



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR  
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO  
CARMÍNICO Y SUS METABOLITOS EN LANA TEÑIDA CON GRANA  
COCHINILLA (*DACTYLOPIUS COCCUS*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

**Karen Guadalupe Cruz Mojica**

Ciudad de México

2019





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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor:** José Federico del Río Portilla

**VOCAL:**                   **Profesor:** Marisol Reyes Lezama

**SECRETARIO:**       **Profesor:** Everardo Tapia Mendoza

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor:** Patricia Díaz Arista

**2° SUPLENTE:**       **Profesor:** Luis Daniel Sifuentes Vázquez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** LABORATORIO NACIONAL DE CIENCIAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA CONSERVACIÓN DEL PATRIMONIO CULTURAL (LANCIC), INSTITUTO DE QUÍMICA.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Everardo Tapia Mendoza**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Mayra León Santiago**

**SUSTENTANTE:**

---

**Karen Guadalupe Cruz Mojica**

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS.....	5
<b>CAPÍTULO I</b> .....	6
ANTECEDENTES .....	6
1.1. La grana cochinilla.....	6
1.1.1. Su rol en la naturaleza.....	6
1.1.2. Aspectos culturales.....	10
1.1.3. Ácido carmínico y sus metabolitos .....	14
1.2. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia .....	16
1.3. Espectrometría de masas .....	20
1.3.1. Sistema de introducción de muestras.....	22
1.3.2. Fuente de ionización .....	22
1.3.3. Analizador de masa .....	25
1.4. Nuevas tecnologías acopladas a sistemas cromatográficos.....	28
1.5. Aplicaciones de técnicas analíticas separativas en extracción textil relacionado con grana cochinilla.....	30
1.6. Tinción.....	35
1.6.1. Pigmento .....	35
1.6.2. Fibras textiles .....	36
1.6.3. Lavado de la tela.....	38
1.6.4. Mordentado de la tela .....	38
1.6.5. Proceso de extracción del pigmento de la grana cochinilla ..	40
<b>CAPÍTULO II</b> .....	41
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	41
2.1. Materiales y equipos .....	41
2.1.1. Disolventes y reactivos .....	41
2.1.2. Sistema cromatográfico .....	41
2.1.3. Sistema de extracción.....	42
2.1.4. Estudio de envejecimiento.....	42
2.1.5. Muestras .....	42
2.2. Preparación de disoluciones estándar de ácido carmínico.....	43

2.3. Desarrollo y optimización del método cromatográfico .....	43
2.4. Tinción .....	45
2.5. Extracción textil .....	50
2.5.1. Métodos propuestos.....	50
2.5.2. Optimización al método Stathopoulou .....	51
2.5.3. Extracción en Fase Sólida (SPE) .....	53
2.6. Estudio de envejecimiento en textiles teñidas con grana cochini- lla.....	54
<b>CAPÍTULO III</b> .....	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
3.1. Desarrollo y optimización del método cromatográfico .....	56
3.2. Tinte de grana cochinilla .....	58
3.3. Métodos de extracción textil .....	62
3.3.1. Métodos propuestos.....	62
3.3.2. Variables realizadas al método Stathopoulou .....	65
3.3.3. Extracción en fase sólida (SPE) .....	66
3.3.4. Extracción textil completa de formulaciones restantes de grana cochinilla. ....	71
3.4. Estudio de envejecimiento en textiles teñidas con grana cochini- lla.....	73
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	77
CONCLUSIONES .....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### a) Figuras

Figura 1. Grana cochinilla, en su ambiente natural.....	3
Figura 2. Microfotografía del Cuerpo de la grana cochinilla hembra (derecha) y macho (izquierda) .....	7
Figura 3. Colonia de cochinilla en nopal .....	8
Figura 4. Desarrollo de la grana cochinilla de huevecillo a adulto. ....	10
Figura 5. Recolección de grana cochinilla, dibujo de José Antonio de Alzate, 1777. ....	11
Figura 6. Extracto del código Laudo, originario del centro de México que data de antes de la conquista española. ....	12
Figura 7. Cochinilla seca y rojo carmín. ....	13
Figura 8. Estructura del ácido carmínico. ....	14
Figura 9. Cambios de color de la grana cochinilla disuelta en agua en función del pH (0-14 unidades) .....	15
Figura 10. Estructura del flavonoide dcII .....	15
Figura 11. Estructura del flavonoide dcIV. ....	15
Figura 12. Estructura del flavonoide dcVII. ....	16
Figura 13. Diagrama del proceso de separación en cromatografía de líquidos .....	17
Figura 14. Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia .	18
Figura 15. Esquema de un espectrómetro de masas.....	21
Figura 16. Diagrama de ionización por electrospray (ESI).....	25
Figura 17. Esquema de un analizador másico del tipo cuadrupolar .....	26
Figura 18. Diagrama del analizador de trampa de vuelo (TOF). ....	27

Figura 19. HPLC-Q-ToF ubicado en el LANCIC-IQ. ....	29
Figura 20. Diego Rivera, época Tenochtitlan, Palacio Nacional, Ciudad de México .....	36
Figura 21. Fórmula estructural de la molécula de lana .....	37
Figura 22. Modelo de enlace entre el ácido carmínico y el catión metálico aluminio proveniente del alumbre, con diferentes ángulos de orientación del azúcar.....	39
Figura 23. Diagrama de tinción de telas.....	46
Figura 24. Formulaciones de grana cochinilla. ....	48
Figura 25. Textiles teñidas con diferentes formulaciones de grana cochinilla. ....	49
Figura 26. Diagrama de 3 métodos de extracción textil diferentes obtenidos de la búsqueda bibliográfica. ....	50
Figura 27. Diagrama del método final de extracción textil. ....	52
Figura 28. Diagrama del método de clean-up por SPE. ....	54
Figura 29. Cromatograma de estándar de ácido carmínico de 10.0 ppm, analizado con columna C18 de 5 cm de largo y método uno.....	56
Figura 30. Cromatograma estándar de ácido carmínico 10.0 ppm obtenido con el método final optimizado utilizando una columna C18 de 10 cm de longitud.....	57
Figura 31. Espectro de masas y estructura del ácido carmínico, modo negativo. ....	58
Figura 32. Cromatograma tinte de grana cochinilla concentrada. ....	59
Figura 33. Espectro de masas y estructura del metabolito dcll. ....	59
Figura 34. Espectro MS/MS y estructura del metabolito dclV. ....	61
Figura 35. Espectro MS/MS y estructura del metabolito dclV. ....	61
Figura 36. Cromatograma lana teñida con grana cochinilla concentrada usando el método de extracción EUA. ....	62

Figura 37. Cromatograma lana teñida con grana cochinilla concentrada usando el método de extracción DMSO.....	63
Figura 38. Cromatograma lana teñida con grana cochinilla concentrada usando el método de extracción Statho. ....	63
Figura 39. Cromatograma blanco de lana mordentado usando el método de extracción Statho. ....	65
Figura 40. Cromatograma fracción 1 por SPE de una lana teñida con fórmula rojo cochinilla. ....	69
Figura 41. Cromatograma fracción 2 por SPE de lana teñida con fórmula rojo cochinilla. ....	69
Figura 42. Cromatograma fracción 3 (250 $\mu$ L) por SPE de blanco de lana mordentado usando el método de extracción Statho. ....	70
Figura 43. Cromatograma fracción 3 (250 $\mu$ L) por SPE de lana teñida con fórmula rojo anaranjado. ....	71
Figura 44. Cromatograma fracción 3 (250 $\mu$ L) de SPE de lana teñida con fórmula rojo mexicano. ....	71
Figura 45. Cromatograma fracción 3 (250 $\mu$ L) de SPE de lana teñida con fórmula morada.....	72
Figura 46. Cromatograma de extracción por método Statho de lana teñida con fórmula morada. ....	72
Figura 47. Comparación de telas a tiempo cero con las envejecidas teñidas con distintas formulaciones de grana cochinilla. ....	73
Figura 48. Cromatograma fracción 3 (250 $\mu$ L) de SPE de blanco de lana envejecida por 4 meses.....	74
Figura 49. Cromatograma fracción 3 (250 $\mu$ L) de SPE de lana envejecida por 4 meses, teñida con fórmula rojo cochinilla. ....	75
Figura 50. Cromatograma fracción 3 (250 $\mu$ L) de SPE de lana envejecida por 4 meses, teñida con fórmula rojo anaranjado. ....	75
Figura 51. Cromatograma fracción 3 (250 $\mu$ L) de SPE de lana envejecida por 4 meses, teñida con fórmula rojo mexicano.....	75



Figura 52. Cromatograma fracción 3 (250  $\mu$ L) de SPE de lana envejecida por 4 meses, teñida con fórmula morada. .... 76

## **b) Tablas**

Tabla 1. Cuadro comparativo de diferentes fuentes de ionización para un espectrómetro de masas. .... 24

Tabla 2. Artículos recientes relacionados con la extracción textil de grana cochinilla. .... 31

Tabla 3. Método cromatográfico inicial utilizado para el análisis del estándar de ácido carmínico. .... 44

Tabla 4. Método cromatográfico optimizado utilizado para la identificación de grana cochinilla y sus metabolitos. .... 45

Tabla 5. Fechas de toma muestra de tela envejecida y horas totales de operación de la cámara de envejecimiento. .... 55

Tabla 6. Condiciones específicas para el experimento MS/MS de los iones de los metabolitos dcIV y dcVII. .... 60

## ABREVIACIONES Y SIMBOLOGÍA

<b>AC</b>	Ácido carmínico
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AF</b>	Ácido fórmico
<b>CE</b>	Electroforesis capilar (por sus siglas en inglés)
<b>DAD</b>	Detector de arreglo de diodos (por sus siglas en inglés)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray (por sus siglas en inglés)
<b>EUA</b>	Extracción Asistida por Ultrasonido (por sus siglas en inglés)
<b>FR</b>	Fase reversa
<b>GC</b>	Cromatografía de Gases (por sus siglas en inglés)
<b>HPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (por sus siglas en inglés)
<b>IQ</b>	Instituto de Química
<b>LANCIC</b>	Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz (por sus siglas en inglés)
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MS</b>	Espectrometría de masas (por sus siglas en inglés)
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>Q-ToF</b>	Quadrupolo-Tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida (por sus siglas en inglés)
<b>ToF</b>	Tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
<b>UHPLC</b>	Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (por sus siglas en inglés)
<b>u.m.a</b>	Unidad de masa atómica

## INTRODUCCIÓN

México, país de una enorme herencia cultural, enfrenta diversos retos para la conservación de su vasto patrimonio; en particular la superación de deficiencias en la generación del conocimiento en esta área. Actualmente las instancias encargadas del manejo, gestión, estudio, protección y conservación del patrimonio requieren el apoyo de instituciones académicas que contribuyan a la formulación de conocimientos científicos, históricos y técnicos para implementar políticas de preservación, logrando promover la toma de decisiones con un sustento científico más sólido.

La realización de proyectos de investigación interdisciplinaria, análisis y diagnóstico para conocer los mecanismos de alteración así como causas de riesgo del patrimonio permitirán la creación tanto de protocolos como propuestas de acción a corto, mediano y largo plazo para la planeación y aplicación oportuna de lineamientos eficaces de gestión, además de la preservación de éste.<sup>1</sup>

El Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC) es un proyecto único a nivel nacional. Es distinguido por trabajar de manera multidisciplinaria con especialistas de las ciencias exactas y las humanidades.<sup>2</sup> LANCIC emplea una metodología de estudio integral para el análisis del patrimonio cultural por medio de técnicas de imagen, análisis no invasivo *in situ* y en el laboratorio, análisis microscópico y químico. Son cinco las instancias académicas encargadas del manejo, gestión, estudio, protección y conservación del patrimonio: tres de ellas en la capital y dos externas. Las cuales son el Instituto de Investigaciones Estéticas (IIE), Instituto de Física (IF), Instituto de Química (IQ) de la

UNAM, el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y el Centro de Investigaciones en Corrosión de la Universidad Autónoma de Campeche (CICORR).<sup>3</sup>

El LANCIC-IQ propone, implementa, discute y desarrolla procedimientos adaptados a los materiales, recetas, tecnología y obras locales mexicanas en prioridad. Para ello el laboratorio cuenta con una base de estándares para estos análisis, que se enriquece y crece día a día. Uno de los proyectos que actualmente se desarrollan en éste laboratorio se enfoca en un pigmento natural con gran relevancia histórica por su gran herencia cultural.

En la época prehispánica los tintes utilizados para teñir diferentes objetos se obtenían de maderas, semillas, insectos, caracoles, plantas o flores y se extraían por procesos de cocción o de una infusión. Un ejemplo de un insecto utilizado para esto, es la grana cochinilla (*Dactylopius coccus*), la cual es un parásito del nopal y era utilizada por los aztecas para teñir diversos objetos: alimentos, madera, piedras, textiles, algodón, trajes, vasijas, plumas; tintas para códices y para decorar las casas; hombres y mujeres lo utilizaban como cosmético y también con fines medicinales. La forma más común de extraer el colorante de este insecto es secando el cuerpo de la cochinilla hembra, molerla y así obtener el colorante rojo, mejor conocido como ácido carmínico.

La grana cochinilla de todos los extractos coloridos americanos que llegaron a Europa, sin lugar a dudas, es el colorante que por su calidad en el color ocupó desde el siglo XVI hasta principios del siglo XIX, el lugar principal entre los rojos de todo el mundo.<sup>4</sup> Esto es debido a su alto porcentaje de ácido carmínico, el cual oscila entre el 17 y 24%,

una cantidad jamás obtenida en Europa hasta antes de la conquista española.<sup>5</sup>

La grana cochinilla, como se puede ver en la figura 1, fue un producto importante en el comercio internacional, tanto su cultivo como su elaboración. No es casualidad que los artistas europeos emplearan la cochinilla en los centros importantes de la industria textil, por ejemplo: Venecia, Sevilla, Amberes y Ámsterdam.<sup>6</sup>

A través de los años la técnica analítica más utilizada para identificar el tinte de la grana cochinilla en textiles, ha sido por medio de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia; logrando identificar al colorante (ácido carmínico) y sus principales metabolitos. Los artículos publicados han estudiado herencias culturales para diferentes partes del mundo pero ninguno ha tenido que ver con la cultura mexicana.



*Figura 1. Grana cochinilla, en su ambiente natural tomada de la URL: <http://minilink.es/3yj6> consultada por última vez 06/04/19*

Con la importancia de la cochinilla mexicana y la falta de estudios en el campo de la identificación de ésta en textiles de relevancia cultural

mexicana, en este trabajo se desarrolló una nueva metodología analítica que permita identificar al ácido carmínico y sus metabolitos más relevantes (dcII, dcIV y dcVII) en textiles teñidos con grana cochinilla.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Mediante la cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) realizar el desarrollo de una metodología optimizada que nos permita identificar el colorante de la grana cochinilla (*Dactylopus coccus*) y sus metabolitos en lana joven y envejecida artificialmente.

### 2. Objetivos particulares

- Identificar el tiempo de retención del ácido carmínico en un sistema cromatográfico mediante una disolución estándar.
- Realizar la tinción de lana con grana cochinilla, usando varias formulaciones de interés cultural.
- Encontrar un método adecuado para la extracción del ácido carmínico y sus metabolitos en lana teñida con grana cochinilla para diversas formulaciones.
- Realizar un estudio de envejecimiento acelerado de la tela para conocer el efecto del tiempo sobre el textil y el colorante fijado en la tela.

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1.1. La grana cochinilla

#### 1.1.1. Su rol en la naturaleza

La utilización de recursos naturales, antes de entrar a la época de la química aplicada, generó todo un sistema de extracción. África, Asia y América fueron grandes regiones poseedoras de materias primas naturales entre ellas los colorantes. El azafrán, el kermes, la grana cochinilla, el índigo, el pali fusete del Brasil, el brazalete, el moralete, el palo de Campeche y la raíz de rubia, entre otros, hicieron que las regiones que poseían estas materias, convirtieran sus procesos de explotación en el eje central sobre el cual giraba su economía.<sup>7</sup>

Un colorante natural es en términos biológicos aquel que se sintetiza y acumula en las células de plantas, hongos o animales. La gran mayoría se encuentra en un mundo vegetal, y sólo el carmín y el púrpura, entre los de origen americano, proceden de un insecto y un molusco marino respectivamente.<sup>8</sup>

No existe necesariamente una correspondencia entre el color de la planta y el colorante que contiene, ni puede establecerse una relación sistemática entre familias botánicas y grupos de colorantes. El hecho de que una molécula biológica esté o no coloreada está determinado por su estructura, y de acuerdo con sus afinidades estructurales se han clasificado los colorantes orgánicos en seis grandes grupos.

- Carotenoides: Colorantes amarillos y naranjas.
- Flavonoides: Colorantes amarillos y naranjas.



- Antocianinas: (Subgrupo de los flavonoides) Colorantes azules y rojos.
- Quinonas: Colorantes púrpura, escarlata, naranja y rojo siena.
- Indigoides: Colorantes azul y púrpura.
- Taninos: Colorantes rojo-siena y anaranjados.

Dentro del grupo de los colorantes con antroquinonas se encuentra el colorante de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus*), cochinilla mexicana o nocheztli ("sangre de nopal" o "sangre de tuna") que es un insecto parásito del nopal perteneciente a la Orden Homoptera, Familia *Coccidae*.<sup>9</sup>

La larva de la grana recién nacida es pequeña, de aproximadamente 1 mm de largo y de color rojizo (figura 2). Se arrastra lentamente, en busca de un área succulenta en el cactus donde la cutícula de la planta es lisa y no está endurecida.



Figura 2. Microfotografía del Cuerpo de la grana cochinilla hembra (derecha) y macho (izquierda) tomada de la URL: <http://minilink.es/3yj9> consultada por última vez el 07/04/19

Después de encontrar un sitio de alimentación adecuado, empuja su rostral largo dentro de la planta, y si es una hembra, permanecerá en el mismo lugar durante toda su vida. Después de alimentarse durante un tiempo, la larva secretará filamentos finos, duros pero elásticos, blancos como agujas, de sus glándulas de cera dorsal. Éstos finalmente alcanzarán una longitud relativamente grande, movida e influida por las corrientes de aire, con el propósito de mantener alejados a los que serían parásitos y depredadores. En esta etapa no hay diferencia visible entre los sexos; después de la muda, la hembra permanece de la misma forma a lo largo de su vida, pero aumenta de tamaño. Las agujas de cera no se producen en una etapa de desarrollo posterior, pero se secreta un fino polvo ceroso blanco que cubre la parte posterior del insecto como se puede ver en la figura 3. Después de la segunda muda, la hembra crecerá rápidamente, eventualmente en forma de globo.<sup>10</sup>



Figura 3. Colonia de cochinita en nopal tomada de la URL: <http://minilink.es/3xpx> consultado por última vez 19/03/19

Cerca del final de su desarrollo, la hembra segrega más filamentos blancos y suaves de la región anal de su cuerpo que se acumulan y forman una textura lanuda. Como los insectos se asientan en grupos, la acumulación de la lana es evidente. Esta secreción lanuda es una barrera protectora eficaz, no sólo contra la desecación y las condiciones climáticas, sino también contra la mayoría de los posibles depredadores. El polvo ceroso se adheriría a las partes de las patas y la boca de los insectos o a los picos de las aves.

La hembra completamente desarrollada (en la crianza en invernadero) alcanza 6 mm de largo, 4.5 mm de ancho y 4.2 mm de alto. No es una forma global perfecta, pero para un insecto es una utilización altamente efectiva del espacio, ya que su cavidad corporal está completamente llena de huevos.<sup>11</sup>

Cuando el polvo céreo se elimina del insecto, su cuerpo aparece oscuro, púrpura-negro; no hay apéndices visibles para el ojo inexperto, pero una lupa mostrará la presencia de antenas cortas y patas en miniatura inútiles para el cuerpo grande.

