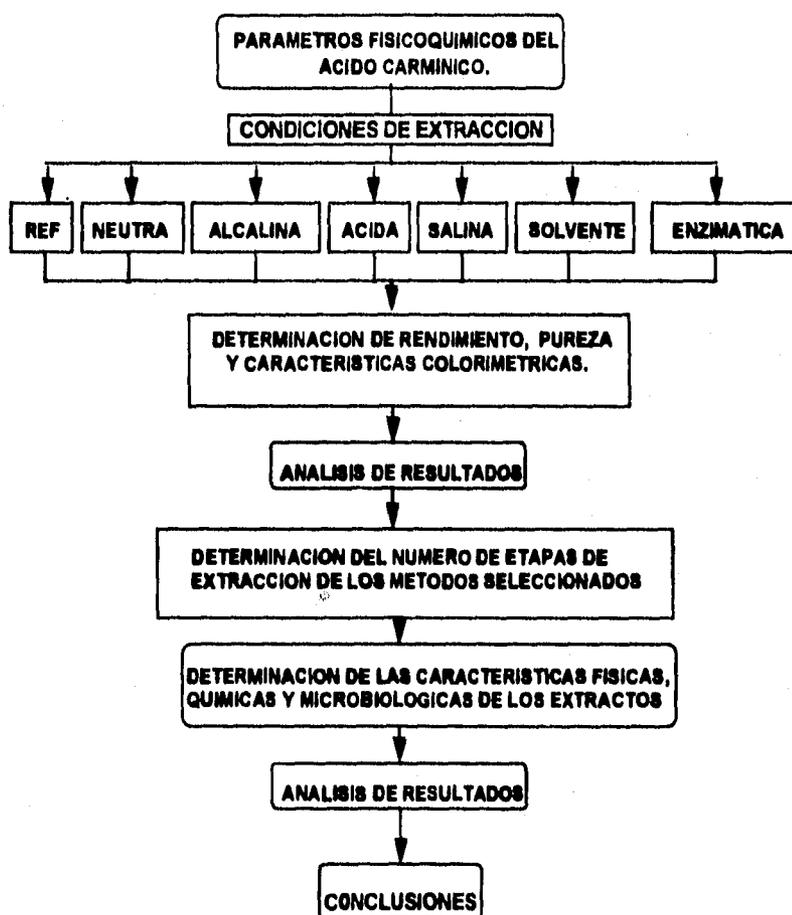
CAPITULO III

DISEÑO EXPERIMENTAL

3. Diseño Experimental.

En el siguiente cuadro se presenta el desarrollo metodológico de la parte experimental del presente trabajo.

Cuadro 10 . Cuadro Metodológico.



3.1. Parámetros fisicoquímicos.

3.1.1. Estabilidad al pH.

Se prepararon soluciones 0.001 molar con un estándar al 90% de ácido carmínico proporcionado por Tlaponochestli Q.P. en amortiguadores de glicina, para valores de pH de 2 y 3; de acetato para 4 y 5 y de fosfatos para 6,7,8,9,10 y 10.8. A cada solución se le realizó un barrido en un espectrofotómetro Beckman DU-64 desde 250 hasta 700 nm cada 15 minutos durante 75 minutos a fin de monitorear cómo se modificaban los máximos de absorción para cada valor de pH; se calculó a cada una de las absorbancias obtenidas el porcentaje de pigmento remanente y se graficaron estos datos en función del tiempo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DE PIGMENTO REMANENTE} = \frac{\text{valor de abs al tiempo } x}{\text{valor de abs inicial}} \times 100$$

Paralelamente, estas soluciones fueron leídas en un colorímetro Minolta CT-300 obteniéndose así las características de intensidad (L) y cromaticidad (a y b) de las mismas según el sistema o espacio de color C.I.E.L.A.B..

Análisis estadístico.

A los datos obtenidos se les calculó la media (μ), la desviación estándar (S) y con el valor de $t_{0.05} (2) = 4.303$, se calcularon los límites de confiabilidad $\mu \pm S t_{0.05} (GL)$; para poder determinar cuáles repeticiones se encuentran dentro de los intervalos de aceptación y sólo utilizar aquellos valores que se encuentren dentro de éste (33).

3.1.2. Punto de equivalencia y longitud de onda de máxima absorbancia.

Una solución 0.01 molar del estándar de ácido carmínico se valoró por titulación potenciométrica con hidróxido de sodio 0.1 molar graficando el pH obtenido en función de los mililitros NaOH adicionados a fin de encontrar el punto de equivalencia del ácido. Una vez establecido el mismo, se preparó una solución del estándar a dicho pH y se le realizó un barrido desde 250 a 700 nm a fin de determinar la longitud de onda en el máximo de absorción.

Análisis estadístico.

A los datos obtenidos se les calculó la media (μ), la desviación estándar (S) y con el valor de $t_{0.05(2)} = 4.303$, se calcularon los límites de confiabilidad $\mu \pm S t_{0.05(2)}$, para poder determinar cuáles repeticiones se encuentran dentro de los intervalos de aceptación y sólo utilizar aquellos valores que se encuentren dentro de éste (55).

3.1.3. Coeficiente de extinción molar.

Con base en el pH de equivalencia encontrado se preparó con el estándar y solución amortiguadora de fosfatos una curva de calibración desde 10 $\mu\text{g/ml}$ hasta 100 $\mu\text{g/ml}$, leyéndose la absorbancia correspondiente en un espectrofotómetro a la longitud de onda previamente establecida. Se graficó la absorbancia obtenida en función de la concentración de ácido carmínico, con esta gráfica se cuantificó la concentración de ácido carmínico (principio activo del colorante) presente en los extractos, necesario para los cálculos de porcentaje de rendimiento y porcentaje de ensayo.

A estas soluciones también se les determinó las características de intensidad y cromaticidad; estas gráficas permitieron comparar los atributos del color de los diferentes extractos con respecto al colorante estándar.

A la par se preparó otra curva a las mismas concentraciones de ácido carmínico del caso anterior pero empleando ácido clorhídrico 2.0 normal, leyéndose la absorbancia a 494 nm de acuerdo al método estándar del Food Chemical Codex (F.C.C.). Las diferentes concentraciones se dividieron entre el peso molecular del ácido carmínico y los resultados (mg/mmol) se graficaron contra la absorbancia correspondiente, la pendiente de las rectas obtenidas representa el coeficiente de extinción molar (ϵ) (65, 72).

Análisis estadístico.

A los datos obtenidos se les calculó la media (μ), la desviación estándar (S) y con el valor de $t_{0.05} (2) = 4.303$, se calcularon los límites de confiabilidad $\mu \pm S t_{0.05} (GL)$; para poder determinar cuáles repeticiones se encuentran dentro de los intervalos de aceptación y sólo utilizar aquellos valores que se encuentren dentro de éste (55).

3.2. Métodos de extracción del ácido carmínico.

Tomando en cuenta la forma en que se encuentra el colorante en diversos crustáceos, es probable que el ácido carmínico en la cochinilla (cuya estructura es similar a la de los crustáceos) se encuentre ya sea en su forma libre y/o unido a las proteínas (10, 34, 64) dicha unión se supone de dos formas:

- El ácido carmínico se encuentra esterificado con proteínas, su ácido carboxílico se halla unido a algún grupo amino-terminal (34).
- En forma de complejo, las proteínas tienen encapsulado al colorante, es decir, el ácido carmínico actúa como un grupo prostético, unido no solo por el grupo carboxílico sino también por los grupos ceto, hidroxilo y la glucosa de su estructura a grupos amino y/o carboxilo de las proteínas y péptidos (10, 64)

Con base en lo anterior se procedió a separar el ácido carmínico de las proteínas utilizando dos procedimientos:

- ◆ Hidrólisis de proteínas.- Partiendo de que los enlaces peptídicos son fácilmente hidrolizables en condiciones extremas de pH (ácidos ó alcalinos) o por medio del uso de enzimas proteolíticas. Suponiendo la esterificación del colorante con péptidos o proteínas de los cuales se desconoce su sensibilidad a condiciones de pH o si existen los aminoácidos que sirven como sitio de reconocimiento para la actividad de una enzima determinada se probaron las tres condiciones: hidrólisis ácida, alcalina y enzimática con las enzimas: Proteinasa K y Papaina (29, 38).
- ◆ Solubilizando el complejo proteína -colorante por medio de sales.- Variando tipo de sales y fuerza iónica del sistema, con agentes quelantes o por solventes (etanol) (29). El uso de agentes quelantes respondió a la suposición de que las proteínas que encapsulan al colorante se encuentran "ancladas" a la estructura celular mediante interacciones con iones calcio y magnesio y al ser retirados estos del medio se provoca la liberación de la

proteína, en este sentido el EDTA es un agente quelante que es capaz de secuestrar estos iones permitiendo la liberación de la proteína de la superficie celular separándose así el colorante.

En todos los casos se pretendió aumentar el rendimiento en la extracción, al aumentar la temperatura del sistema y disminuir el tamaño de partícula de la grana.

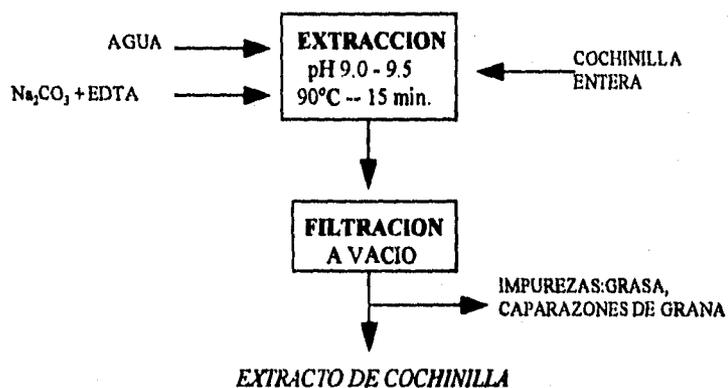
A partir de un gramo de grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) se efectuó la extracción del ácido carminico empleándose 6 métodos de extracción: hidrólisis ácida, alcalina, neutra, enzimática, por solventes y salina. Al variar el tamaño de partícula de la grana, la temperatura, tipo de sales, tipo de enzima y concentraciones se tenían 52 formas de extracción diferentes las cuales se compararon con un método de referencia.

Para la grana pulverizada se realizó una molienda y se determinó el tamaño promedio de la partícula (anexo 1). Las condiciones de cada uno de los métodos de extracción son:

Soluciones de extracción:

I. Extracción de Referencia: Se emplearon 50 ml de solución extractora (EDTA 3.42 mM y Na_2CO_3 94.34 mM a pH de 9.5), se usa la grana entera, la temperatura de extracción es de 95°C con agitación a 100 rpm, el tiempo de extracción es de 15 minutos. Después de la extracción se filtró a vacío usando celita de flujo rápido como ayuda filtro (44, 59).

Cuadro 11. Diagrama de bloques del método de referencia para la obtención de extracto de cochinilla.



2. Extracción Alcalina: EDTA 3.42 mM y Na₂CO₃ 94.34 mM.

3. Extracción ácida: HCl 2N.(pH = 3.0)

4. Extracciones salinas:

4.1 HCl 1.81 N y NaCl 94.34 mM.

4.2 HCl 1.62 N y NaCl 188.69 mM.

4.3 HCl 2 N y EDTA 3.42 mM.

4.4 HCl 2 N y EDTA 6.84 mM.

4.5 HCl 1.81 N, NaCl 94.34 mM y EDTA 3.42 mM.

4.6 HCl 1.62 N, NaCl 188.69 mM y EDTA 6.84 mM.

4.7 Amortiguador de fosfatos 0.15 M, pH 7.0.(extracción neutra).

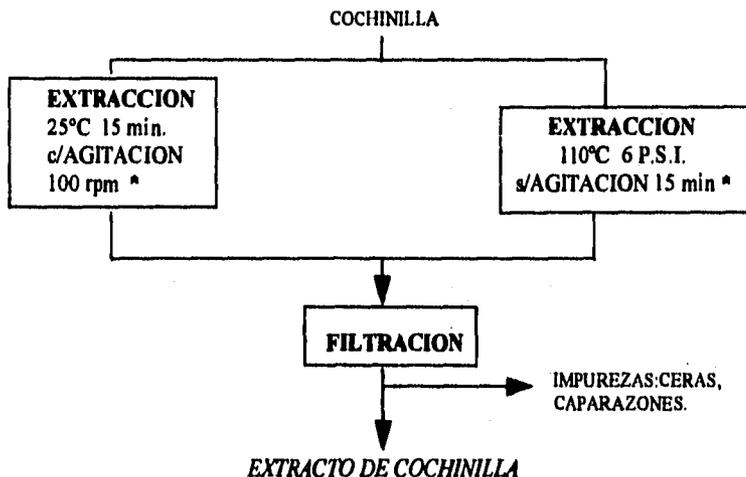
4.8 A. de fosfatos 0.15 M y Na₂CO₃ 94.34 mM.

