



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN DEL COLORANTE ROJO DE LA
COCHINILLA (*Dactylopius coccus*): EFECTO DEL pH Y LA
TEMPERATURA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ANAYELY MONROY MONTIEL



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	PROF. FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS
VOCAL	PROF. MA. DE LOS ANGELES VALDIVIA LÓPEZ
SECRETARIO	PROF. ALBERTO TECANTE CORONEL
PRIMER SUPLENTE	PROF. JOSE GUILLERMO AGUILAR OSORIO
SEGUNDO SUPLENTE	PROF. LUIS PADILLA FUENTES

LUGAR DE TRABAJO:

LABORATORIO 313, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO "E" FACULTAD DE QUÍMICA
UNAM.

DIRECCIÓN:

Circuito de la Investigación Científica s/n
Conjunto E, Facultad de Química
Ciudad Universitaria
C.P. 04510
México, D. F.
TELÉFONO: 56225307 Correo electrónico:
tecante@servidor.unam.mx

Asesor: Alberto Tecante Coronel

Sustentante: Anayely Monroy Montiel

AGRADECIMIENTOS

Dr. Alberto Tecante Coronel

Por el gran apoyo que me brindó durante el desarrollo de este trabajo, por sus consejos, por su tiempo y sobretodo por creer en mi. ¡Gracias doctor, fue una grata experiencia trabajar con usted!.

QFB Agustín Reyó Herrera y al depto. de alimentos del laboratorio 4A

Por su apoyo para la realización de una parte de este trabajo, específicamente del análisis proximal y del HPLC.

M. en C. Carla Karina Chávez Moreno

Por proporcionar la materia prima para la realización de este trabajo y por el interés y las observaciones que aportó a este.

DEDICATORIAS

A mis padres Gerardo y Mary

Por haberme dado la vida y hacer de mí una persona fuerte y con grandes valores. ¡Gracias por educarme!, ¡gracias por confiar en mí!, ¡gracias por su apoyo!, ¡gracias por respetar mis pensamientos e ideas a pesar de los tropiezos!, pero sobretodo ¡gracias por sus cuidados y por su amor! Padres, son el principal motor de mi vida y estoy muy orgullosa de ustedes, ¡Los amo!

A mi hermano Alan

Por ser parte de mí, por su apoyo, por su cariño, por sus palabras de aliento, por ser mi guía y un ejemplo en mi vida. Te quiero hermano.

A mi sobrino Gerardito, a mi cuñada Elizabeth y al nuevo bebé

Por haber llegado y convertirse en una pieza importante de mi entorno y en una de las más grandes alegrías de mi vida. Los quiero mucho.

A mi tía Rosy

Por haber sido y ser uno de mis ejemplos a seguir, por su enorme cariño y por el apoyo incondicional que me ha brindado desde que tengo memoria.

A mis primas Fany, Valeria y Joselyn

Por su cariño y compañía, espero que esto sirva de algo para motivarlas a seguir adelante y que algún día ustedes también terminen este ciclo. Las quiero mucho y no olviden que cuentan con todo mi apoyo.

A Christian R. G. C.

Por ser mi mayor inspiración. Gracias por tu apoyo, por tu compañía y por haber formado parte de esta etapa en la que los dos crecimos y aprendimos lo más importante de la vida. Gracias por tu amor y espero que esto sea solo uno de los tantos momentos importantes que pasaremos juntos ¡TE AMO!.

A mis compañeros del laboratorio 313 Carmen, Christian, Laura y Mariana

Por todo el tiempo de convivencia y los momentos tan divertidos que pasamos juntos, por su apoyo emocional y académico que los hizo parte de este trabajo.

A mis compañeros de la EDN

Por el interés y el apoyo que me brindaron para que terminara este trabajo y por la fuerza y energía que me inspiraron para seguir superándome y poder crecer con ustedes.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	16
CAPÍTULO 1. La cochinilla como colorante.....	17
1.1 Los colorantes.....	17
1.2 Historia.....	17
1.3 Clasificación taxonómica.....	18
1.4 Morfología de <i>Dactylopius coccus</i>	20
1.5 Ciclo biológico.....	22
1.6 Química del insecto.....	23
1.7 Aspecto ecológico.....	26
1.8 Productos obtenidos de la cochinilla.....	27
1.9 Adulteraciones de la cochinilla.....	29
1.10 Aplicaciones de los productos de la cochinilla.....	29
1.11 Situación de la cochinilla y sus productos en el mercado.....	33

CAPÍTULO 2. Metodología experimental.....	36
2.1 Descripción de la materia prima.....	36
2.2 Análisis proximal de la materia prima.....	36
2.3 Extracción sólido-líquido.....	37
2.4 Pureza del estándar.....	37
2.5 Medición de la concentración de ácido carmínico por espectrofotometría.....	38
2.6 Medición de la concentración de ácido carmínico por HPLC.....	40
2.7 Análisis estadístico.....	42
CAPÍTULO 3. Resultados y discusión.....	43
3.1 Análisis proximal de la materia prima.....	43
3.2 Extracción total de colorante en el Soxhlet.....	44
3.3 Espectrofotometría.....	45
3.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	49
3.5 Comparación entre las técnicas de HPLC y espectrofotometría para la determinación de la cantidad de ácido carmínico.....	52
CONCLUSIONES.....	56
REFERENCIAS.....	57

ANEXOS.....	61
ANEXO 1. Análisis proximal de la materia prima cochinilla.....	61
A.1.1. Ácido carmínico.....	61
A.1.2. Cenizas.....	62
A.1.3. Extracto etéreo.....	62
A.1.4. Hidratos de carbono.....	63
A.1.5. Humedad.....	63
A.1.6. Proteína.....	64
ANEXO 2. Preparación de buffers.....	66
A.2.1. Buffer Glicina-HCl (pH 2).....	66
A.2.2. Buffer para pH 5.....	66
A.2.3. Buffer de fosfatos (pH 7).....	66
A.2.4. Buffer universal (pH 10).....	66
ANEXO 3. Resultados de análisis estadístico (ANOVA).....	67

INDICE DE CUADROS

CUADRO	CONTENIDO	PÁGINA
1	Clasificación taxonómica de la cochinilla.	19
2	Composición general de la cochinilla <i>Dactylopius sp.</i> Hembra madura.	24
3	Utilización de colorantes de carmín y cochinilla.	31
4	Composición de las fases empleadas en el cromatógrafo.	42
5	Composición de la materia prima, cochinilla en polvo.	43
6	Porcentajes de ácido carmínico obtenidos por espectrofotometría para cada extracción.	45
7	Porcentajes de ácido carmínico determinados por HPLC para cada extracción.	49

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Hembras vivas de cochinilla en su hábitat natural.	21
2	Morfología y ciclo biológico de la cochinilla.	22
3	Fórmula desarrollada del ácido carmínico.	25
4	Obtención de antraquinona a partir de antraceno.	26
5	Espectro infrarrojo de ácido carmínico estándar.	38
6	Curva estándar de ácido carmínico por espectrofotometría.	39
7	Curva estándar de ácido carmínico por HPLC.	41
8	Cinética de extracción a 30°C de ácido carmínico determinado por espectrofotometría.	46
9	Cinética de extracción a 50°C de ácido carmínico determinado por espectrofotometría.	47
10	Rendimientos de extracción de colorante de la cochinilla para cada condición de pH y temperatura con la cantidad de ácido carmínico determinado por espectrofotometría.	48
11	Cinética de extracción a 30°C con el ácido carmínico determinado por HPLC.	50
12	Cinética de extracción a 50°C con el ácido carmínico determinado por HPLC.	51
13	Rendimientos de extracción de colorante de la cochinilla	52

para cada condición de estudio con el ácido carmínico determinado por HPLC.

- | | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 14 | Estructuras químicas del ácido kermésico y carmínico. | 53 |
| 15 | Cromatograma en donde se observa el pico atribuido a la presencia de ácido kermésico. | 54 |
| 16 | Rendimientos de extracción de colorante en la cochinilla a pH 7 para cada temperatura de estudio con la cantidad de ácido carmínico por HPLC y por espectrofotometría. | 54 |

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la extracción del colorante rojo de la cochinilla (*Dactylopius coccus*) bajo diferentes condiciones de pH y temperatura a partir de cochinilla desengrasada y en polvo. En la primera parte se hizo el análisis proximal de la cochinilla para conocer la composición general del insecto, pero principalmente su contenido de colorante. El análisis mostró que la materia prima empleada en este estudio fue cochinilla de descarte ya que su contenido de ácido carmínico fue menor y su contenido de proteína e hidratos de carbono fue mayor que el reportado en la literatura para grana fina. Posteriormente con el objeto de extraer la mayor cantidad de colorante y de conocer su cantidad inicial para calcular los rendimientos de extracción a las diferentes condiciones de pH y temperatura, éste se extrajo en un equipo de Soxhlet y la cantidad se determinó por medio de una técnica espectrofotométrica y por HPLC. La primera técnica resultó en un contenido inicial, expresado como ácido carmínico, de 14.4%, mientras que la segunda resultó en 20.9%. Ambas cantidades fueron superiores al 10% obtenido en el análisis proximal. La comparación entre las técnicas espectrofotométrica y HPLC permitió conocer el contenido real de colorante en el insecto y de esta manera expresar los rendimientos de las extracciones de manera más precisa. En la segunda parte se extrajo el colorante a pH 2, 5, y 7 y temperaturas de 30 y 50 °C en una sola etapa en modo discontinuo con las fases sólida y líquida en movimiento. La relación inicial sólido-disolvente fue de 1:20. Se determinó la concentración de ácido carmínico extraído para cada

combinación de variables mediante espectrofotometría y HPLC para comparar los resultados de cada técnica. A pH 7 y 50 °C se extrajo el mayor porcentaje de colorante total. La determinación de colorante por HPLC permitió expresar los rendimientos con referencia al ácido carmínico y mostró la presencia de ácido kermésico en los extractos.

INTRODUCCIÓN

El color es importante en la presentación de los productos terminados, ya que aunque sus propiedades funcionales, nutricionales y del gusto no se vean afectadas, es uno de los primeros atributos percibidos por los sentidos e influye de manera significativa en la aceptación o rechazo del producto (Furia 1975). El uso de colorantes sintéticos en la industria de alimentos, en la farmacéutica y en la cosmética principalmente, está cada vez más restringido y se han ido retirando del mercado por la aplicación de legislaciones que tienden a limitar su uso, debido a los problemas que se originan durante su degradación y absorción dentro del organismo, provocando daños en la salud de los consumidores; además de que algunos presentan cierta inestabilidad ante los cambios de temperatura, la luz y el ataque microbiano (Code of Federal Regulations 1991). Esto ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir, cuando es factible, los colorantes artificiales por otros naturales.

En los últimos treinta años se ha puesto especial atención a la recuperación de los colorantes naturales como sustitutos viables de los sintéticos y esta tendencia ha favorecido entre otros, al colorante de la cochinilla (*Dactylopius coccus*), el cual es bien apreciado por la industria ya que sus análisis toxicológicos demuestran que es un colorante seguro, de acuerdo con los reportes de la FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1995) y de la Unión Europea, con un gran potencial (The European Community (EC) Officially Adopts the Name European Union (EU), Effective Nov. 1993, 1994).

Actualmente, en la reglamentación vigente en la Comunidad Económica Europea y en la de la Food and Drug Administration de Estados Unidos, que en buena medida son la base de la normatividad legal adoptada por todos los países, la cochinilla y el carmín de grana aparecen como colorantes inocuos para la salud humana, por lo que a partir de 1960 han tenido una creciente aplicación en la industria.

El ácido carmínico, principio activo del colorante, es producido por las hembras de *Dactylopius coccus* y se extrae de diversas maneras, desde formas muy artesanales hasta formas industriales, mediante las cuales se transforma en un polvo fino de color rojo púrpura intenso, que se presenta comercialmente en carmín líquido, extracto de cochinilla libre de proteínas, ácido carmínico en cristales, carmín laca en polvo o carmín polvo soluble en agua.

Como el mercado que procesa la cochinilla “cruda” se concentra en pocos países industrializados, como Francia, Gran Bretaña, Italia y Japón y aunque la cochinilla es un producto comercial, el proceso de obtención de colorante por extracción con disolvente permanece prácticamente secreto o por lo menos no divulgado en la literatura abierta. Debido a esto, en el campo de la extracción del colorante y de la obtención de los diferentes productos de cochinilla existe en la mayoría de los casos ambigüedad en los parámetros de extracción (Ramos 1983). Así que las aportaciones hechas hasta el momento en el ámbito entomológico y las siguientes sobre la misma línea benefician directamente en dos formas principalmente: primero que sin la propagación del insecto no se cuenta con materia prima para la obtención del colorante y segundo que la

manipulación del contenido del colorante en el insecto se refleja directamente en el rendimiento durante su separación. Resulta entonces indispensable establecer las condiciones de extracción del colorante (Chávez 1994), por lo cual toda esta situación justifica ampliamente el presente estudio, uno de cuyos propósitos es conocer más acerca de la extracción de colorante y las variables que pueden influir de manera directa en su rendimiento.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer el efecto del pH y la temperatura en los rendimientos de extracción de ácido carmínico en la cochinilla, mediante un sistema de extracción dinámico por lotes en una sola etapa.

Objetivos específicos

- Conocer la calidad de la cochinilla empleada como materia prima mediante un análisis proximal.
- Determinar las condiciones de pH y temperatura a las cuales se extrae la mayor cantidad de ácido carmínico.
- Comparar la técnica de determinación espectrofotométrica de colorante con cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación del ácido carmínico y determinar cuál método proporciona resultados más confiables y más precisos.

1.1 Los colorantes

Los colorantes son todas aquellas sustancias que proporcionan color y tienen cierta estabilidad, dependiendo de su origen, estructura química, sustrato en que se apliquen y condiciones de almacenamiento entre otros (Marmion 1991). Son una especie y categoría única dentro de los aditivos ya que son de gran importancia en la selección y preferencia de un insumo (Furia 1975).