Se conoce que de su estado de huevecillo hasta adulto (cuando la hembra está a punto de cosecha) pasan de 80 a 120 días dependiendo de la temperatura. El insecto pasa por los estados de huevo, ninfa y adulto (ver figura 4). El peso de un insecto cochinilla hembra vivo completamente desarrollado de invernadero es en promedio 46.96 mg.<sup>12</sup>

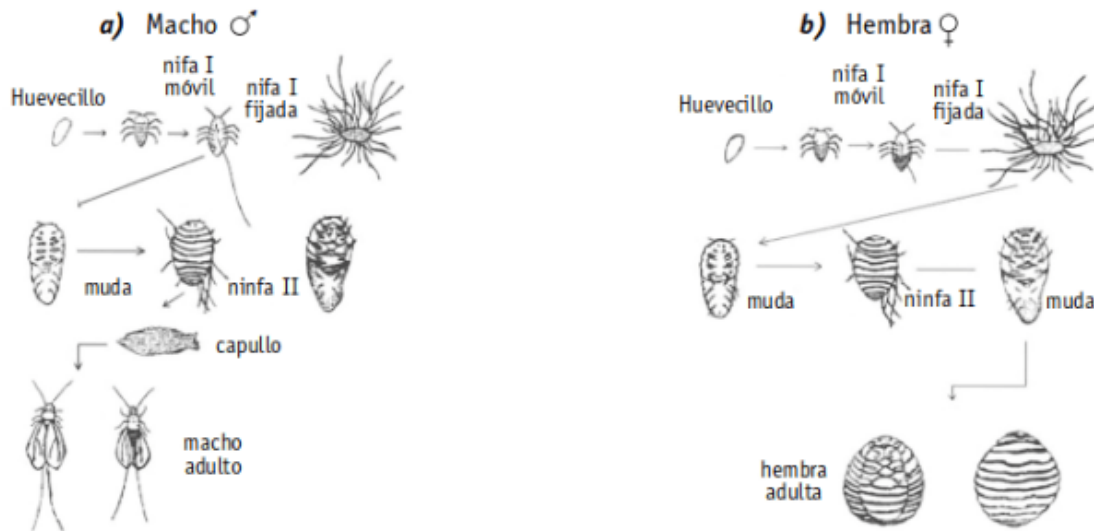


Figura 4. Desarrollo de la grana cochinilla de huevecillo a adulto tomada de URL: consultada por última vez 07/04/19.

Existen dos tipos de cochinilla, silvestre y fina. La silvestre es un complejo de ocho especies que crece como una plaga en las huertas de nopal. Su colorante es de mala calidad y de baja concentración. Se distingue de la fina porque su cuerpo está cubierto de una madeja de "algodoncillo" blanco en vez del polvo de la cochinilla fina. La cochinilla fina se distingue porque su colorante es de buena calidad y alta concentración.<sup>13</sup>

La cochinilla se introdujo en varios países: Nicaragua, Colombia, Perú, Ecuador, San Domingo, Brasil, Portugal, Argelia, India, Islas Canarias, etc. Este insecto no sólo necesita un clima cálido y seco, sino que aparentemente depende de una cierta variedad de nopales; prefiere el *Opuntia cochinillifera*; su distribución en México se da principalmente en Oaxaca, Guerrero y Puebla.

### 1.1.2. Aspectos culturales

La llegada de los españoles al México antiguo propició el intercambio cultural y comercial, con artículos que enriquecieron a ambas culturas.



El vestido fue fundamental en la vida civil y religiosa de los pueblos indígenas: las prendas usadas por los nobles y sacerdotes, otorgaban estatus y jerarquías. Una característica importante de estas prendas fue su valor ceremonial y de intercambio relacionado con los tintes usados para teñirlas. La Grana Cochinilla formaba parte de un conjunto de pigmentos y colorantes provenientes principalmente de plantas y animales.

La cochinilla se recolectaba como se observa en la figura 5; se ponía a secar y se molía para formar una masa de colorante. Para referirse a la sustancia que se obtenía de la *nocheztli* se utilizaba el vocablo *tlapalli*. Éste no sólo se refería a aquel tinte sino a los colores en general.<sup>14</sup>



Figura 5. Recolección de grana cochinilla, dibujo de José Antonio de Alzate, 1777. Tomada de la URL: <http://grana-cochinilla.blogspot.com/2014/> consultada por última vez 19/03/19.

Hablando culturalmente, en la Mesoamérica prehispánica la grana cochinilla tuvo un gran valor ya que era la base para producir la tintura de color rojo, componente esencial en sus creencias simbólicas y religiosas. En esta época los principales centros productores del tinte escarlata se ubicaban en las siguientes zonas mexicanas: Oaxaca, Puebla-Tlaxcala, Michoacán y Chiapas. Lo usaban, entre otras aplicaciones para fines paganos, religiosos y tributarios: para teñir sus telas; como colorante natural en sus comidas (por ejemplo, en tamales y tortillas); para pintar sus casa, sus códices (Figura 6) y como cosméticos. Una investigación reciente confirmó la presencia de cochinilla en casi todos los códices prehispánicos elaborados en las regiones centrales y suroccidentales de Mesoamérica (excepto en los códices del área maya)<sup>15</sup>.

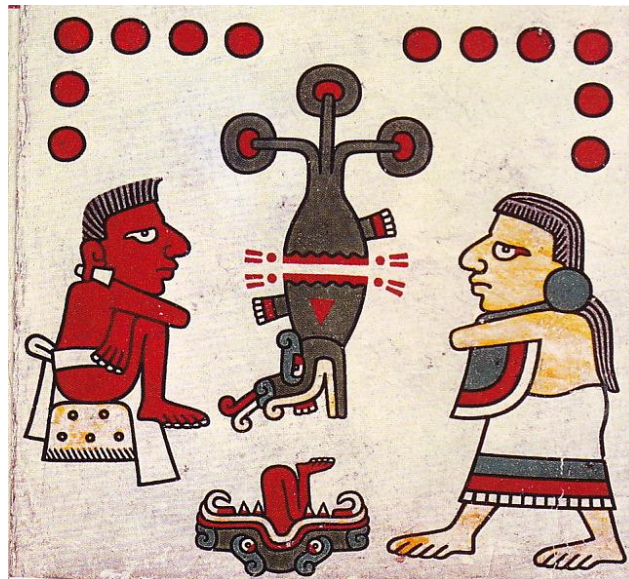


Figura 6. Extracto del códice Laudo, originario del centro de México que data de antes de la conquista española tomado de la URL: <http://minilink.es/3yjp> consultado por última vez el 7/04/19.

Cabe destacar que ese tinte escarlata aparece como objeto de tributo hacia los aztecas, junto al oro, las piedras preciosas, el maíz, el

frijol, los escudos y los trajes de guerrero, no es coincidencia que los historiadores le nombraran el "oro rojo".<sup>16</sup>

Se estima que la capital azteca debió haber consumido una gran cantidad de cochinilla, según los códices encontrados. No obstante, a pesar de lo laborioso de la cría de este insecto, la habilidad y paciencia de los indígenas posibilitaron la expansión del producto. El mercado europeo, al descubrir las cualidades de este tinte, pronto incrementó su demanda.

En la figura 7 se puede observar el rojo carmín, el cual se convirtió en una fuerte competencia para los colorantes europeos, pues con él se teñía la ropa de reyes, nobles y del clero. Como producto de exportación, salía del puerto de Veracruz hacia Europa entrando por España, y de ahí a distintos destinos; la grana llegaba a Persia y hasta a la misma Rusia.



Figura 7. Cochinilla seca y rojo carmín tomada de la URL: <http://minilink.es/3xpz> consultada por última vez 19/03/19.

Por lo ya descrito, resalta la gran importancia de este colorante considerado como el mejor colorante natural del mundo en ese momento y su aplicación en obras tan relevantes como las de artistas como Jacopo Robusti Tintoretto, Peter Paul Rubens, Francisco de Zurbarán, Nicolás Pousin, Diego Velásquez, Paul Cézanne, Eugene Delacroix, Joshua Reynolds, Pierre-Auguste Renoir y significativamente Vincent van Gogh.<sup>17</sup>

### 1.1.3. Ácido carmínico y sus metabolitos

La capacidad del ácido carmínico para formar complejos con metales es explotada en la manufactura de carmines, aunque los orígenes de la técnica se pierden en la antigüedad. La figura 8 muestra la estructura aceptada del ácido carmínico.

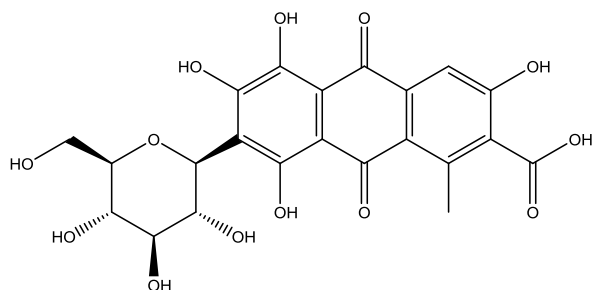


Figura 8. Estructura del ácido carmínico.

El ácido carmínico es un polvo rojo brillante que se descompone a 136° C. El AC tiene 3 constantes de disociación:  $pK_{a1}=2.81$ ;  $pK_{a2}=5.43$  y  $pK_{a3}=8.10$ , que están asociadas a las diversas coloraciones. Como se muestra en la figura 9 el ácido carmínico de la grana cochinilla a pH menor que 4 toma color amarillo, entre pH 4 y 7 se torna color rojo y a pH mayor que 7 es violeta. Se disuelve en agua caliente, alcohol y soluciones de hidróxidos alcalinos más no en éter, benceno o cloroformo.<sup>18</sup>



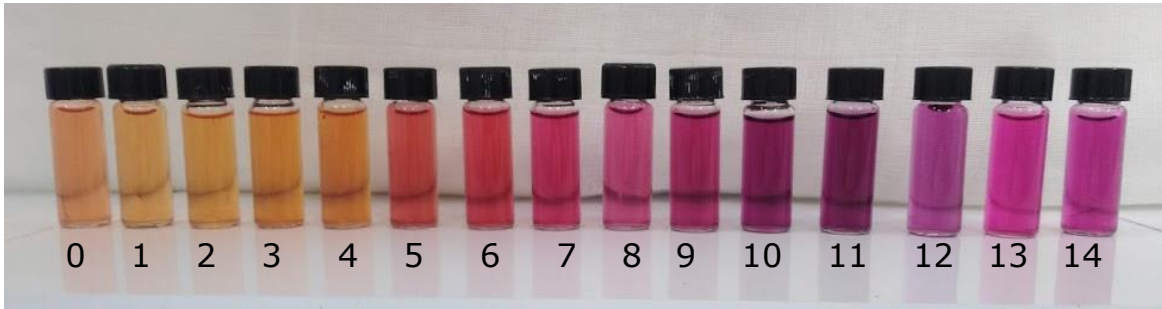


Figura 9. Cambios de color de la grana cochinilla disuelta en agua en función del pH (0-14 unidades)

Al ser un colorante natural, el rojo de la grana cochinilla es una mezcla de compuestos los cuales hacen que sea único. Varios estudios han afirmado haber identificado mediante metodologías analíticas los cromóforos menores, es decir, sus biomarcadores además del ácido carmínico. Los principales metabolitos reportados en la literatura son el dcII, dcIV y dcVII aunque se siguen investigando más marcadores para confirmar sus estructuras.<sup>19</sup> A continuación se muestran las estructuras de dichos metabolitos (Figuras 10-12).

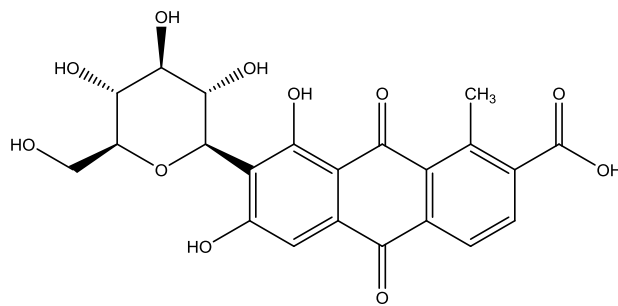


Figura 10. Estructura del flavonoide dcII

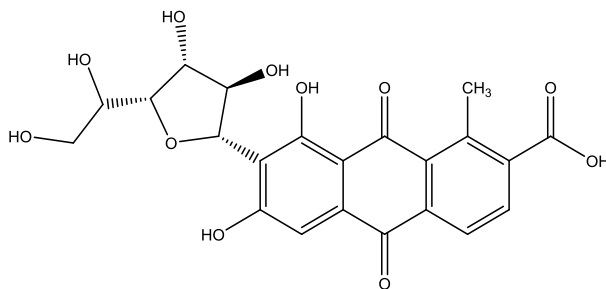


Figura 11. Estructura del flavonoide dcIV.

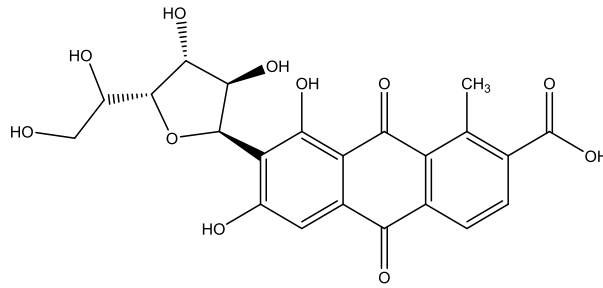


Figura 12. Estructura del flavonoide dcVII.

## 1.2. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

La cromatografía es un método físico de separación en la cual los componentes (analitos) de la muestra a ser separados están distribuidos en dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra se mueve en una dirección definida (fase móvil). En la figura 13 se muestra un diagrama donde se explica este proceso.

La Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna en el que por presión, se hace pasar una mezcla de analitos en un sistema disolvente (fase móvil). La fase móvil con los compuestos de interés a separar entra a través de una columna cromatográfica empacada con alguna fase estacionaria particular a un flujo especificado. La separación de los compuestos ocurre por la interacción de éstos con la fase móvil y la fase estacionaria.<sup>20</sup>

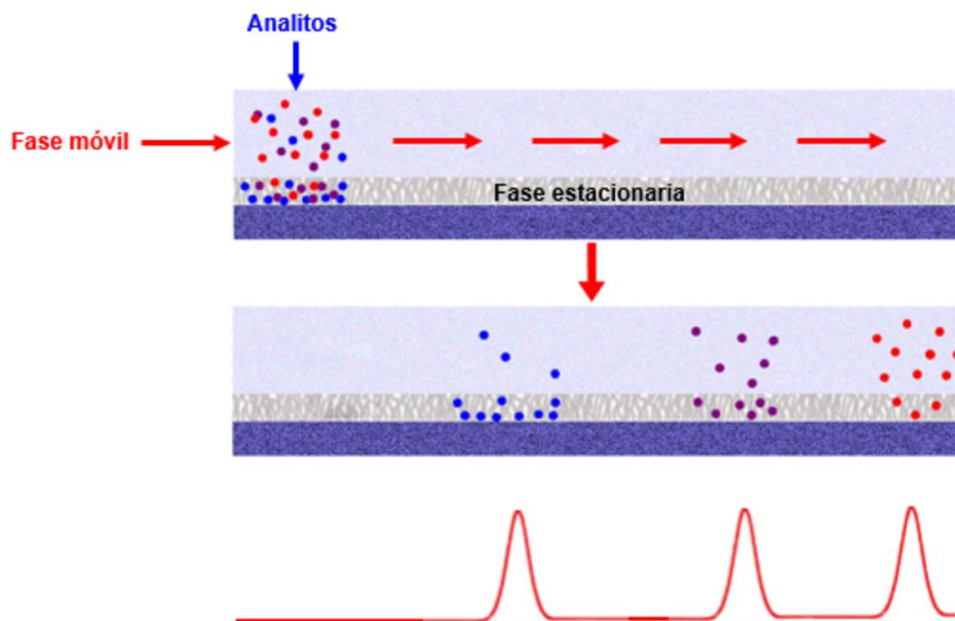


Figura 13. Diagrama del proceso de separación en cromatografía de líquidos tomado de la URL: <http://minilink.es/3yjs> consultado por última vez 07/04/19

Aunque en la literatura se encuentran descritos diferentes métodos de separación disponibles para resolver las mezclas por cromatografía de líquidos; la separación mediante fase reversa (FR) es el modo más común en cromatografía líquida, ésta evolucionó a partir del uso de la fase estacionaria polar y de un eluyente no polar como componente principal de la fase móvil, por ello se consideró la práctica normal, de ahí el nombre de fase normal.

Si bien este modelo separó componentes basados en su naturaleza polar, hubo una gran cantidad de mezclas de analitos que no eran polares y tenían características hidrofóbicas que necesitaban separación. El uso de una fase estacionaria no polar, con una fase móvil polar ayudó a separar estos analitos hidrofóbicos. Dado que esta práctica es inversa a la fase normal, se utiliza el término fase reversa o inversa.<sup>21</sup>

La instrumentación básica de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (figura 14) se describe a continuación: sistema de bombeo, inyector, columna y detector. El desarrollo del HPLC se dice fue dado por el desarrollo del sistema de bombeo.

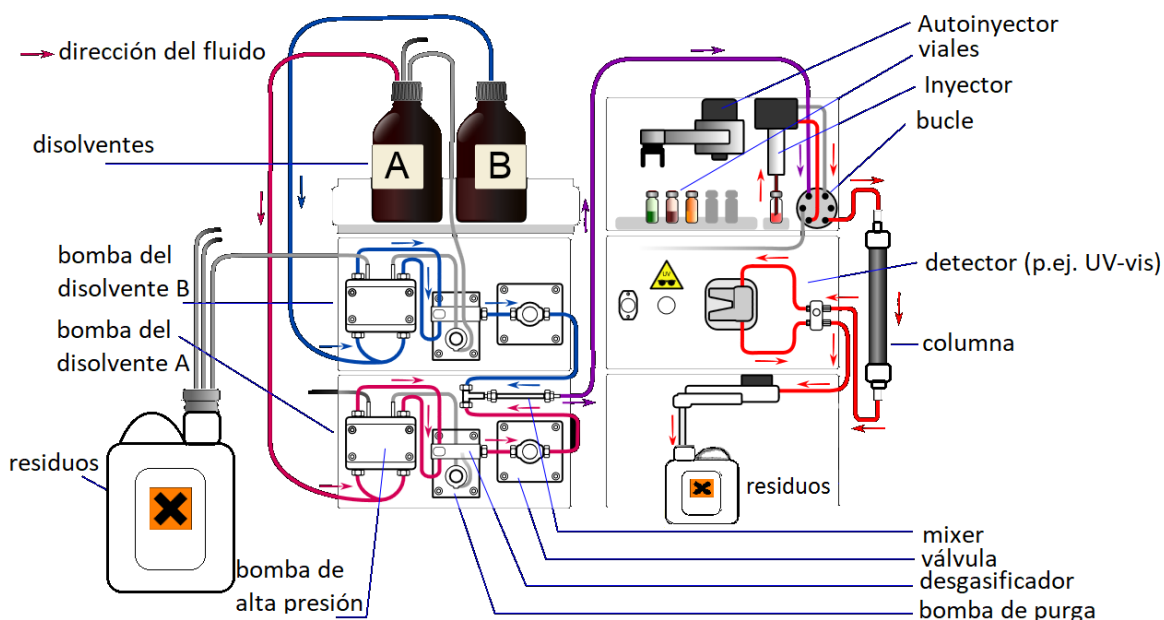


Figura 14. Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia tomada de la URL: <http://minilink.es/3yjj> consultada por última vez el 7/04/19

La bomba genera un flujo del reservorio del disolvente al sistema. La función del sistema de bombeo o medición de disolventes en el HPLC es proporcionar un suministro constante y reproducible de fase móvil a la columna. Debido al pequeño tamaño de partícula utilizado en el empaque de las columnas modernas de cromatografía de líquidos, éstas presentan resistencia sustancial al flujo, es por eso que se requieren bombas de alta presión.<sup>22</sup> Sin embargo, la generación de alta presión generada por la bomba es normal y lo que más preocupa hoy en día es proporcionar una presión constante en cualquier condición, para proporcionar un caudal controlable y reproducible dado que el cambio en la proporción del flujo puede influir el análisis en gran medida.<sup>23</sup>

El inyector se coloca al lado de la bomba. La inyección mediante válvulas es la más utilizada, ya que reúne prácticamente todas las características exigibles para un inyector, como inyección a presiones elevadas, precisión de décimas por ciento y volúmenes de inyección entre 0.5 y 500  $\mu\text{L}$ . El uso de muestreador automático (auto-inyector) del sistema también es ampliamente utilizado ya que permite una serie de inyecciones repetitivas en un tiempo programado.