4.9 A. de fosfatos 0.15 M y Na₂CO₃ 188.69 mM.

- 4.10** A. de fosfatos 0.15 M y EDTA 3.42 mM.
- 4.11** A. de fosfatos 0.15 M y EDTA 6.84 mM.
- 4.12** A. de fosfatos 0.15 M, Na_2CO_3 94.34 mM y EDTA 3.42 mM.
- 4.13** A. de fosfatos 0.15 M, Na_2CO_3 188.69 mM y EDTA 6.84 mM.
- 4.14** NaCl 150.58 mM.
- 4.15** NaCl 284 mM.
- 4.16** NaCl 150.58 mM y EDTA 3.42 mM.
- 4.17** NaCl 150.58 mM y EDTA 6.84 mM.

Para los métodos 2.0 al 4.17 la extracción se realizó a partir de un gramo de grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) usando dos tamaños de partícula, entera y en polvo (0.7 mm de diámetro promedio); para cada caso se usaron 50 ml de solución extractora, el tiempo de extracción fue de 15 minutos y se manejaron dos temperaturas: 25°C con agitación a 100 rpm y 110°C. Después de la extracción, los extractos eran filtrados a vacío usando celita de flujo rápido como ayudafiltro. El cuadro 12 muestra el diagrama de bloques utilizado en los casos del 2.0 al 4.17.

Cuadro 12. Diagrama de bloques para la obtención de ácido carmínico bajo diferentes condiciones en la extracción.



* La extracción se hizo empleando cada uno de los diferentes métodos (2.0 - 4.17) anteriormente citados, para la grana entera (6 mm) como con la grana pulverizada (0.7mm de diámetro promedio de partícula).

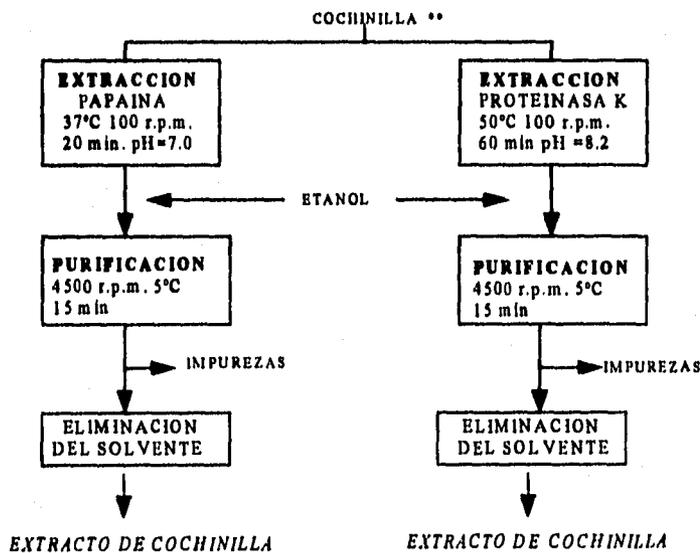
5. Extracciones enzimáticas:

5.1. Extracción con Papaina: se emplearon 7.6 µl enzima/ml, a 37°C con agitación a 100 rpm durante 20 minutos, con 50 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.4 M a pH 7.0 (58)

5.2. Extracción con Proteinasa K: se utilizaron 10 µl enzima/ml, a 50°C con agitación a 100 r.p.m. durante 60 minutos, con 50 ml de solución amortiguadora de: 50 mM Trizma base, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM EDTA., a pH de 8.2 (58).

Para ambas enzimas proteolíticas se usó la grana entera y la grana pulverizada (0.7 mm de diámetro de partícula). A fin de inactivar y precipitar a la enzima, después de la extracción se adicionaron 200 ml de etanol al 96%, el tiempo de contacto entre el solvente y el extracto fue de 12 horas, para la purificación se centrifugó a 4500 r.p.m. a 5°C por 15 minutos. Se decantó y se eliminó el etanol en un rotavapor a presión reducida, obteniéndose de 45 a 50 ml de producto final (10, 34, 64), todo el proceso bajo las condiciones de temperatura, pH y concentración de enzima recomendadas por Robyt F.J 1990. El cuadro 13 muestra el diagrama de bloques para la obtención del ácido carmínico empleando enzimas proteolíticas para la extracción.

Cuadro 13. Diagrama de bloques para la obtención de ácido carmínico empleando enzimas proteolíticas.



** Se empleó cochinilla entera y cochinilla en polvo (0.7 mm de diámetro promedio de partícula) para ambos tipos de enzimas

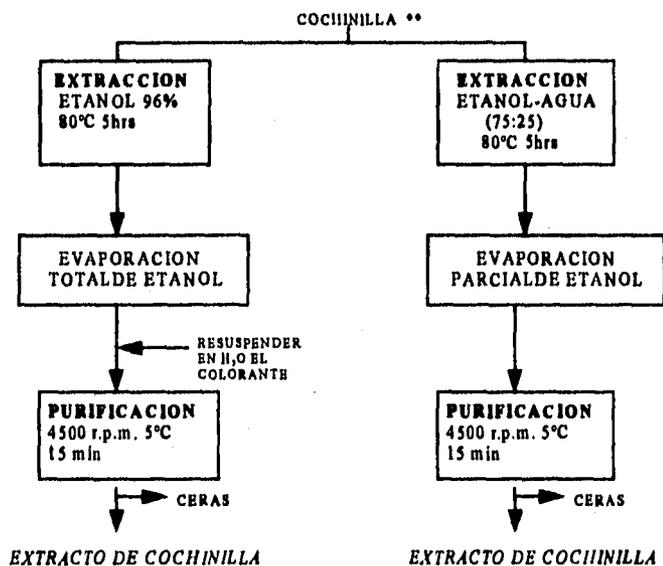
6. Extracción con solventes.

6.1. Etanol 96%

6.2. Etanol - agua (75:25 %).

Para las extracciones con solventes se utilizaron 200 ml de las soluciones antes señaladas, tanto para la grana entera como pulverizada, a 80°C por cinco horas usando un sistema de extracción tipo Soxhlet. Después de la extracción, el solvente se eliminó en su totalidad en un rotavapor a presión reducida en los extractos con etanol al 96%, para después disolver el colorante seco adherido al matraz con 50 ml de agua; en los extractos con etanol al 75% se eliminó el solvente hasta tener aproximadamente 50 ml de extracto. Posteriormente se centrifugaron ambos extractos a 4500 r.p.m. a 5°C por 15 minutos obteniéndose el sobrenadante, todo esto con el fin de purificar los extractos (9, 10, 20). El cuadro 14 muestra el proceso de extracción de ácido carmínico empleando solventes.

Cuadro 14. Diagrama de bloques del proceso de extracción de ácido carmínico empleando solventes.



** Se empleó cochinilla entera (6 mm) y cochinilla en polvo (0.7 mm de diámetro promedio de partícula) para ambos tipos de enzima

3.3. Determinación del % de rendimiento de ácido carmínico.

Se tomaron 240 µl de cada extracto y se aforaron a 12 ml con amortiguador de fosfatos a pH 7.2 y se leyó la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro. Las absorbancias obtenidas se interpolaron en la gráfica de absorbancia en función de la concentración de ácido carmínico (µg/ml) , para conocer el contenido de ácido carmínico de cada extracto (My).

El porcentaje de rendimiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{mg. ác. carmínico obtenidos}}{\text{mg. de cochinilla iniciales.}} \times 100$$

3.4. Determinación del % de ensayo de los extractos libre de sales.

Se colocaron en cajas de vidrio a peso constante (M1), 5 ml de cada extracto.

Se secaron en una estufa a 70°C durante 5 horas, se dejaron enfriar y se pesaron (M2).

De cada una de las soluciones de extracción empleadas se hizo un blanco del cual se tomaron 5 ml y se secaron a 70°C en cajas de vidrio y posteriormente se pesaron (M3).

El porcentaje de ensayo de ácido carmínico libre de sales se calculó:

$$My = M2 - M1$$

$$Mz = M3 - M1$$

$$Mx = My - Mz$$

donde: Mx = mg. de colorante obtenido en el extracto.

$$\% \text{ de Ensayo} \\ \text{(libre de sales)} = \frac{\text{mg. de ác. carmínico obtenidos}}{\text{mg. de colorante obtenido en el extracto}} \times 100$$

3.5. Determinación de las características colorimétricas:

Se determinaron las características colorimétricas: brillantez (L) y cromaticidad (a y b) de los extractos en el colorímetro Minolta CT-300, según el sistema C.I.E.L.A.B..

Análisis estadístico.

A los porcentajes de rendimiento y ensayo (libre de sales), de ácido carmínico en los extractos obtenidos se les analizó estadísticamente con ayuda del programa de: mínimos cuadrados (LSMeans), con un nivel de confianza del 95%, se tenían las dos siguientes hipótesis para las medias de los diferentes datos:

Hipótesis nula: las medias son iguales: $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$

Hipótesis alternativa: las medias son diferentes: $H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \neq \mu_k$

Suponiendo que la hipótesis alternativa era la correcta, con el mismo programa estadístico se trataron los datos para ver el efecto en la extracción del ácido carmínico de cada uno de los factores bajo estudio (temperatura, tamaño de partícula, concentración y tipo de medio) y conocer también cuál método de extracción era el óptimo al compararse las medias con el método de referencia, teniéndose el arreglo factorial del cuadro 15 que se muestra en la siguiente página (35).

Cuadro 15. Arreglo factorial propuesto para el análisis estadístico de los métodos de extracción.

METODO DE EXTRACCION	ARREGLO FACTORIAL	FACTOR A ANALIZAR
BLOQUE 1 ACIDO NEUTRO ALCALINO	2 X 2 X 3	TAMAÑO DE PARTICULA (ENTERA Y POLVO) TEMPERATURA (25° Y 110°C) MEDIO (SOL. DE EXTRACCION)
BLOQUE 2 ENZIMATICO	2 X 2	TAMAÑO DE PARTICULA (ENTERA Y POLVO) TIPO DE ENZIMA (PAPAINA Y PROTEINASA K)
BLOQUE 3 SOLVENTES	2 X 2	TAMAÑO DE PARTICULA (ENTERA Y POLVO) CONCENTRACION (75% ETANOL - AGUA 96% ETANOL)
BLOQUE 4 SALINO	2 X 2 X 8	TEMPERATURA (25° Y 110°C) CONCENTRACION DE SALES TIPO DE SALES (Na ₂ CO ₃ , NaCl, EDTA, PO ⁴ Y LA MEZCLA DE ESTAS)

3.6. Determinación del número de etapas de extracción.

De los métodos de extracción que resultaron con mayor rendimiento y ensayo, se determinó el número de etapas de extracción convenientes para cada proceso; calculándose los mg. de ácido carmínico obtenidos en cada etapa y leyéndose las características colorimétricas de los extractos obtenidos; independientemente de la temperatura (25° o 110°C), o del tamaño de partícula (grana entera o grana pulverizada 0.7mm de diámetro promedio de partícula).

Análisis estadístico.

A los porcentajes de ácido carmínico obtenidos en cada etapa de extracción para los diferentes métodos utilizados, se les realizó una prueba de rango múltiple por el método de Tukey al 95% de confianza para ver si había diferencias significativas entre ellos (55).