La industria de los colorantes se ha venido desarrollando principalmente en el siglo XX con la síntesis de colorantes (Chopin et al. 1980) que representan materiales con propiedades reproducibles en cada proceso de obtención, de bajo costo y fácil aplicación. Sin embargo, muchos de los colorantes sintéticos se han ido retirando del mercado por los problemas que se originan durante su degradación y absorción dentro del organismo (Code of Federal Regulations 1991); debido a esto su uso es cada vez más restringido (FDA Consumers 1990).

1.2 Historia

La cochinilla es un insecto originario de México cuya antigüedad no ha sido determinada con exactitud, aunque Clavijero (1945) y Humboldt (1941) suponen que se remonta al llamado periodo Tolteca, que comprende alrededor del siglo X de nuestra era, registrándose su auge durante la época prehispánica y colonial. Desde la época colonial hasta nuestros días se designa indistintamente al

insecto con los nombres de grana o cochinilla, la palabra grana deriva del latín *grana*, cuyo singular *granum* significa grano e igualmente del latín *coccinus* que significa escarlata (Sopena 1941).

Diversos testimonios señalan la importancia de este pequeño insecto parásito del nopal que desde hace siglos se ha utilizado para teñir de rojo carmín el cuerpo, los dientes, textiles, códices, muros y alimentos (Chávez 2002). En 1856 se produjo el primer colorante artificial y con esto el arte del teñido dio un giro completo. La cochinilla no podía competir con los colorantes químicos, principalmente las anilinas, y la demanda disminuyó significativamente, aunque nunca cesó del todo. A mediados del Siglo XX entró en escena otro factor que reactivó nuevamente el cultivo de la grana. Se detectaron casos de alergias provocadas por el uso de colorantes artificiales en alimentos industrializados e incluso algunos de éstos fueron señalados como agentes cancerígenos.

Actualmente la coccidocultura se encuentra en México en el inicio de una segunda etapa de producción, misma que se realiza en gran medida bajo el sistema de nopaloteca (Portillo 1991). Sin embargo, la explotación del insecto aún se considera incipiente (Chávez 2002).

1.3 Clasificación taxonómica

En 1835, Cockerell asignó un nombre distinto al insecto gracias a los estudios y descripción más detallada que realizó el coccidiólogo italiano O. Costa L. en 1835. De esta forma la cochinilla quedó denominada como *Dactylopius coccus* Costa L. o *Dactylopius coccus*, *Dactilopius coccus*,

Dactylopius coccus Costa L. Se agregó el apellido Costa, en honor al investigador. El Cuadro 1 muestra la clasificación taxonómica actual de la cochinilla (Venkataraman y Rao 1972, MacGregor 1976, Piña 1984). De todo el género únicamente *D. coccus* se considera de importancia comercial, ya que es utilizada para extraer el colorante o grana cultivada o fina (Portillo 1991), el cual ha sido distribuido de América al resto del mundo por esta propiedad. El resto de las especies forman un grupo de cochinillas denominadas granas silvestres o corrientes, indistintamente de la especie que se trate (De Lotto 1974, Portillo 1991, De Haro y Claps 1995, Pérez Guerra y Kosztarab 1992).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la cochinilla (Piña, 1984, Viguera et al. 1993)

Clasificación	Nombre
Reino	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Arthropoda</i>
Sub-phylum	<i>Mandibulata</i>
Clase	<i>Insecta</i>
Sub-clase	<i>Pterigota</i>
Orden	<i>Homóptera</i>
Sub-orden	<i>Strenorrhyncha</i>
Superfamilia	<i>Coccoidea</i>
Familia	<i>Dactylopiidae</i>
Género	<i>Dactylopius</i>
Especies	<i>Coccus</i>

Existen evidencias que hacen suponer que *Dactylopius coccus* Costa fue y sigue siendo la cochinilla “original”, o el ancestro de las cochinillas silvestres. Esta hipótesis se basa en dos observaciones, primero que la hembra es de mayor talla, que en las otras especies y esto está en relación directa con el contenido de material colorante. Hay que recordar que la reducción de tamaño es una estrategia que adoptan los insectos a fin de facilitar su supervivencia al permitir un más rápido desplazamiento por cualquier vía y reducir el consumo de nutrientes. La segunda modificación que el insecto sufre, es el aumento en la producción de “tomentum” o cera algodonosa que cubre el cuerpo, las especies silvestres se caracterizan porque esta capa es muy abundante y tiene compuestos químicos que alejan a algunos agresores, de ahí que recibiera el nombre de cochinilla algodonosa o “cottony”. Este carácter de adaptación le ayuda a sobrevivir en condiciones adversas silvestres o fuera del manejo humano como es el caso de *Dactylopius coccus* en la práctica de la “coccidocultura” (MacGregor 1976, MacKenzie 1976).

1.4 Morfología de *Dactylopius coccus*

Entre la estructura de esta especie, los espiráculos se distinguen por estar bien desarrollados. Presenta setas modificadas muy delgadas, pequeñas y en número escaso. Sus poros son anchos con margen grueso, fuertemente esclerosado, en esta especie alcanzan el mayor grado de desarrollo y son muy característicos, se localizan en toda la zona ventral del tórax y/o abdomen con ausencia de poros de bordes angostos. Se caracterizan por ser gregarias, se

localizan los cladodios cubiertos por cera blanca. Ponen en promedio 419 huevos por hembra y son capaces de ovodepositar aun desprendidas del sustrato (De Haro y Claps 1995).

Dentro de la especie *Dactylopius coccus* se presenta un marcado dimorfismo sexual, esto es, hembra y macho son muy diferentes en su etapa adulta (Figura 1) Las hembras maduras, entre 90 a 120 días de desarrollo, dependiendo de las condiciones del lugar tales como el clima, temperatura, precipitación pluvial, tienen un cuerpo globular con un tamaño que va desde 3 hasta 9 mm y diámetro de 2 a 5 mm, la mayor talla la alcanzan en la etapa de ovoposición. Son de color rojo hasta púrpura, dependiendo de la concentración del ácido carmínico, que también alcanza su máximo en dicha etapa, pueden en este momento separarse por métodos físicos, tales como el cribado o el tamizado para extraerles el colorante. con surcos transversales, una cubierta de cera blanca de apariencia algodonosa, carecen de alas y viven fijadas sobre los nopales en los que permanecen hasta que son colectadas o mueren.



Figura 1. Hembras vivas de cochinilla en su hábitat natural.

Durante su primera etapa de crecimiento las hembras pierden la propiedad de locomoción, manteniéndose vivas gracias a que insertan su aparato bucal para alimentarse de los nutrientes que contienen las pencas o cladodios. Por otra parte el macho posee un par de alas, su cuerpo está perfectamente definido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen, carecen de aparato bucal y es de menor tamaño que la hembra; 1 a 3 mm (Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara, 1992; International Life Science Institute 1984, Piña 1984).

La característica que distingue a las hembras es que después de haberse fijado en un punto determinado segregan ceras que las protegen y son responsables de esa apariencia algodonosa mencionada anteriormente (Clemente y Vidal 1986).

1.5 Ciclo biológico

La información acerca del ciclo biológico de *Dactylopius* se basa principalmente en los avances de estudios sobre *Dactylopius coccus* Costa, debido a su importancia comercial, pues de esta manera ha podido quedar establecido el momento de su desarrollo en que presenta la mayor concentración de colorante. Por lo que se puede decir que el ciclo biológico general de esta especie comprende las siguientes etapas: a) Huevo, b) Ninfa I, c) Desarrollo de filamentos, d) Primera muda, e) Ninfa II, f₂) Segunda muda, g₂) Hembra adulta, f₁) Capullo, g₁) Macho adulto (Figura 2).

El ciclo biológico de *Dactylopius coccus*, esta en función al sexo y al medio ambiente. El macho tiene una duración menor que la hembra y su diferenciación entre uno y otro sexo es durante el estadio de Ninfa II (Figura 2). A mayor altitud y temperaturas bajas, el insecto presenta un ciclo de vida más largo o viceversa, es decir a menor altitud y temperaturas altas el ciclo es más corto. Los huevos son ovalados, miden 1 mm en promedio, con superficie lisa y lustrosa; posteriormente presentan un color rojo vivo o morado lila.

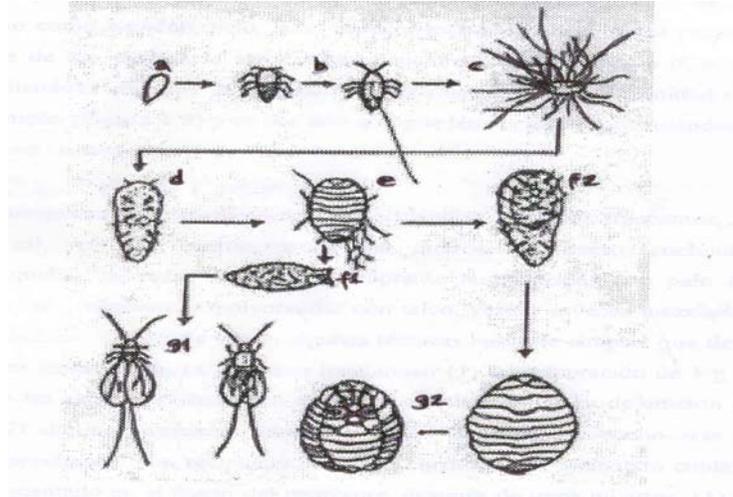


Figura 2. Morfología y ciclo biológico de la cochinilla (Vigueras et al. 1993). (a) huevo; (b) vista dorsal y ventral de la ninfa I migrante; (c) ninfa I establecida; (d) muda a ninfa II; (e) ninfa II, (f1) capullo de macho; (g1) vista ventral y dorsal de macho adulto; (f2) muda a hembra adulta; (g2) vista ventral y dorsal de hembra adulta.

La Ninfa I es conocida como ninfa migrante, es de color rojo, de forma oval con setas modificadas. Con presencia de antenas, patas y ojos. Se moviliza en este estadio buscando en la penca un lugar propicio para fijarse hasta ser adulta. La Ninfa II de forma ovoide de color rojo oscuro y lustroso, esta cubierta de una cera pulverulenta blanca, en este estadio permanece fija, posee antenas y patas reducidas, además se observa claramente un aparato bucal que cumple la función de inyector por el cual obtiene su alimento.

La hembra adulta es de forma ancha en el vientre, de color rojo, lustrosa y de consistencia blanda. Se cubre de una sustancia pulverulenta blanca. La vida de la cochinilla hembra tiene un promedio de 120 días. Realiza dos mudas antes de llegar a su madurez, la etapa de ovoposición se da al cabo de los tres meses aproximadamente, dependiendo de los factores bióticos y abióticos que intervienen en su ciclo biológico. Después la hembra muere lentamente depositando huevos infértiles.

El macho es de talla menor a la hembra, presenta un par de alas, antenas bien desarrolladas y patas delgadas. Su cuerpo es de color rojo, con ligera pulverulencia cerosa. No presenta aparato bucal desarrollado. En el desarrollo del macho el dimorfismo sexual se hace visible a partir de la Ninfa II, cuando comienza la formación de un cocón blanco ceroso, luego forma el

estado de pre-pupa y pupa, al interior del cual se desarrolla el macho adulto, que es elemento básico en la reproducción de la especie. Como macho adulto sólo vive de 3 a 4 días.

1.6 Química del insecto

La cochinilla hembra madura, de aproximadamente 90 días de vida, es decir cuando están listas para ovopositar o una vez que lo han hecho, contiene en promedio, en su mayoría proteínas e hidratos de carbono y en menor cantidad, extracto etéreo y el pigmento rojo denominado ácido carmínico o principio activo del colorante, cenizas y agua como se muestra en el Cuadro 2. Es importante señalar que de acuerdo con la literatura esta composición varía ligeramente (Clemente y Vidal 1986, Nicanor 1983).

La fracción de proteínas incluye los aminoácidos glicina, glutamina, lisina, ácido aspártico, alanina, serina, prolina, histidina, treonina, arginina, leucina, valina, tirosina, isoleucina, fosfoalanina, metionina y cisteína (Piña 1984). El extracto etéreo está compuesto por 83% de triacilglicéridos y el resto por ceras, ubicados en la parte externa del insecto y que sirven de protección a éste, ya que son repelentes a otros insectos y desagradables a sus principales depredadores, como aves y reptiles.

Cuadro 2. Composición general de la cochinilla *Dactylopius sp.* hembra madura (Badui 1990)

Compuesto	Contenido (%)
Ácido carmínico	10
Cenizas (minerales)	8

Hidratos de carbono	30
Extracto etéreo	12
Proteínas	40

El ácido carmínico es el nombre común del compuesto químico, establecido en 1965 por Venkataraman y Bathia (Venkataraman y Rao 1972), como: ácido 7- β -D-glucopiranosil-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxi-2-antraceno carboxílico y es el responsable de la coloración roja del líquido contenido en el insecto. Su ubicación es interna y fluye con los líquidos que circulan en el mismo. Su síntesis comienza a partir de la absorción de compuestos contenidos en la especie hospedera y es completada en el insecto. (International Life Science Institute 1984, Marmion 1991). Cada molécula de ácido carmínico es una antraquinona ácida, poli-hidroxilada, es decir, contiene un núcleo de antraceno, el cual es muy estable frente a la temperatura y la luz y encuentra unido un anillo de β -D-glucopiranososa, cuatro grupos hidroxilo, dos grupos oxo y un grupo metilo y adquiere su carácter de ácido por la presencia de un grupo carboxilo (Figura 3). Los cristales de ácido carmínico son de color rojo brillante que se oscurecen entre 130 y 135 °C; se descomponen entre 205 a 250 °C (Química Universal 1995), son muy solubles en agua, alcohol, éter, ácido sulfúrico concentrado y soluciones de hidróxidos de álcalis, son insolubles en éter de petróleo, benceno y cloroformo. Las soluciones de ácido carmínico son amarillas a pH 4.8 a 5 y rojo azuladas desde pH 6.2 y arriba de 8, usándose comúnmente el colorante entre pH 4.8 a 6.2. El carmín, principal producto de la cochinilla, se presenta como

pequeños fragmentos de polvo rojo brillante, puede disolverse en álcalis y ser utilizado como colorante (The Hereld Organization Science, Application & Marketing of Natural Colors in Food; Confectionery & Beverages, 1991-1995; Tropical Development y Research Institute 1983).