Finalmente donde ocurre la separación es en la columna analítica, por lo tanto, se puede decir que la columna es el corazón de cualquier sistema cromatográfico. Las columnas para HPLC proporcionan una ampliación mínima de bandas de muestra separadas. Por lo que, tanto el tamaño de partícula como la funcionalización de la sílice de la columna son de gran importancia práctica, las funcionalizaciones para sílice más comunes son C8, C18, ciano, amino, resinas y polímeros.

La separación de los analitos se realiza dentro de la columna, mientras que un detector se utiliza para observar la separación obtenida. Un importante requisito de instrumentación en la HPLC moderna es un detector sensible para una monitorización continua del efluente de la columna.<sup>24</sup> Los detectores empleados en HPLC se han diseñado, adaptado y perfeccionado con el fin de incorporar celdas de flujo que permitan medir las bajas concentraciones de analito que hay en la fase móvil.

Existen varios tipos de detectores que se utilizan con la cromatografía de líquidos; sin embargo, el tipo de detección que se debe usar para un problema particular depende de las características del soluto, la sensibilidad, selectividad requeridas, la conveniencia y versatilidad deseadas para el análisis a desarrollar.<sup>25</sup>

### **1.3. Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas es una técnica de análisis cualitativo, de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, por si sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría.

En la espectrometría de masas convencional no se utiliza ningún tipo de radiación, por lo que básicamente no puede ser considerada como una técnica espectroscópica. Otra diferencia esencial que presenta la espectrometría de masas con las espectroscopias clásicas, es que en estos últimos métodos los procesos que se originan son puramente físicos, es decir no destructivos, de forma que la muestra utilizada para la obtención del espectro no se modifica químicamente y se puede volver a recuperar; en cambio, en la espectrometría de masas, durante la obtención del espectro tienen lugar procesos químicos, con lo que la muestra utilizada se destruye y no puede recuperarse; este hecho no es un inconveniente grave, ya que la cantidad de muestra necesaria para la obtención de un espectro de masas, es muy pequeña (del orden del pg)<sup>26</sup>.

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Un espectro de masas brindará, en consecuencia, un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la masa/carga de cada uno de ellos. Por esta razón la espectrometría de masas puede ofrecer una enorme cantidad de información sobre un compuesto determinado.

Esencialmente, el espectrómetro de masas (figura 15) realiza cuatro funciones: vaporizar los compuestos de interés. Una vez volatilizada la muestra, el espectrómetro debe ser capaz de originar iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa. Una vez generados los iones, el espectrómetro debe separarlos en función de su relación masa/carga.<sup>27</sup> Una vez separados los iones, el espectrómetro debe detectar los iones formados y registrar la información adecuadamente. Ya que el espectrómetro debe cumplir estas cuatro funciones, su instrumentación consta de cuatro partes fundamentales que se describen con más detalle en las siguientes secciones.

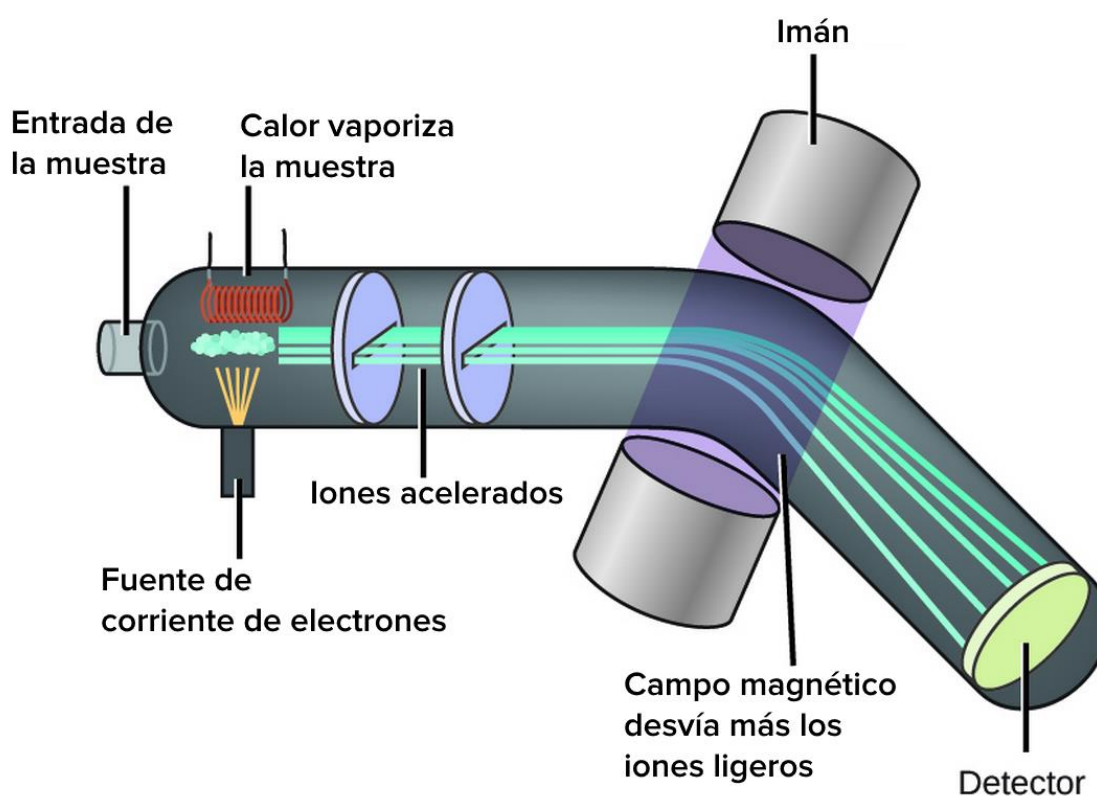


Figura 15. Esquema de un espectrómetro de masas de la URL: <http://minilink.es/3ylv> consultado por última vez 8/04/19

### 1.3.1. Sistema de introducción de muestras.

La finalidad del sistema de entrada es la de permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío, espectrómetros de masas más modernos están equipados con dos tipos de entradas capaces de acomodar diversos tipos de muestras, que incluyen sistemas de entrada, de sonda directa y entradas cromatográficas.

El principal factor limitante en la espectrometría de masas, es la posibilidad de vaporización de la muestra. Como norma general, se puede decir que la condición necesaria para que se pueda obtener el espectro de un compuesto, es que su presión de vapor sea igual o superior a  $10^{-6}$  mm de mercurio, a una temperatura tal que la muestra no pirolíce; para poder realizar el espectro, no es necesario vaporizar toda la muestra, sino únicamente la cantidad necesaria para alcanzar la presión indicada anteriormente. La muestra se calienta en el capilar directamente a través de la varilla, o bien indirectamente por medio de una resistencia eléctrica externa.

### 1.3.2. Fuente de ionización

Las fuentes de ionización de los espectrómetros de masas tienen características comunes, pese a la gran variabilidad de tipos existentes, la principal es que todas transforman los componentes de una muestra en iones. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinados en un único componente. En todos los casos, se obtiene un haz de iones positivos o negativos que posteriormente se acelera hacia el interior del analizador másico.<sup>28</sup>



Existen varios métodos para producir la ionización de la muestra, por ejemplo:

- Impacto electrónico (EI)
- Ionización química (CI)
- Desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI)
- Ionización por electrospray (ESI)
- Fuentes de bombardeo con átomos rápidos (FAB)
- Termospray (TS)
- Ionización química a presión atmosférica (APCI)

A modo de cuadro comparativo se explican brevemente las diferentes fuentes de ionización anteriormente mencionadas. (Ver tabla 1).

Tabla 1. Cuadro comparativo de diferentes fuentes de ionización para un espectrómetro de masas.

Tipo de ionización	Forma de ionización	Presión de fuente	Usos
Impacto electrónico (EI)	Bombardeo de electrones (70 eV)	$10^{-4}$ - $10^{-6}$ torr	Largas fragmentaciones que permitan determinación de estructuras GC/MS Existen bases de datos
Ionización química (CI)	Iones en estado gaseoso	-1 torr	Para determinación de peso molecular GC/MS
Ionización por desorción (DI)			
Bombardeo atómico rápido (FAB)	Ar energéticamente cargado u otro átomo neutro	$10^{-5}$ - $10^{-6}$ torr	Para peso molecular y estructuras con grande masa , no disponible para compuestos en fase condesada
Desorción LASER (LDI) y de matriz asistida (MALDI)	Electrones energéticos	$10^{-5}$ - $10^{-6}$ torr	Para compuestos lábiles
Ionización spray (SI)			
Termospray (TS)	Gas de termoiones	1-10 torr	Soluciones con gran masa molar
Electrospray (ESI)	Campo eléctrico, iones en disolución	De atmosférica a ligeramente reducida	Acoplamiento HPLC/MS y CE/MS
Ionización química a presión atmosférica (APCI)	Descarga de corona, iones gaseosos	Atmosférica	Acoplamiento HPLC/MS

El tipo de ionización utilizada en esta investigación fue electrospray (ESI), conocido como un método de ionización suave, como se puede ver en la figura 16, la muestra en estado líquido se hace pasar a través de un capilar al que se le aplica un alto potencial eléctrico. A la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, las cuales se evaporan rápidamente, ya sea por un proceso de desorción del campo eléctrico o de evaporación del solvente, liberando moléculas protonadas a la fase gaseosa. Los iones generados pueden estar protonados de forma múltiple dando lugar a diferentes especies para una misma molécula.<sup>29</sup>

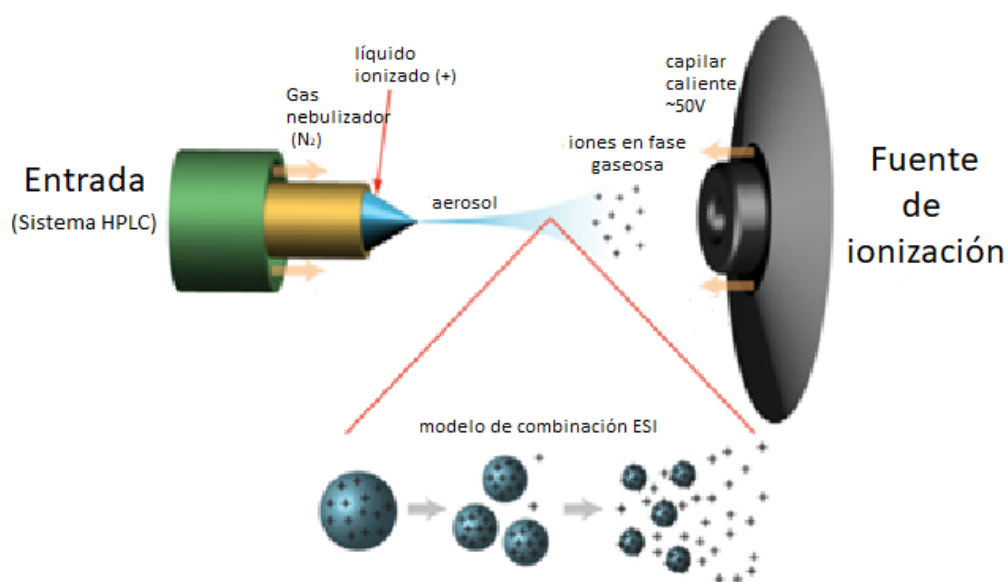


Figura 16. Diagrama de ionización por electrospray (ESI) obtenida de la URL: <http://minilink.es/3xq2> consultada por última vez 19/03/19.

### 1.3.3. Analizador de masa

A la salida de la fuente de iones, se tiene una mezcla de diversos iones que deben ser separados para detectarlos de forma individual; para la separación de estos iones, existen también diversas instrumentaciones. Los analizadores más utilizados son: el analizador cuadrupolar, muy

utilizado en equipos combinados con un cromatógrafo de gases, el analizador de trampa de iones y la trampa de vuelo.

Un cuadrupolo (figura 17) es parecido a un filtro, ya que en unas determinadas condiciones de operación permite el paso sólo iones de un pequeño intervalo de relaciones  $m/z$ . Todos los otros iones son neutralizados y eliminados como moléculas sin carga. Variando las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores  $m/z$  transmitidos, haciendo así posible el barrido espectral. Debido a que los cuadrupolos funcionan por eliminación selectiva de iones, se llaman a menudo filtros de masas, en vez de analizadores de masas.<sup>30</sup>



Figura 17. Esquema de un analizador másico del tipo cuadrupolar tomada de URL: <http://minilink.es/3yk8> consultada por última vez 07/04/19

La trampa de iones es una modificación del analizador cuadrupolar, y está basado en la utilización de una zona de confinamiento electromagnética generada por medio de dos señales de radiofrecuencia.<sup>31</sup>

Una trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos.

El analizador de trampa de iones presenta la ventaja de ofrecer una sensibilidad más elevada que las conseguidas utilizando otros analizadores; al mismo tiempo, su velocidad de barrido es también muy alta. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que al existir una concentración de iones bastante elevada en el interior de la "trampa", es relativamente frecuente la existencia de reacciones bimoleculares entre los iones, lo que puede dar lugar a espectros con esquemas de fragmentación diferentes a los que se obtienen por medio de los otros tipos de analizadores, siendo esta su principal desventaja.

En los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) (figura 18), los iones positivos se producen periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Estos impulsos tienen normalmente una frecuencia de 10 a 50 kHz y un tiempo de vida de  $0.25 \mu s$ .<sup>32</sup>

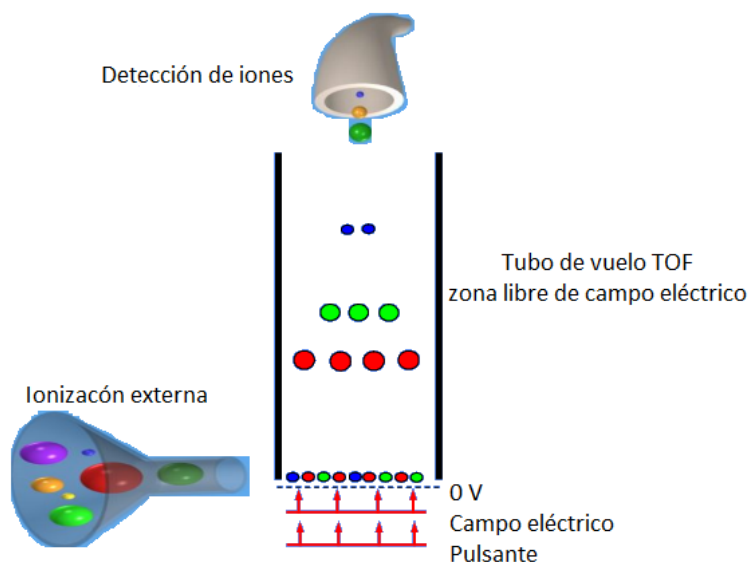


Figura 18. Diagrama del analizador de trampa de vuelo (TOF).

Las partículas aceleradas pasan entonces a un tubo analizador de un metro de longitud sobre el que no actúa ningún campo. Debido a que

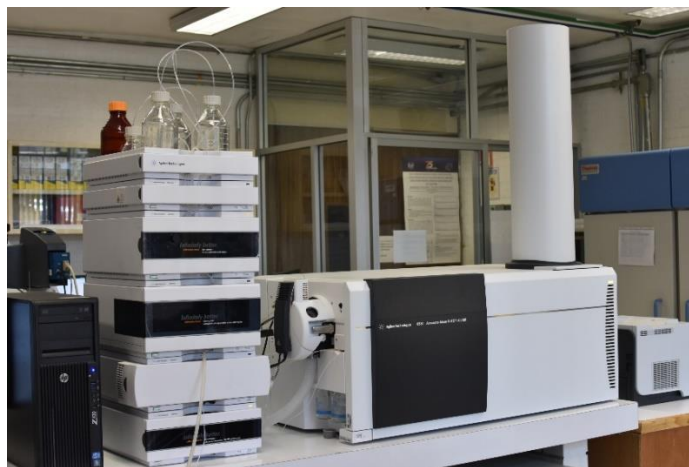
todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas, y por tanto las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas. Los tiempos de vuelo típicos están entre 1 y 30  $\mu$ s.

Desde el punto de vista de la resolución y reproducibilidad, los instrumentos que utilizan separadores de tiempo de vuelo no son tan satisfactorios como los magnéticos y de cuadrupolo. Sin embargo, algunas ventajas compensan parcialmente estas limitaciones como son la simplicidad y la robustez, el fácil acceso a la fuente de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas.

#### **1.4. Nuevas tecnologías acopladas a sistemas cromatográficos**

Actualmente se requieren sistemas analíticos con mayor sensibilidad. La espectrometría de masas al ser una técnica analítica muy completa ha podido sobrellevar esa necesidad al ser capaz de ofrecer una identificación eficaz, ya que proporciona un espectro característico para cada molécula. Tiene una gran sensibilidad al poder detectar concentraciones del orden de ppb o menores, es universal, además de proporcionar una información estructural sobre la molécula analizada.

HPLC-MS combina el poder de separación de los materiales de gran peso molecular, su capacidad de detección selectiva y confirmación con la identidad molecular dada por el espectrómetro de masas. Donde el eluyente proveniente del HPLC es acoplado a espectrometría de masas generalmente mediante ionización por electrospray.



*Figura 19. HPLC-Q-ToF ubicado en el LANCIC-IQ.*

Este tipo de acoplamientos permite confirmar compuestos sintéticos, caracterizar y analizar modificaciones en proteínas, definir perfiles de biomarcadores, identificar metabolitos o detectar la presencia de pesticidas. La exactitud de masa típica es menor a 1 ppm, confiriendo eficacia, fiabilidad y reducción de falsos positivos.<sup>33</sup>

La velocidad de adquisición de datos es de hasta 40 espectros por segundo y permite compatibilidad con los flujos de trabajo de cromatografía rápida de alto rendimiento. La capacidad de resolución es de hasta 20 000, lo que implica el poder distinguir los compuestos de interés de las interferencias. Con este tipo de instrumentación es posible identificar compuestos a nivel traza (impurezas, metabolitos o biomarcadores); incluso en presencia de compuestos mucho más abundantes.

### **1.5. Aplicaciones de técnicas analíticas separativas en extracción de colorante en textiles, relacionados con grana cochinilla.**

En esta sección se resumen, las últimas investigaciones relacionadas con el tema de extracción de textiles teñidos con grana cochinilla en diferentes matrices, así como su método cromatográfico (columnas, gradientes, fases móviles, etc). Se muestran tablas para una mejor ejemplificación, las tablas están separadas por matriz, es decir, del lugar de procedencia de la muestra y tipo de tela. Así mismo se presentan técnicas de extracción y la cantidad de muestra que fue utilizada en el experimento, las características de la extracción describiendo un poco el método y por último la técnica de análisis.



Tabla 2. Artículos recientes relacionados con la extracción textil de grana cochinilla.