3.7. Determinación de las características físicas, químicas y microbiológicas de los extractos.

A los extractos seleccionados según el análisis estadístico se les determinó las características colorimétricas, así como todas aquellas especificaciones que señala la F.D.A. para aceptar el colorante, estas especificaciones son:

- pH (potenciométricamente).
- Sólidos totales (por gravimetría).
- Contenido de ácido carmínico (anexo 2)

- **Presencia de metales pesados (arsénico y plomo).** Por espectrofotometría de absorción atómica empleándose las siguientes condiciones: Espectrofotómetro de absorción atómica GBC modelo 902. Horno de grafito, empleando lámparas de cátodo hueco en ambos casos, para el arsénico se leyó la absorbancia a 193.7 nm y para plomo a 217 nm. (46, 48).
- **Proteína (Kjeldahl).**
- **Microorganismos viables de Salmonella (método estándar).**

3.7.1. Análisis de los extractos por cromatografía líquida de alta presión..

Se realizó el HPLC de los extractos para cuantificar el contenido de ácido carmínico y caracterizar los extractos. Para el presente trabajo se empleó :Cromatógrafo LDC Analytical con detector Spectromonitor UV/VIS 3100, siendo la fase móvil: mezcla agua - metanol - ácido fosfórico al 5% 40:50:10; con una velocidad de flujo de 1 ml/min; la fase estacionaria: columna no polar C- 18 Perkin Elmer (-Si-C₁₈H₃₇), de 3 mm de I.D. X 8 cm de largo; la detección se hizo a 275 nm. (75, 76).

CAPITULO IV

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.0 Análisis y discusión de Resultados

4.1 Parámetros fisicoquímicos

4.1.1. Estabilidad al pH.

En la tabla 16 tenemos los valores de longitud de onda de máxima absorción del ácido carnínico en función del pH del medio; se observa que la longitud de onda se modifica con el pH, y que existen dos longitudes de onda en todos los casos al existir picos de asimetría. La antraquinona que forma al ácido carnínico se modifica por efecto del pH del medio en el que se encuentra, pasando de su forma enólica a su forma ceto afectando con ello el máximo de longitud de onda, este efecto se refleja en general en las características colorimétricas. En algunos valores de pH se presentan picos de asimetría "este doble pico" se debe a que la estructura antraquinónica del ácido carnínico al estar en solución acuosa está como mezcla en equilibrio en dos formas isoméricas, la forma ceto y la forma enol, comúnmente a este tipo de isomerismo se le llama tautomerismo; la interconversión de estas formas se cataliza con un ácido o una base. En medio ácido la estructura se encuentra protonada, existe la presencia del tautómero estando en mayor proporción la forma enólica que la ceto y hay una baja resonancia; a medida que el pH aumenta una de las formas es más predominante además de que en medio alcalino hay una gran des-protonación en la estructura, incrementándose la resonancia, teniendo así uno de los picos mayor valor de absorción que el otro. Este cambio en la estructura de resonancia se refleja en las características colorimétricas del ácido carnínico así como en su estabilidad (43, 66)

Cuadro 16 Longitud de onda de máxima absorción en función del pH para el ácido carmínico

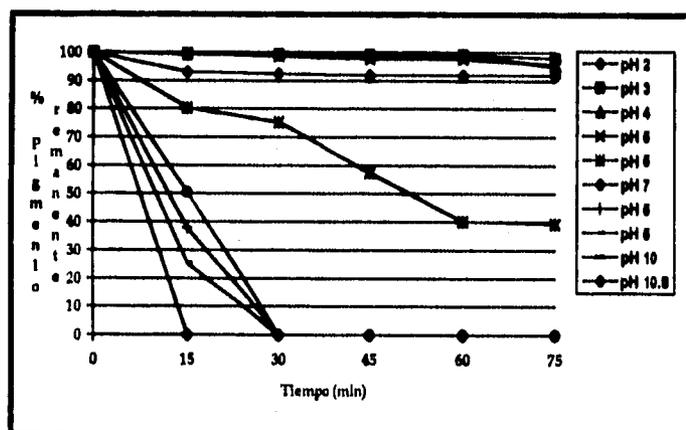
pH	Longitud de onda de máxima absorción	
	λ (nm)	
2.0	483	
	558*	
3.0	483	
	558*	
4.0	483	
	558*	
5.0	494	
	558*	
6.0	520	
	558*	
7.0	530	
	558*	
8.0	530	
	558*	
9.0	542	
	565	
10.0	535	
	565	
10.8	532	
	565	

* No definido.

Los datos de la cinética de degradación del ácido carmínico en función del pH del medio se muestran en la gráfica 9. Se observa que a pH de 7.0 el color se degrada en tan solo 15 minutos quedando un porcentaje de pigmento remanente del 50%, siendo menor a pH de 8.0 y 9.0 con un 37.9% y un 25.32% respectivamente; la degradación es completa durante los primeros 15 minutos a pH de 10.0 y 10.8; a pH ácido el colorante muestra gran estabilidad principalmente en el intervalo de pH de 3.0 a 5.0 y esto se debe a que la molécula de glucosa que se halla unida a la antraquinona le confiere resistencia a la hidrólisis ácida (34); los azúcares en solución acuosa a pH de 3.0 a 7.0 y a

temperatura ambiente se equilibran en varias formas estructurales sin perder su identidad sin embargo si la solución se calienta fuertemente o si se lleva el pH fuera de esta región cabe esperar la enolización, de esta forma es probable que la molécula de glucosa que se halla unida a la antraquinona del colorante se enolice, dicho fenómeno se ve catalizado por ácidos y alcalis siendo las bases catalizadores mucho más efectivos; se observa que a pH de 6.0 el colorante empieza a manifestar su inestabilidad.

Gráfica 9. % de Pigmento remanente del colorante de cochinilla en función del tiempo a diferente pH.



En la gráfica 10 se puede observar que la degradación del color también se refleja en la tonalidad, es importante recordar que a diferentes valores de pH el colorante de cochinilla da diferentes tonalidades, a pH alcalino (9.0 - 10) en los primeros 15 minutos de estar el colorante en dicho medio los valores del tono (b) se modifican pasando de valores negativos correspondientes en el diagrama de color C.I.E.L.A.B. (gráfica 11) a

los tonos azules, a valores positivos (tonos amarillos). A pH de 6.0, 7.0 y 8.0 el cambio se presenta a los 30 minutos; a pH ácido (2.0 - 4.0) el colorante es estable, los valores del tono son positivos manteniéndose constantes, teniéndose tonalidades rojo-amarillas y a pH de 5.0 el tono es rojo con tendencia a azul manteniéndose la tonalidad a dicho pH a lo largo de la cinética.

Gráfica 10. Efecto sobre el tono (b) en función del tiempo del colorante de cochinilla a diferente pH.

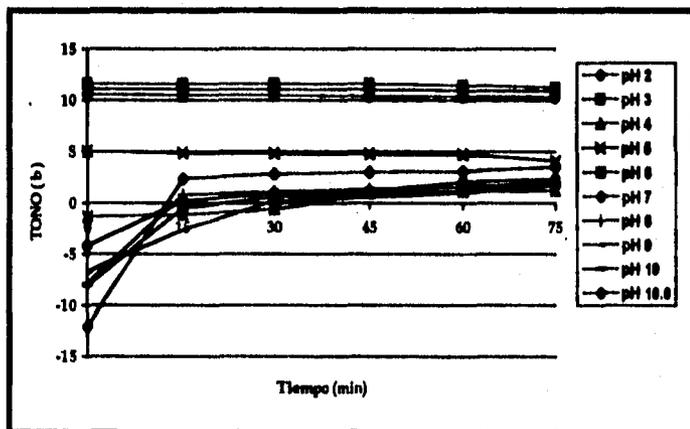
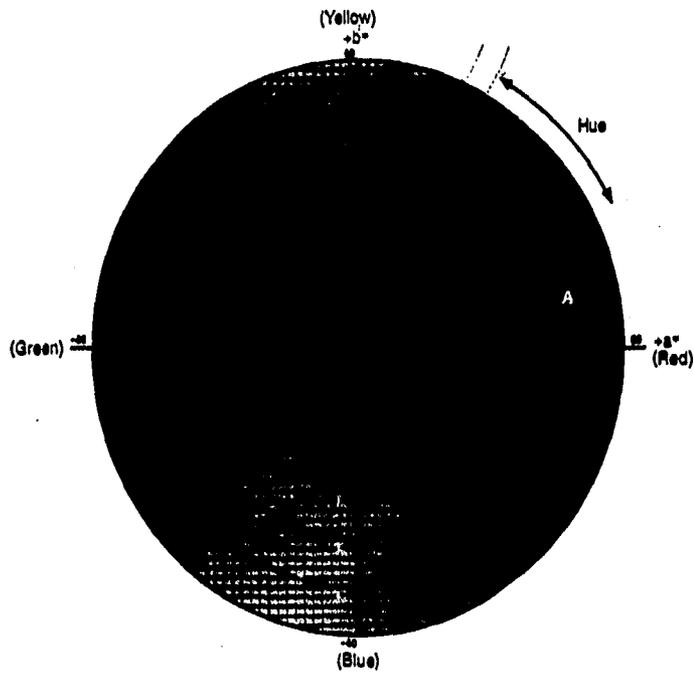
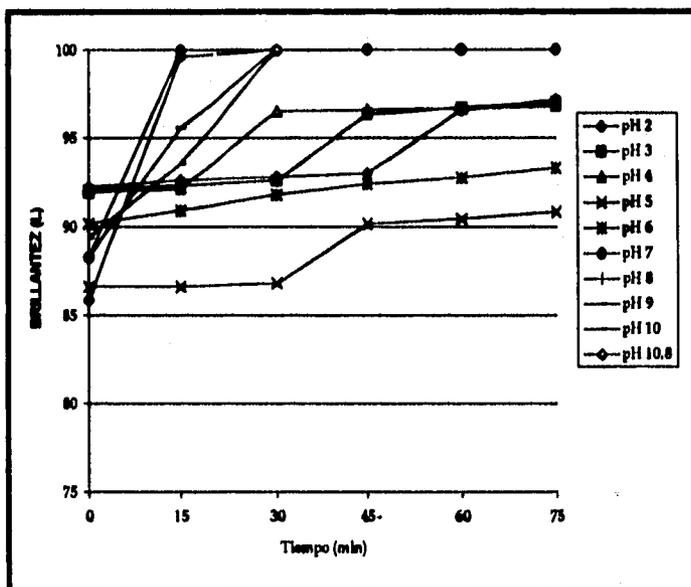


Gráfico 11. Diagrama de color C.I.E.L.A.B. en dos planos



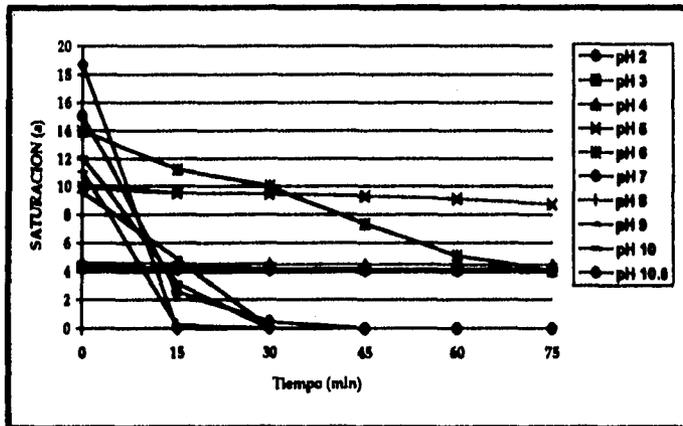
Al paso de la degradación la brillantez (L) aumenta (ver gráfica 12), y la saturación disminuye (a) (ver gráfica 13), haciéndose con esto el color cada vez más claro y menos intenso respectivamente. En la brillantez las soluciones a pH de 7.0 a 10.8 inicialmente son más oscuras (L = 88.3 a pH 8, L = 85 a pH 10.8) en comparación de aquellas que están a pH ácido de 2.0 a 6.0 (L = 92.18 a pH 2.0, L = 91.93 a pH 3.0), después de 15 minutos las soluciones de colorante a pH neutro-alkalino comienzan a incrementar su valor de L el cual llega a ser de 100 manteniéndolo en general constante y por arriba de los valores de las soluciones a pH ácido cuyos valores de L en los tiempos trabajados no llega a ser de 100; a pH de 6.0 el valor de L se incrementa conforme al tiempo; a pH de 4.0 la brillantez se incrementa a los 30 minutos de estar el colorante en solución y a pH de 2.0 y 3.0 el aumento se da a los 45 minutos.