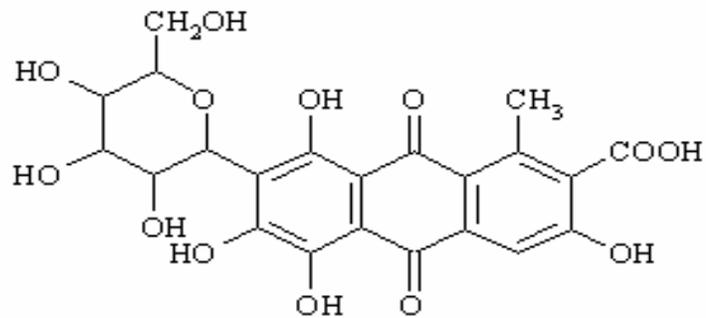


Figura 3. Formula desarrollada del ácido carmínico.

Los compuestos de antraceno y sus derivados, como las antraquinonas, se caracterizan por ser compuestos químicos coloridos por la presencia de tres anillos bencénicos, estructuras con resonancia magnética, igualmente estables (Fessenden y Fessenden 1983) (Figura 4). Los grupos hidroxilo presentes en la molécula de antraquinona pueden participar en reacciones de oxidación y reducción y por lo tanto presentar variaciones de coloración al modificarse el pH.

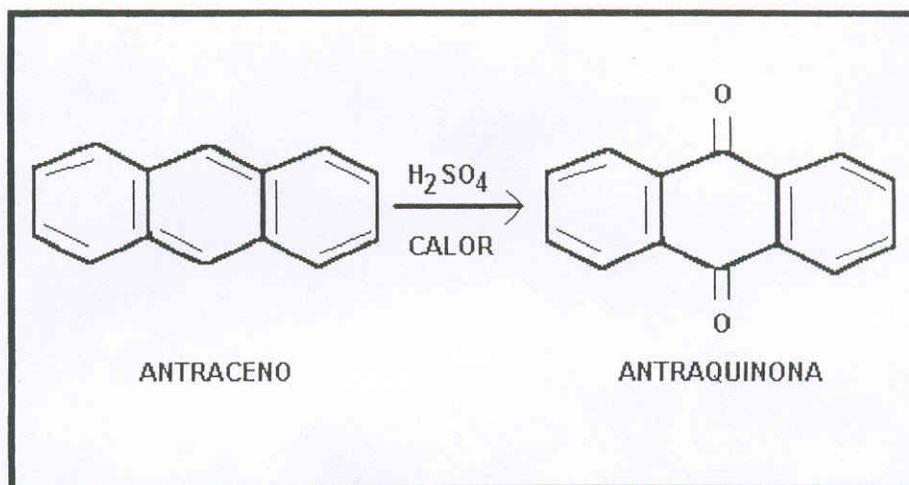


Figura 4. Obtención de antraquinona a partir de antraceno (Murillo 1958).

Esta característica los hace excelentes indicadores de pH (Hoxter 1979) y aumenta sus usos en alimentos y textiles; sin embargo, dificulta la determinación cualitativa y cuantitativa de los colorantes (Egan et al. 1988).

1.7 Aspecto ecológico

A los Dactylopius se los localiza dentro de los insectos de origen Neotropical, llamados comúnmente “cochinillas del carmín” o “carmine cochineals”, se les localiza exclusivamente en cactáceas, principalmente se alojan en los cladodios aunque pueden alimentarse también de las raíces, flores y frutos (De Haro y Claps 1995). Las plantas hospederas de *D. coccus* son compartidas con otras especies de dactilópodos. Tanto las hembras como los insectos inmaduros de ambos sexos se alimentan de la planta insertando sus largos estiletes en sus hospederos. A pesar de que *Pseudococcus* y *Dactylopius* comparten algunas características en común, como lo es su tamaño pequeño, son fáciles de

reconocer por su cubierta “algodonosa” que secretan y cubren su cuerpo rojo globoso (MacKenzie 1976, De Haro y Claps 1995). *Dactylopius*, es una pequeña familia que presenta una serie de características que le hacen única, en ciertos aspectos: primero, son los insectos que poseen un colorante preciado comercialmente, en distintas áreas *Dactylopius coccus*, segundo ciertas especies de la familia se usan para el control biológico de plagas (De Haro y Claps 1995). En México los enemigos naturales de *Dactylopius* son hormigas larvas de *Laetilia coceidivora*, *Hyperaspis trifurcata* y *Leucopis sp.*, el ácido carmínico es tóxico contra la larva de *Artemia salina*, algunas bacterias, el pez *Paramecium caudatum*, pero no contra hongos que tienen enzimas lignolíticas (Chávez 2002).

1.8 Productos obtenidos de la cochinilla

Es importante señalar que el carmín, el ácido carmínico, la cochinilla y el extracto de cochinilla suelen ser considerados sinónimos por lo que es importante establecer la diferencia entre cada uno de ellos.

- Insecto cochinilla, cochinilla, grana de cochinilla o grana. Es el propio insecto, el cual es de interés tanto para la reproducción de insecto vivo como para la obtención de materia prima que consta de insectos, hembras maduras, muertos o secos (Piña 1984). Se identifica en primera instancia por sus características morfológicas macroscópicas, el hospedero en que se desarrolla y el habitat (MacKenzie 1976). Posteriormente deben conocerse otras características que diferencien con mayor rigor a las especies, caracteres morfológicos

microscópicos.

-Ácido carmínico. Es el principio activo del colorante presente en los insectos cochinilla obtenido por un tratamiento de extracción y purificación, está contenido en los diversos productos de *Dactylopius* y son el extracto de cochinilla, carmín de cochinilla y los carmines (Code of Federal Regulations 1991).

-Extracto de cochinilla. Es la solución concentrada que resulta después de recuperar mediante una extracción alcohólica-acuosa el colorante contenido en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa, *Coccus cacti* L.): el principio activo es el ácido carmínico (Code of federal Regulations 1991).

-Carmín de cochinilla. Es la laca alumínica o calcio-alumínica del ácido carmínico sobre un sustrato de hidróxido de aluminio, cuyo principio activo (color primario) es el propio ácido obtenido por extracción acuosa a partir de la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa, *Coccus cacti* L.) (Code of federal Regulations 1991). El carmín contiene de 52 a 56% de material colorante, reportado como ácido carmínico, 20% de materia nitrogenada, 17% de humedad y 7% de cenizas (Clemente y Vidal 1986). Para la FDA el termino carmín sólo se aplica a productos con un contenido de ácido carmínico no menor de 50% (Marmion 1991).

El carmín es un polvo de aspecto lustroso y de color *sui generis*; insoluble en agua, alcohol, éter, benceno, cloroformo y soluble en amoniaco en el que produce una solución clara de color intenso al 10%. Es precipitado nuevamente, sólo una parte, con ácido acético diluido. Se disuelve en hidróxido de potasio

produciendo un color rojo y con los ácidos un color rojo-amarillo. El carmín es decolorado por el cloruro de calcio y cambia de color en medio fuertemente ácido y básico; debido a que el carmín es insoluble en agua no puede ser usado como indicador de pH. Se obtiene gracias a que el ácido carmínico tiene la propiedad de formar complejos con una variedad de metales, elementos metálicos hidrolizables, según los cuales adquiere diferentes colores (Clemente y Vidal 1986). Otra variedad de “carmines” está constituida por los llamados solubles en agua, la cual se divide en dos grandes grupos de compuestos: (1) *Sales alcalinas de carmín* constituidas por compuestos inestables frente a los ácidos, que precipitan en este tipo de medios; (2) *carmines solubles en agua o carminatos* que son compuestos estables en medios ácidos, en los que la brillantez de su coloración roja se ve modificada con los cambios de pH del medio. Estos compuestos se obtienen por tratamiento del ácido carmínico con sales.

1.9 Adulteraciones en cochinillas

Las adulteraciones efectuadas sobre las cochinillas son muy frecuentes, e incluyen la adición de cal, cemento, cenizas, arena fina, queroseno, insectos cochinilla de menor tamaño o aquellas agotadas de material colorante humedecidas con palo rojo, palo de Campeche u otro colorante, espolvoreadas con talco, yeso y a veces mezcladas con trozos de plomo (Nicanor 1983).

El parámetro directo que determina la calidad del insecto es el contenido de ácido carmínico y de acuerdo con éste la grana puede considerarse de

exportación, de comercialización o de descarte.

1.10 Aplicaciones de los productos de la cochinilla

Históricamente el colorante proveniente de *Dactylopius* ha sido utilizado como colorante de textiles, alimentos, códigos y construcciones (Piña 1984). Actualmente sus usos van desde análisis químico, teñido de preparaciones microscópicas y preparación de acuarelas para pintores, aunque entre los usos no convencionales se le destaca como un gran cordial, sudorífico, aleximórfico y lubrificante (MacGregor 1976). El colorante carmín se utiliza de varias maneras dependiendo de la coloración, solubilidad y características de estabilidad deseadas (Cuadro 3).

El carmín se utiliza en muchas áreas, por ejemplo:

Alimentos

- Productos cárnicos: salsas para carne, paté, salami, surimi.
- Productos de tomate para estandarizar el color de salsas.
- Productos lácteos: yogurt sin cultivos activados, helados, quesos.
- Bebidas: incluyendo jugos y bebidas no carbonatadas.
- Repostería: bases de harina para pasteles y galletas (fresa), jaleas, gelatinas y conservas, jarabes, cerezas marraschino o de cocktail, cereales.
- Confitería: caramelo macizo, cubiertas de nuez o pistache (confitados), goma de mascar.

Cuadro 3. Utilización de colorantes de carmín y cochinilla (Duxbury 1993, Química Universal 1995, The Hereld Organization Science, Application & Marketing of Natural Colors in Food, Confectionery & Beverages, 1991-1995)

Preparados de carmín insolubles en agua	Preparados de carmín	Extracto de cochinilla hidrosolubles
Cosméticos	Productos cárnicos	Bebidas
Medicamentos	(embutidos)	Derivados lácteos (helados, yogures)
Derivados lácteos	Derivados lácteos (helados, yogures)	Conservas de frutas
Panadería	Conservas de frutas	Confitería
Confitería	(mermeladas)	
	Bebidas (licores)	
	Confituras, caramelos y chicles	
	Panadería y galletería	
	Cosméticos	
	Medicamentos	

Productos farmacéuticos

- Jarabes
- Tabletas: vitaminas masticables y comprimidos
- Pastas: dentríficas y cubiertas de antibióticos

Cosméticos

- Polvo facial, lápiz labial, maquillaje en pasta, rubor líquido, máscara para pestañas, cremas y lociones.

En Estados Unidos es el único pigmento orgánico permitido para usarse en la zona de los ojos (Duxbury 1993; Química Universal 1995; The Hereld Organization Science, Application & Marketing of Natural Colors in Food, Confectionery & Beverages, 1991-1995).

El desarrollo de los llamados carmínes, pueden ir desde amarillo-rojo hasta casi azul, manteniendo sin alteración alguna su contenido de ácido carmínico (Química Universal 1995). Además de todas las ventajas que estos colorantes ofrecen, no existe limitación ni restricción en el uso de los colorantes de la cochinilla (carmín) en ninguna de las tres áreas ya mencionadas. (FDA consumers 1990). Por cuestiones prácticas, el límite de su uso está determinado por el equilibrio entre el costo que representa el colorante en el producto terminado y las buenas prácticas de manufactura (Duxbury 1993; Química Universal 1995; The Hereld Organization Science, Application & Marketing of Natural Colors in Food, Confectionery & Beverages, 1991-1995).

El carmín presenta un tono rojo magenta y el extracto de cochinilla es rojo-púrpura, ambos similares al rojo 3 sin ser tan brillantes como este último. Se mezclan adecuadamente con colorantes azules para crear los tonos púrpura y rosa, igualmente de menor brillantez que el colorante por sustituir. Presentan excelente estabilidad frente al calor, la luz y son resistentes a la oxidación-reducción. Los nuevos desarrollos de carmínes, los ácidos solubles en agua y los carmínes en polvo solubles, han ido introduciéndose en lugar del rojo 3. Las desventajas que ofrecen estos colorantes son su elevado costo, no tienen la certificación Kosher y se observan variaciones en el producto terminado de lote

a lote por la materia prima de las que se les extrae (Duxbury 1993). También se usan mezclas de colorantes, con el fin de reducir el costo del producto terminado, tal es el caso al mezclar rojo 40 con carmín.

En la Unión Europea el carmín y el extracto de cochinilla deben etiquetarse E120 e internacionalmente se conocen como colorante rojo natural No. 4. La OMS ha establecido un límite de consumo diario de 5 mg/kg-día. El uso de la laca carmín aumentó a partir de los años 80 al ser un sustituto probable del FD&C rojo 3 (Duxbury 1993; FDA Consumer 1990; Sapers 1994). Más aún, en la medida en que se han incrementado las fuentes de colorantes naturales, incluyendo la explotación del insecto cochinilla, los fabricantes de diversos productos han enfocado su atención en el carmín y el extracto de cochinilla, en el carmín líquido y hasta en el ácido carmínico, los cuales se utilizan en un intervalo de 12 a 150 ppm. (International Life Science Institute 1984, Marmion 1991).