Matriz	Analito	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	Referencia
<b>Hilo rojo de lana de la cultura Inca, 1200-1532 DC</b>	-Ácido carmínico -dcII -dcIII -dcVII -Ácido flavokermésico	EUA <sup>i</sup>  20 g	MeOH, 10 mL seguido de baño de ultrasonido x 5 min y un baño de agua a 60 °C x 15 min	HPLC-UV-vis-ESI QqQ <sup>ii</sup> MS Fase reversa (Zorbax SB-Phenyl, 4.6x150 mm, 3.5 µm, 80Å Agilent Technologies) Fase móvil: 1.5% ácido fórmico en agua/metanol. Gradiente, modo negativoNegativo	Lech, et. al., 2014. <sup>34</sup>
<b>Textiles del monasterio de Simonos Petra, (griego) del S. 16 a principios del 20.</b>	-Ácido carmínico -dcII -dcIV -dcVII	Método HCl Micro muestras >1 mg	Acondicionamiento: H <sub>2</sub> O- MeOH-37% 1:1:2, 400 µL a 100° C por 10 min. Después evaporadas a 65 °C bajo un flujo de N <sub>2</sub>	HPLC-DAD-MS Fase reversa, columna C18 (Altima 5µm tamaño de partícula, 250 mm x 3.0 mm) Fase móvil: Gradiente de elución H <sub>2</sub> O- 0.1% TFA y CH <sub>3</sub> CN -0.1% TFA. Modo negativo	Mantzouris, et. al., 2011. <sup>35</sup>
<b>Textiles De lana y seda</b>	-Ácido carmínico -dcII -dcIV -dcVII	Extracción ácida 0.1-0.3 mg	Extracción a dos pasos: 1) Fibras con DMSO en un baño 80° C x 10 min. Se guarda el extracto. 2) La extracción acida agregada a las fibras y se calentó a 100° C x 10 min. Se evapora con flujo de N <sub>2</sub> .	UHPLC <sup>iii</sup> -DAD- MS Fase reversa, columna BEH Shield RP18 (1.7 µm, 201 x 150 mm) Fase móvil, gradiente, 10% MeOH acuoso, MeOH y ácido fórmico 1%. Modo negativo.	Serrano et. al., 2015 <sup>36</sup>

<sup>i</sup> EUA: Extracción asistida por ultrasonido.

<sup>ii</sup> QqQ: Detector de triple cuadrupolo.

<sup>iii</sup> UHPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta resolución.

Continuación Tabla 2.

<p><b>Textiles Rumanos de los s. 17-18.</b></p>	<p>-Ácido carmínico -dcII</p>	<p>Extracción ácida 0.5 mg</p>	<p>Se extrajeron con HCl (37%)/MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1:1, v/v/v)</p>	<p>HPLC-DAD Fase reversa, LiChrosorb RP-18 columna, 125mm x 4mm x 5 µm. HPLC-MS Columna C18 (Zorbax 5µm tamaño de partícula, 150 mm x 4.6 mm) Fase móvil, gradiente de elución, Ácido fórmico (0.2%) y MeOH-ACN (1:1) Negativo</p>	<p>Petroviciu et. al., 2012<sup>37</sup></p>
<p><b>Textil religiosa, griega de seda del s. 18-19.</b></p>	<p>-Ácido carmínico -dcII -dcIII -Ácido kermésico</p>	<p>Extracción ácida 1 g</p>	<p>Muestra sumergida en 400 µL H<sub>2</sub>O:MeOH:37% HCl 1:1:2 (v/v/v) a 100 ° C. Después evaporado a 65° C con flujo de N<sub>2</sub></p>	<p>HPLC-DAD-MS Fase reversa, columna C18 (Altima HP, 250mm x 3.0mm x 5 µm) Fase móvil, gradiente de elución, TFA (0.1%) y CH<sub>3</sub>CN (0.1%) Negativo</p>	<p>Stathopoulou et. al., 2013.<sup>38</sup></p>
<p><b>Fibras de seda de textiles históricas. Ensayos con muestras envejecidas</b></p>	<p>-Ácido carmínico -dcII -dcIII -dcIV -dcVII -Ácido kermésico</p>	<p>Extracción ácida 0.2 -0.3 mg</p>	<p>Acondicionamiento: 400 µL a 60°C por 30 min, con agitación cte. Muestra sumergida en 400 µL H<sub>2</sub>O:MeOH:37% HCl 1:1:2 (v/v/v) .</p>	<p>HPLC-DAD Fase reversa, columna C18 (Zorbax Eclipse Plus, 150mm x 2.1mm x 5 µm) Fase móvil, gradiente de elución, MeOH puro y Ácido perclórico acuoso (0.3%)</p>	<p>Serrano et. al., 2015.<sup>39</sup></p>

**Continuación Tabla 2.**

<p><b>Textil de seda aterciopelada del Palacio de Topkapi del s. 16-18.</b></p>	<p>-Ácido carmínico -dcIV -dcVII -Ácido kermésico</p>	<p>Extracción ácida 0.5 g</p>	<p>Muestra sumergida en H<sub>2</sub>O:MeOH:37% HCl 1:1:2 (v/v/v) a 100 ° C. Después evaporado a 65° C con flujo de N<sub>2</sub></p>	<p>HPLC-DAD Fase reversa, columna C18 (Altima HP, 250mm x 3.0mm x 5 µm. Fase móvil, gradiente de elución, TFA acuoso (0.1%) y de TFA en CH<sub>3</sub>CN (0.1%)</p>	<p>Karapanagiotis et. al., 2007. <sup>40</sup></p>
<p><b>Lana con colorante con ácido 4-aminocarmínico</b></p>	<p>- Ácido 4-aminocarmínico</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>HPLC-DAD Fase reversa, columna C18 (Altima RP) 250mm x 4.6mm x 5 µm. Fase móvil, gradiente de elución: metanol, 5% ACN acuoso, 2% ácido acético acuoso y ACN.</p>	<p>Chieli, et. al., 2016. <sup>41</sup></p>
<p><b>Textiles de lana</b></p>	<p>-Ácido carmínico -dcII -dcIII -dcIV</p>	<p>Extracción ácida 0.21 g</p>	<p>Cochinilla sumergida en una mezcla de una mezcla de 37% HCl:MeOH:H<sub>2</sub>O (2:1:1 (v/v/v), 20 mL) En un baño de agua a 100° C por 10 min. Evaporada en rotavapor en un baño de agua 40° C Y el residuo seco fue reconstituido con MeOH y agua.</p>	<p>HPLC-DAD-MS Fase reversa, Phenomenex C18 ODS2, 150 mm x 4.6 mm x 5 µm. Fase móvil, gradiente de elución: Agua, MeOH, Ácido Fórmico 5% Negativo</p>	<p>Peggie, et. al., 2007. <sup>42</sup></p>

En la tabla 2 se observa el análisis de textiles con relevancia cultural a lo largo de todo el mundo, especialmente en Europa. Los hilos más analizados son lana y seda al ser dos tipos de fibras muy utilizadas en las zonas estudiadas. Al hacer una comparación en los analitos detectados por diversos autores, se puede apreciar que prácticamente, todos identifican el mismo grupo de compuestos; esto implica, que la grana cochinilla ya cuenta con un perfil molecular identificado. Es importante recalcar que esta identificación es gracias a la espectrometría de masas.

Al hablar del tipo de extracción observamos que la mayoría han ocupado una extracción ácida y el único que uso EUA, es una cantidad de muestra de 20 g, cantidad poco práctica para un análisis en una muestra de patrimonio cultural. Mientras que los de extracción ácida no pasan de 1 g, cantidad más viable. Al analizar las características de la extracción no todos usan las mismas proporciones de disolución ácida, pero si tienen en común al ácido clorhídrico concentrado. Lo cual nos indica que en efecto, se debe de hacer una extracción agresiva para poder obtener el color de la tela. Por lo que después recomiendan evaporar el disolvente del extracto para poder concentrar y así deshacerse del ácido fuerte y evitar interacción agresiva hacia la columna cromatográfica.

Al hablar del método de separación, el tipo de cromatografía más utilizada fue la de líquidos en fase reversa, con una columna C18 y un gradiente de elución. La fase móvil acidula en la mayoría de los artículos eran mezclas de ácido fórmico combinado con acetonitrilo o metanol. Esto se puede interpretar que se necesita seguir con un medio ácido para conservar al componente principal en su forma molecular, que es el ácido carmínico (AC), pero sin ser tan agresivo con la columna, y que el AC al ser una molécula medianamente polar presente interacciones efectivas con una columna C18. El tipo de detector en su mayoría es un espectrómetro de

masas pero también hay con arreglo de diodos (DAD). Los que usan espectrometría de masas (MS) el modo de ionización sin excepción es negativo y sus tipos de analizador de masa varían entre trampa de iones y cuadrupolo, dos casos aislados de triple cuadrupolo y una trampa de vuelo.

Cabe resaltar que únicamente se encontró un artículo donde experimentaron con telas envejecidas para simular épocas pasadas. En este artículo se compararon las telas envejecidas con las recién teñidas y se observaron cambios en la coloración aclarándose a través del tiempo y la exposición UV, más no cambios relevantes en la composición.

Al tener esta información analizada, se desarrolló la metodología de extracción y análisis con los materiales y equipos del laboratorio, enfocándose en la grana cochinilla mexicana.

## **1.6. Tinción<sup>43</sup>**

Al no tener un método de extracción textil probado, se debió experimentar con muestras sin relevancia cultural, es por eso que se decidió aprender varias técnicas de tinción tradicionales con el fin de simular los procesos de tinción natural y tener textiles con la cuales experimentar y optimizar el método analítico.

Primero es necesario entender varios conceptos para conocer el proceso de tinción, debido a que en la tinción se trabaja con ciertas sustancias que no sólo ayudan al colorante a unirse a la tela sino que, además, influyen en la tonalidad del color. Estos se describen a continuación:

### **1.6.1. Pigmento**

Sustancia capaz de teñir las fibras textiles. Los pigmentos naturales se pueden presentar en una planta, insecto, mineral o metal para aportar un

color. Para que un pigmento sea útil, debe unirse fuertemente a la fibra, y no debe perder su color por lavado, o por acción de la luz.

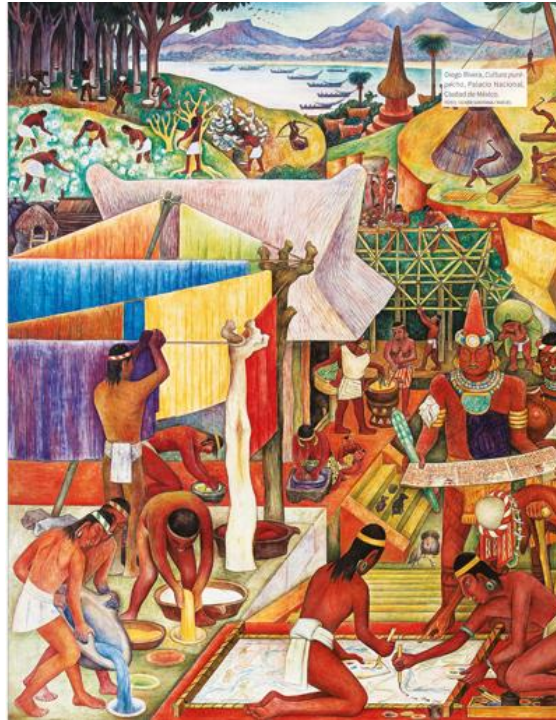


Figura 20. Diego Rivera, época Tenochtitlan, Palacio Nacional, Ciudad de México tomada de la URL: <http://minilink.es/3xq6> consultada por última vez 19/03/19

### 1.6.2. Fibras textiles

Se pueden clasificar en sintéticas y naturales. Ambos tipos de fibras son polímeros, es decir, macromoléculas formadas por la unión sucesiva de moléculas pequeñas denominadas monómeros. Las fibras sintéticas (poliéster, nylon) se obtienen por síntesis química (reacción de polimerización) a partir de monómeros seleccionados por el hombre.

Las fibras naturales de origen vegetal (algodón, lino) están compuestas por celulosa, un polisacárido que producen las plantas. En tanto que las fibras naturales de origen animal (lana, seda) están formadas por proteínas como se observa en la figura 21, en la fórmula estructural de la lana.

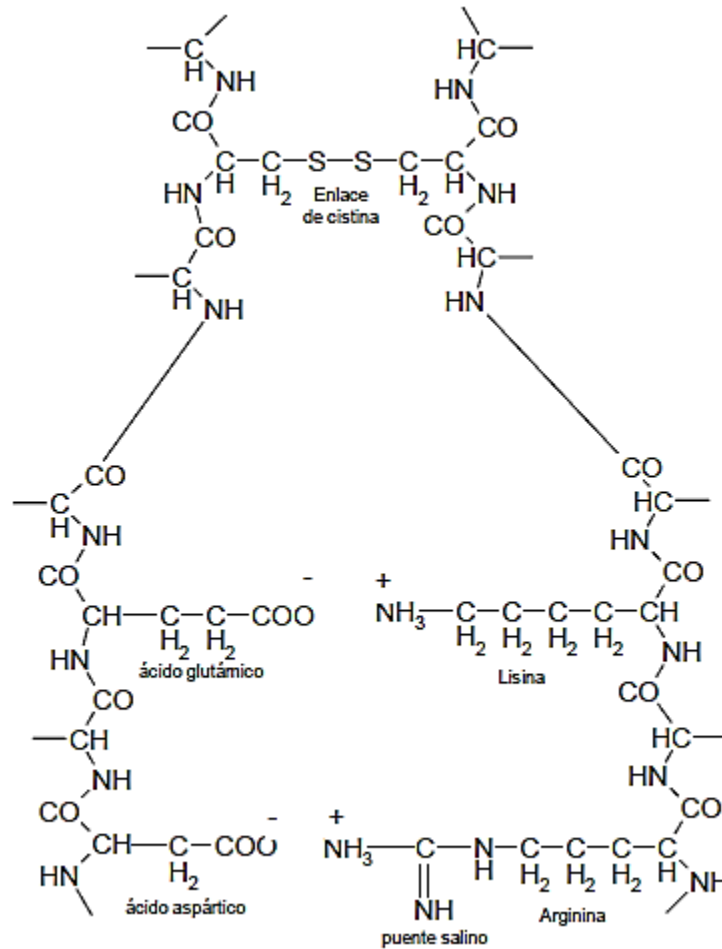


Figura 21. Fórmula estructural de la molécula de lana tomada de la URL: <http://minilink.es/3yke> consultada por última vez 07/04/19

El teñido de fibras textiles con colorantes se realiza en una solución acuosa denominada licor o baño de teñido. El teñido verdadero se produce sólo si la coloración es relativamente permanente, es decir, si no es removida fácilmente con agua o con los procedimientos normales de lavado. Más aún, el color no debe desteñirse rápidamente por exposición a la luz. Muchas plantas y animales producen compuestos coloreados, pero sólo un número limitado puede ser utilizado para teñir.

### 1.6.3. Lavado de la tela

Antes de teñir cualquier fibra es necesario limpiarla perfectamente retirando el apresto. El apresto se le aplica a las telas hoy en día al fin de darles lustre, pulimiento y firmeza, al lavar la tela nos aseguramos que se retire todo tipo de suciedad, goma, almidón o grasa.

El lavado debe llevarse a cabo con suficiente agua, jabón suave y neutro. Después es necesario descrudar y ablandar la tela, el descrudado consiste en quitarle a la fibra o textil todo el resto de goma, grasa o almidón procedente del proceso del tramado, este proceso se lleva a cabo con hidróxido de sodio y agua. Y el ablandado del textil se refiere a reblandecer las fibras que componen el tejido a modo de que pueda permear perfectamente el mordiente y posteriormente el tinte, para esto se utiliza ácido oxálico y agua.

### 1.6.4. Mordentado de la tela

El término mordente o mordiente es aplicado a cualquier sustancia de origen natural o sintético que sirva para fijar el colorante a la fibra, de manera uniforme y estable al contacto con la luz y el agua. Antiguamente se empleaba para esa función a ciertos productos naturales como: cenizas, hojas de palta, o corteza de nogal. Hoy en día se utilizan sales solubles de metales, como aluminio, cobre, hierro y estaño.

El mordentado de la fibra puede realizarse antes o durante el teñido, y generalmente comprende el agregado del mordiente en agua caliente junto con la fibra. Los mordientes se usan en poca cantidad, para no dañar la fibra. Utilizados en exceso pueden dejarla rígida y áspera. Los mordientes también son utilizados para variar las tonalidades del color agregándolos en la parte final del teñido.



El mordente actúa al colocarlo en el agua caliente, éste se disuelve. En ese proceso, la sal se disocia, y el metal queda como catión metálico. Entonces, el catión se une a la fibra textil, y forma un complejo con la molécula del colorante (figura 22). El tipo de metal que forme parte del complejo determina la tonalidad del color. Es decir, para un mismo tipo de colorante y fibra, el agregado de distintos mordientes producirá diferentes tonos o colores.

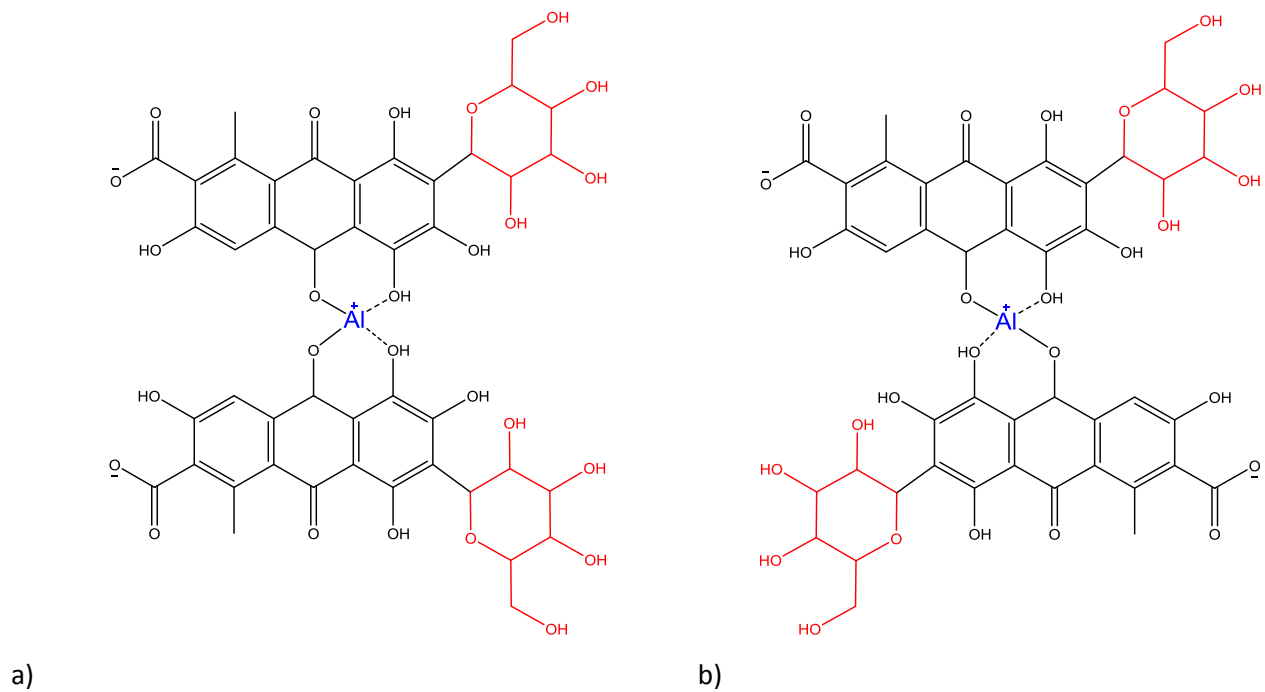


Figura 22. Modelo de enlace entre el ácido carmínico y el catión metálico aluminio proveniente del alumbre, con diferentes ángulos de orientación del azúcar tomado de la URL: <http://minilink.es/3ykh> consultado por última vez 07/04/19

Existen sustancias llamadas entonadores que, si bien no son propiamente mordientes, ayudan a fijar el color e influyen en la tonalidad del mismo. También dan suavidad y brillo a la fibra. Algunos ejemplos: vinagre, sal, limón, crémor tártaro y orina.

#### 1.6.5. Proceso de extracción del pigmento de la grana cochinilla

Un proceso de extracción es aquel medio por el cual se obtiene el pigmento de una planta o insecto para poder teñir aquello que se desea, el proceso de extracción y tinción con el pigmento se resume en los siguientes pasos:

- i. Una vez seco el insecto se muele en un metate o molcajete hasta dejarlo como talco, el resultado de este proceso será un pigmento de color rojo oscuro.
- ii. Se coloca dentro de un recipiente con agua y se deja reposar una noche, a este proceso se le conoce como maceración.
- iii. Al día siguiente se tamiza con un filtro, el líquido toma un color rojo, el cual es el tinte. El resultado del tamiz es el polvo del pigmento que se puede separar para tinciones posteriores.
- iv. Se coloca el tinte dentro de otro recipiente que se pueda calentar, y se agregan los entonadores, disolviéndolos perfectamente.
- v. Se coloca esta solución al fuego por 15 min agitando constantemente.
- vi. Se agrega la tela pre-mordentada y húmeda, dejando hervir por espacio de una hora, moviendo de vez en cuando.
- vii. Después del tiempo transcurrido, se retira del fuego y se deja enfriar. Se puede dejar en reposo una noche más para intensificar el color.
- viii. Se debe enjuagar muy bien con agua a temperatura ambiente y se deja secar a la sombra.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 2.1. Materiales y equipos

##### 2.1.1. Disolventes y reactivos

- ✓ Disolventes grado cromatográfico J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA): metanol y dimetilsulfóxido (DMSO).
- ✓ Agua desionizada obtenida con un desionizador marca Millipore modelo WaterPro BT.
- ✓ Estándar de ácido carmínico, marca Sigma Aldrich (San Luis, Misuri, USA) con pureza mayor al 99%.
- ✓ Ácido fórmico concentrado Merck (Darmstadt, Alemania).