Gráfica 12. Efecto sobre la brillantez (L) en función del tiempo del colorante de cochinilla a diferente pH.



Con respecto a la saturación (gráfica 13) en condiciones ácidas (2.0 - 5.0) los valores se mantienen casi constantes siendo diferente la intensidad del colorante a pH de 5.0 con respecto a las otras condiciones de acidez; a pH de 6.0 la saturación disminuye a los 30 minutos y a pH neutro-alcalino la disminución se presenta durante los primeros 15 minutos de estar el colorante a un pH determinado.

Gráfica 13. Efecto sobre la saturación (a) en función del tiempo del colorante de cochinilla a diferente pH.

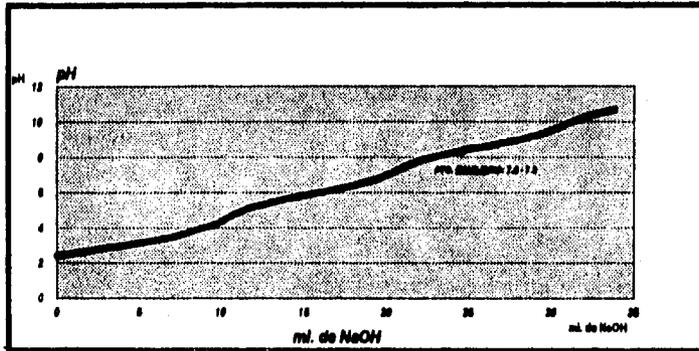


4.1.2. Punto de equilibrio y longitud de onda de máxima absorbancia.

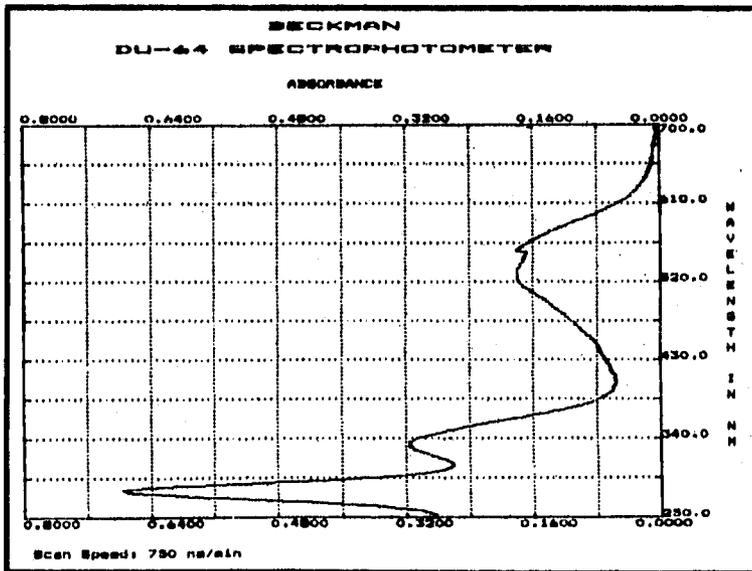
En la gráfica 14 se puede observar que el punto de equivalencia para el ácido carmínico está a un pH entre 7.0 y 7.2; y en la gráfica 15 se muestra el espectro de absorción a dicho pH en donde la máxima absorción está a una longitud de onda de 530 nm; los picos observados en la región ultravioleta del espectro (250 - 380 nm) se deben a otros compuestos no colorados presentes en la solución pudiendo ser: proteínas, fosfolípidos y/o ácidos nucleicos los cuales absorben luz ultravioleta (71). En otras investigaciones se

ha encontrado que la longitud de onda de máxima absorbancia para el colorante a pH neutro es de 528 nm (20, 56), coincidiendo con lo realizado en el presente trabajo.

Gráfica 14. Punto de equilibrio del ácido carmínico.



Gráfica 15. Barrido espectrofotométrico del ácido carmínico a pH neutro.

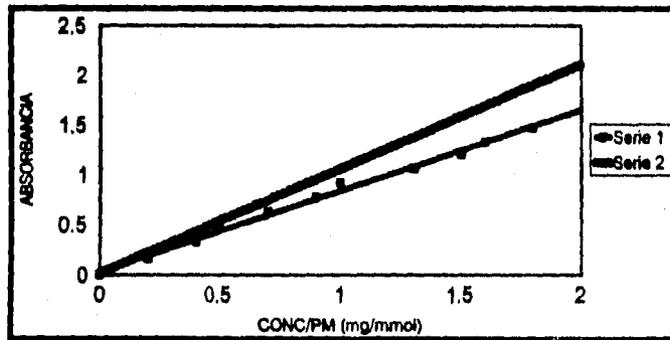


4.1.3. Coeficiente de extinción molar.

En la gráfica 16 se muestran las curvas de la absorbancia a diferentes concentraciones del estándar de ácido carmínico del amortiguador de fosfatos 0.4 Molar. y del ácido clorhídrico 2.0 Normal; relacionadas con el peso molecular de dicho ácido (abs vs mg/mmol); leídas a 530 nm (máxima longitud de onda de absorción observada en el presente trabajo) y a 494 nm (longitud de onda propuesta por el Food Chemical Codex en la que se leen las muestras para cuantificar su contenido de ácido carmínico).

Los coeficientes de extinción molar obtenidos a partir de las pendientes de dichas curvas son de 10481 para el amortiguador de fosfatos y de 8100 para el ácido. El tener un mayor valor de ϵ a 530 que a 494 nm, es debido a que se tiene una mayor sensibilidad en las lecturas a esta primer longitud de onda. El coeficiente de extinción molar de la especie colorida va a determinar la sensibilidad del método colorimétrico (65, 72).

Gráfica 16. Coeficientes de Extinción Molar (ϵ) del ácido carmínico a diferente pH.



$\epsilon = 8100.1839$
 $r = 0.9993$

$\epsilon = 10481.8417$
 $r = 0.9996$

En el cuadro 17 se tienen los coeficientes molares reportados en la bibliografía para el ácido carmínico a diferentes condiciones así como los obtenidos experimentalmente, observándose que para el ácido clorhídrico el valor para ϵ experimental obtenido es parecido con el reportado por Marshall 1974 (36), la diferencia que existe con los demás valores reportados se puede deber a variaciones experimentales, a la sensibilidad del instrumento empleado para la medición etc.; con hidróxido de sodio se tiene un ϵ menor debido a que en condiciones alcalinas el colorante tiene gran inestabilidad degradándose rápidamente como ya se observó en el punto anterior de este trabajo.

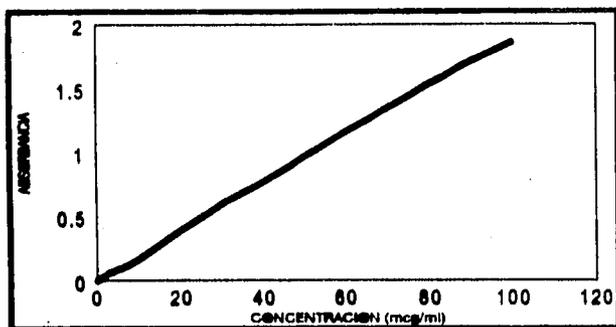
Cuadro 17. Coeficientes de Extinción molar del ác. carmínico.

Condiciones	Coefficiente de extinción molar (ϵ).	Fuente
HCl 2 N, 494 nm	8100	Experimental
PO, 0.4 M, 530 nm	10481	Experimental
HCl 0.02 N, 490 nm	8595	Marshall 1974
H ₂ O, 500 nm	6800	Index Merck
HCl 0.02 N, 490-500nm	5800	Index Merck
NaOH 0.0001N, 540 nm	3450	Index Merck

La gráfica 17 es la curva realizada con el estándar del colorante a diferentes concentraciones a pH de 7.2 a 530 nm, con dicha gráfica se cuantifico el contenido de ácido carmínico presente en los diferentes extractos empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = (\text{abs} + 4.5877 \text{ E-3}) / (0.0191)$$

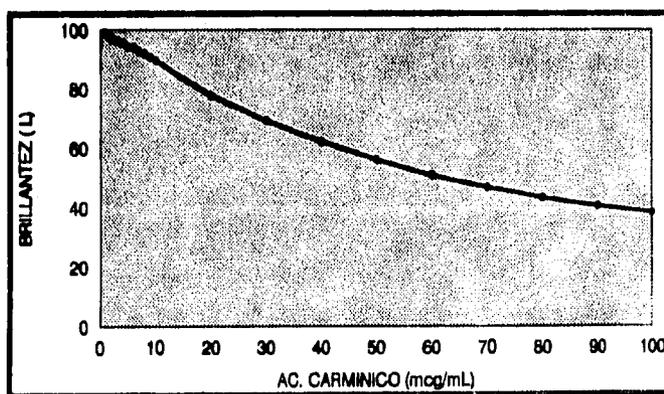
Gráfica 17. Absorbancia en función de la concentración de ác. carmínico.



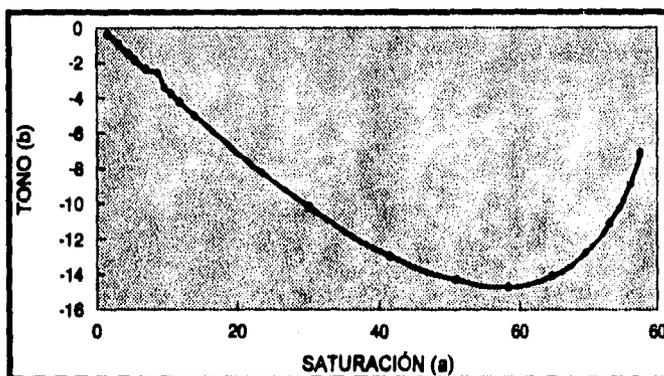
$m = 4.5877 \text{ E} - 3$ $b = 0.0191$ $r = 0.9996$

Las gráficas para la brillantez (gráfica 18) y la cromaticidad (gráfica 19) del estándar de ácido carmínico en función de la concentración de éste se muestran a continuación; a medida de que la concentración del colorante aumenta, se vuelve más intensa y oscura la solución teniendo una tonalidad rojo-azul.

Gráfica 18. Brillantez en función de la concentración para el estándar de ác. carmínico.



Gráfica 19. Cromaticidad (Saturación vs Tono) del estándar de ácido carmínico.