1.11 Situación de la cochinilla y sus productos en el mercado

La producción mundial de los colorantes representa una industria que cada día se extiende más. En 1987 a nivel mundial se produjeron alrededor de 700 000 toneladas de colorantes, de los cuales el 2.2% estaban destinados a las áreas de alimentos, medicamentos y cosméticos. A pesar de que estos compuestos abarcan un pequeño porcentaje, su mercado mundial tiene un crecimiento extraordinario.

La proporción de colorantes naturales usados en alimentos es creciente

debido a la toxicidad de algunos compuestos sintéticos. Sin embargo cerca del 80% de las ventas totales en Estados Unidos, uno de los principales mercados, es cubierto por tres colorantes sintéticos, compuestos monoazóicos, como la tartrazina (amarillo), dos azofenoles (azules) y el rojo 40 (Clemente y Vidal 1986).

En México, el mercado estimado para los colorantes, excluyendo el color caramelo, es cubierto en su mayor parte por los amarillo-naranja que representa el 55% y los rojos el 25%. Esto significa que una parte muy importante del mercado consume principalmente colorantes que imparten tonalidades rojas, siendo reducida la lista de los de origen sintético, en los que se incluyen el rojo 2, rojo 3, rojo 4 y rojo 40, todos ellos FD&C, que se encuentran en uso en la lista de colorantes certificados en forma “provisional”. En la Comunidad Económica Europea y algunos países de Asia la tendencia al uso de colorantes naturales ha favorecido a los colorantes de la cochinilla cuyos resultados toxicológicos demuestran que es un colorante seguro (Hendry 1990; Lloyd & Associates 1979), de acuerdo con los reportes de la FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1995 y con un gran potencial, como se puede ver en las aplicaciones que tiene (The European Community (EC) Officially Adopts the Name European Union (EU), Affective Nov. 1993, 1994).

El mercado que procesa la cochinilla “cruda” se concentra en pocos países industrializados, como Francia, Gran Bretaña, Italia y Japón. Una cantidad menor la cubren la República Alemana, Bélgica-Luxemburgo y Argentina que representa un mercado potencial. La preparación del ácido carmínico y del

carmín de cochinilla a partir del insecto es realizada por tres firmas en Francia, una en Italia y otra en Alemania. Estas compañías cubren sus mercados domésticos, así como otros mercados con extracto de carmín (The European Community (EC) Officially Adopts the Name European Union (EU), Affective Nov. 1993, 1994). Francia se considera el procesador de cochinilla más grande del mundo, siendo Perú el principal proveedor de Francia, quien cubre el 90% de sus requerimientos. Los siguientes procesadores en importancia son Japón y las Islas Canarias a Italia (The Hereld Organization. Science, Application & Marketing of Natural Colors in Food. Confectionary & Beverages, 1991-1995).

Para los procesadores de la cochinilla y sus derivados, el precio y la calidad del insecto y del colorante los determinan su contenido de ácido carmínico, mientras que para los usuarios de los colorantes, dichos parámetros son establecidos por el color que el producto desarrolle (Química Universal 1995).

2.1 Descripción de la materia prima

La materia prima fue cochinilla molida (*Dactylopius coccus*) proveniente del Centro de Difusión de la Grana Cochinilla, Tlapanochestli™, Santa María Coyotepec, Oaxaca y proporcionada por Carla Karina Chávez Moreno, cuyos trabajos de investigación están enfocados en este insecto.

2.2 Análisis proximal de la materia prima

Los componentes del análisis proximal se cuantificaron de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC (Anexo 1): Cenizas, extracto etéreo, hidratos de carbono, humedad y proteína. La cantidad de colorante (expresada como ácido carmínico) se determinó por el método oficial del Food Chemical Codex (Anexo 1). Por otro lado, se extrajo la mayor cantidad de colorante con el equipo Soxhlet, utilizando agua como disolvente. Esta extracción fue diferencial y así se evitó la degradación del colorante; además los cambios de agua permitieron arrastrar casi todo el color y así conocer la cantidad real de colorante (expresada como porcentaje de ácido carmínico) contenido en la materia prima. La cantidad de colorante obtenida se cuantificó por HPLC y espectrofotométricamente y los resultados se compararon con el porcentaje de colorante (expresado como ácido carmínico) obtenido por el método oficial del Food Chemical Codex (Anexo 1).

2.3 Extracción sólido-líquido

Al extraer el colorante se ajustó previamente el pH del disolvente, utilizando diferentes amortiguadores (Anexo 2). Se usaron aproximadamente 50 mL de disolvente al pH correspondiente y se colocó en un recipiente cilíndrico de vidrio, provisto de una chaqueta para control de temperatura por circulación de agua, al abrigo de la luz para prevenir la degradación del colorante. Se conectó la chaqueta del recipiente a un baño con circulación de agua para controlar la temperatura a 30 o 50 °C. Una vez ajustado el pH y fijada la temperatura se agregó aproximadamente 2.5 g de cochinilla molida para extraer el colorante manteniendo una proporción inicial cochinilla-disolvente de 1:20. En el momento en que se agregó la cochinilla al recipiente de vidrio se empezó a contar el tiempo de la extracción utilizando un cronómetro y se tomaron muestras de 2 mL con pipeta automática cada 15 minutos hasta completar 2 h. Las muestras tomadas se depositaron de inmediato en un tubo para centrifuga y se centrifugaron durante 7 minutos a 5000 rpm para sedimentar el residuo de cochinilla y poder separar únicamente el disolvente con el extracto de colorante. El extracto se colocó en un tubo tipo Eppendorf, tomando de éste 1 mL para leer la absorbancia en un espectrofotómetro y el resto se guardó en el congelador para posteriormente cuantificar el contenido de ácido carmínico mediante un cromatógrafo de líquidos (HPLC).

2.4 Pureza del estándar

Antes de construir las curvas estándar de cada técnica se comprobó la pureza del estándar de ácido carmínico mediante un espectro Infrarrojo que se efectuó en la USAI de la Facultad de Química (Figura 5). La amplitud de la longitud de onda y la baja transmitancia del lado izquierdo del espectro son características de la presencia del enlace O-H en un ácido carboxílico y los enlaces C-H, mientras que los enlaces C=O aparecen a 1760 cm^{-1} . Los picos entre 1000 a 1300 cm^{-1} son atribuidos a la presencia de los enlaces C-O. La comparación con un espectro de referencia de ácido carmínico puro indica que el estándar usado aquí también fue puro.

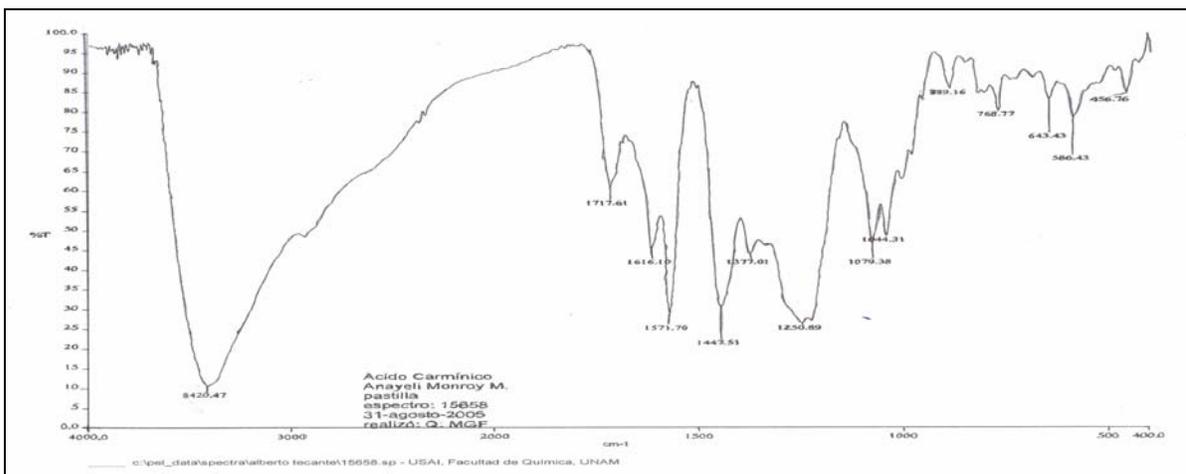


Figura 5. Espectro Infrarrojo de ácido carmínico estándar.

2.5 Medición de la concentración de ácido carmínico por espectrofotometría

Para determinar el contenido de ácido carmínico por espectrofotometría, se construyó una curva patrón de ácido carmínico estándar (Sigma Chemicals Co.),

tomando como referencia el método oficial del Food Chemical Codex. En este último la cantidad de colorante se determina considerando que una disolución de ácido carmínico con una concentración de 100 mg/L tiene una absorbancia de 1.39 a 494 nm. Nuestra técnica espectrofotométrica se basó en el uso de una curva de calibración con ácido carmínico estándar. Para ello se pesó por separado 1.2, 3.0, 1.4, 6.6, 9.8 y 15.1 mg de ácido carmínico estándar y se colocó cada una de estas masas en vasos de precipitado de 100 mL con ácido clorhídrico 2 N en ebullición, se agitaron un poco y se dejaron enfriar. Posteriormente se depositó el contenido de cada vaso en matraces aforados de 1 L y se aforó con agua destilada. Se hicieron las lecturas de cada muestra por triplicado en celdas de plástico de 1 cm a 494 nm en el espectrofotómetro (Termo Electrón Corporation, modelo GENESYSTM 10 Series Spectrophotometers). Se calculó el promedio de absorbancia para cada muestra y se graficaron los resultados (Figura 6).

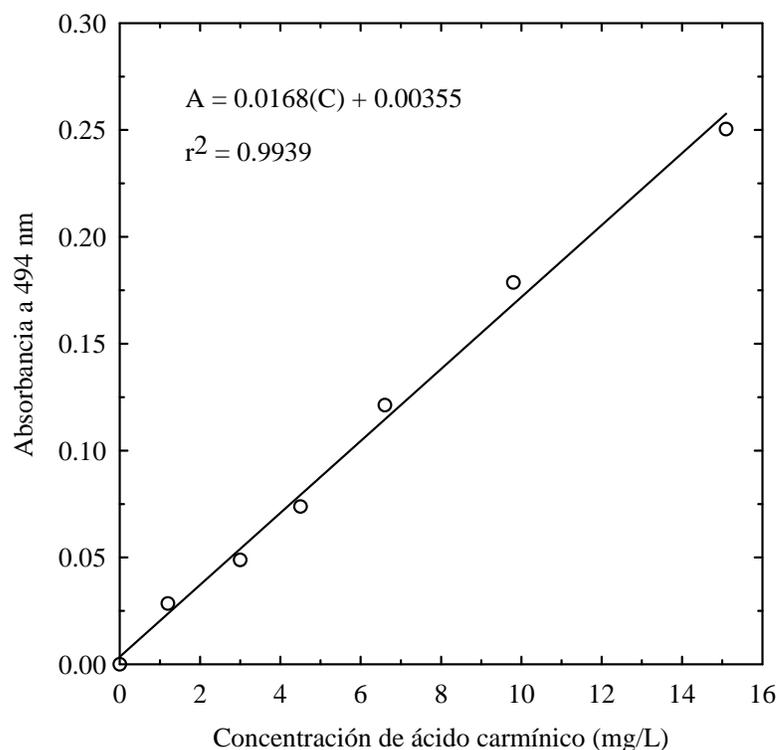


Figura 6. Curva estándar de ácido carmínico por espectrofotometría.

Tomando en cuenta el método oficial de ensayo para la cuantificación de ácido carmínico se llevó a cabo el siguiente procedimiento para cada una de las muestras tomadas durante las extracciones de colorante. Se tomaron 30 mL de ácido clorhídrico 2 N previamente preparado y se depositó en un vaso de precipitado de 100 mL, se calentó hasta ebullición con parrilla eléctrica. Una vez que el HCl empezó a hervir, se le agregó a cada vaso 1 mL con pipeta automática de cada una de las muestras, se agitó un poco y se retiró del calor para enfriarlo. Se transfirió el extracto anterior a un matraz aforado de 1 L, se aforó con agua destilada y se agitó. Se tomaron de 4 a 5 muestras en celdas de plástico de 1 cm del contenido del matraz y se leyó la absorbancia en el

espectrofotómetro a una longitud de onda de 494 nm, utilizando agua destilada como blanco. Se recopilaron todos los datos y se hicieron los cálculos correspondientes utilizando la ecuación de la Figura 6 para obtener el contenido de ácido carmínico en cada extracción a las diferentes condiciones.

2.6 Medición de la concentración de ácido carmínico por HPLC

Para determinar el contenido de ácido carmínico por cromatografía de líquidos, se construyó una curva patrón de ácido carmínico estándar (Figura 7). Esta curva se construyó partiendo de una disolución madre de ácido carmínico estándar con una concentración de 100 ppm. De esta disolución se tomaron las diferentes fracciones y se inyectaron en el cromatógrafo utilizando una fase orgánica "A" (cuya composición se muestra en el Cuadro 4) para eluir al ácido carmínico. Se usó una columna empacada de fase estacionaria químicamente unida X-Brige C18 de 50 mm de longitud y 3.0 mm de diámetro y un tamaño de partícula de 3.5 μm , un detector de doble longitud onda Walters 2487 y un integrador Perkin Elmer modelo 220. Todas las lecturas se hicieron a temperatura ambiente y a 275 nm debido a que a esta longitud el ácido carmínico y los otros compuestos tuvieron la mayor absorción lo que permitió poder cuantificarlos e identificar los otros pigmentos aunque estén en cantidades muy pequeñas en la muestra.