##### 2.1.2. Sistema cromatográfico

- ✓ Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity.
- ✓ La adquisición de datos y tratamiento de los mismos se realizó mediante el software MassHunter Workstation Software, versión B.07.00.
- ✓ Automuestreador 1200, Infinity Series marca Agilent.
- ✓ Desgasificador G4225A, marca Agilent.
- ✓ Columna analítica de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (50 x 3.0 mm, d.i., 2.7  $\mu$ m) empacada con sílice fase reversa marca Agilent.
- ✓ Columna analítica de fase reversa InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (100 x 2.1 mm, d.i., 2.7  $\mu$ m) empacada con sílice fase reversa marca Agilent.

### 2.1.3. Sistema de extracción

- ✓ Microbalanza analítica marca Mettler Toledo, Ohio, EUA modelo XP6.
- ✓ Balanza analítica balanza analítica con capacidad de 220 g y precisión 0.1 mg, modelo AND gg-202.
- ✓ Viales ámbar y transparentes con tapón de rosca de 2 mL, 5 mL y 10 mL.
- ✓ Micropipeta VWR de 10- 1000  $\mu$ L.
- ✓ Micropipeta BioHit de 20-200  $\mu$ L.
- ✓ Matraces aforados de 10.0 mL, 5.0 mL y 2.0 mL para la preparación de las disoluciones estándar.
- ✓ Material de vidrio común como: vasos de precipitado de 1 L, 500 mL y 250 mL; pipetas pasteur, agitadores, espátula, etc.
- ✓ Sílice C18 forma irregular, marca Sigma Aldrich.
- ✓ Cartucho SPE de 60 x 6.0 mm.

### 2.1.4. Estudio de envejecimiento

- ✓ Cámara de envejecimiento ATLAS, ultraviolet/condensation waevering device (UVCON).

### 2.1.5. Muestras

- ✓ Grana cochinilla plateada (Nopaltepec, Color es Natural)
- ✓ Grana cochinilla pulverizada (Nopaltepec, Color es Natural)
- ✓ Textil de lana mordentado.
- ✓ Textiles de lana teñidas con varias formulaciones de grana cochinilla.
- ✓ Textiles envejecidos de lana teñidas con varias formulaciones de grana cochinilla.

## **2.2. Preparación de disoluciones estándar de ácido carmínico**

Todas las disoluciones fueron preparadas con metanol como disolvente y mantenidas en viales ámbar bajo congelación a  $-30^{\circ}$  C. Se prepararon disoluciones de 50.0 y 10.0 ppm para el desarrollo del método cromatográfico HPLC-MS.

Para la disolución de 50.0 ppm, se usó la microbalanza analítica y se pesó 0.5000 mg de AC para disolverlos en un matraz de 10.0 mL llegando al aforo con metanol.

Para la disolución de 10.0 ppm, se tomó 1.0 mL de la disolución de 50.0 ppm, dicha alícuota se depositó en un matraz volumétrico de 5.0 mL llegando al aforo con metanol.

## **2.3. Desarrollo y optimización del método cromatográfico**

Se inició el desarrollo del método cromatográfico usando una columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (50 x 3.0 mm, d.i., 2.7  $\mu$ m), con las condiciones que se describen en la tabla 3, utilizando la disolución del estándar de ácido carmínico de concentración 10.0 ppm.

Tabla 3. Método cromatográfico inicial utilizado para el análisis del estándar de ácido carmínico.

Nombre del método: Cochinilla UV-masas (Método 1)			
Modo de ionización: Negativo	No. De onda utilizadas: 280, 450, 500, 550 nm.	Vol. Inyectado: 25 µL	Flujo: 0.5 mL/min
Temperatura del gas: 300° C	Flujo del gas de secado: 8 L/min	Nebulizador: 40 psig	Fragmentor: 150 V
Gradiente de elución			
Tiempo (min)	% agua con ácido fórmico 1.5%	% metanol	
0.0	60	40	
15.0	40	60	
20.0	20	80	
27.0	0	100	
30.0	0	100	

Después se decidió usar una columna analítica fase reversa InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (100 x 2.1 mm, d.i., 2.7 µm), analizando nuevamente el estándar de ácido carmínico de 10.0 ppm, usando primeramente el método 1, pero se terminó optimizando al disminuir la fuerza eluyente al inicio del gradiente de elución. Como no se obtenía información relevante del detector UV, se decidió usar únicamente el espectrómetro de masas como detector. En la tabla 4 se muestra el método optimizado en su versión final.

Tabla 4. Método cromatográfico optimizado utilizado para la identificación de grana cochinilla y sus metabolitos.

Nombre del método: Cochinilla masas con menor fuerza eluyente (Método final)			
Modo de ionización: Negativo	Vol. Inyectado: 20 µL	Flujo: 0.5 mL/min	
Temperatura del gas: 300° C	Flujo del gas de secado: 8 L/min	Nebulizador: 40 psig	Fragmentor: 150 V
Gradiente de elución			
Tiempo (min)	% agua con ácido fórmico (0.1%)	% metanol	
0.0	60	40	
5.0	50	50	
6.0	50	50	
15.0	20	80	

Los análisis y justificaciones de todos los cambios que se hicieron a las condiciones del análisis cromatográfico para llegar al método final se discuten en la sección 3.1 del capítulo III.

## 2.4. Tinción

Debido a que se necesitaba desarrollar un método de extracción textil y no se contaba con muestras para experimentar, se optó por usar la técnica de tinción más cercana a la de la época prehispánica y colonial sobre textiles naturales disponibles en ese periodo, específicamente lana.

Para tener una tinción exitosa fue necesario realizar una serie de pasos antes de añadir el tinte a la tela. (Figura 23)



Figura 23. Diagrama de tinción de telas.

A continuación, se describe de manera más detallada como se realizó la tinción de lana con la grana cochinilla.

#### a) Lavado de la tela

El procedimiento de lavado es para las telas modernas ya que en la actualidad las telas comerciales presentan este apresto.

Inicialmente, se lavó la tela para quitar el apresto presente en ella, puesto que en la época que se quiere asemejar no existían ese tipo de procesos para las fibras textiles. El lavado consistió en dos etapas, la primera fue descrudar y la segunda ablandar.

Primero, la tela se lavó con jabón marca Roma<sup>®</sup>, disolviendo primero el jabón en polvo en agua y después sumergiendo la tela agitando de vez en cuando, después se enjuagó con suficiente agua para asegurarse que no



quedara residuos de jabón. (Por practicidad cada que se indique que se realizó un enjuague, éste fue llevado con agua). Una vez ya lavada se pasó a descruar la tela.

Para descruar la tela, se disolvieron 5 g de NaOH en un litro de agua. La tela se sumergió en la disolución alcalina; se calentó hasta ebullición por 10 minutos, transcurrido el tiempo la tela se enjuagó nuevamente.

Después se pasó al ablandado de la lana disolviendo 9 g de ácido oxálico en un litro de agua, se sumergió la tela en la disolución. Se calentó hasta ebullición por 10 minutos. Por último, se eliminó el exceso de ácido oxálico enjuagando con abundante agua.

#### b) Mordentado de la tela

Ya una vez lavada la tela se prosiguió al pre-mordentado de la tela, para esto se usaron 16 g de alumbre por cada litro de agua utilizada. Se agitó hasta que se disolvió el alumbre por completo y se sumergieron las telas de interés. Se mantuvieron en calentamiento por 30 min para después enjuagarse nuevamente con agua.

#### c) Preparación del tinte

Para hacer el tinte fue necesario dejar macerar la grana cochinilla en agua toda una noche, las cantidades que se usaron fueron 20 g de grana cochinilla pulverizada por cada litro de agua.

Paralelo al lavado de las telas y el macerado de la grana cochinilla, se hizo una búsqueda de testimonios oaxaqueños, en la cual se obtuvieron diferentes formulaciones de tintes para la obtención de distintas tonalidades del color proveniente de la grana cochinilla, una vez recolectada toda esta evidencia cultural, se decidieron probar y experimentar la tinción con cuatro

formulaciones diferentes, dichas formulaciones según la evidencia reportada en el código Florentino pudieron ser utilizadas por las civilizaciones antiguas mesoamericanas. Para la variación de color se usaron diferentes entonadores completamente naturales al tinte macerado (ver figura 24).

Después de agregar los entonadores (según la fórmula requerida) a la disolución de grana cochinilla, ésta se sometió a calentamiento por 30 min y después se dejó enfriar para ser filtrada a través de tela manto de cielo para quitar los residuos sólidos que quedaban en la disolución de grana cochinilla, quedando así el colorante listo para la tinción.



Figura 24. Formulaciones de grana cochinilla.

#### d) Tinción de tela

El experimento abarcó únicamente la tinción de lana debido a que era un textil bastante utilizado en la época prehispánica-colonial y de fácil acceso.

Por ejemplo obras como el huipil de la Malinche se tiene una fuerte creencia que los hilos de algodón y lana fueron teñidos con el insecto de estudio en este trabajo.<sup>44</sup>

Ya que el tinte estaba filtrado y listo, se adicionaron las telas de lana previamente mordentadas y se aseguró que se sumergieran completamente en el recipiente para después someterlo a calentamiento por 30 min y dejar reposar las telas por un día más para terminar enjuagándolas con agua; las lanas teñidas se dejaron secar sin exponerse al de rayo de sol. En la figura 25 se presentan las telas teñidas con las distintas formulaciones de grana cochinilla.



*Figura 25. Textiles teñidas con diferentes formulaciones de grana cochinilla.*

## 2.5. Extracción textil

### 2.5.1. Métodos propuestos

Para el desarrollo del método de extracción se probaron tres métodos diferentes reportados en la literatura (tabla 2, capítulo II). Para iniciar con esta experimentación se decidió utilizar la formulación más simple: Rojo Cochinilla. Cada método de extracción propuesto fue realizado por triplicado tanto para la lana teñida como para el blanco de tela mordentado. En la figura 26 se describen a modo de diagrama, los tres métodos de extracción que se probaron.

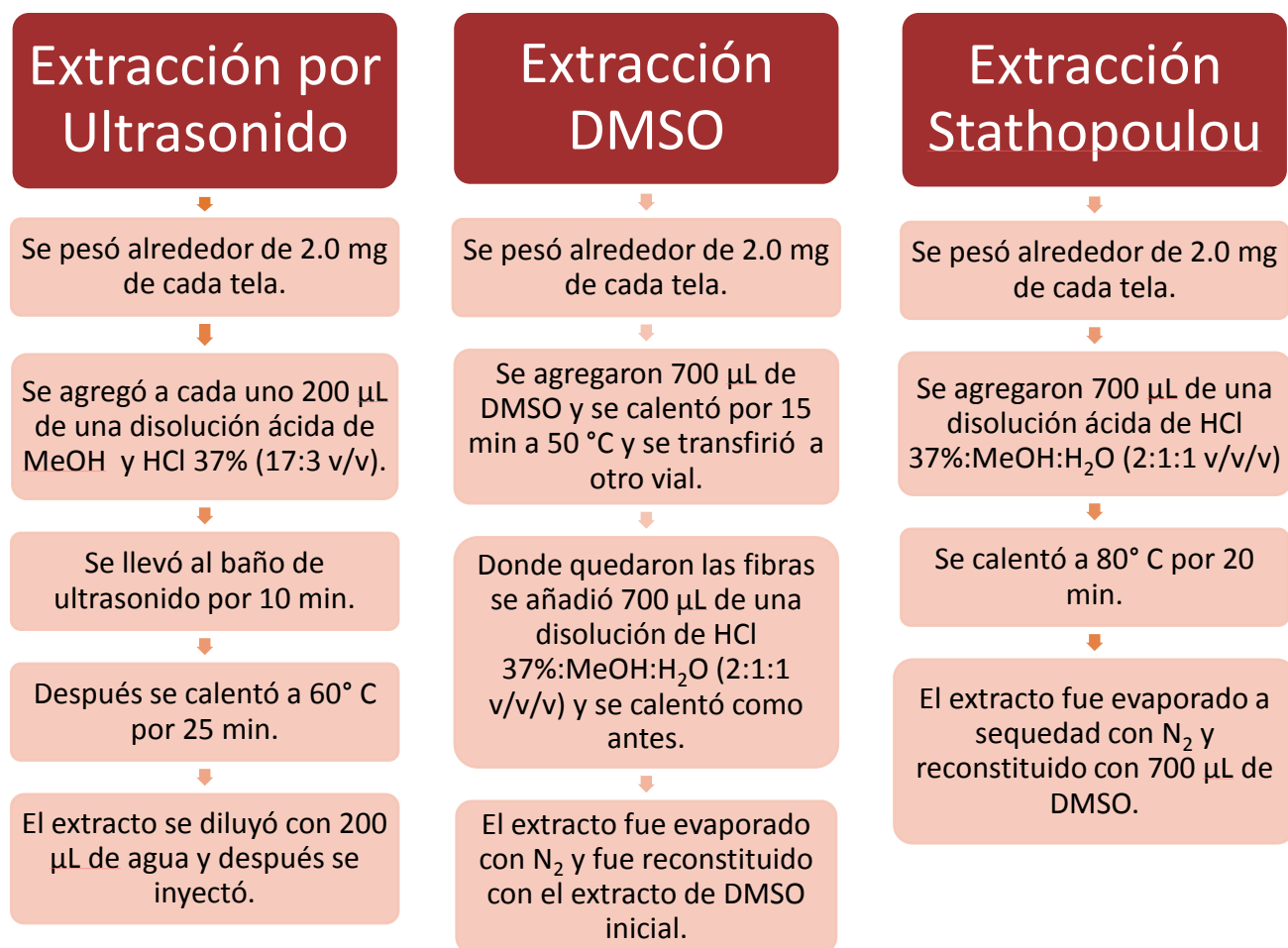


Figura 26. Diagrama de 3 métodos de extracción textil diferentes obtenidos de la búsqueda bibliográfica.

Después de la experimentación con los tres métodos de extracción textil propuestos, se eligió al método Stathopoulou (Statho) como el más conveniente para los análisis posteriores, en la sección 3.3.1 del capítulo III se muestra el análisis de esta decisión.

#### 2.5.2. Optimización al método Stathopoulou

Durante el proceso de experimentación se decidió realizar cambios al método original de Stathopoulou, con el fin de obtener extractos concentrados en función de los metabolitos de interés y economizar en el proceso de extracción, los parámetros que se variaron fueron los siguientes:

- Agitación magnética durante el calentamiento
- Evaporación en parrilla con agitación
- Volumen de reconstitución con DMSO

Como primera variable se modificó la agitación al momento del calentamiento, el experimento consistió en preparar dos viales con la disolución ácida y la tela teñida de grana cochinilla, la diferencia fue que a uno se le agregó una barra de agitación magnética durante el calentamiento y se continuó el método extracción como estaba reportado en la referencia. Ambos extractos con y sin agitación se analizaron en el cromatógrafo de líquidos con el método optimizado.

Como segundo experimento se prepararon dos viales, siguiendo la metodología de extracción textil Statho hasta el momento de evaporar, uno se evaporó con flujo de N<sub>2</sub> y el otro se dejó evaporando en la parrilla con la campana de extracción encendida y una barra de agitación magnética para evitar salpicaduras y derrames del extracto. Al finalizar el tiempo de evaporación ambos viales se reconstituyeron en 700 µL, volumen original, y se inyectaron al HPLC-MS.

Finalmente, el tercer experimento consistió en modificar únicamente el volumen de reconstitución con DMSO, se hicieron pruebas reconstituyendo en el volumen original de 700  $\mu\text{L}$  y probando otros dos volúmenes diferentes 250  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$ .

Cabe mencionar que los experimentos mencionados anteriormente se realizaron por triplicado y únicamente con telas teñidas con la formulación de rojo cochinilla (ir a figura 24). La influencia de estos parámetros en la extracción se analizaron (sección 3.3.2, capítulo III) y se seleccionaron las condiciones más óptimas. En la figura 27 se muestra la metodología de la extracción final (Figura 27).

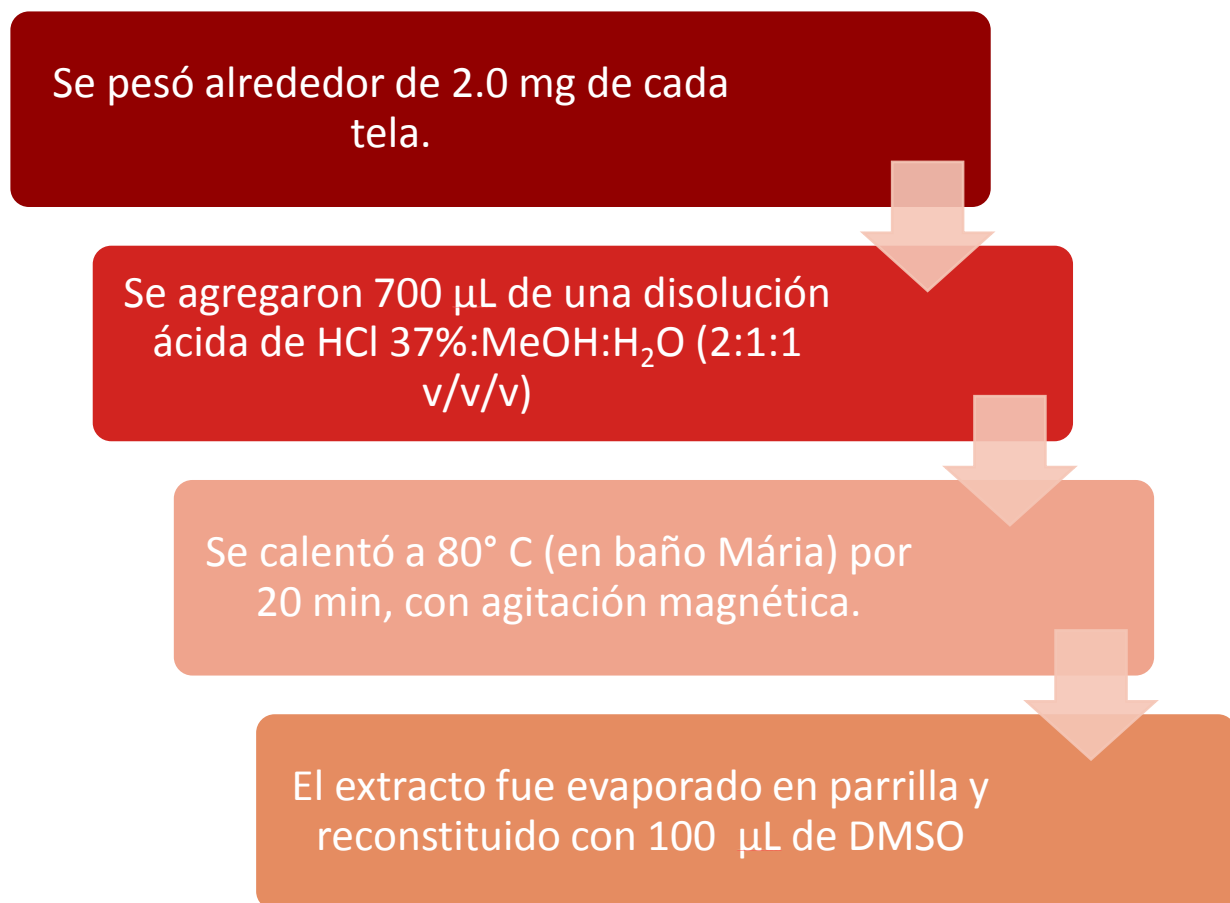


Figura 27. Diagrama del método final de extracción textil.