4.2. Condiciones de extracción.

La tabla 18 muestra el porcentaje de ensayo libre de sales y el porcentaje de rendimiento del ácido carmínico para cada método de extracción, así como los valores para brillantez, tono y saturación. Del análisis estadístico aplicado a los datos de rendimiento y ensayo (en extractos libres de sales) de cada uno de los diferentes métodos de extracción empleados se acepta $H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \dots \neq \mu_n$, ya que al comparar la $F_{experimental}$ (228.86 para los datos de porcentaje de ensayo y de 418.48 para los valores de porcentaje de rendimiento) con la $F_{teórica} = 1.53$; se observa que sí existen diferencias significativas entre los promedios de ambos porcentajes en las condiciones de extracción empleadas. De acuerdo a la metodología propuesta del análisis factorial realizado al bloque 1 y 3, para la forma (tamaño de partícula), medio, temperatura y concentración de solvente, así como la relación entre estas variables, la $P_{experimental}$ es igual a 0.0001 siendo menor al valor teórico que es de 0.05, con lo que las diferentes condiciones en

TABLA 18. RESULTADOS (% RENDIMIENTO, ENSAYO LIBRE DE SALES Y CARAC. COLORIMÉTRICAS)

TRATAMIENTO	% RENDIMIENTO	% ENSAYO	L	a	b
GA1	4.55	31.32	92.1	7.36	-1.57
GA2	12.78	33.99	60.16	51.51	-11.13
GS1	0.99	6.16	92.17	7.36	-1.57
GS2	8.41	22.51	60.16	51.51	-11.13
GH1	2.87	13.19	78.84	26.51	-8.58
GH2	10.34	15.25	51.42	61.43	-12.27
TA1	14.77	31.8	45.91	67.79	-4.73
TA2	15.15	25.51	42.87	69.47	-3.18
TS1	10.48	33.43	52.11	64.17	-9.31
TS2	12.78	38.48	44.54	89.72	-8.79
TH1	6.9	17.72	62.66	45.07	-12.42
TH2	11.8	17.39	49.74	63.23	-12.35
GP	2.44	4.88	82.2	25.39	-5.85
TP	11.32	15.53	56.57	57.93	-9.87
GK	16.47	82.34	47.34	69.03	-3.46
TK	17.16	86.9	44.71	74.8	-8.07
GDB	5.5	27.64	76.05	30.07	-18.96
TDB	9.16	31.68	50.12	63.27	-10.49
GDC	0.79	11.58	97.44	2.17	0.51
TDC	3.6	27.57	76.12	33.4	-9.32
THNB1	7.92	25.11	61.57	48.53	-11.79
THNC1	7.41	28.78	85.61	46.49	-9.16
THNB2	12.84	13.78	49.23	61.81	-13.79
THNC2	13.43	18.52	42.7	67.17	-13.52
THEB1	8.98	20.68	68.38	42.4	-6.47
THEC1	8.87	22.45	87.68	46.05	-8.39
THEB2	12.58	17.99	45.15	68.42	-8.21
THEC2	13.38	19.58	50.25	68.88	-3.85
THMB1	7.29	23.32	68.29	48.19	-8.98
THMC1	7.35	18.34	66.76	47.91	-6.4
THMB2	13.75	23.03	49.89	66.66	-8.29
THMC2	13.27	18.89	51.4	68.93	-3.75
TSNB1	11.48	17.83	52.61	64.14	-8.82
TSNC1	11.42	14.71	52.86	62.79	-8.94
TSNB2	13.46	27.64	45.49	64.95	-13.15
TSNC2	11.87	29.85	49.2	60.13	-13.01
TSEB1	13.91	20.42	48.57	70.22	-6.06
TSEC1	13.88	21.36	49.05	70.92	-5.13
TSEB2	12.86	33.01	50.27	66.73	-9
TSEC2	13.54	33.32	50.17	69.38	-5.63
T SMB1	13.93	20.7	48.59	70.17	-5.58
TSMC1	13.95	18.51	48.45	69.3	-4.79
T SMB2	11.93	23.32	52.28	62.47	-10.59
TSMC2	13.09	25.02	51.31	66.95	-6.07
TRB1	8.55	27.64	55.46	59.83	-10.8
TRC1	8.1	28.76	55.43	59.6	-9.77
TRB2	10.66	38.42	52.38	59.37	-12.21
TRC2	10.66	33.57	52.97	58.55	-12.27
TREB1	9.06	25.35	60.54	55.94	-10.17
TREC1	8.64	24.54	62.43	60.77	-9.11
TREB2	9.57	20.97	53.79	61.47	-8.6
TREC2	10.75	20.4	57.2	60.15	-7.92
REF	12.73	31.56	52.96	62.29	-4.52

estudio interactúan teniendo influencia en la extracción del colorante; observándose en la tabla de resultados (ver pagina 76) que el rendimiento y ensayo es mayor en los extractos trabajados con la grana pulverizada y a 110°C.

Del bloque 2 se tiene una $P_{\text{experimental}} = 0.1243$ para: forma - Proteinasa K, para este tipo de proteasa el tamaño de partícula no tiene efecto en la extracción ($P_{\text{experimental}} \geq 0.05$), no siendo así para los extractos trabajados con Papaina.

La disminución del tamaño de partícula favorece la extracción independientemente de la temperatura, concentración y /o el tipo de medio (ácido, alcalino, neutro, por solventes y enzimático) empleado para la extracción, debido probablemente a que existe un aumento en la superficie de contacto entre soluto y disolvente (67). Solamente para los extractos trabajados con Proteinasa K el tamaño de partícula no tuvo diferencia significativa, al menos en los tiempos de extracción utilizados. Debido a ello las extracciones salinas se realizaron con la grana pulverizada.

La extracción del colorante con etanol presenta un buen ensayo (27%) sin embargo el rendimiento independientemente del tamaño de partícula es muy pobre (de 0.79 a 9.16%) estos últimos datos son significativamente menores al método de referencia (12.73%). El rendimiento es mayor en las extracciones realizadas con etanol al 75%, que con etanol al 96%; el complejo colorante-proteína se solubiliza más en la solución hidroalcohólica indicando con ello que hay una pobre cantidad de ácido carmínico libre ya que éste también es muy soluble en etanol, al emplear el solvente al 96% se

precipitan las proteínas del sistema dificultando la liberación del colorante que se halla unido a ellas (67, 71).

Del análisis factorial del cuarto bloque se obtuvo una $P_{\text{experimental}} = 0.2669$ para la concentración de sales por lo que no influye este factor en la extracción, la cantidad de ácido carmínico obtenido estadísticamente es igual cuando se usa una alta o baja concentración de sales. Para la temperatura y tipo de sales la $P_{\text{experimental}} = 0.0001$, estas variables sí afectan a la extracción del colorante. La relación ensayo-rendimiento es mejor en las soluciones extractoras que contenían solamente sales de fosfato y/o cloruro de sodio que en aquellas soluciones de extracción en las que se empleaban otras sales como las de EDTA en combinación con las de NaCl y Na_2CO_3 .

El aumento en la concentración salina pudo provocar por un lado una cierta saturación de la fase acuosa a niveles suficientes como para disminuir la "partición" del ácido carmínico desde la grana pulverizada hacia la fase acuosa en la extracción y por otro lado, el ácido carmínico retenido en forma de complejo con proteínas (20) no fue extraído debido probablemente a que el aumento en la fuerza iónica del medio generó en un momento dado un cambio conformacional de las proteínas o péptidos enlazados disminuyendo su solubilidad (29, 67).

El empleo de EDTA no tuvo efecto significativo en la extracción del colorante, se puede aseverar que las proteínas a las que se encuentra unido el ácido carmínico no están ancladas a la estructura celular mediante interacciones de calcio y magnesio como

se suponía, de las soluciones extractoras que contenían EDTA la que dió mejores resultados en ensayo-rendimiento fue: TSEC2 (proceso de grana en polvo con sales de fosfatos y EDTA a 110°C a alta concentración), la relación ensayo-rendimiento (33.32%-13.54%) que pareciera ser mayor al método de referencia (31.56%-12.73%) no tiene diferencia significativa con dicho método.

La hidrólisis alcalina dió mejores resultados en comparación con la hidrólisis ácida y es que en condiciones alcalinas no sólo se hidrolizan las proteínas que tienen esterificado al colorante sino también a la quitina cuyos enlaces se rompen más fácil bajo estas condiciones (14).

Las condiciones de extracción que estadísticamente en ensayo y rendimiento fueron mejores en comparación al método de referencia son: proceso enzimático con Proteinasa K, proceso alcalino, proceso neutro (amortiguador de fosfatos) y proceso con cloruro de sodio a baja concentración, estos tres últimos a 110°C y con la grana pulverizada. Estos son los métodos que estadísticamente fueron óptimos y que fueron seleccionados para la siguiente etapa experimental de determinación del número de etapas de extracción. Para el método con Proteinasa K nada más se realizó una reacción pues la cinética de acción de la enzima - sustrato indica que solo es necesario que esté en contacto la enzima una hora para degradar completamente al sustrato, de acuerdo a la concentración de proteína en la muestra. (58).

En general el aumento en la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la cantidad de ácido carmínico obtenido para todas las extracciones, permitiendo una mayor eficiencia de extracción al parecer por favorecer el aumento de las interacciones con el agua del complejo colorante-proteína; el agua del medio de extracción circundante comenzará a ingresar hacia el interior de la partícula con una velocidad de difusión mayor a la que presentara a temperaturas más bajas (65, 67).

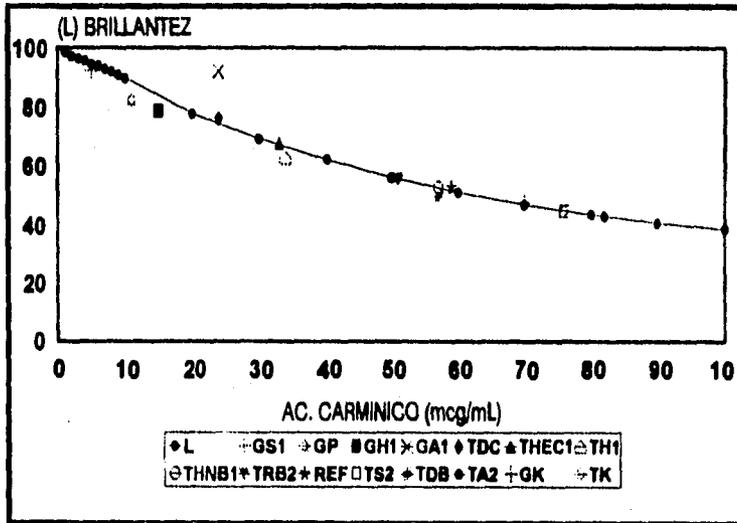
En general los rendimientos obtenidos en los diferentes métodos de extracción realizados fueron bastante buenos ya que si se comparan con los rendimientos reportados en las extracciones de otros pigmentos, por ejemplo para pigmentos liposolubles, en diferentes especies de *Capsicum*: en la Paprika Húngara se obtuvo un rendimiento entre 0.3 - 0.8%, para la Paprika decolorada un 2.2%, Paprika estadounidense 0.336% (61); de los carotenoides obtenidos a partir de las cabezas de camarón, para el camarón rosado se tiene un 0.98% de rendimiento, camarón cristal 0.88% y camarón acamaya con un 0.96%.(57). En la extracción de pigmentos hidrosolubles como es el caso de las betalainas se obtuvo un rendimiento del 9% (3).

4.3. Análisis de las características colorimétricas de los extractos obtenidos.

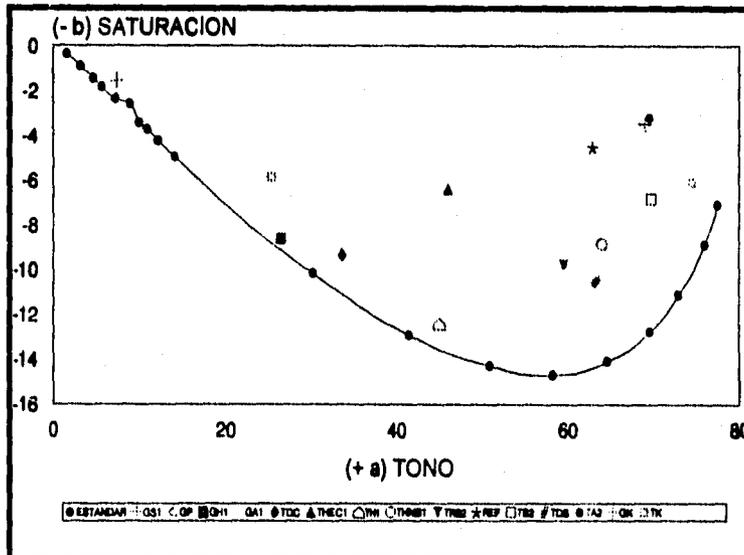
Debido a que se tenían una gran cantidad de condiciones de extracción solo se graficaron las características colorimétricas de 15 extractos, cuya relación ensayo-rendimiento como se observa en la tabla de resultados fue: baja, intermedia y alta. Las gráficas 20 y 21 muestran respectivamente el comportamiento para la brillantez y la cromaticidad de los extractos con respecto a las curvas realizadas con el estándar de

ácido carmínico para dichas características colorimétricas. En la mayoría de los extractos los valores para la brillantez y saturación a las concentraciones obtenidas estuvieron dentro de los valores de la curva estándar. Para el tono en general los valores son menores a los del estándar a las concentraciones obtenidas, además de que en los extractos ácidos y en donde hay sodio el tono es rojo - azul y en el resto de los extractos tiende a ser rojo - amarillo como se puede ver en la gráfica 21; esto puede ser debido a la presencia de otros compuestos coloridos generados en la extracción que aunque en menor proporción que el ác. carmínico están presentes en la grana .