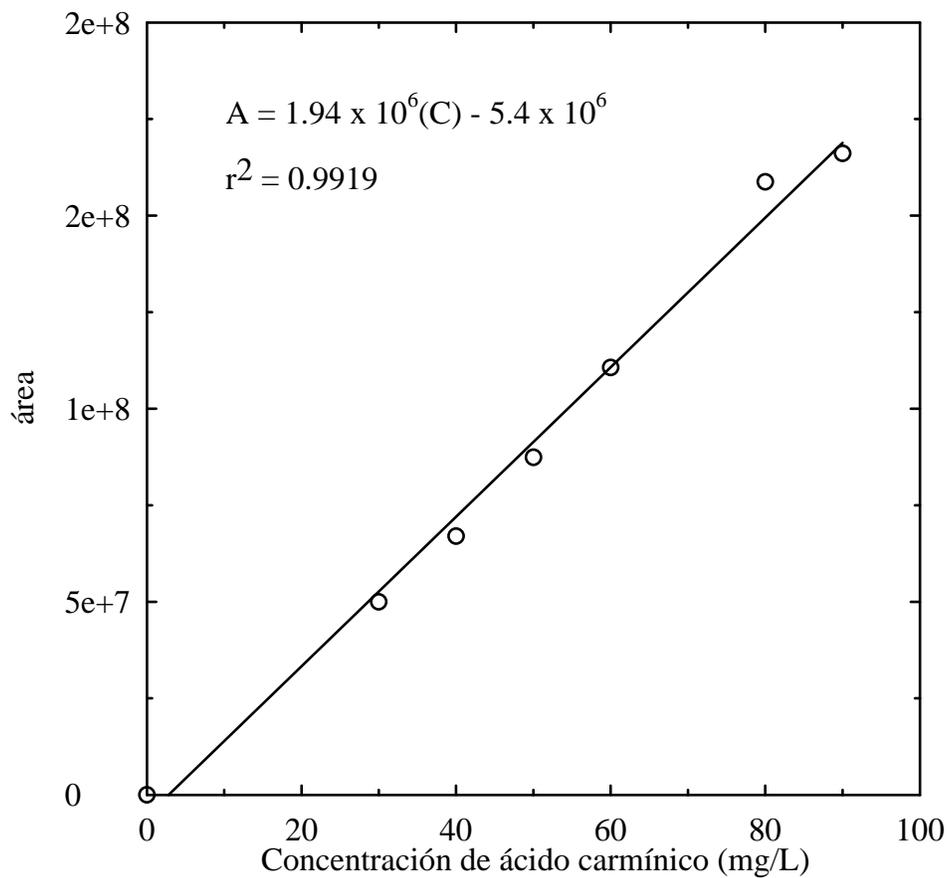


Figura 7. Curva estándar de ácido carmínico por HPLC.

Las determinaciones de ácido carmínico por HPLC en todas las muestras se hicieron bajo las siguientes condiciones:

- 1) Empleo de dos fases ("A" y "B"). La fase "A" sirvió para eluir al ácido carmínico y la fase "B" para eluir a los otros pigmentos, cada fase estuvo compuesta de la siguiente manera (Cuadro 4).

Cuadro 4. Composición de las fases empleadas en el cromatógrafo

FASE	A (%)	B (%)
Metanol	40	90
Ácido fosfórico	10	10
Agua	50	-

2) Flujo de 0.5 mL/min.

3) Presión de 2200 a 3000 psi.

2.7 Análisis estadístico

Las extracciones se realizaron por lo menos tres veces con el fin de asegurar que el pH no cambió. Las lecturas realizadas en el espectrofotómetro se hicieron por quintuplicado, y por duplicado las realizadas en HPLC; a estos datos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), así como la desviaciones estándar representadas en las gráficas. En el análisis proximal se calculó la desviación estándar para cada componente. En la estadística de todos los resultados de este trabajo se empleo el programa Microsoft Excel.

3.1 Análisis proximal de la materia prima

En el Cuadro 5 se muestra el análisis proximal de la materia prima empleada en este trabajo.

Cuadro 5. Composición de la materia prima, cochinilla en polvo (^aAssociation of Official Analytical Chemists, AOAC, 1990; ^bChávez 1994; ^cPiña 1984). Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar.

Componente	Método	Concentración (%) (BH) ¹	Literatura ^c (%) (BH) ¹	Literatura ^c (%) (BH y BD) ¹
Ácido carmínico	FFC (1 y 2) ^b	10.0	10 a 20	11.4 a 21.4
Cenizas ^a	AOAC 923.03	4.93 \pm 0.0554	2 a 8	2.27 a 8.27
Extracto etéreo ^a	Goldfish	0.00	12	0
Hidratos de carbono ^a	AOAC 979.06	26.4	30	34.1
Humedad ^a	AOAC 925.10	10.3 \pm 0.279	5 a 6	6.82 a 7.82
Proteína ^a	AOAC 920.87-979.09	48.4 \pm 0.454	40	45.5

Dado que la cochinilla se recibió molida y desengrasada el contenido de extracto etéreo (Cuadro 5) fue prácticamente cero, por lo que la comparación con la literatura se hizo con una base desengrasada.

De acuerdo con el Cuadro 5, el contenido de ácido carmínico fue de 10.0%, el cual fue 13% menor al reportado en la literatura (11.4%). Este porcentaje de colorante se considera adecuado si se trata de una cochinilla de descarte aunque es un valor bajo comparado con el contenido de ácido carmínico en una grana fina.

Los contenidos de proteína y de humedad no corresponden con los reportados en la literatura (Cuadro 5). En el caso de la proteína el porcentaje obtenido fue 48.4%, el cual es 6% superior al valor de la literatura; esto puede deberse a que al tratarse de una cochinilla de descarte, esta contiene más proteína por ser insectos sin la madurez suficiente para tener más colorante. Por otro lado, la elevada humedad (10.3%) puede atribuirse a la humectación del polvo durante su almacenamiento bajo condiciones no controladas. Finalmente, el contenido de cenizas (4.93%) es intermedio en el intervalo reportado. Un contenido de cenizas superior al del intervalo hubiera indicado algún tipo de contaminación o adulteración de la cochinilla con material que contiene iones metálicos.

3.2 Extracción total de colorante con el Soxhlet

La cantidad de ácido carmínico extraída con el colorante usando el Soxhlet fue de 14.4% por espectrofotometría y de 20.9% por HPLC. Estos porcentajes resultaron mayores al 10.0% obtenido por el método oficial de la AOAC (Cuadro 5). Dadas las condiciones de la extracción en el Soxhlet se tomaron 14.4% y 20.9% como la cantidad inicial real de ácido carmínico en la cochinilla molida

¹ BH Base húmeda y BD Base desengrasada

para cada técnica y se tomaron como referencia para calcular los rendimientos de las extracciones realizadas para este trabajo.

3.3 Espectrofotometría

En el Cuadro 6 se muestran los porcentajes de colorante extraído para las diferentes condiciones examinadas, determinando la cantidad de ácido carmínico por espectrofotometría.

Cuadro 6. Porcentajes de ácido carmínico obtenidos por espectrofotometría para cada extracción.

Tiempo (min)	pH 2		pH 5		pH 7	
	30 °C	50 °C	30 °C	50 °C	30 °C	50 °C
15	16.9	28.7	74.8	67.5	94.7	91.6
30	21.2	22.9	69.9	52.7	91.7	94.6
45	16.1	23.8	61.8	52.4	92.8	89.6
60	13.0	23.3	61.6	61.2	86.4	91.1
75	12.8	26.4	57.9	61.0	81.7	93.1
90	13.4	24.9	55.7	55.7	78.7	86.9
105	14.7	23.9	56.7	59.4	76.2	85.6
120	10.3	24.5	51.7	56.5	70.8	83.7

Las cifras en negritas indican los porcentajes más altos de colorante obtenidos para cada condición de extracción.

De acuerdo con el Cuadro 6, la extracción realizada a pH 7 y 30 °C sólo toma

15 min y en ese lapso se extrajo la mayor cantidad de colorante. Así mismo, en las extracciones al mismo pH pero a 50 °C se obtienen resultados semejantes, por lo que más adelante se determinará cuál fue la mejor condición utilizando este método para determinar el contenido de colorante.

En las Figuras 8 y 9 se presentan las cinéticas de extracción del colorante rojo para las dos temperaturas estudiadas con su respectivo pH. En estas figuras se representan las proporciones de colorante extraídas cada 15 minutos determinadas por espectrofotometría a lo largo de 120 minutos de extracción para las diferentes condiciones de estudio. En ambas figuras se aprecia una cinética muy similar y se diferencia claramente que a pH 7 (triángulos) se extrajo la mayor cantidad de colorante y que la proporción extraída a 30 °C en un inicio fue ligeramente mayor que la extraída a 50 °C.

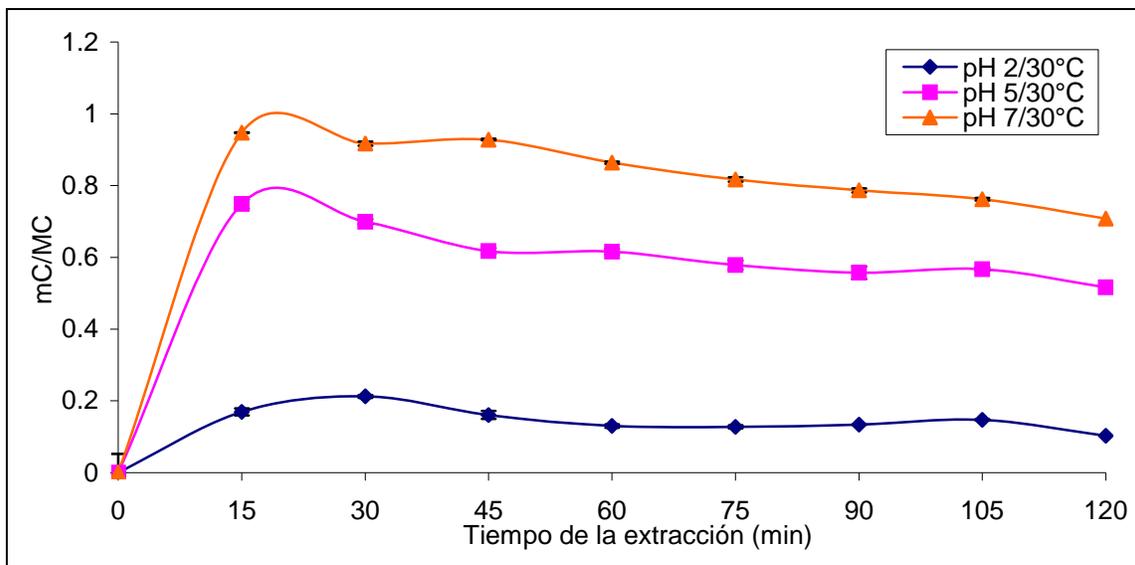


Figura 8. Cinética de extracción a 30°C de ácido carmínico determinado por espectrofotometría.

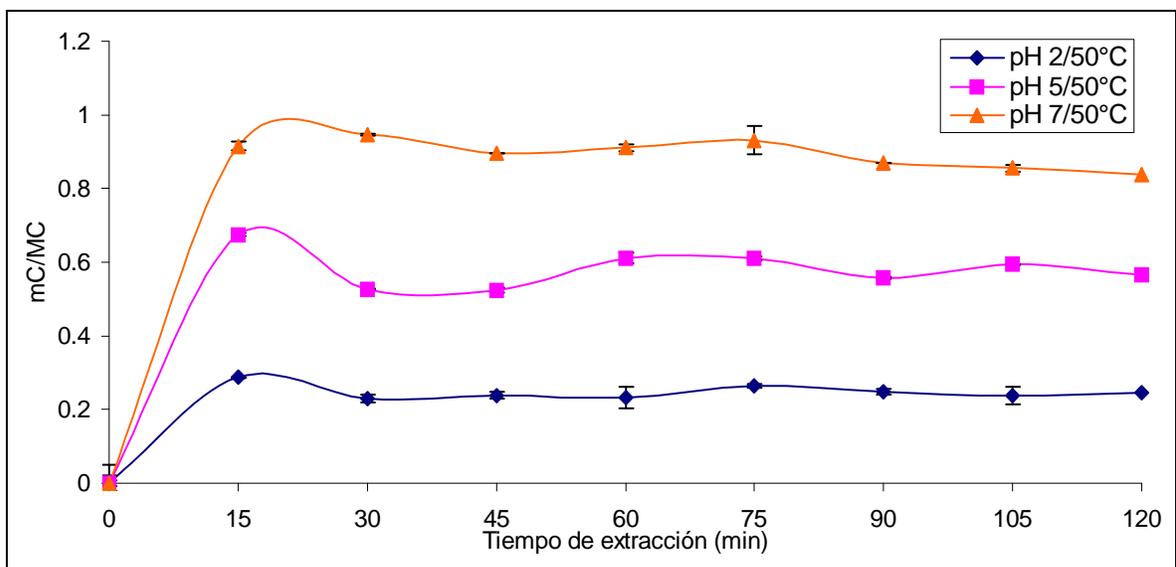


Figura 9. Cinética de extracción a 50°C de ácido carmínico determinado por espectrofotometría

Los cuadros en ambas figuras representan las cinéticas de las extracciones a pH 5. Para ambas temperaturas la proporción de colorante obtenida también es similar. Finalmente, las proporciones de colorante más bajas obtenidas en las extracciones fueron las efectuadas a pH 2 (rombos) para ambas temperaturas.

La Figura 10 muestra los rendimientos para 120 minutos de extracción debido a que existió diferencia significativa entre los diferentes tiempos de

extracción para un mismo pH con excepción de pH 5 a 30 °C (anexo 3). Si se consideran los rendimientos de extracción para los tiempos en los cuales se observa un valor máximo y se comparan con los mostrados en la Fig. 10, se observa que a pH 7, 30 °C hay 25% de diferencia, a 50 °C para el mismo pH hay 12% de diferencia. La extracción de colorante a 50 °C y pH 7 es la que produce mayores rendimientos ya que se logra extraer más de 90% del colorante total inicial presente en el polvo. Cabe recordar que dicho colorante, que constituye el 100%, fue extraído en el Soxhlet y determinado por espectrofotometría.