### 2.5.3. Extracción en Fase Sólida (SPE)

Al analizar los cromatogramas obtenidos con el método Statho descrito en la figura 26, se decidió aplicar un método de *clean-up*. Dada la naturaleza de la muestra el método de limpieza se basó en la técnica de Extracción en Fase Sólida (SPE), esto previo a la inyección de las muestras. A todos los cartuchos de extracción se les colocó doble filtro y empacados con 200 mg de sílice C18 previamente acondicionada (se acondicionó pasando 2 mL de MeOH por cada gramo de sílice), una vez empaquetado se aplicó 100  $\mu$ L del extracto de lana teñida con la formulación rojo cochinilla obtenida del método Statho.

Una vez aplicada la muestra en el cartucho SPE, el primer experimento de esta sección consistió en hacer pasar 1 mL de agua acidulada con ácido fórmico 0.1 % m/v y posteriormente se pasó una mezcla de agua acidulada y MeOH (50:50 v/v) donde se recolectaron 4 fracciones de 0.5 mL cada una. Cada fracción se inyectó al cromatógrafo de líquidos con el método de análisis ya descrito con anterioridad (ir a tabla 4, sección 2.3).

Se obtuvieron los cromatogramas con las condiciones descritas, y se decidió realizar algunas modificaciones al método de *clean-up*. Para esto se realizó otro experimento preparando el cartucho de SPE de la misma forma que ya se describió en el párrafo anterior. Una vez preparado el cartucho se aplicó nuevamente 100  $\mu$ L del extracto de la muestra obtenido por Statho, después se le hicieron pasar 4 mL de agua acidulada y luego se le adicionó una mezcla de agua acidulada:MeOH (30:70 v/v) donde se recolectaron dos fracciones de 0.5 mL cada una, inyectando cada fracción al cromatógrafo.

Con la información obtenida hasta el momento se decidió realizar el proceso de *clean-up* como ya se describió arriba, cambiando sólo el volumen de recuperación, se recolectaron tres fracciones de 250  $\mu$ L en vez de dos de

0.5 mL con la mezcla agua acidulada:MeOH (30:70 v/v) para asegurar la presencia significativa de los metabolitos de interés en el extracto. Logrando así inyectar únicamente la fracción 3 del fraccionamiento por SPE. A continuación, se muestra un diagrama con el método final de SPE.

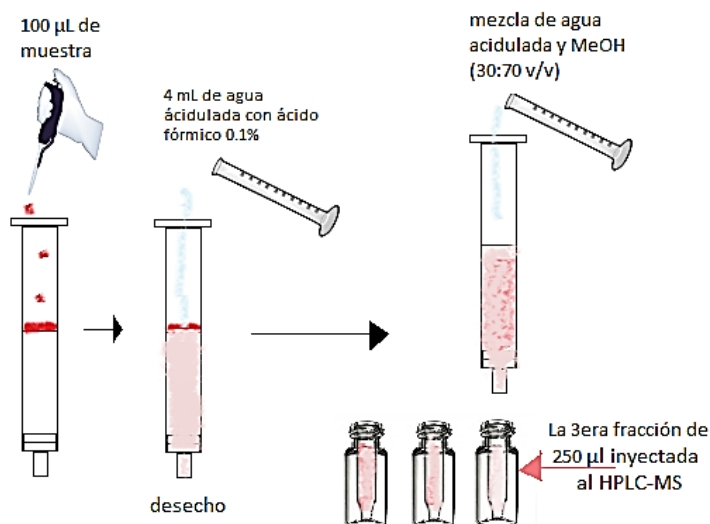


Figura 28. Diagrama del método de clean-up por SPE.

Finalmente, tras la observación y análisis (sección 3.3.3, capítulo III) de los cromatogramas se decidió cambiar el volumen de inyección del método cromatográfico de 20 µL a 50 µL. Cabe mencionar que el análisis anterior se realizó por triplicado con la lana teñida y con los blancos de tela mordentada. Al contar con un método de extracción y análisis satisfactorio, con el que se obtuvieron resultados confiables, se prosiguió a analizar las diferentes formulaciones restantes con el método desarrollado SPE-HPLC-ESI-MS.

## 2.6. Estudio de envejecimiento en textiles teñidas con grana cochinilla

El método analítico desarrollado en este trabajo fue creado con el fin de llegar a analizar muestras del patrimonio cultural mexicano, es por eso que



se quiso replicar las condiciones de las muestras lo más apegadas a la realidad. Por este motivo se realizó un estudio de envejecimiento acelerado, para así poder simular el desgaste de las telas por el tiempo, la exposición a la luz y el medio ambiente.

Se escogió una tela de lana por cada formulación y como blanco se usó una tela mordentado para introducirlo en la cámara de envejecimiento. El estudio duró cuatro meses, donde por periodos de cada 3 semanas se iba recolectando una pequeña muestra de cada tela y esta era analizada por el método SPE-HPLC-ESI-MS para conocer si se podía seguir detectando al ácido carmínico y sus metabolitos provenientes de la grana cochinilla. A continuación, en la tabla 5 donde se muestran las horas de operación de la cámara de envejecimiento y las fechas donde se recolectó cada muestra de tela envejecida. En total las telas estuvieron expuestas a un equivalente de 875.04 horas de radiación UV.

*Tabla 5. Fechas de toma de muestra de tela envejecida y horas totales de operación de la cámara de envejecimiento.*

<b>Fecha de toma de muestra</b>	<b>Horas de luz ultravioleta (h)</b>	<b>Δ de horas de trabajo acumuladas (h)</b>
Inicio 2-octubre-2018	331956	-
25-octubre-2018	352690	20734
22-noviembre-2018	369413	16723
10-diciembre-2018	390849	21436
07-enero-2019	405169	14320
31-enero-2019	419460	14291
	<b>Total</b>	<b>87504</b>
	número de ciclos	218.76
	<b>HORAS EQUIVALENTES DE ENVEJECIMIENTO</b>	<b>875.04</b>

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Desarrollo y optimización del método cromatográfico

Al probarse en primera estancia la columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (50 x 4.6 mm, d.i., 2.7  $\mu\text{m}$ ) con el método uno (tabla 3, sección 2.3), analizando la disolución estándar de ácido carmínico de 10.0 ppm, se observa en la figura 29 que la columna no era la adecuada debido a que el ácido carmínico eluía al iniciar la corrida, es decir, no había la suficiente interacción con la fase estacionaria para que el analito fuera retenido más tiempo.

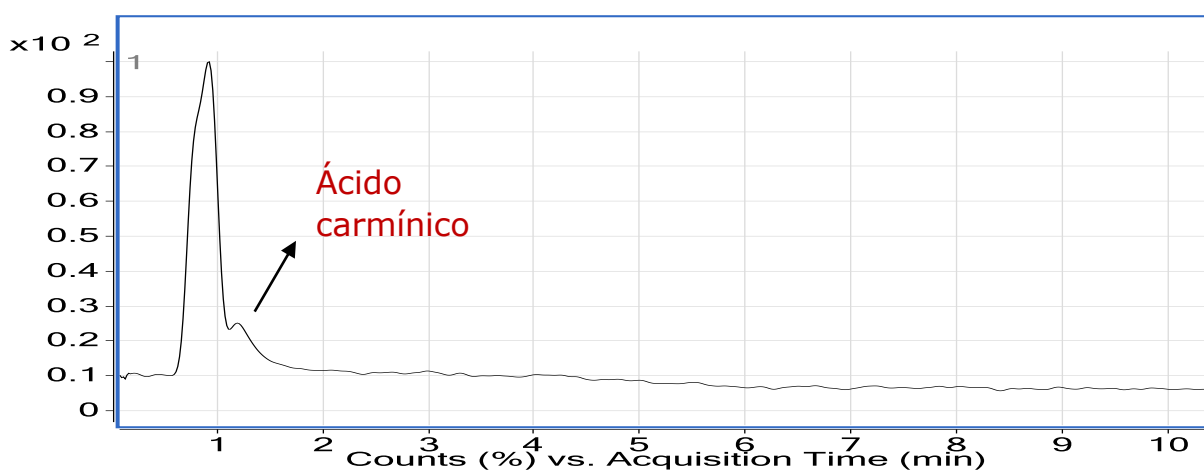


Figura 29. Cromatograma de estándar de ácido carmínico de 10.0 ppm, analizado con columna C18 de 5 cm de largo y método uno.

Al observar que el pico del ácido carmínico eluía seguido del disolvente, se optó cambiar de columna, una columna con la misma fase estacionaria (C18) pero con mayor longitud y menor diámetro, con el fin de mejorar los parámetros cromatográficos de eficiencia, selectividad y factor de capacidad, también se decidió disminuir la fuerza eluyente, con el fin de resolver cromatográficamente el pico del AC y el frente del disolvente.

En la figura 30 se muestra el cromatograma obtenido con el método final, el cual fue optimizado el gradiente de elución a un tiempo de análisis de 15 min teniendo así el método más rápido comparado con los reportados hasta el momento en la literatura.

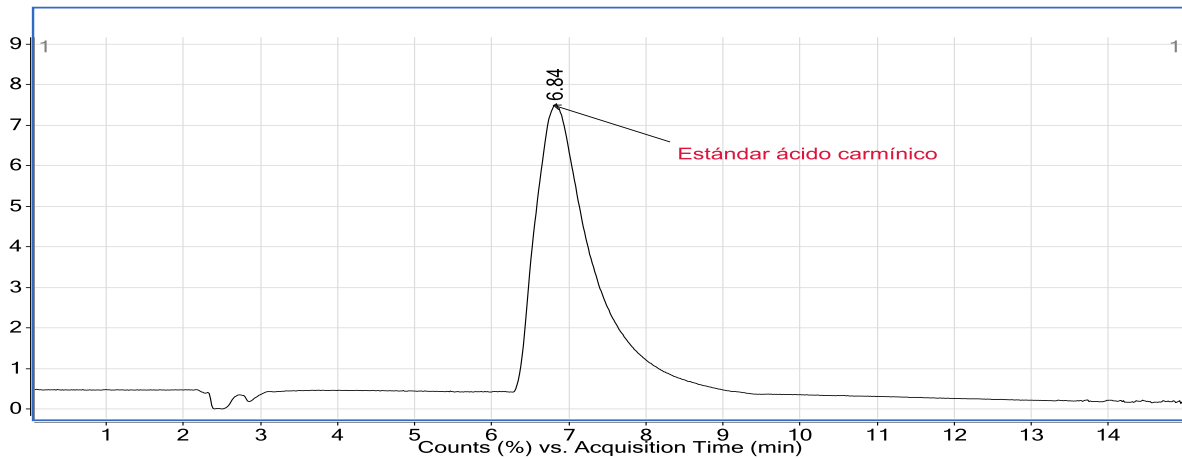


Figura 30. Cromatograma estándar de ácido carmínico 10.0 ppm obtenido con el método final optimizado utilizando una columna C18 de 10 cm de longitud.

Con el método final y una columna con mayor longitud pero diámetro menor, se obtuvo un mejor factor de capacidad ( $k'$ ) para el AC que con la primera columna. También como consecuencia del cambio de la columna se aumentaron los platos teóricos, logrando así incrementar la eficiencia del sistema. Aunque el pico presentó una asimetría negativa, no se le tomó importancia debido a que pudo ser por efectos de alta concentración del estándar.

Estableciéndose así el método final por cromatografía de líquidos para el ácido carmínico, al realizarse este estudio por triplicado se pudo estandarizar el tiempo de retención de éste,  $6.84 \text{ min} \pm 0.2 \text{ min}$ , el cual posteriormente se buscó en el tinte de la grana cochinilla y en los extractos textiles

Con el espectro de masas de la figura 31 se confirmó que el pico de 6.84 min efectivamente correspondía al ácido carmínico (492 u.m.a), pero al tener un modo de ionización negativo se observó  $[M-H]^-$ , es decir la relación m/z esperada menos una unidad, es por eso que observamos el 491 m/z como la masa designada del ácido carmínico.

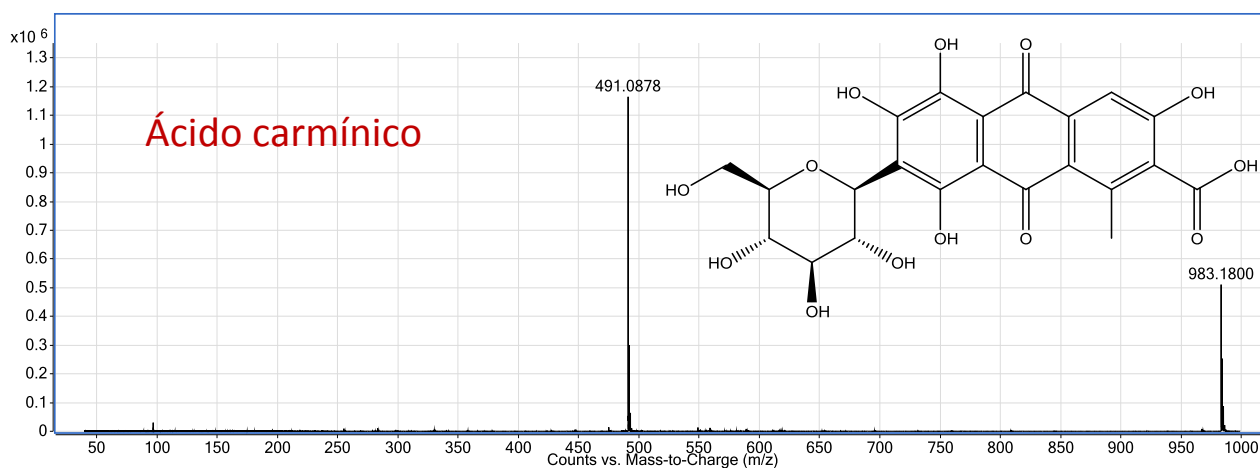


Figura 31. Espectro de masas y estructura del ácido carmínico, modo negativo.

### 3.2. Tinte de grana cochinilla

Una vez ya estandarizado el tiempo de retención en el cual el ácido carmínico eluía de la columna analítica, se prosiguió a analizar el tinte de grana cochinilla mexicana (ver figura 32), con el fin de conocer el perfil cromatográfico del tinte con el que se iban a impregnar las lanas.

En estos análisis se pudo identificar al ácido carmínico y a sus principales metabolitos de la grana cochinilla, los cuales fueron confirmados por los espectros de masas y por su comparación con la bibliografía presentada al principio de este documento.

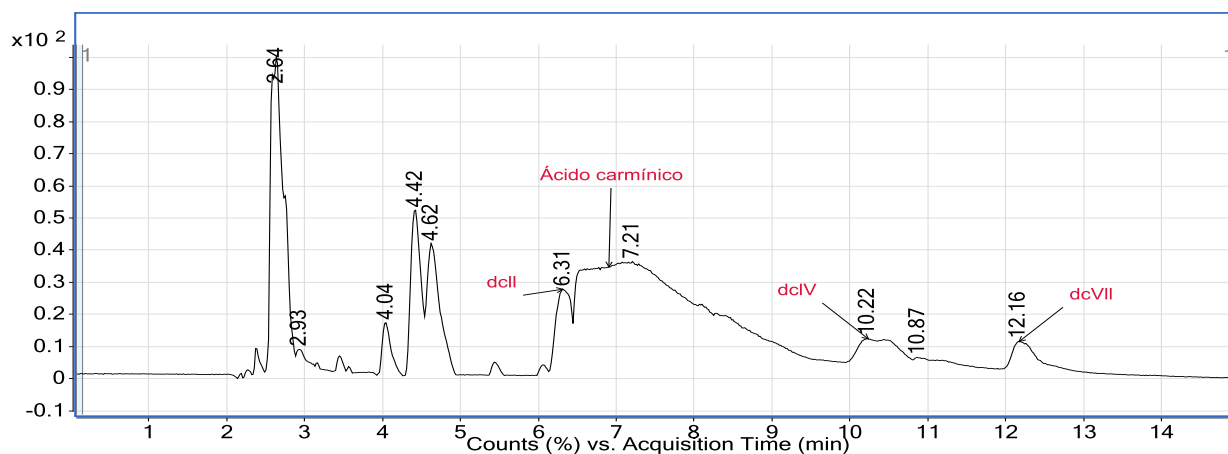


Figura 32. Cromatograma tinte de grana cochinilla concentrada.

El primer metabolito identificado en un tiempo de retención de 6.31 min fue el dcII (figura 33), este analito siempre se presenta como un hombro del ácido carmínico. El dcII presenta una estructura similar al ácido carmínico, pero sin un grupo hidróxido; por lo cual su masa pasa a ser de 476 u.m.a y determinada en modo negativo 475 m/z.

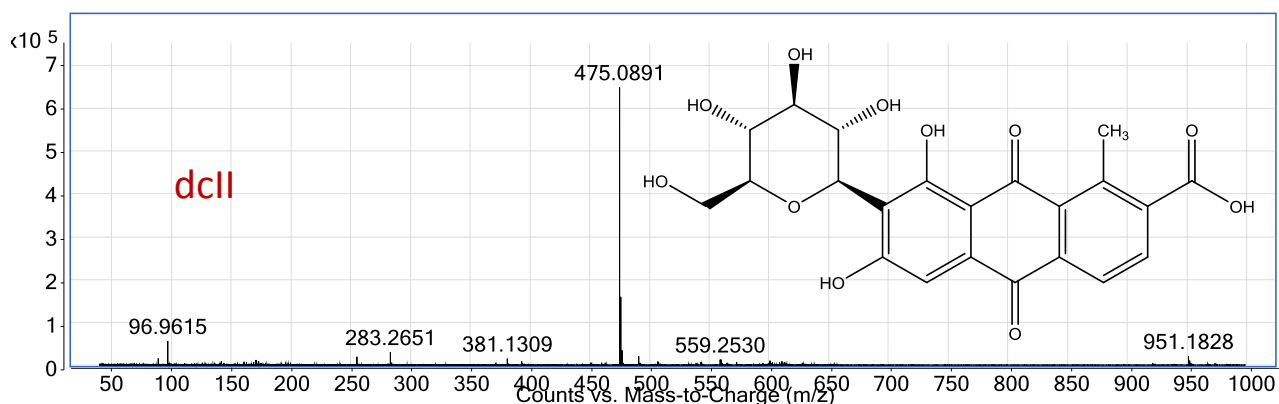


Figura 33. Espectro de masas y estructura del metabolito dcII.

Después eluye el ácido carmínico, el cual a simple vista se puede ver notablemente deforme debido a la alta concentración de éste en el tinte de grana cochinilla. En este estudio fue relevante poder identificar a los metabolitos de la grana cochinilla que se encuentran en muy baja concentración respecto al AC, fue por esto que se inyectó una disolución concentrada del tinte logrando el objetivo de identificar los metabolitos

relevantes de la grana cochinilla, a pesar de la deformación del pico del ácido carmínico.

También se puede notar en el cromatograma de la figura 29 que se identificaron a los metabolitos dcIV y dcVII, esto por comparación en el orden de tiempos de elución reportados en la literatura para columnas C18 y su espectro de masas. Pero, al no tener la certeza exacta de que estos dos últimos metabolitos fueran efectivamente los que se proponen, se decidió hacer un experimento MS/MS el cual fragmenta un ion específico, fragmentándolo en iones característicos de cada analito. En la tabla 6 se muestran las condiciones en las cuales fue realizado este experimento.

*Tabla 6. Condiciones específicas para el experimento MS/MS de los iones de los metabolitos dcIV y dcVII.*

m/z precisa	Z	Tiempo de ret. (min)	$\Delta$ tiempo de ret. (min)	Ancho de isótopo	Energía de colisión (V)
491.08	1	10.23	0.3	Medio (~ 4 m/z)	32
491.08	1	12.21	0.3	Medio (~ 4 m/z)	35

El metabolito dcIV se puede observar en un tiempo de retención de 10.22 min, con una masa igual a la del ácido carmínico de 492 u.m.a, lo cual quiere decir que son isómeros; el único cambio presente es el cierre del anillo del azúcar. En la figura 34 se muestra el espectro de masa bidimensional que, con base en los fragmentos presentes y su abundancia relativa, confirma la identificación del metabolito dcIV.