Gráfica 20. Brillantez de los extractos de cochinilla.



Gráfica 21. Cromaticidad (tono vs. saturación) de los extractos de cochinilla.



4.4. Determinación del número de etapas de extracción de los métodos seleccionados.

Los métodos seleccionados al tener un mayor ensayo y rendimiento a los que se realizó diferente número de extracciones son: proceso alcalino a 25 ° y a 110°C (TA1 y TA2), proceso neutro a 25° y 110°C (TS1 y TS2), y proceso con cloruro de sodio 150.58 mM a 25° y 110°C (TRB1 y TRB2). El realizar la extracción a ambas temperaturas fue para observar cuál método de extracción iba a ser más costeable; si se requiere de una etapa más de extracción a 25°C esto resulta ser más barato que el realizar una extracción de menos a 110°C por el incremento de temperatura. En el cuadro 19 se muestran los porcentajes de ácido carmínico obtenidos en cada extracción para los diferentes métodos seleccionados, así como los valores para las características colorimétricas.

Cuadro 19. Resultados de las diferentes etapas de extracción.

MET. EX- TRAC- CIÓN	1a. EXTRACC.				2a. EXTRACC.				3a. EXTRACC.				4a. EXTRACC.				% TOTAL DE AC. CAR- MÍNICO OBTENIDO.
	%	L	a	b	%	L	a	b	%	L	a	b	%	L	a	b	
	OBT				OBT				OBT				OBT				
PROP.	78.8	52.9	62.3	-4.5	18.3	64.3	20.7	-2.8	5.3	95.8	4.5	-0.2	—	—	—	—	99.99
TA1	62.1	46.9	67.8	-4.7	12.4	68.6	15.1	-2.9	2.8	87.3	2.8	-0.1	2.7	99.1	0.62	0.44	99.98
TA2	90.6	42.8	66.5	-3.2	8.1	80.8	8.9	-0.2	—	—	—	—	—	—	—	—	99.99
TS1	78.8	52.1	64.1	-8.3	10.4	69.3	14.7	-4.4	8.0	93.8	7.8	-2.3	4.8	96.7	5.38	-1.7	99.98
TS2	63.2	44.8	69.8	-6.8	13.4	65.2	18.4	-3.9	3.3	98.2	4.43	-1.1	—	—	—	—	99.99
TRB1	68.6	55.4	68.6	-9.7	18.8	62.2	24.2	-7.3	8.5	81.1	12.3	-3.7	3.4	95.7	5.68	-1.8	99.36
TRB2	78.8	55.4	68.8	-10	18.0	66.1	17.8	-5.2	6.5	94.7	7.6	-2.2	—	—	—	—	99.98

Del cuadro anterior se puede observar que a 110° C el proceso alcalino requiere de dos extracciones para alcanzar un 99.99% de ácido carmínico; para los procesos con cloruro de sodio y fosfatos bajo las mismas condiciones de temperatura se requiere de tres extracciones para llegar a obtener un porcentaje igual, al método alcalino a dicha temperatura, sin embargo la cantidad extraída en la tercer extracción es mínima por lo que se considera que con dos extracciones es suficiente.

Para las extracciones a 25°C independientemente del método empleado son cuatro las extracciones necesarias para agotar el soluto aunque en la cuarta extracción se obtiene muy poco ác. carmínico siendo incosteable realizar dicha extracción por la inversión en reactivos. El proceso de referencia a pesar de ser a alta temperatura (95°C) con agitación presenta una menor cantidad del principio activo (78.8%) en contraste con los otros métodos alcalinos (82.1% a 25°C y 90.8% a 110°C), debido al tamaño de partícula que se está manejando, el tener la grana entera dificulta la extracción.

En cada extracción el principio activo del colorante se va agotando reflejándose esto en las características colorimétricas del extracto, la brillantez se incrementa a lo largo del número de extracciones y los valores para la saturación y el tono disminuyen pues el colorante se diluye deteriorándose con ello la calidad del producto final.

En general se puede decir que es mejor realizar los procesos a temperatura ambiente, con agitación y con la grana pulverizada, el realizar los procesos a alta temperatura

requiere de menos extracciones pero el costo es mayor, por el gasto requerido para elevar la temperatura.

4.5. Determinación de las características físicas, químicas y microbiológicas de los extractos.

El cuadro 20 muestra los resultados de las características físicas, químicas y microbiológicas que señala la F.D.A. para poder aceptar los extractos del colorante de la grana cochinilla.

Cuadro 20. Resultados de las pruebas especificadas por la F.D.A. de los extractos seleccionados como óptimos.

ANÁLISIS	ESPECIFICACIONES	REF	TA1	TA2	TR1	TR2	TS1	TS2	GP%	TP%	STD
pH	5-5.5	9.70	9.67	9.79	5.17	5.57	6.69	6.98	6.31	6.35	N.D.
% PROTEINA	2.2	2.50	2.28	2.16	2.08	2.16	2.30	2.41	2.05	2.00	1.26
% S.T.	5.7-6	5.27	6.10	6.25	6.30	5.90	5.82	6.71	5.30	5.08	N.D.
ALCOHOL METILICO ppm	150	N.D.									
Pb ppm	10	1.09	1.24	0.95	0.75	0.72	1.42	1.20	0.35	0.45	0.35
As ppm	1	1.40	1.24	1.56	1.49	1.50	1.17	1.15	0.88	0.97	1.59
% AC. camínico	1.8 min.	6.34	5.96	6.36	5.23	6.70	4.34	5.58	9.32	9.43	117.9
M.O. VIABLE SALMONELLA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

El pH de los extractos varía de acuerdo al método de extracción aplicado aunque es conveniente que en los extractos alcalinos el pH se disminuya inmediatamente después

de la extracción, ya que de acuerdo al estudio de estabilidad del estándar de ácido carmínico a diferente pH, las condiciones alcalinas inestabilizan el colorante favoreciendo la degradación con respecto al tiempo.

En cuanto al contenido de proteína y de sólidos totales no hay variación significativa entre los valores obtenidos, estando la mayoría dentro de las especificaciones de la F.D.A..

Para el contenido de plomo todos los extractos caen dentro de las especificaciones no siendo así para el arsénico, la presencia de este elemento en los extractos puede deberse a la grana, ya sea porque los plantos en los que crece el insecto sean regados con aguas residuales con un alto contenido de este elemento, por el uso de plaguicidas con arsénico empleados para eliminar alguna otra plaga que afecte al crecimiento de la grana o bien por emisiones a la atmósfera por el uso de combustibles como la gasolina, aceite, carbón o madera (34); también puede deberse al tipo de recipientes usados en la recolección del insecto o a las condiciones empleadas para el secado del mismo después de la recolección.

Se descarta la posibilidad de que la contaminación en especial por el arsénico, se deba a los reactivos utilizados para preparar las soluciones extractoras. En el cuadro 21 se muestran los valores en ppm del contenido de plomo y arsénico de los reactivos usados para la extracción.

Cuadro 21. Contenido de As y Pb en los reactivos usados para la extracción.

	As (ppm)	Pb (ppm)
AGUA	0.002	0.009
P. ENZIMATICO	0.238	0.887
P. ALCALINO	0.248	0.892
P. FOSFATOS	0.250	0.883
P. CLORURO DE SODIO	0.238	0.848

En cuanto al análisis microbiológico no se detectó la presencia de ningún microorganismo en los extractos, a excepción del realizado con fosfatos a 25°C en donde se tenía una cantidad incontable de diferentes colonias volviéndose a sembrar cada colonia por separado, realizándoseles las pruebas bioquímicas de identificación, el cuadro 22 muestra los resultados de las mismas; los microorganismos aislados fueron: *Klebsiella ozaenae* y *Klebsiella aerogenes* y *Enterobacter aerogenes*, la presencia de estos microorganismos puede deberse al mal manejo de la muestra cuyo crecimiento se vio favorecido por el pH del medio (12,32).

Cuadro 22. Resultados de las pruebas bioquímicas de identificación de microorganismos.

PRUEBA	COLONIA CREMA	COLONIA PTO. ROSA	COLONIA ROSA
CATALASA	DUDOSA	DUDOSA	DUDOSA
OXIDASA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
O.F.	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
MOTILIDAD	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
CITRATO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
ROJO DE METILO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
V.P.	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
INDOL	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
MNO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
LIA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SACAROSA	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
XILOSA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
LACTOSA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
TRIALOSA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
MANTOL	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
TSI	ALCALINO-ACIDO-GAS	ALCALINO-ACIDO-GAS	ALCALINO-ACIDO-GAS
UREA	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	G (-)	G (-)	G (-)
GRAM	COCOBACILOS	BACILOS	COCDBACILOS
MICROORGANISMO IDENTIFICADO	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>

4.5.1. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

En el cuadro 23 se dan los valores para el contenido en μg . ácido carnínico por mg . de polvo y el porciento de rendimiento obtenido por el método de HPLC, por la técnica del F.C.C. y por el método propuesto en el presente trabajo para determinar el contenido de ác. carnínico en los extractos.

Cuadro 23. Comparación de los resultados de las técnicas usadas para cuantificar ácido carnínico.

	HPLC μg ác/mg polvo	F.F.C. μg ác/mg polvo	EXPERI- MENTAL μg ác/mg polvo	HPLC % RENDI- MIENTO	F.C.C.	EXPERI- MENTAL
REF.	57.41	83.4	80.28	14.33	15.63	17.04
TA1	58.60	83.8	98.43	20.04	26.54	24.25
TA2	17.92	58.6	88.44	3.87	17.76	19.28
TR1	40.0	82.3	55.9	10.75	12.88	14.74
TR2	81.0	87	78.7	18.26	17.75	18.90
T61	30.9	43.4	66.82	18.28	16.47	22.54
T82	53.84	56.8	78.23	19.48	20.17	24.65
GP%	21.89	83.2	83.05	4.57	9.27	18.47
TP%	23.52	84.3	86.83	5.39	10.92	17.18

Se observa que los valores obtenidos por el método del HPLC son menores a los del método del F.C.C. y estos a su vez a los del método usado en el presente trabajo. Como se tenían 53 métodos de extracción con sus respectivas replicas, el método para cuantificar el contenido de ácido carnínico propuesto (ajuste de los extractos a pH de 7.2 y abs. leída a 530 nm) se utilizó a fin de reducir el tiempo y gasto en reactivos en comparación a la técnica del F.C.C., además de que en la técnica utilizada se tenía un control más estricto del pH, las soluciones extractoras presentaban amplios rangos de

diferencia en el mismo y esto afecta el pH final en las diluciones utilizadas, la técnica del F.C.C. no contempla dicha variación y como se hizo notar al principio de la experimentación el pH del medio en el que se encuentre el colorante afecta notablemente las estructuras de resonancia del ácido carmínico.

La técnica del F.C.C. y la propuesta son técnicas espectrofotométricas que absorben no solo el color rojo proporcionado por el ácido carmínico sino el proveniente de otros compuestos coloridos que absorben a similares o iguales longitudes de onda, de acuerdo a Schull 1992, debe existir un método para cuantificar realmente el contenido de ácido carmínico presente en las muestras estándares y en aquellos productos alimenticios que contengan dicho colorante; ya que los métodos propuestos por Marshall (1974) en el que se realiza una hidrólisis ácida de la muestra y se lee a 490 nm o el propuesto en el F.C.C. que lee a 494 nm, así como el propuesto en el presente trabajo son métodos espectrofotométricos que de acuerdo a las técnicas estadísticas de validación son lineales, exactos y precisos, más no específicos, la lectura de absorbancia corresponde no solo al color rojo proporcionado por el ácido carmínico sino al proveniente de otros compuestos coloridos que absorben a las mismas longitudes de onda, además de que las curvas de absorción no siguen la ley de Lambert - Beer y solo son lineales entre 0.650 y 0.830 de absorbancia originando problemas en la cuantificación del ácido carmínico, un ejemplo de esto: Schull en 1992 (62), analiza una muestra estándar de este ácido al 98% y por la técnica del F.C.C. obtiene un 89.5% y al emplear la técnica de Marshall 1974 (36) obtiene un 106%.