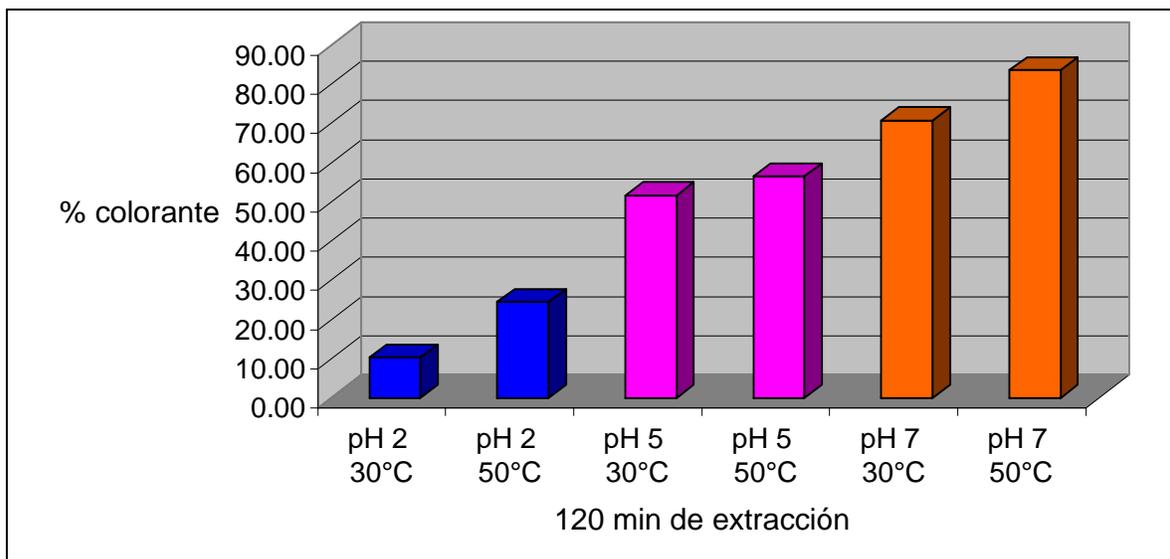


Figura 10. Rendimientos de extracción de colorante de la cochinilla para cada condición de pH y temperatura con la cantidad de ácido carmínico determinada por espectrofotometría.

En el caso de las extracciones realizadas a pH 5, se observó que independientemente de la temperatura se obtuvo un rendimiento muy similar. A pH 2 la extracción a 50 °C produjo rendimientos mayores que a 30 °C. Por lo tanto, para esta primera parte se observó que para los 3 pH's de estudio se obtuvieron rendimientos más altos al trabajar con una temperatura de 50 °C a

los 120 minutos de extracción. También se observó que pH 7 y 50 °C son las mejores condiciones para extraer el mayor colorante posible de la cochinilla.

3.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia

También se determinó el contenido de ácido carmínico de la cochinilla por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y los porcentajes de colorante obtenidos por esta técnica se presentan en el Cuadro 7. Las cifras en negritas indican el porcentaje más alto de colorante en cada condición, las cifras subrayadas son los resultados no incluidos debido a su poca confiabilidad. En las siguientes Figuras 11 y 12 se representan las cinéticas de las extracciones de ácido carmínico a diferente pH y temperaturas, utilizando la cromatografía de líquidos de alta eficiencia como el método analítico para determinar la cantidad de colorante.

Cuadro 7. Porcentajes de ácido carmínico determinado por HPLC para cada extracción.

pH 2	pH 5	pH 7
------	------	------

Tiempo (min)	30 °C	50 °C	30 °C	50 °C	30 °C	50 °C
15	14.54	31.62	66.07	<u>106.84</u>	89.26	96.63
30	21.99	<u>5.72</u>	76.78	67.39	<u>109.43</u>	94.08
45	16.03	30.41	61.80	51.93	87.36	<u>107.28</u>
60	16.18	39.94	65.31	54.00	85.91	<u>103.44</u>
75	12.57	34.79	57.62	47.21	82.45	93.02
90	13.31	28.09	54.08	48.92	77.91	57.97
105	13.26		56.95	44.67	73.85	73.16
120	10.11	29.59	51.07	48.73	67.82	91.60

De acuerdo con la Figura 11, que muestra las extracciones a 30 °C, la extracción a pH 7 (triángulos) fue nuevamente en la que se extrajo la mayor cantidad de colorante, mientras que a pH 2 (rombos) se obtuvieron proporciones menores de éste, quedando el pH 5 como la condición en la que se pudo extraer aproximadamente la mitad del colorante total inicial en la muestra. En esta figura también se observa que para las tres diferentes condiciones de pH se extrajo la mayor cantidad de colorante en sus diferentes proporciones durante los primeros 30 minutos de la extracción, obteniendo proporciones menores y más o menos constantes en los siguientes minutos. En la Figura 12 se muestran las cinéticas de extracción a 50 °C. Prácticamente en los primeros 15 minutos de la extracción se extrajo la mayor cantidad posible de ácido carmínico en diferentes proporciones para cada pH. También se observó que al mantener el pH 5 durante la extracción se obtuvo en un inicio la mayor cantidad de colorante,

aunque a diferencia de la Figura 11, aquí no se observa una tendencia muy clara, ya que a pH 7 también se logró obtener proporciones altas de carmínico, es decir, cercanas a 100%.

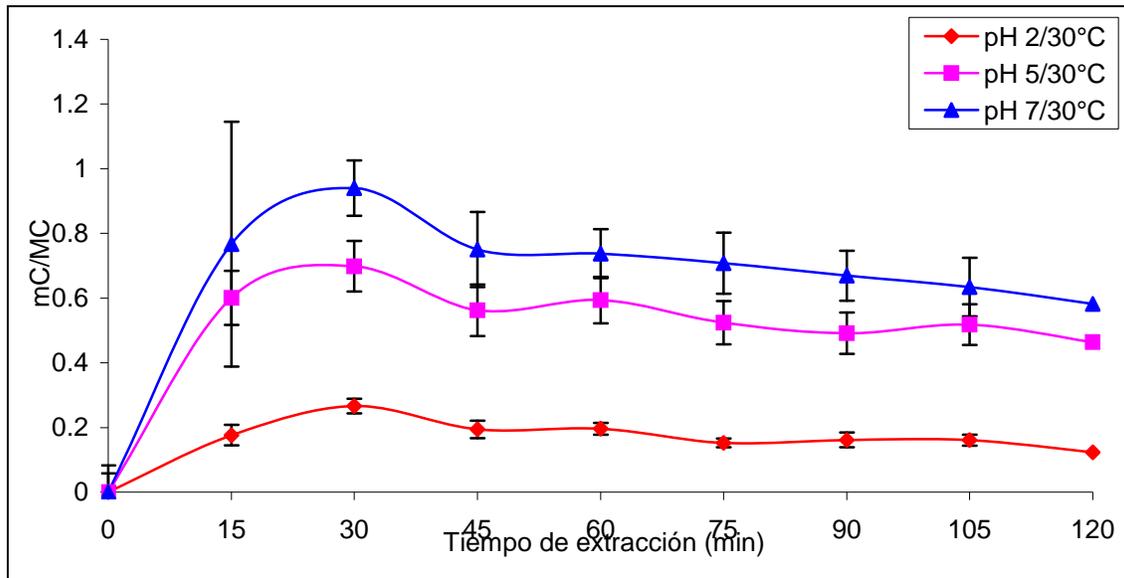


Figura 11. Cinéticas de extracción a 30°C con el ácido carmínico determinado por HPLC.

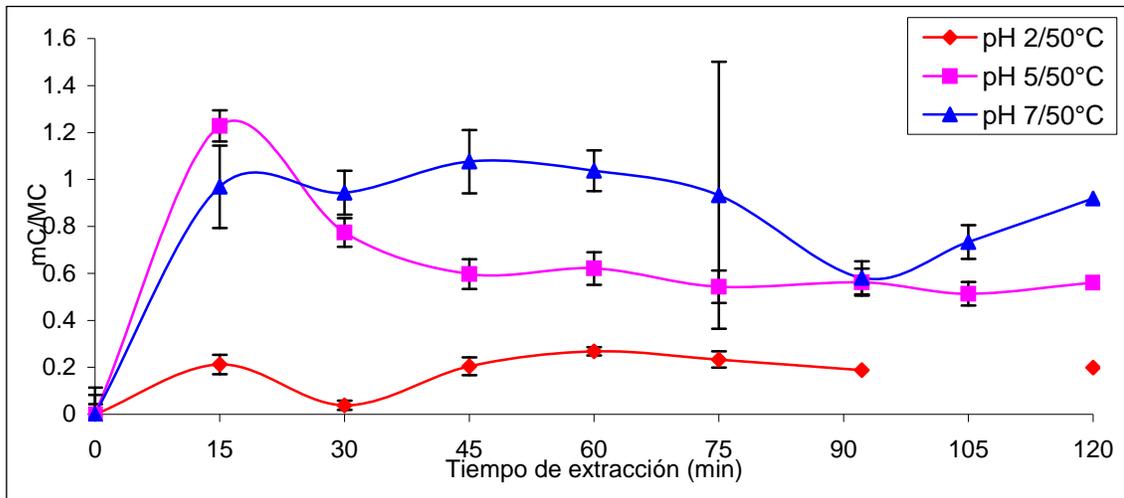


Figura 12. Cinéticas de extracción a 50°C con el ácido carmínico determinado por HPLC.

En la Figura 13 se muestra el lugar que ocupa cada condición de acuerdo con la cantidad de ácido carmínico extraído a los 120 minutos en la muestra de cochinilla.

También se observa que la mejor condición para extraer la mayor cantidad de ácido carmínico ocurre a pH 7 a lo largo de toda la extracción y aunque la diferencia entre las temperaturas es pequeña, a 50 °C se obtuvo el porcentaje de carmínico más alto (> 80%) además de que también se encontró que sólo para esta condición no hubo diferencia significativa entre los tiempos de extracción (anexo 3), por lo que fue el mejor rendimiento en la extracción de este colorante. De igual manera, al trabajar a pH 5, se obtienen mejores rendimientos al mantener una temperatura de 50 °C a lo largo de toda la extracción, mientras que para las extracciones realizadas a pH 2 también se obtuvo mayor rendimiento utilizando una temperatura de 50 °C.

Si también se consideran los rendimientos de extracción para los tiempos en

los cuales se observa un valor máximo y se comparan con los mostrados en la Fig. 13, se tiene que a pH 7, 30 °C hay 24% de diferencia y a 50 °C para el mismo pH hay 5% de diferencia.

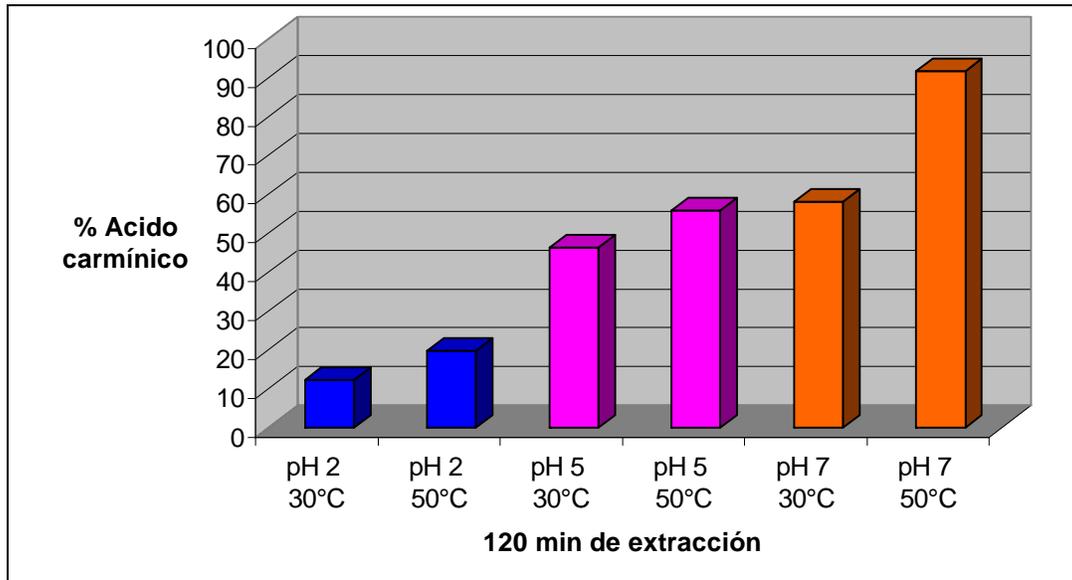


Figura 13. Rendimientos de extracción de colorante en la cochinilla para cada condición de estudio con el ácido carmínico determinado por HPLC.

3.5 Comparación entre las técnicas de HPLC y espectrofotometría para la determinación de la cantidad de ácido carmínico.

El ácido carmínico es el principal componente del colorante rojo de la cochinilla (González et. al 2002). Sin embargo, hay otros compuestos en menor cantidad que también influyen en la pigmentación de este colorante como es el caso del ácido kermésico y el ácido flavokermésico, entre otros, cuyas estructuras químicas son muy parecidas a las del ácido carmínico (Figura 14).