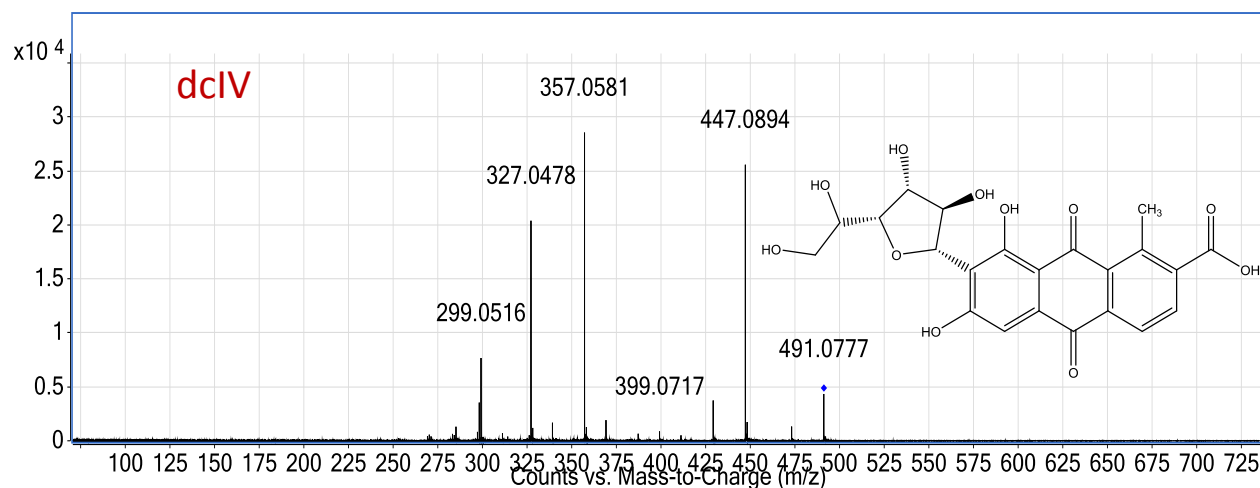


Figura 34. Espectro MS/MS y estructura del metabolito dcIV.

Finalmente el metabolito dcVII presente en un tiempo de retención de 12.16 min, isómero del dcIV al únicamente cambiar la orientación en el espacio del anillo del azúcar. El espectro de masas/masas (figura 35) confirma la identificación de este metabolito por sus fragmentos característicos y su abundancia relativa.

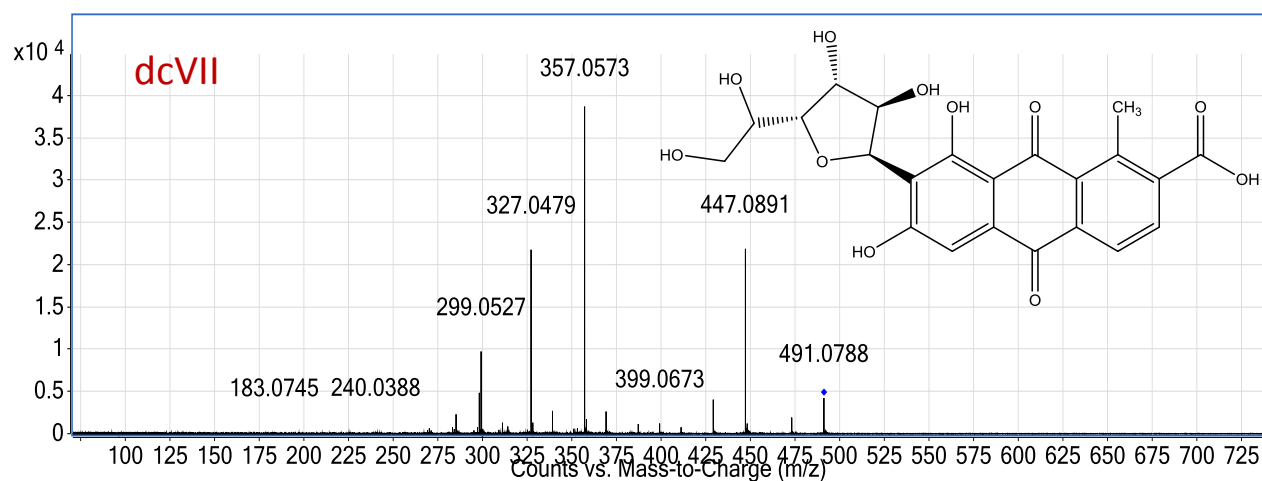


Figura 35. Espectro MS/MS y estructura del metabolito dcVII.

En los dos anteriores espectros de masas/masas se pueden observar los mismos fragmentos pero con abundancias distintas, en el espectro del metabolito dcIV se presenta una abundancia del ion 447 m/z de

prácticamente 1:1 con respecto al ion 357 m/z, mientras que en el espectro del metabolito dcVII se presenta una abundancia 1:2 con respecto a los mismos iones. Este criterio fue muy importante para la confirmación de los metabolitos.

De aquí en adelante en este documento solo se especificarán los nombres de los metabolitos en los cromatogramas.

### 3.3. Métodos de extracción textil

#### 3.3.1. Métodos propuestos

Después de la tinción de los textiles de lana con las cuatro diferentes formulaciones, se probaron tres diferentes métodos de extracción textil únicamente para formulación rojo cochinilla. Cabe mencionar que estos análisis se realizaron por triplicado. Al compararse los tres métodos se eligió el que obtuvo una mejor extracción, aunque no fuera la más selectiva. A continuación, se presentan los tres cromatogramas, cada uno obtenido con un método de extracción diferente.

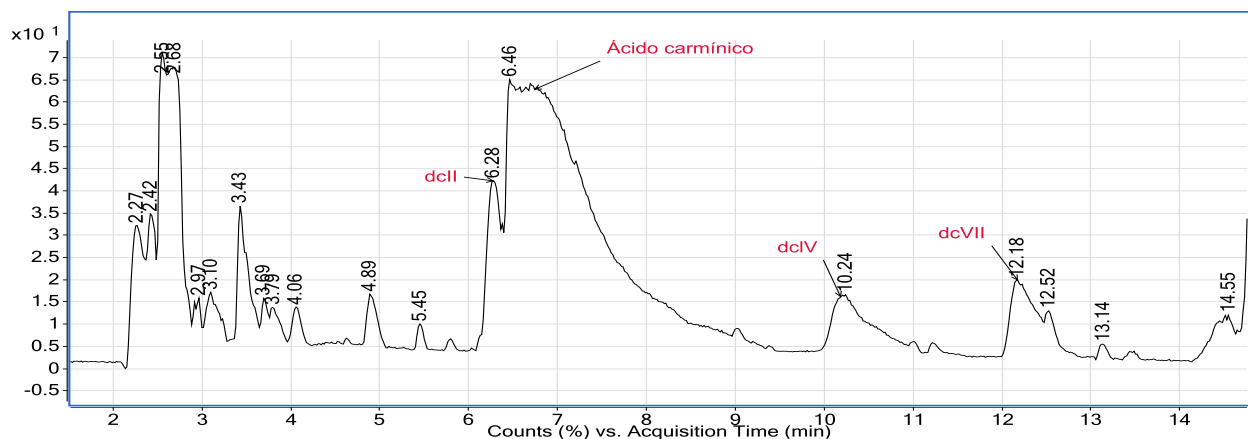


Figura 36. Cromatograma lana teñida con grana cochinilla concentrada usando el método de extracción EUA.



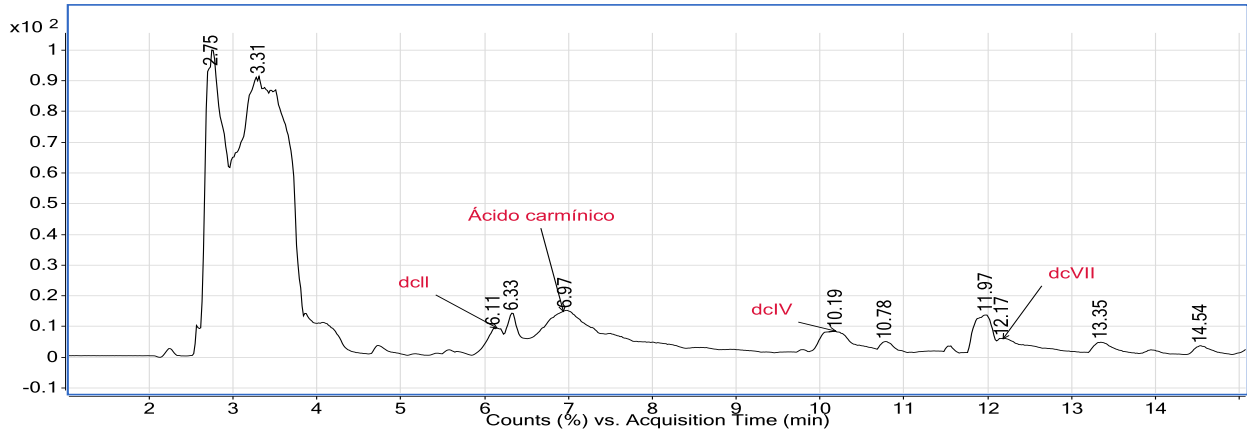


Figura 37. Cromatograma lana teñida con grana cochinilla concentrada usando el método de extracción DMSO.

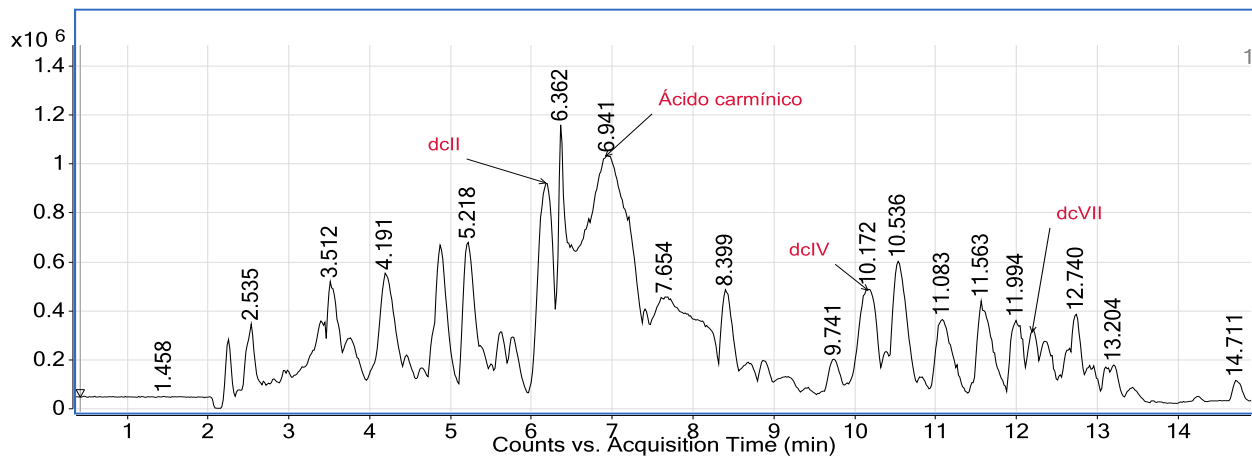


Figura 38. Cromatograma lana teñida con grana cochinilla concentrada usando el método de extracción Statho.

El primer método en probarse fue EUA. Éste fue el método más rápido y sencillo puesto que no fue necesaria una evaporación. Al observar el cromatograma (figura 36) se distinguen los analitos de interés con una abundancia del orden de  $10^1$ , lo cual lo clasifica como un método de extracción textil aceptable al lograr su objetivo de extracción.

En la figura 37 se observa la extracción con DMSO, la escala de la abundancia del cromatograma se muestra en un orden de  $10^2$ , debido a que al principio de la corrida eluyen compuestos sin relevancia para el estudio que se encuentra en concentraciones mucho mayores a los analitos de interés, al analizar los analitos de interés estos se encuentran en una abundancia parecida al método anterior por lo que en ese aspecto la

eficiencia de extracción por EUA y DMSO son equivalentes. Pero al pensar en los experimentos continuos que se realizarían posteriormente no era bueno para el equipo cromatográfico que se introdujeran sustancias con mayor concentración que los analitos pues lo podían ensuciar y contaminar con el paso de las corridas. Por lo que se clasificó como un método de extracción textil no efectivo, al no tener una mayor abundancia de metabolitos que el método EUA.

Por último, al analizar los resultados en la figura 38 de la extracción por el método Stathopoulou (Statho). Se puede notar una extracción bastante efectiva al tener muchas sustancias presentes y una abundancia mucho mayor, con respecto a los dos últimos métodos, del orden de  $10^6$ . En este cromatograma se logra identificar al AC y a los metabolitos de interés en mayor concentración que en los métodos anteriores, lo que fue una ventaja para este método puesto que el objetivo del estudio es identificar al ácido carmínico y a sus biomarcadores en telas del patrimonio cultural mexicano. Lo cual hace pensar que los analitos de interés en las muestras culturales puede que estén en menores concentraciones por el paso del tiempo.

Por todo lo anterior, se decidió quedarse con el método Statho y así asegurarse de poder observar al ácido carmínico y sus metabolitos de la grana cochinilla aun en bajas concentraciones.

Dado que se eligió el método de extracción Statho se muestra a continuación en la figura 39, el cromatograma del blanco de una tela mordentada.

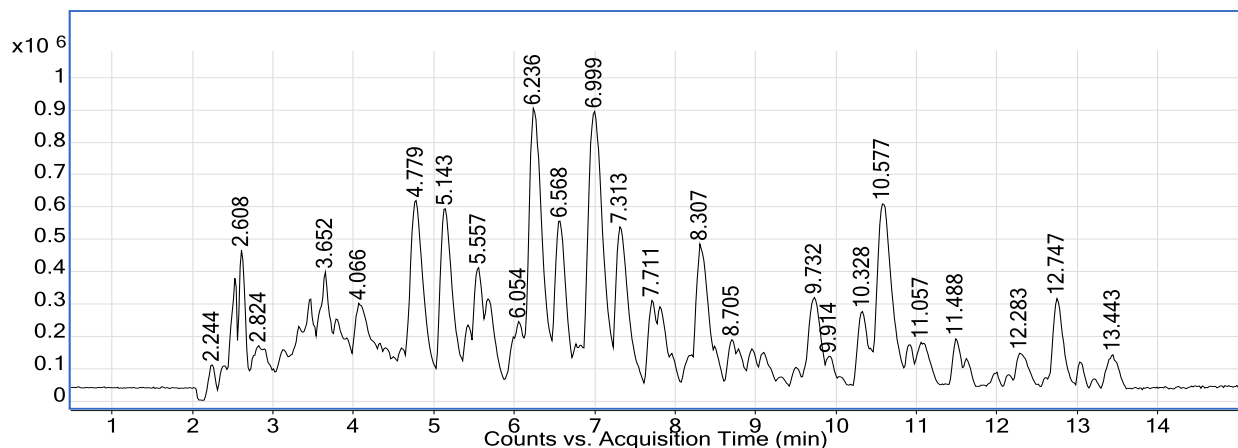


Figura 39. Cromatograma blanco de lana mordentado usando el método de extracción Statho.

En este cromatograma se puede observar nuevamente la extracción efectiva del método al tener una abundancia alta de los compuestos extraídos de lana. Debido a la presencia de varios compuestos del blanco en los tiempos de retención de interés en los cuales eluirían el AC y sus metabolitos si se tratara de una muestra de lana teñida, se optó por utilizar un método de *clean-up* previo a la inyección de la muestra, esto fue para asegurar que no hubiera ningún tipo de interferencia por los compuestos de la matriz y se pudiera realizar una exitosa identificación de los analitos deseados. Una razón más para implementar el método de *clean-up*, fue la limpieza de la fuente del espectrómetro de masas, al evitar la introducción de tantos compuestos irrelevantes para este estudio, más tiempo de inyecciones efectivas tendría el equipo y así se retardaría su limpieza.

Pero antes de probar este método se decidió optimizar algunas variables del método de extracción de Stahopoulou.

### 3.3.2. Variables realizadas al método Stathopoulou

Estas variables fueron propuestas para optimizar y economizar el método Statho. Se inició modificando la agitación magnética que al compararse con el cromatograma obtenido con el método original (figura 38) no había

cambios en el perfil cromatográfico, por lo que se decidió dejar la agitación para asegurar una extracción efectiva, y mayor número de colisiones efectivas entre el disolvente y la tela.

Después se probó evaporar en parrilla en vez de usar el flujo de nitrógeno, al analizar los resultados de este experimento no se observó ningún cambio significativo con respecto al resultado original de la extracción Statho, por lo que se decidió evaporar con parrilla y así economizar en el gasto del nitrógeno, el cual no era necesario.

Finalmente al elegir el volumen de reconstitución se optó por elegir 100  $\mu\text{L}$  para tener una muestra mucho más concentrada y así poder identificar los metabolitos de la grana cochinilla.

Al obtener cromatogramas como los de las figuras 38 y 39 (de la lana teñida con grana cochinilla y extracción textil del blanco mordentado), se observó que aún no se tenía un método selectivo, por lo cual éste se siguió optimizando al agregarle un paso de *clean-up* y así poder presentar cromatogramas más eficientes y limpios.

### 3.3.3. Extracción en fase sólida (SPE)

Al tener un exhaustivo método de extracción textil pero poco selectivo se optó por agregar un paso de *clean-up* anterior a la inyección de la muestra. Se decidió utilizar SPE debido a sus usos en purificación, enriquecimiento de trazas y la desalinización. El principio de SPE implica la partición entre un líquido (matriz de la muestra o disolvente con analitos) y una fase de sorbente sólido, en este caso sílice C18.

El objetivo general de SPE es proporcionar extractos de muestras que estén libres de componentes de la matriz, interferentes y lo suficientemente concentrados para la detección. El proceso de SPE consiste básicamente en

cuatro pasos diferentes: acondicionamiento, adición de muestras, lavado y elución. Durante el acondicionamiento, los grupos funcionales del lecho de sorbente se solvatan para que puedan interactuar con la muestra. La adición de la muestra consiste en la percolación de las muestras a través del sorbente sólido. Durante este paso, los analitos, así como algunos componentes de la matriz, se retienen y, por lo tanto, se concentran en el material de embalaje SPE.<sup>45</sup>

Sucesivamente, la separación de los analitos e interferentes se podría realizar de las siguientes tres formas: extracción selectiva, lavado selectivo o elución selectiva. La extracción selectiva se realiza cuando se utiliza el procedimiento SPE para eliminar los componentes interferentes (enriquecimiento de trazas). De esta manera, solo se retienen los componentes seleccionados. El lavado selectivo se logra cuando los analitos objetivo y las impurezas se retienen en el lecho del sorbente: las impurezas se enjuagan con soluciones de lavado que son lo suficientemente fuertes para eliminarlas, pero lo suficientemente débiles para dejar los analitos atrás. De manera diferente, la elución selectiva consiste en la elución de los compuestos adsorbidos de interés por un solvente que deja atrás las impurezas fuertemente retenidas.

En el primer experimento de esta sección, se buscó eliminar primero las impurezas solubles en agua para después iniciar con una mezcla de disolventes, agua acidulada con ácido fórmico 0.1 % y MeOH (50:50 v/v), con la que se sabía que el ácido carmínico eluía de una sílica C18. Al ir recolectando las fracciones de esta mezcla de disolventes se esperaba ir separando al ácido carmínico y a sus metabolitos, al inyectarse estas fracciones determinarían en cuál de ellas estaban presentes cada uno de los metabolitos.

Al obtener los resultados con el experimento anterior, se observó que la concentración del ácido carmínico era muy alta en todas las fracciones y dificultaba la identificación de los metabolitos obteniendo un cromatograma nada resuelto ni selectivo.