Wouters 1989 (75) y Yamada 1993 (76), utilizan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar el contenido de ácido carmínico en grana cochinilla de diferentes lugares y en productos comerciales respectivamente. El HPLC es una técnica analítica en la que se separan los componentes de una mezcla pudiéndose cuantificar los mismos. Esta técnica no presenta problemas a diferencia de otras, como de degradación térmica (cromatografía de gases), fotosensibilidad (polarografía), efectos adversos propios del sistema como la acidez ocasionada por los adsorbentes (cromatografía en capa fina y en columna) así como oxidación (60); además de que al realizar el análisis en alimentos no presenta interferencia con los componentes del alimento (75, 76). Los cromatogramas obtenidos muestran que existen otros picos además del correspondiente al ácido carmínico, el RRT de dicho ácido es de 1.15 +/- 0.02 los otros valores de RRT son de 1.73 y 2.50 y dado que se usaron las mismas condiciones propuestas por Wonders 1989 (75), es probable que los picos encontrados a 1.73 y 2.50 correspondan al ácido flavokérmesico y ácido kérmesico respectivamente, para conocer la concentración de estos dos últimos ácidos es necesario realizar una curva a concentraciones conocidas con los estándares correspondientes; es importante señalar que sólo en la extracción ácida y en el estándar del ácido carmínico se presenta el ácido kérmesico; la variación en el tono en los extractos se debe a la presencia de estas materias colorantes, que aunque no pueden cuantificarse, las áreas bajo la curva de los picos son mayores para las extracciones enzimática, alcalina y con fosfatos, en comparación al área existente para la extracción ácida y con cloruro de sodio, recordando que en la hidrólisis ácida está presente el ácido kérmesico (36, 62, 63, 76). En la

figura 22 se muestra el cromatograma correspondiente al estándar del ácido carmínico y las figuras 23 y 24 representan las estructuras químicas del ácido flavokérmesico y kérmesico respectivamente, observándose que ambas son estructuras antraquinónicas como la del ácido carmínico.

Figura 21. Cromatograma del ácido carmínico.

0.95 = Pico generado por solventes de la fase móvil

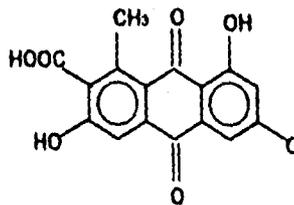
1.18 = Pico correspondiente al ácido carmínico.

1.73 = Pico correspondiente al ácido flavokérmesico.

2.50 = Pico correspondiente al ácido kérmesico.

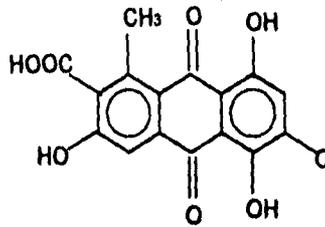
DEVICE	SAMPLE	METHOD	TIME	DATE
01	903	METHOD1	13-30-80	13-09-85
AUT: 0-94-1.15 1.73				
2.51				

Figura 22. Estructura del ácido Flavokérmesico.



FUENTE: (75)

Figura 23. Estructura del ácido Kermesico.



FUENTE: (75)

CONCLUSIONES

1. Para el colorante de cochinilla la longitud de onda a la cual la absorbancia es máxima está en función del pH del medio que se emplee siendo más estable a pH ácido que alcalino.
2. Las condiciones de pH empleadas para la extracción del ácido carmínico modifican el tono del colorante, encontrándose a pH alcalino una coloración rojo-indigo y a pH ácido rojo-amarillo; esto es debido a la presencia de otros compuestos coloridos. La saturación y la brillantez de los extractos corresponden a la misma concentración del estándar.
3. La disminución del tamaño de partícula así como el aumento de temperatura favorecen la extracción del ácido carmínico.
4. La saturación y la brillantez de los extractos corresponden a la misma concentración del estándar y solo se tienen cambios en el tono. Los cambios presentados en la tonalidad pueden corresponder a otros compuestos coloridos.
5. El análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) permite la cuantificación aislada del ácido carmínico en una muestra. Las técnicas espectrofotométricas en contraste al HPLC son más viables de realizar por la facilidad en la disponibilidad del equipo y reactivos.
6. Las mejores condiciones de extracción fueron: polvo de grana, hidrólisis alcalina a 25°C con agitación, aplicándose el proceso de extracción tres veces.

RECOMENDACIONES

1. Es recomendable realizar la extracción enzimática no solo con enzimas proteolíticas sino también con el empleo de una quitinasa, ya que la grana cochinilla es un insecto cuya capa externa, exocutícula y endocutícula están formadas principalmente por quitina y proteínas constituyendo la quitina en este tipo de insectos del 25 al 60% del peso seco (6, 14), con lo cual se podría obtener tal vez un mayor rendimiento.
2. Sería conveniente el trabajar los estándares de ácido flavokermésico y ácido kermésico bajo las mismas condiciones del HPLC empleadas en el presente trabajo a fin de poder cuantificar el contenido de estas materias coloridas en estudios posteriores.
3. Si se quiere obtener carmín a partir de extractos alcalinos de cochinilla es conveniente una vez terminada la extracción que el extracto sea acidificado antes de que se mezcle con la sal metálica, a fin de que no se degrade el colorante al estar en medio alcalino ya que al partir de una materia prima deteriorada el producto final (carmín) puede ser de baja calidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barranco, F.R. (1978). Síntesis de proceso para la obtención de colorantes naturales a partir de flor de jamaica, flor de cempazuchitl y betabel para la industria alimentaria. Tesis Universidad Iberoamericana.
2. Beristain, F. (1990). Comparación de los tamices para ensayos. Apuntes para la materia de Ingeniería de Alimentos.
3. Bilyk, A. (1979). Extractive Fractionation of Betalaines. *Journal of Food Science*. 44, 1249-1251.
4. Biocons (1988). Label clean - up Has Led to an Increased Used of Natural Colors. *Food Engineering*. (1) 64.
5. Bojorquez, I.E. y Santiago, M.L. (1990) Anteproyecto de norma para extracto de cochinilla y carmín colorante orgánico natural. Aditivo para alimentos. Tesis. Facultad de Química. UNAM.
6. Borror, J.D. (1989) An Introduction to the study of insects. Ed. Harcourt Brace. 6a. edición. U.S.A.
7. Cal, A. (1987). Natural Colors Systems. *Food Processing*. (2) 46-47.
8. Cartagena, G.L., Zuñiga, P.F. y Abab, B.F. (1990) Medida del Color de Bebidas Fermentadas y Derivados. Vinos, cervezas y brandis. *Alimentaria*. (8) 59-66.
9. Chavez, M.K. (1994) Extracción del colorante rojo presente en la cochinilla. Tesis Universidad Simón Bolívar.
10. Chen Hwei - Mei y Meyers, S.P. (1982) Extraction of Axtaxanthin Pigment from Crawfish Waste Using a Soy- oil process. *Journal of Food Science*. 47, 892-896.
11. Clydesdale, F.N. (1969) The Measurement of Color. *Food Technology* 23 (1) 18-22.
12. Cowan, S.T. y Steel, J.K. (1982) Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica. Ed. Continental, 2a. edición. México.
13. Dasso, I. (1986) Control de color en alimentos, sistemas numéricos de expresión. *La Alimentación Latinoamericana*. 19 (156)
14. Davies, R.G. (1989) Introducción a la entomología. Morfología y taxonomía de los insectos. Ed. Mundi-Prensa. España

BIBLIOGRAFÍA

1. Barranco, F.R. (1978). Síntesis de proceso para la obtención de colorantes naturales a partir de flor de jamaica, flor de cempazuchitl y betabel para la industria alimentaria. Tesis Universidad Iberoamericana.
2. Beristain, F. (1990). Comparación de los tamices para ensayos. Apuntes para la materia de Ingeniería de Alimentos.
3. Bilyk, A. (1979). Extractive Fractionation of Betalaines. *Journal of Food Science*. 44, 1249-1251.
4. Biocons (1988). Label clean - up Has Led to an Increased Used of Natural Colors. *Food Engineering*. (1) 64.
5. Bojorquez, I.E. y Santiago, M.L. (1990) Anteproyecto de norma para extracto de cochinilla y carmín colorante orgánico natural. Aditivo para alimentos. Tesis. Facultad de Química. UNAM.
6. Borror, J.D. (1989) An Introduction to the study of insects. Ed. Harcourt Brace. 6a. edición. U.S.A.
7. Cal, A. (1987). Natural Colors Systems. *Food Processing*. (2) 46-47.
8. Cartagena, G.L., Zuñiga, P.F. y Abab, B.F. (1990) Medida del Color de Bebidas Fermentadas y Derivados. Vinos, cervezas y brandis. *Alimentaria*. (8) 59-66.
9. Chavez, M.K. (1994) Extracción del colorante rojo presente en la cochinilla. Tesis Universidad Simón Bolívar.
10. Chen Hwei - Mei y Meyers, S.P. (1982) Extraction of Axtaxanthin Pigment from Crawfish Waste Using a Soy- oil process. *Journal of Food Science*. 47, 892-896.
11. Clydesdale, F.N. (1969) The Measurement of Color. *Food Technology* 23 (1) 18-22.
12. Cowan, S.T. y Steel, J.K. (1982) Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica. Ed. Continental, 2a. edición. México.
13. Dasso, I. (1986) Control de color en alimentos, sistemas numéricos de expresión. *La Alimentación Latinoamericana*. 19 (156)
14. Davies, R.G. (1989) Introducción a la entomología. Morfología y taxonomía de los insectos. Ed. Mundi-Prensa. España

15. Duxbury, D.D. (1990) Replacement colors and blends for banned FD&C Red #3 lake. *Food Processing* (5) 63-66.
16. Francis, F.J. (1987) Lesser-Known food colorants. *Food Technology*. (4) 62-68.
17. *Food Engineering*. (1978) Red 40 safety in doubt at NCL (10) 35.
18. *Food Manufacture* (1985) The importance of additives. (8) 20-22.
19. *Food Manufacture* (1990) Colouring what comes naturally. (1) 25-26.
20. García, C.Z. y Zaragoza, S.N. (1990) Estudio de la estabilidad del colorante de cochinilla y sus aplicaciones en alimentos. Tesis. FESC UNAM.
21. Hallagan, J.B., Allen, D.C., Borzelleca, J.F. (1995) The Safety and Regulatory Status of Food, Drug and Cosmetics Colour Additives Exempt from Certification. *Fd. Chem. Toxic.* 33 (6), 515-528.
22. Institute of Food Technologists (1980) Food Colors. *Food Technology*. (7) 77-84.
23. Institute of Food Technologists (1986) Food Colors II. *Food Technology*. (7) 49-46.
24. Kearsley, N.M. y Katsaboxakis, Z.K. (1980) Stability and use of natural colours in foods red beet powder, copper chlorophyll powder and cochineal. *J. Fd. Technol.* (15) 501-514.
25. Knott, M. Colours a consumer whitewash ?. (1989) *Food Manufacture*. (2) 21-23.
26. Kramer, A. (1978) Benefits and risks of color additives. *Food Technology*. (8) 65-67.
27. Laquis, A. (1983) Los colorantes para la industria alimentaria. *La Alimentación Latinoamericana*. 17 (142) 12-14.
28. Lazos, V.L. (1986) Aplicación de un estudio social de costo - beneficio en el caso de la grana cochinilla en Oaxaca. Tesis. ITAM.
29. Lengninger, L.A. (1991) Principios de Bioquímica. Ed. Omega S.A. Barcelona.
30. Little, C.A. y Mackinney, G. (1969) The sample as a problem. *Food Technology*. 23 (1) 25-28.
31. Loprieno, G., Boncristiani, E. y Loprieno N. (1992) Genotoxicity studies in vitro and in vivo of carminic acid (natural red # 4). *Fd. Chem. Toxic.* 30 (9) 759-764.