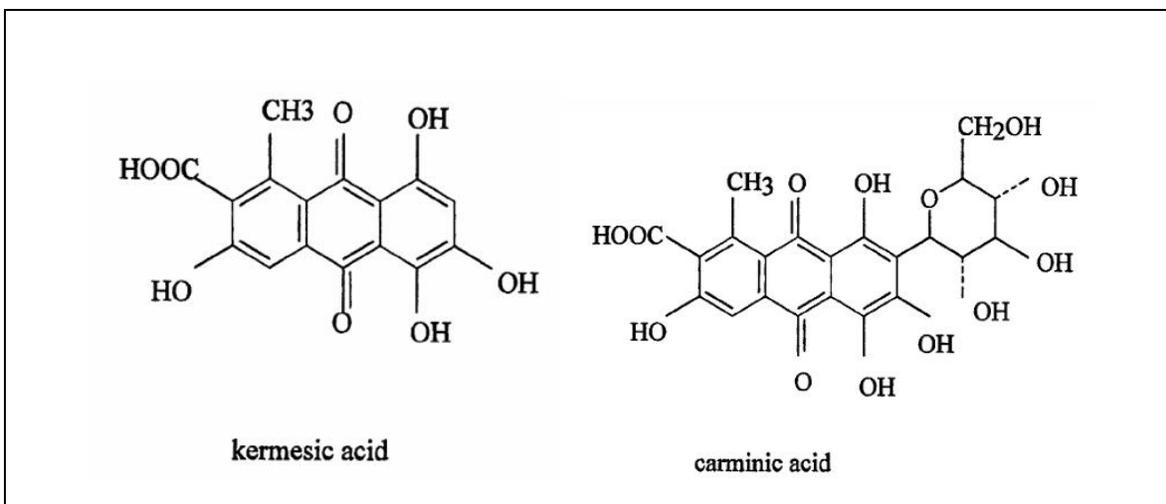


Figura 14. Estructuras químicas del ácido kermésico y carmínico.

Debido a esto surgió la idea de que al emplear el método espectrofotométrico para la determinación de ácido carmínico en muestras de cochinilla, posiblemente se estaba sobreestimando la cantidad de colorante ya que aunque se utilizó una curva estándar de carmínico, se pudo incluir a los otros compuestos coloridos en la misma longitud de onda que al ácido carmínico debido a las similitudes estructurales que presentan dichos compuestos. Por tal motivo se recurrió a la otra técnica para la determinación de la cantidad de ácido carmínico, lo que permitió analizar la confiabilidad del método espectrofotométrico. De esta manera se empleó la cromatografía líquida de alta eficiencia, ya que al ser ésta más sensible y con mayor poder de resolución se pudo separar al ácido carmínico de otros compuestos coloridos en el extracto; específicamente del ácido kermésico y pese a que no se cuenta con un estándar de este último se pudo identificar por la posición en la que apareció su pico tomando en cuenta información de la bibliografía (González et. al 2002), como se muestra en la Figura 15.

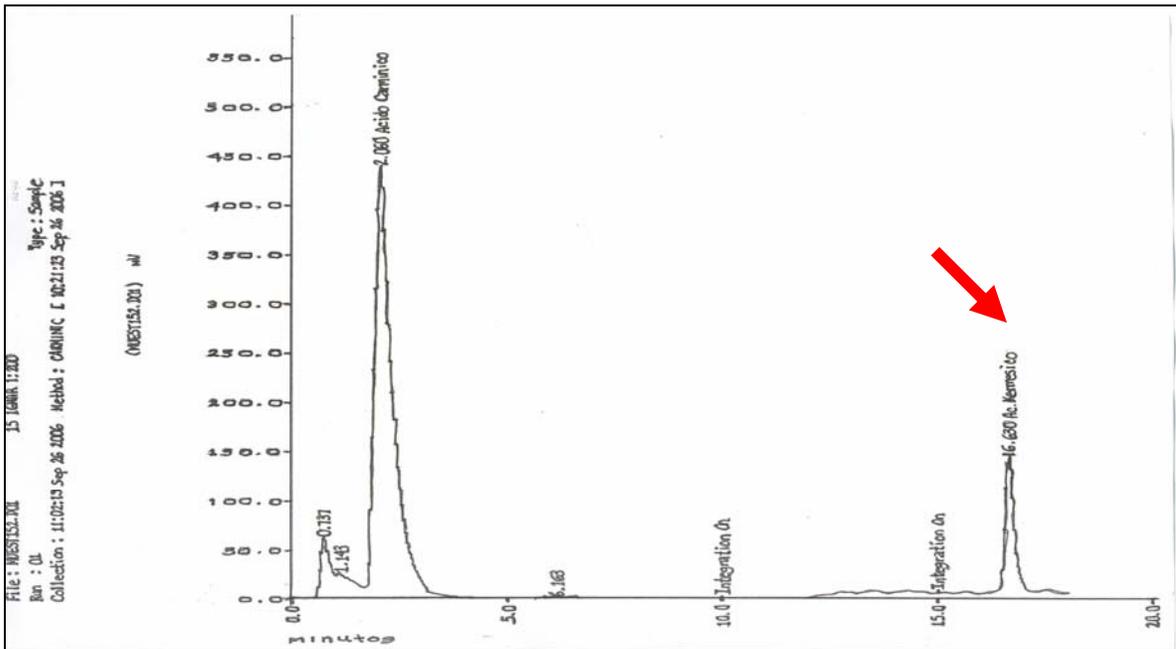


Figura 15. Cromatograma de este trabajo en donde se observa el pico atribuido a la presencia de ácido kermésico (flecha roja). El gran pico a la izquierda corresponde al carmínico.

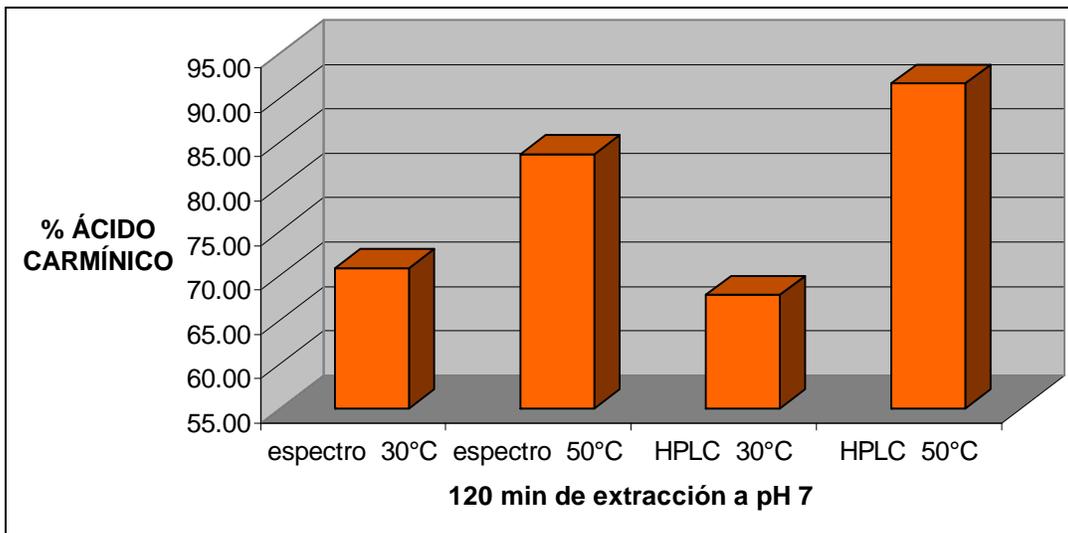


Figura 16. Rendimientos a los 120 minutos de extracción de colorante en la cochinilla a pH 7 para cada temperatura de estudio con la cantidad de ácido carminico determinada por HPLC y por espectrofotometría.

En la Figura 16 se compararon las dos técnicas empleadas para la determinar la cantidad de ácido carmínico. Se graficaron los porcentajes de colorante resultantes a los 120 min de extracción a pH 7 que fue la condición en la que se obtuvieron mayores rendimientos para cada temperatura y para cada técnica. En esta figura se observa el porcentaje más alto de ácido carmínico se obtuvo por HPLC y gracias a la resolución del método cromatográfico y tomando como ejemplo la Figura 15 se encontró que por HPLC se cuantifica la mayor cantidad de ácido carmínico puro y a la vez se logran separar otros compuestos coloridos. A partir de la Figura 16 y tomando en cuenta sólo los resultados obtenidos por HPLC, se encontró que a pH 7 y 50 °C son las mejores condiciones para extraer el ácido carmínico de la cochinilla seca y molida ya que se obtienen rendimientos cercanos a 90%.

CONCLUSIONES

- Con los resultados en el análisis proximal de la materia prima se encontró que la cochinilla empleada en este trabajo fue de “descarte”, lo que indica que su calidad es menor con respecto a las cochinillas finas considerando su contenido de ácido carmínico.
- Se logró optimizar una metodología de extracción a nivel laboratorio para extraer la mayor cantidad posible de colorante en cochinillas de descarte (*Dactylopius coccus*).
- Al realizarse la extracción del colorante en la cochinilla en un sistema diferencial con el equipo Soxhlet, se logró extraer una mayor cantidad de colorante y por lo tanto un porcentaje mayor al ser cuantificado espectrofotométricamente, por lo que se obtiene un valor más real del contenido total de colorante en el insecto en comparación con el porcentaje que se obtiene aplicando solo el método oficial.
- Al emplear el método cromatográfico, se encontró que el colorante rojo de la cochinilla, no sólo está conformado por ácido carmínico, sino también por otros compuestos menores de los cuáles se pudo separar al ácido kermésico.
- Al emplear HPLC como análisis rutinario del colorante proveniente de cualquier tipo de cochinilla se podría conocer más acerca de su calidad y servir como punto de control, para evitar adulteraciones o contaminaciones de estos productos y de esta manera darle un valor comercial justo.

- Independientemente de la técnica de cuantificación (HPLC ó espectrofotometría), se encontró que al mantener constante un pH de 7 y una temp. de 50 °C en toda la extracción de colorante de cochinilla seca, desengrasada y molida, se logra obtener el rendimiento más alto en una proporción inicial de insecto-agua 1:20.

REFERENCIAS

1. Association of Oficial Chemists (AOAC) (1990) Official Methods of Analisis Vol. 1 y 2, 15th edition, Helrich, K. (ed.). VA, USA.
2. Badui Dergal, S. (1990). Química de los Alimentos, 2^a ed. Alambra Universidad (ed.). México.
3. Chopin, G.R., Jaffe, B., Summerlin, L. y Jackson, L. (1980), Química. Publicaciones Culturales S.A. México, D.F.
4. Clavijero, F.J (1945) Historia Antigua de México, 1945. Vol. 4. México.
5. Clemente, L. A., & Vidal, F. S. (1986) Aspectos Químicos de la Cochinilla. I Seminario departamental de producción y Fomento de la Tuna y la Cochinilla, U.N.S.C.H Ayacucho, Perú.
6. Code of Federal Regulations (1991) Food and drugs 21 parts 1 to 99. Revised as of April 1 1991 (F&D), USA.
7. Chávez Moreno, C. K. (1994) Extracción del colorante rojo presente en la cochinilla (*Dactylopius coccus*) Tesis de Licenciatura Ingeniería en Alimentos. Universidad Simón Bolívar, México.
8. Chávez Moreno, C. K. (2002) Extracción con disolvente del colorante rojo de la cochinilla (*Dactylopius coccus*): caracterización de la separación y la transferencia de masa. Tesis Maestría. UNAM, México, D.F.
9. De Haro, M. E. & Claps L. E. (1995) Conociendo nuestra Fauna III: Familia Dactylopiidae (Insecta: Homoptera) Morfología, Biología e Importancia Económica. Serie Monográfica y Didáctica. Tucumán, República de

- argentina. No. 19. pp: 1-21.
10. De Lotto, G. (1974) On the Status and Identity of the Cocínela Insects (Homóptera: Coccoidea: *Dactylopiidae*). J. Ent. Soc. Sth. Afr. 37(1), 167-193.
 11. Duxbury, D. D. (1993) Replacement Colors and Blends for Banned FD&C Red 3 Lake. Delaney Clause Enforcement by FDA: Food Industry Cites Negligible Risk Spotlight on Ingredients. USA.
 12. Egan, H., Ronald, S. K. y Sawyer, R. (1988) Análisis Químico de los Alimentos de Pearson. Ed. CECSA. México, D.F.
 13. FDA Consumers (1990) A reprint from FDA Consumer Magazine Department of Health and Human Service. Art: "Red No. 3 and other Colour Controversies". Public Health. Service Food & Drug Administration Office of Public Affairs, USA.
 14. Fessenden, R. J. y Fessenden, J. S. (1983) Química Orgánica. Iberoamericana (ed.). México.
 15. Food & Drug Administration (1995) Hhs 21 CFR Chapter 1 (4-1-95), F&DA (ed.), USA.
 16. Furia, T.E. (1975) Handbook of Food Additives. 2nd ed. CRS Press (ed.), USA.
 17. González. M., Méndez, J., Carnero, A., Lobo, M.G. & Alfonso A. (2002). Optimizing Conditions for the Extraction of Pigments in Cochineals (*Dactylopius coccus Costa*) Using Response Surface Methodology. J: Agric. Food Chem., 6968-6974.
 18. Hendry, B. S., (1990) Natural Food Colours. C. Press (ed.), USA.