32. Mc. Faddin, F.J. (1980) Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Panamericana. 3a. edición. Argentina.
33. Madsen, H.L., Stapelfeldt, H.M. y Berstelsen, G. (1993) Cochineal as a colorant in processed pork meat. Colour matching and oxidative stability. *Food Chemistry*. 46 (3) 265-271.
34. Manu-Tawiah, W. y Haard, N.F. (1987) Recovery of carotenoprotein from the exoskeleton of snow crab *Chinocetes opilio*. *Canadian Institute of Food Science and Technology*. (1) 31-33.
35. Marmion, M.D. (1984). Handbook of U.S. Colorants for foods, drugs and cosmetics. Ed. John Wiley and Sons. 3a. edición.
36. Marshall, P.N. y Horobin, W.R. (1974) A simple assay procedure for carmine and carminic acid samples. *Stain Technology*. 49, 19-28.
37. Mc. Nutt, W.K., Powers, E.N. y Sloan, E. (1986) Food colors, flavors and safety. A consumer viewpoint. *Food Technology*. (1)
38. Meggos, N.H. (1984) Colors-key Food ingredients. *Food Technology*. (1) 70-74.
39. Merck. The Merck Index. Ed. Merck & Co., Inc. 11a. edición. USA: 1989.
40. Minolta. (1994). Manual de colorimetría, el color, sistemas de medición. Minolta Co.
41. Moore, L. (1991) The natural vs. certified. *Food Engineering*. (8) 69-71.
42. Mori, H., Iwata, H., Tanaka, T. (1991) Carcinogenicity study of cochineal in B6C3F₁ mice. *Fd. Chem. Toxic.* 29 (9) 585-588.
43. Morrison, T.R. y Boyd, N.R. (1980) Química Orgánica. Ed. Fondo educativo Interamericano. México.
44. Mottier, R. (1974) Cochenille acide carminique et. carmin. *Revue de la Conserve Alimentation Moderna*. (27) 85-86.
45. Nakamuro, K.D. (1993). Cochineal and derivatives from Peru, present situation and future outlook. Resumen del trabajo presentado en "The first International Symposium on Natural Colorants for Food, Nutraceuticals, Beverages and Confectionary". Nov. 7-10 Amherst, Massachusetts.

46. Norma Oficial Mexicana. NOM 117-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por absorción atómica. Secretaría de Salud.
47. Norma Oficial Mexicana. NOM 118-SSA-1994, Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes Inorgánicos. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud.
48. Norma Oficial Mexicana. NOM 119-SSA-1994, Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes Orgánicos Naturales. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud.
49. Official Journal of the European Communities. (1994 - Oct- 9) European Parliament and Council Directive 94/36/EC on Colours for use in Foodstuffs.
50. Ottestätter, G. (1990) Colorantes Alimenticios. Ayer-Hoy-Mañana. Industria Alimentaria. (9) 3-8.
51. Pérez, D.J.A. (1992) Anteproyecto de una planta procesadora de grana cochinilla para la obtención de sus principales derivados. Tesis. Universidad La Salle.
52. Piña, L.I. (1979) La grana o cochinilla del nopal. Publicación de los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial.
53. Pinzón, M.E. (1990) Relación numerada de aditivos alimentarios considerados por la Comunidad Económica Europea. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. 18 (4) 394-397.
54. Restrepo, I. (1992) La contaminación Atmosférica en México. Sus causas y sus efectos. Comisión Nacional de Derechos Humanos. México.
55. Reyes, C.P. (1990) Bioestadística Aplicada. Ed. Trillas. 2a. edición. México.
56. Reyes, Q.R. (1991) Evaluación de la estabilidad y aplicación de una mezcla de colorantes de rojo cochinilla y rojo # 3. Tesis. FESC. UNAM.
57. Rivera, S.P. (1995) Optimización de la extracción de pigmento de origen natural proveniente de las cabezas de camarón. Tesis. FESC. UNAM.
58. Robyt, F.J. y White, J.B. (1990) Biochemical Techniques. Ed. Waveland Press, Inc. Iowa State University. USA.
59. Rodríguez, H.I., Sáenz, P.D. y Saavedra, O.O. (1988) La cochinilla un parásito singular. Dpto de Producción Agraria. Universidad Politécnica de Canarias. 677 (57) 914-919.

60. Santiago, J. (1995) Colorantes para alimentos. *Tecnología de Alimentos*. 30 (4) 26-33.
61. Sawaya, M.J. (1993) Extracción, caracterización y estabilidad de pigmentos de chile ancho. Tesis. FESC. UNAM.
62. Schul, J. (1993) An ancient but still young colorant. Resumen del trabajo presentado en "The first International Symposium on Natural Colorants for Food, Nutraceuticals, Beverages and Confectionary". Nov. 7-10 Amherst, Massachusetts.
63. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Subsecretaría de Comercio Exterior. Sistema de Estadísticas de Comercio Exterior. Banco Nacional de Comercio Exterior.
64. Simpson, B.K. y Haard, N.F. (1985) The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry*. (7) 212-222.
65. Skoog, A.D. (1986) *Análisis Instrumental*. Ed. Interamericana. 2a. edición. México.
66. Streitwieser, A.J. y Clayton, H.H. (1985) *Química Orgánica*. Ed. Interamericana. México.
67. Toral, M.T. (1973) *Fisicoquímica de superficies y sistemas dispersos*. Ed. URMO España.
68. Valdés, M.S.E. et al. (1993) Evaluation of the stability of cochineal pigment and its potential use in food products. Resumen del trabajo presentado en "The first International Symposium on Natural Colorants for Food, Nutraceuticals, Beverages and Confectionary". Nov. 7-10 Amherst, Massachusetts.
69. Valle, V.P. (1991) *Toxicología de Alimentos*. México.
70. Vilorio, M.L. (1995) Obtención de una emulsión seca de oleoresina de chile ancho. Tesis. FESC. UNAM.
71. White, A. y Handler, P. (1970) *Principios de Bioquímica*. Ed. Mc. Graw-Hill. México.
72. Willard, H.H. (1976) *Instrumental Methods of Analysis*. Ed. Wadsworth Inc. 8a. edición USA.
73. Willard, H.H. (1991) *Métodos Instrumentales de Análisis*. Ed. Iberoamericana. México.
74. Williams, B.L. y Wilson, K. (1981) *Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental*. Ed. Omega. Barcelona. España.

75. Wouters, J. y Verkeken, A. (1989) The scale insect dyes. (Homoptera: coccioidea). Species Recognition by HPLC and Diode array analysis of the dyestuffs. *Annls. Soc. ent. Fr. (N.S.)* 25 (4) 393-410.
76. Yamada, S., Noda, N. y Hayakawa, J. (1993) Analysis of Natural Colouring Matters in food. 4 Methylation of cochineal color with Diazomethane for the Analysis of food products. *J. Agric. Food. Chem.* (6) 1071-1075.
77. Yuink-Hei-Mue. (1991) Natural Foods Colours and Flavours. A survey of the Netherlands and other major markets in the European Community. Ed. C.B.

ANEXO 1

Para determinar el diámetro promedio de partícula se usó la serie de tamices Tyler cuyo diámetro de abertura de malla se muestra en el siguiente cuadro:

No. de malla.	ABERTURA	SERIE TYLER
	(mm)	DOBLE MALLA
	7.925	2 1/2
3	6.680	--
	5.613	3 1/2
4	4.699	--
	3.962	5
6	3.327	--
	2.794	7
8	2.362	--
	1.981	9
10	1.651	--
	1.397	12
14	1.168	--
	0.991	16
20	0.833	--
	0.701	24
28	0.589	--
	0.495	32
39	0.417	--
	0.351	42
48	0.295	--
	0.246	60
65	0.208	--

	0.175	80
100	0.147	--
	0.124	115
150	0.104	--
	0.088	170
200	0.074	--
	0.061	250
270	0.053	--
	0.043	325
400	0.037	

El diámetro de partícula promedio se calculó con la siguiente ecuación:

$$D_p = \frac{\text{abertura de malla a través de la que pasa} \cdot \text{abertura de malla en la que se retiene}}{2}$$

2

$$D_s = 1 / (\sum x / D_p)$$

Donde: D_p = diámetro de partícula. (mm)

D_s = diámetro promedio de la distribución de partícula. (mm)

x = fracción retenida por tamiz.

Fuente: (2).

ANEXO 2

Determinación del contenido de ácido cármínico.

Procedimiento:

1. Pesar 0.10 gr. de muestra y colocarla en un vaso de precipitados de 250 ml.
2. Adicionar 30 ml. de HCl 2 Normal y calentar a ebullición en baño maría durante 3 - 4 minutos.
3. Vaciar esta mezcla en un matraz aforado de 1000 ml. y aforar con agua destilada.
4. Preparar un blanco de reactivos con HCl 2 Normal y agua destilada en partes proporcionales a lo usado para analizar la muestra.
5. Leer la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 494 nm.
6. Calcular el porcentaje de ácido cármínico de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ác. cármínico} = \frac{\text{Absorbancia} \times 100}{13.9 \times (\text{peso muestra en gr})}$$

Fuente: Food Chemical Codex, (31, 48).

ANEXO 3

Cromatografía generalidades

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos que pueden ser desde simples iones inorgánicos hasta complejas macromoléculas. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria, dicha fase puede ser sólida, líquida o una mezcla sólido - líquido inmovilizada; la fase móvil puede ser líquida o gaseosa y discurre por o a través de la fase estacionaria.

La selección de fases estacionarias y móviles se hace de manera que los compuestos a separar tengan distintos coeficientes de distribución teniéndose con esto diferentes tipos de cromatografía:

- **Cromatografía de adsorción:** se establece un equilibrio de adsorción entre un sólido poroso estacionario y una fase líquida o gaseosa móvil; la separación de componentes por este método depende de las diferencias de los grados de adsorción del adsorbente y de la solubilidad del disolvente empleado, ejemplos: cromatografía en columna (de líquidos o de gases) y cromatografía en capa fina.
- **Cromatografía de reparto:** hay un equilibrio de reparto o de distribución entre un líquido estacionario o un semilíquido y una fase líquida móvil, ejemplos: cromatografía en papel y cromatografía de distribución en contracorriente.

- **Cromatografía de intercambio iónico:** el equilibrio de intercambio iónico se establece entre una resina de intercambio iónico la cual puede ser de aniones o de cationes como fase estacionaria y una fase de electrolitos móvil.
- **Cromatografía de permeabilidad:** se tiene un equilibrio entre la fase líquida en el interior y en el exterior de una estructura porosa (tamiz molecular), la separación de moléculas se da atendiendo su tamaño y forma geométrica.
- **Cromatografía de afinidad:** el equilibrio se da entre una macromolécula y una pequeña molécula por la que tiene una elevada especificidad biológica y por lo tanto afinidad.

En la cromatografía de líquidos de alta presión también conocida por las siglas: HPLC por su nombre en inglés se tiene buena resolución, reproductibilidad, cortos tiempos de análisis y gran sensibilidad. En este método se emplean columnas de diámetro muy reducido (de 4 a 5 mm), rellenas de materiales especiales cuyas partículas tienen tamaño de 3 a 10 μm de diámetro. Este tipo de columna es muy eficaz pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil por lo que se emplean sistemas de bombeo de alta presión que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. Como la cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, la cantidad de muestra que se requiere también es mínima siendo por lo general de 1 a 10 microgramos. A la salida de la columna hay un detector el cual proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale (cromatograma), este se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

En el HPLC existen dos tipos de sistemas de elución: sistema isocrático (la muestra es inyectada en la columna y la fase móvil se mantiene sin cambio durante el tiempo necesario para que los componentes de la muestra eluyan de la columna) sistema de gradiente (la composición de la fase móvil varía con respecto al tiempo de análisis).

Los detectores en la cromatografía responden a la concentración del soluto produciendo una señal que es proporcional a la concentración del mismo, cuando se grafica la señal con respecto al tiempo, se obtiene un pico de elución; en el cromatograma la distancia desde que eluye la muestra hasta la cresta del pico de elución se le llama tiempo de retención (RRT), el tiempo de retención de cada compuesto bajo determinadas condiciones de trabajo constantes (tipo de columna, temperatura, fase móvil, presión, etc.) comparado con otras muestras de referencia corridas a las mismas condiciones sirve para identificar con certeza a que substancia corresponde cada pico; en el análisis cuantitativo para conocer la cantidad de cada compuesto basta con saber el área bajo la curva del pico de elución, para relacionar las áreas de los picos con la cantidad de componente presente es necesario haber efectuado un calibrado previo utilizando compuestos estándar de concentración conocida.