19. Hoxter, G. (1979) Suggested Isosbest Wavelength Calibration in Clinical Analysis. Vol. 25, No. 1, 143-146.
20. Humboldt, A. (1941) Ensayo Político sobre el Reino de la Nueva España de 1811. Vol. 5. México.
21. Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara (1992). Introducción al Teñido de Lana con Grana Cochinilla. V Congreso Nacional y III Congreso Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Universidad de Chapingo. México.
22. International Life Science Institute (1984) Cochineal/Carmines. USA.
23. Lloy & Associates (1979) Extraction & Chemistry of Cochineal Food Chem, 1980. USA.
24. MacGregor, L. R. (1976) La Grana o Cochinilla del Nopal usada como colorante desde el México Antiguo hasta nuestros días. Cact. Suc. Mex. XXI, 93-99.
25. MacKenzie, H. L. (1976) Mealybugs of California. California Press Berkley and Los Angeles. pp 523.
26. Marmion, D. M. (1991) Handbook of US Colorants. 3rd. ed., John Wiley & son (ed.). USA.
27. Murillo, H. (1958) Química. E. CL. A. L. (ed.). Porrúa 4^a ed. México, D.F.
28. Nicanor, L. H. (1983) Ácido Carmínico y sus Derivados. I Seminario Departamental de Producción y Fomento de la Tuna y la Cochinilla, U.N.S.C.H. Ayacucho, Perú.
29. Pérez Guerra G. & Kosztarab, M. (1992) Biosystematic of the family

- Dactylopiidae (Homoptera: Coccinea) with emphasis on the life cycle of *Dactylopius coccus* Costa-Studies on the Morphology and Systematics of Scale Insects No. 6 Bulletin No. 92-1. Virginia Agricultural Experiment Station, Virginia Polytechnic Institute and State University, pp 90.
30. Piña, L. Y. (1984) La grana cochinilla del nopal. Monografías del Lanfi. México.
31. Portillo Martínez, L. (1991) Infestación Óptima de Cladodios Aislados del Nopal (*Opuntia ficus indica* (L) Miller). QUEPO Revista Anual de la Sociedad Peruana de Cactus y Suculentas 5, 77-87, Perú.
32. Química Universal (1995). Lima, Perú.
33. Ramos García, F. (1983) La Grana Cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) como Alternativa de Producción para Productores Minifundistas de Valles Centrales de Oaxaca. Instituto Agropecuario de Oaxaca. Instituto de Botánica Coccinocultura, México.
34. Sapers, G. M. (1994) Color Characteristics and Stability of Nonbleeding Cocktail Cherries with Carotenoid Pigments. J. Food Sci. 59(1).
35. Sopena (1941) Nuevo Diccionario Ilustrado de la Lengua Española. Ramos Sopena (ed.). Barcelona.
36. The European Community (EC) Officially Adopts the Name European Union (EU), Affective Nov. 1993 (1994). Natural Food Colours and Flavours. A survey of the Netherlands and other Major Markets in the European Union. EC Europa.
37. The Hereld Organization. Science, Application & Marketing of natural Colors

- in Food. Confectionary & Beverages (1991-1995). Literature reference compilation. USA.
38. Tropical Development & Research Institute (1983) Cochineal 127 Clerkenwell Road London EC1R 5DB London.
39. Venkataraman, K. & Rao, A. V. R. (1972) Insect Pigments derived from Hydroxyanthraquinones. In: Some recent developments in the Chemistry of Natural Products. Rangaswami, S. & Rao, A. V. R. (ed.) Prentice Hall. India.
40. Viguera, G. A. L., Portillo, M. L. & Flores, F. V. (1993) Influencia de los Macro y Microelementos Aplicados a Cladodios de *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Sobre el Desarrollo de la cochinilla. QUEPO Revista Anual de la Sociedad Peruana de cactus y Suculentas 7, 81-91.
41. www.departamento.us.es/dma1euaita/Docencia/ayuda.htm

ANEXO 1

ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA, COCHINILLA

A. 1.1 ÁCIDO CARMÍNICO

MÉTODO OFICIAL DEL FOOD CHEMICAL CODEX.

(Food Chemical Codex, 1990)

Pesar exactamente 1 g de muestra por tratarse de un extracto que contiene al ácido carmínico. Colocar la muestra en un vaso de precipitados de 250 mL. Adicionar 30 mL de ácido clorhídrico 2 N y calentar a ebullición. Filtrar a través de papel Whatman No. 1. Vaciar el líquido filtrado en un matraz aforado de 1000 mL y aforar con agua destilada. Preparar un blanco con ácido clorhídrico 2 N, agua destilada y sin muestra. Leer la absorbancia a 494 nm. Corregir la lectura con el blanco correspondiente leyendo a 494 nm. Determinar el contenido de ácido carmínico con la siguiente ecuación:

$$A = \left[\frac{100 A_b}{1.39 m_g} \right] * 100$$

Donde

A contenido de ácido carmínico, (% masa).

A_b absorbancia a 494 nm.

m_g masa de la muestra, mg.

1.39 absorbancia de una disolución de ácido carmínico con una concentración de 100 mg por 1000 mL.

A. 1.2 CENIZAS

MÉTODO OFICIAL DE LA AOAC (923.03). (AOAC, 1990)

Lavar y secar los crisoles a 98 a 100°C hasta peso constante. Pesar 3 a 5 g de muestra homogeneizada. Colocar la muestra en un crisol previamente tarado. Calentar la muestra a 550 °C hasta obtener cenizas grises o blancas. Colocar el crisol en el desecador hasta temperatura ambiente y pesar posteriormente. Reportar el contenido de cenizas en porcentaje, utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \left[\frac{m_{sc} - m_c}{m_g} \right] * 100$$

Donde

C contenido de cenizas, % en masa.

m_c masa de crisol vacío, kg.

m_g masa de muestra inicial, kg.

m_{sc} masa de crisol con cenizas, kg.

A. 1.3 EXTRACTO ETÉREO

MÉTODO OFICIAL DE LA AOAC. GOLDFISHER. (AOAC, 1990)

Pesar 3 g de muestra en un cartucho. Colocar 40 mL de éter etílico en los vasos para extracto etéreo, previamente llevados a peso constante. Llevar a cabo la extracción (GOLDFISHER). Eliminar el éter etílico calentando el residuo contenido en el vaso de extracción a baño de agua. Llevar al horno los vasos hasta peso constante. Determinar el contenido de extracto etéreo como porcentaje de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E_e = \left[\frac{m_e - m_r}{m_g} \right] * 100$$

Donde

E_e contenido de extracto etéreo, % en masa.

m_e masa del recipiente con extracto etéreo, kg.

m_g masa de muestra inicial, kg.

m_r masa de recipiente vacío, kg.

A. 1.4 HIDRATOS DE CARBONO

MÉTODO OFICIAL DE LA AOAC (979.06). (AOAC, 1990)

El contenido de hidratos de carbono se determina por la diferencia con la siguiente ecuación:

$$C_H = 100 - (A + C + E_e + H + P)$$

Donde

A contenido de ácido carmínico, % en masa.

C contenido de cenizas, % en masa.

E_e contenido de extracto etéreo, % en masa.

C_H contenido de hidratos de carbono, % en masa.

H contenido de humedad, % en masa.

A. 1.5 HUMEDAD

MÉTODO OFICIAL DE LA AOAC (925.10). (AOAC, 1990)

Lavar y secar las cajas a 98 a 100 °C hasta peso constante. Calentar el horno a 130 ± 3 °C. Esta temperatura debe mantenerse 1 hora antes de introducir la muestra.

Pesar 2 g de muestra homogeneizada, ponerlos en las cajas para humedad y meterlas al horno. Sacar las muestras del horno, colocarlas en el desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y pesar.

Reportar el contenido de humedad en porcentaje, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$h = \left[\frac{m_s - m_r}{m_g} \right] * 100$$

Donde

h contenido de humedad, % en masa

m_g masa de muestra inicial, kg.

m_r masa de recipiente vacío, kg.

m_s masa de la muestra seca, kg.

A. 1.6 PROTEÍNA

MÉTODO OFICIAL DE LA AOAC (920.87 Y 979.09). (AOAC, 1990)

Pesar 0.7 a 2.2 g de muestra en un tubo de digestión. Agregar una tableta de catalizador (en este caso de Selenio) y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Si la muestra pesa más de 2.2 g, adicionar 10 mL de ácido sulfúrico por cada 2 g de muestra. Calentar generosamente hasta que cese la espuma y la solución de haga clara. Enfriar a temperatura ambiente. Destilar el contenido del tubo de digestión. Agregar una cantidad de hidróxido de sodio 32% y calentar nuevamente durante dos minutos (destilador BUCHI). Inmediatamente conectar un matraz Erlenmeyer con ácido bórico al 4% y 3 gotas de verde de bromocresol (0.1 g en 250 mL de alcohol absoluto) para recibir los vapores de amoniaco. Parar la titulación cuando se hayan recuperado 30 mL. Remover el receptor y lavar la terminal del condensador. Titular el exceso con ácido clorhídrico 2 N. Efectuar este procedimiento con un blanco libre de proteína. Reportar el contenido de proteína como porcentaje de nitrógeno total, calculando con la siguiente ecuación:

$$N_t = [0.014(V_m - V_b)m_g] * 100$$

$$P = N_t * f$$

Donde

m_g masa de muestra inicial, kg.

f factor de conversión de nitrógeno a proteína cruda, 6.25.

N_t contenido de nitrógeno, % en masa.

P contenido de proteína, % en masa.

V_b volumen de titulación del blanco, mL.

V_m volumen de titulación de la muestra, mL.

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE BUFFERS

A. 3.1 BUFFER GLICINA-HCl PARA pH 2.2

A: solución de glicina 0.2 M (1.50 g en 100 mL)

B: HCl 0.2 M

Preparación: 50 mL de A + 44 mL de B, diluir en un total de 200 mL.

A. 3.2 BUFFER PARA pH 5

Tomar el volumen necesario de agua destilada y ajustar su pH con HCl 0.01 N, manteniendo la solución en agitación.

A. 3.3 BUFFER FOSFATOS PARA pH 7

A: solución de fosfato de sodio monobásico 0.2 M (2.78g en 100 mL)

B: solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (5.36 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó 7.17 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL)

Preparación: 39 mL de A + 61 mL de B, diluir en un total de 200 mL.

A. 3.4 BUFFER "UNIVERSAL" PARA pH 10

Preparar una solución 0.1 M con los ácidos: acético, bórico, clorhídrico y fosfórico; pesar 5.73, 6.18, 5.93 y 6.75 de cada ácido respectivamente y, colocarlos en un matraz volumétrico de 1 L, agitando constantemente. Aforar con cuidado.

ANEXO 3
RESULTADOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO (ANOVA)

Espectrofotometría

Cuadro 8. Absorbancias pH 2/30°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	6.89E-05	4	1.7225E-05	1.650017106	0.05	2.71	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	0.0003712	7	5.30286E-05	5.079712624	0.05	2.36	SI	Ft<Fc
Error	0.0002923	28	1.04393E-05					
Total	0.0007324	39						

Cuadro 9. Absorbancias pH 2/50°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	0.00027665	4	6.91625E-05	2.045039337	0.05	2.71	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	0.000728175	7	0.00010402	3.075875178	0.05	2.36	SI	Ft<Fc
Error	0.00094695	28	3.38196E-05					
Total	0.001951775	39						

Cuadro 10. Absorbancias pH 5/30°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	5.115E-05	4	1.27875E-05	0.348145267	0.05	2.71	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	0.0004408	7	6.29714E-05	1.71442462	0.05	2.36	NO	Ft>Fc
Error	0.00102845	28	3.67304E-05					
Total	0.0015204	39						

Cuadro 11. Absorbancias pH 5/50°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	9.41E-05	4	2.3525E-05	0.921645446	0.05	2.71	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	0.004573175	7	0.000653311	25.59493494	0.05	2.36	SI	Ft<Fc
Error	0.0007147	28	2.5525E-05					
Total	0.005381975	39						

Cuadro 12. Absorbancias pH 7/30°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	7.965E-05	4	1.99125E-05	1.548965134	0.05	2.71	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	0.0003323	7	4.74714E-05	3.692735102	0.05	2.36	SI	Ft<Fc
Error	0.00035995	28	1.28554E-05					
Total	0.0007719	39						

Cuadro 13. Absorbancias pH 7/50°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	0.00015165	4	3.79125E-05	1.281523511	0.05	2.71	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	0.004683775	7	0.000669111	22.61737188	0.05	2.36	SI	Ft<Fc
Error	0.00082835	28	2.95839E-05					
Total	0.005663775	39						

HPLC

Cuadro 14. Absorbancias pH 2/30°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	0.00015165	4	3.79125E-05	1.281523511	0.05	2.71	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	0.004683775	7	0.00066911	22.61737188	0.05	2.36	SI	Ft<Fc
Error	0.00082835	28	2.95839E-05					
Total	0.005663775	39						

Cuadro 15. Absorbancias pH 2/50°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	1.7338E+13	1	1.7338E+13	0.464696882	0.05	5.99	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	1.6631E+16	6	2.7718E+15	74.290248	0.05	4.28	SI	Ft<Fc
Error	2.2386E+14	6	3.73104E+13					
Total	1.6872E+16	13						

Cuadro 16. Absorbancias pH 5/30°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	6.3713E+11	1	6.37133E+11	0.355430993	0.05	5.59	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	2.8465E+14	7	4.06643E+13	22.68497067	0.05	3.79	SI	Ft<Fc
Error	1.2548E+13	7	1.79256E+12					
Total	2.9783E+14	15						

Cuadro 17. Absorbancias pH 5/50°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	3.2249E+13	1	3.22492E+13	1.747463995	0.05	5.59	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	9.6747E+15	7	1.38211E+15	74.89117708	0.05	3.79	SI	Ft<Fc
Error	1.2918E+14	7	1.84549E+13					
Total	9.8362E+15	15						

Cuadro 18. Absorbancias pH 7/30°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	3.8114E+14	1	3.81136E+14	1.581960532	0.05	5.59	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	1.6554E+16	7	2.3649E+15	9.8158648	0.05	3.79	SI	Ft<Fc
Error	1.6865E+15	7	2.40926E+14					
Total	1.8622E+16	15						

Cuadro 19. Absorbancias pH 7/50°C

F.V.	SC	g.l.	CM	FC	α	Ft ²	Diferencia significativa	Fc vs Ft
Abs lecturas	9.2731E+14	1	9.27308E+14	1.729746911	0.05	5.59	NO	Ft>Fc
Abs tiempos	4.2028E+15	7	6.00403E+14	1.119957438	0.05	3.79	NO	Ft>Fc
Error	3.7527E+15	7	5.36095E+14					
Total	8.8828E+15	15						

1

¹ www.departamento.us.es/dma1euita/Docencia/ayuda.htm