Al no tener una presión constante y alta en la SPE como se tiene en el HPLC, se razonó que no se iba a poder separar el ácido carmínico de sus metabolitos, pero si bajar la concentración de ácido carmínico en los extractos de recuperación para aumentar la eficiencia de los cromatogramas obtenidos, por lo cual se decidió pasar más cantidad de agua acidulada (4 mL), para así asegurar el lavado de más impurezas solubles en agua al notar que no todas las impurezas se iban con 1 mL y posteriormente pasar agua acidulada y metanol (30:70 v/v) hasta recolectar dos fracciones de 0.5 mL, para fugar más ácido carmínico en los lavados y al tratar de eluir el AC con los metabolitos, el ácido carmínico esté en menor cantidad logrando definir mejor el perfil cromatográfico.

Al analizarse las fracciones 1 y 2 con la mezcla de disolventes 30:70 agua acidulada:MeOH, se puede observar que en la fracción uno (figura 40), hay bastantes interferencias lo que nos sigue dando un cromatograma no resuelto ni muy selectivo, pero al ver los resultados de la fracción dos (figura 41), se pudo observar que las impurezas ya habían eluído en la fracción anterior junto con gran parte del ácido carmínico, lo que permitió optimizar los parámetros de resolución y selectividad para los metabolitos de interés. Pero a cambio se tenía que sacrificar el metabolito dcII debido a que mientras se desechaba el ácido carmínico el metabolito se fugaba con él.

A pesar de esta decisión, si en algún momento se quiere observar este metabolito en específico se sabe que se puede encontrar en la fracción uno y confirmar su presencia por dos factores: se presenta siempre como un

hombro izquierdo del ácido carmínico y su relación masa/carga que es de 475 m/z.

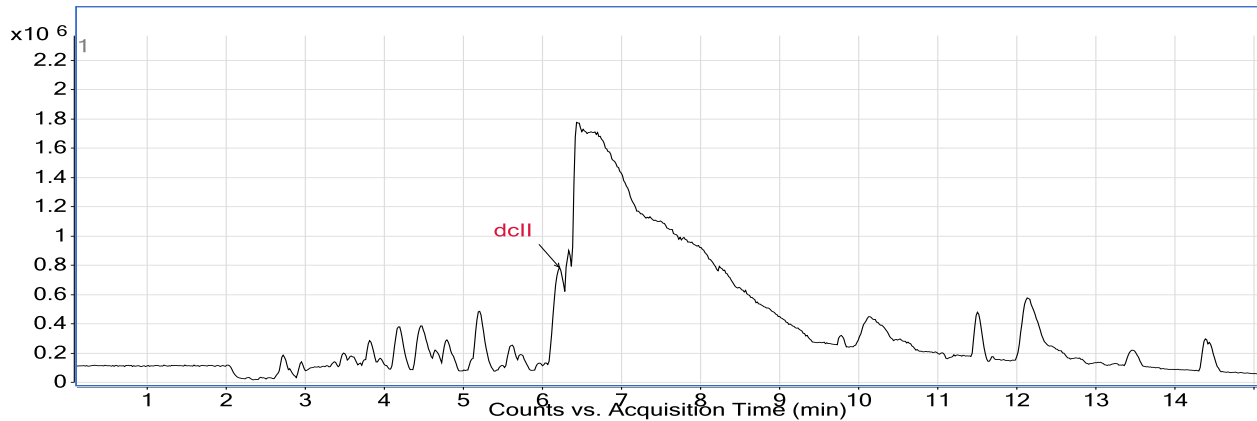


Figura 40. Cromatograma fracción 1 por SPE de una lana teñida con fórmula rojo cochinilla.

Tras hacer varios experimentos como el anterior, en la mayoría se observó resultados como en la figura 41 pero en algunos había fuga de los últimos metabolitos. Esto podría ser a causa de la heterogeneidad de la muestra, al no tener la misma cantidad del tinte de grana cochinilla distribuido uniformemente en las muestras.

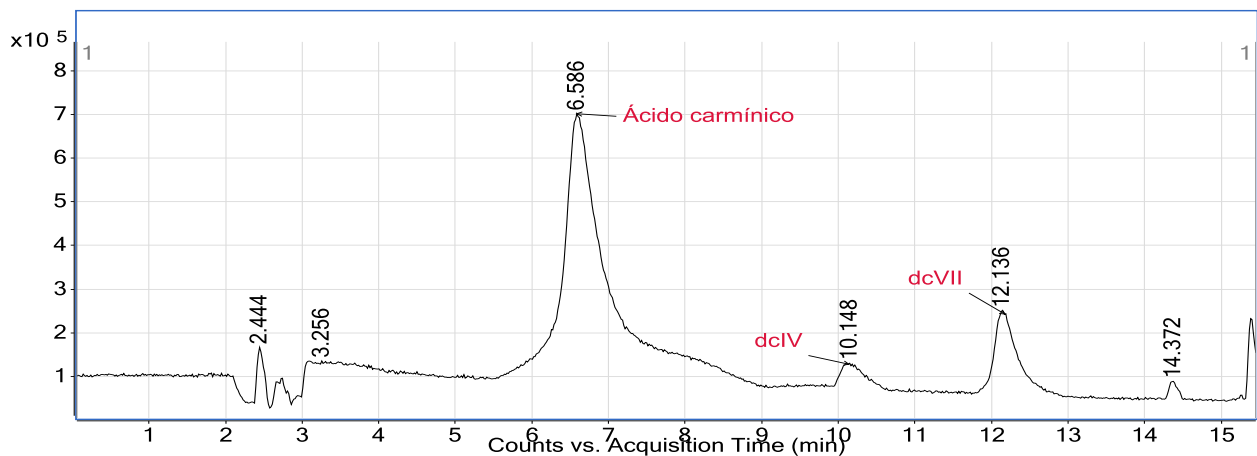


Figura 41. Cromatograma fracción 2 por SPE de lana teñida con fórmula rojo cochinilla.

Es por eso que para asegurarse que siempre se identificara el ácido carmínico y sus metabolitos (dcIV y dcVII) se decidió hacer un último cambio al método SPE. Se continuó lavando primero con agua acidulada y después

con una mezcla de agua acidulada y metanol (30:70 v/v) pero en vez de recolectar fracciones de 0.5 mL, se optó por recolectar 3 fracciones de 250  $\mu$ L e inyectar la tercera fracción, de esta manera era más probable que siempre se encontraran a los metabolitos.

Al realizar estos experimentos por triplicado se unificaron los resultados y en cada uno de ellos había presencia del AC y sus metabolitos.

En la figura 42 se observa un blanco de lana mordentado extraído con el método SPE-HPLC-ESI-MS, que si lo comparamos con el de la figura 39, se logra ver que el método de *clean-up* usado fue exitoso, debido a que todas las impurezas que se observaban únicamente en la extracción por Stathopoulou fueron desechadas al realizar los lavados con agua acidulada y la mezcla de disolventes.

Con esto se elimina la presencia de posibles interferencias al realizar el análisis de las muestras teñidas y se conserva el equipo limpio por periodos de tiempo más largos.

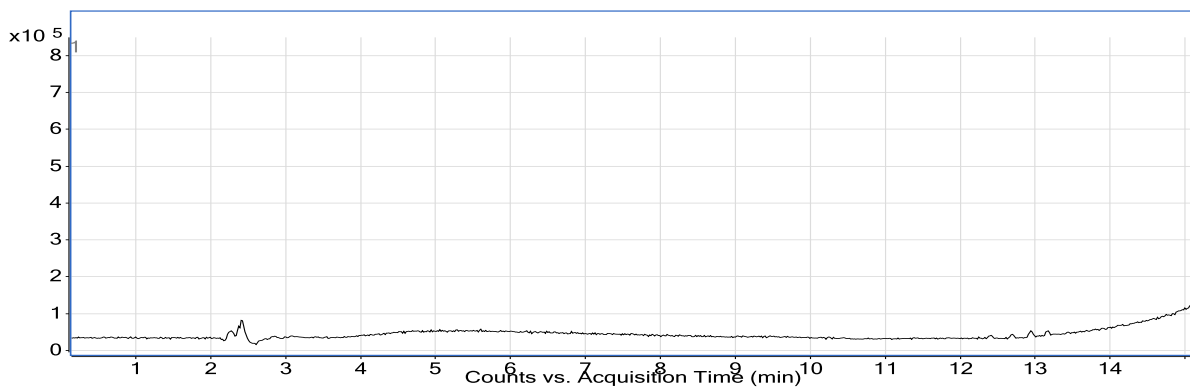


Figura 42. Cromatograma fracción 3 (250  $\mu$ L) por SPE de blanco de lana mordentado usando el método de extracción Statho.



### 3.3.4. Extracción textil completa de formulaciones restantes de grana cochinilla.

Al haber desarrollado un método de extracción completo y eficiente se prosiguió a analizar las siguientes telas teñidas con distintas formulaciones de grana cochinilla: Rojo anaranjado, rojo mexicano y morado usando como entonadores limón, crémor tártaro con alumbre y bicarbonato respectivamente.

En la figura 43 y 44 se pueden identificar al ácido carmínico y a sus metabolitos en telas teñidas con formulación rojo anaranjado y rojo mexicano respectivamente. Por lo que se calificó como efectivo el método SPE-HPLC-ESI-MS para estas dos formulaciones.

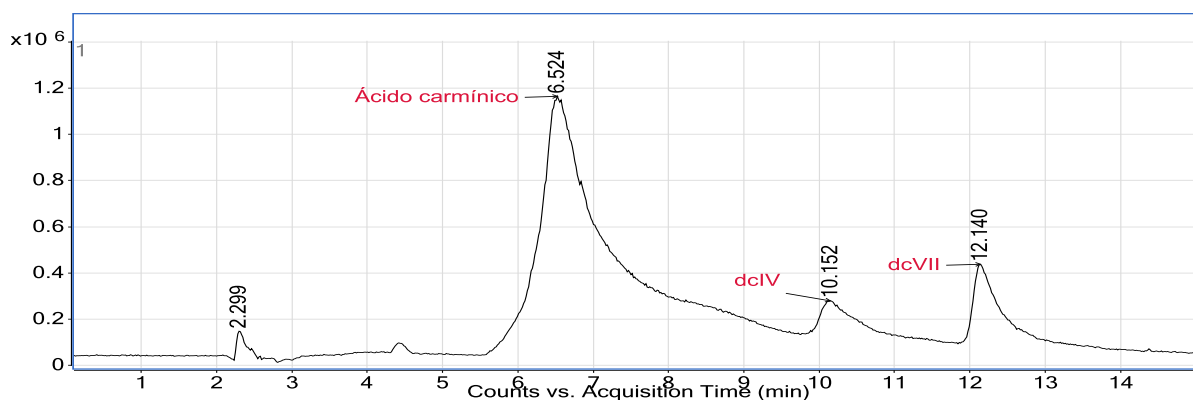


Figura 43. Cromatograma fracción 3 (250 µL) por SPE de lana teñida con fórmula rojo anaranjado.

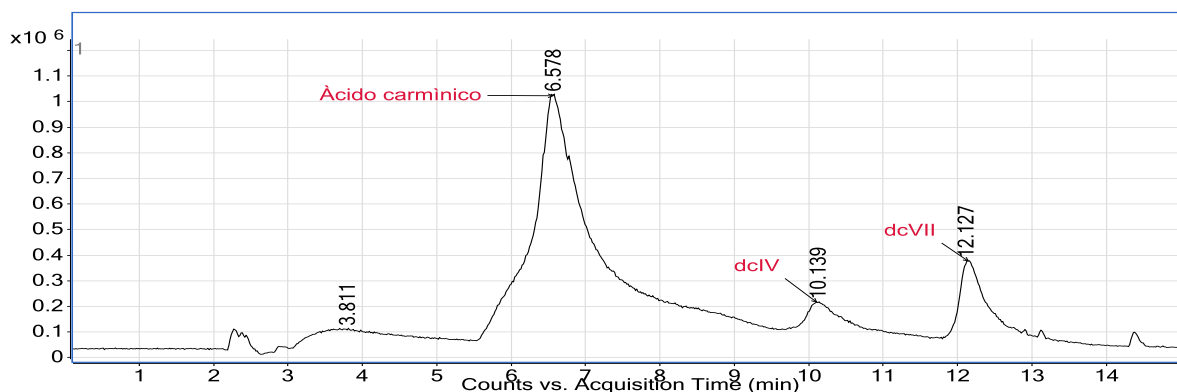


Figura 44. Cromatograma fracción 3 (250 µL) de SPE de lana teñida con fórmula rojo mexicano.

Al hablar de la formulación morada desde la extracción Sthato el color rojo era menos intenso que en las demás por lo que cuando se realizó la SPE, la coloración era nula y al momento de analizar el cromatograma (figura 45), no hubo presencia alguna del AC ni de los metabolitos. Fue por eso que se decidió prescindir del método de *clean-up* para esta formulación y únicamente se realizó el método de extracción Sthato, inyectando al HPLC-MS el extracto obtenido.

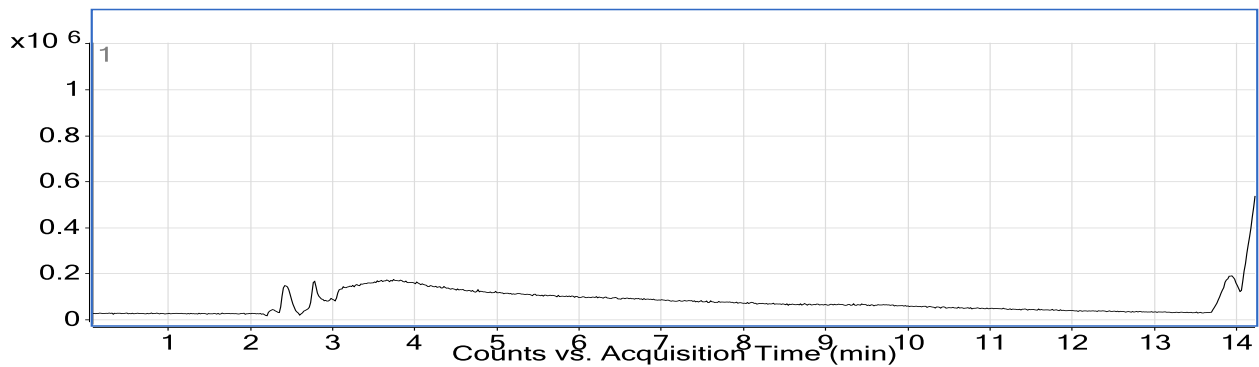


Figura 45. Cromatograma fracción 3 (250 µL) de SPE de lana teñida con fórmula morada.

En la figura 46 se muestra el cromatograma del extracto teñido con bicarbonato obtenido por el método Sthato, en el cual se pudo identificar únicamente al ácido carmínico. Al tener una abundancia mucho menor del AC comparado con las otras formulaciones, se puede observar que el extracto de la formulación morada inyectado directo contiene a los metabolitos en concentraciones no detectables para el instrumento.

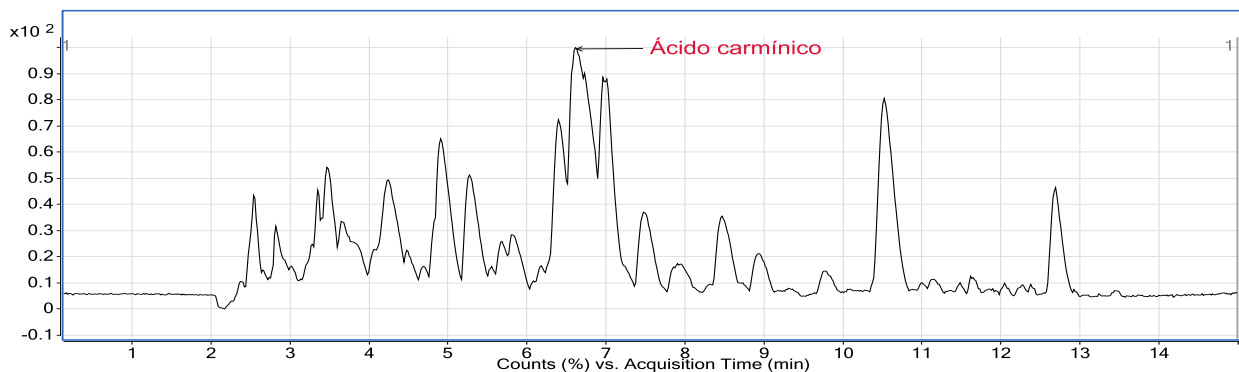


Figura 46. Cromatograma de extracción por método Sthato de lana teñida con fórmula morada.

### 3.4. Estudio de envejecimiento en textiles teñidas con grana cochinilla

Al querer tener un método adecuado para una muestra del patrimonio cultural, se implementó un estudio de envejecimiento acelerado para simular el desgaste que pudieran tener las telas de lana por el tiempo y exposición solar.

El estudio tuvo una duración de 4 meses, donde se sometió a radiación UV y humedad a blancos de tela mordentada y telas teñidas con las 4 diferentes formulaciones empleadas en este trabajo. Por lapsos de 3 semanas aproximadamente se fue sacando una muestra de cada tela para ir monitoreando los cambios que había al tratar de identificar al ácido carmínico y a sus metabolitos. En la figura 47 se muestra la comparación de las telas al tiempo cero con las sometidas a envejecimiento por 4 meses.



Figura 47. Comparación de telas a tiempo cero con las envejecidas teñidas con distintas formulaciones de grana cochinilla.

Si se hablara únicamente de los cambios físicos que sufrió la lana al ser envejecida, resaltaría únicamente que las telas se opacaron un poco sin perder su color a excepción de la tela teñida con la formulación morada, la cual paso de ser morada a tomar un color rosa pálido.

Únicamente se presentarán los cromatogramas de la última toma de muestra que fue cuando concluyeron los 4 meses de exposición.

Al observar el blanco de tela envejecido (figura 48) se notó que la lana se fue descomponiendo con el envejecimiento UV, debido a que estaban presentes varias sustancias que no estaban en el blanco de tela al tiempo cero (figura 42). A pesar de esto, las interferencias presentadas en los tiempos de retención de interés son de respuesta baja al comprarlas con la respuesta de los metabolitos que están en órdenes de  $10^6$ .

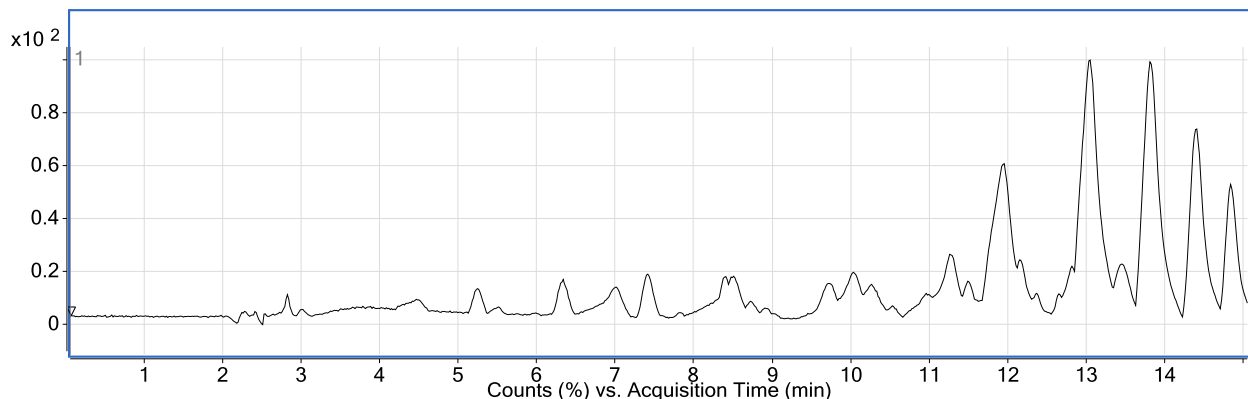


Figura 48. Cromatograma fracción 3 (250  $\mu$ L) de SPE de blanco de lana envejecida por 4 meses.

En las figuras 49, 50 y 51 se puede observar que al analizar la tela envejecida teñida con la formulación rojo cochinilla, rojo anaranjado o rojo mexicano respectivamente, prevalecen el ácido carmínico y sus metabolitos. Es decir, si se contara con una tela que fue teñida con grana cochinilla y algún entonador ya sea: limón, crémor o alumbre nuestro método analítico SPE-HPLC-ESI-MS es capaz de identificarlo.

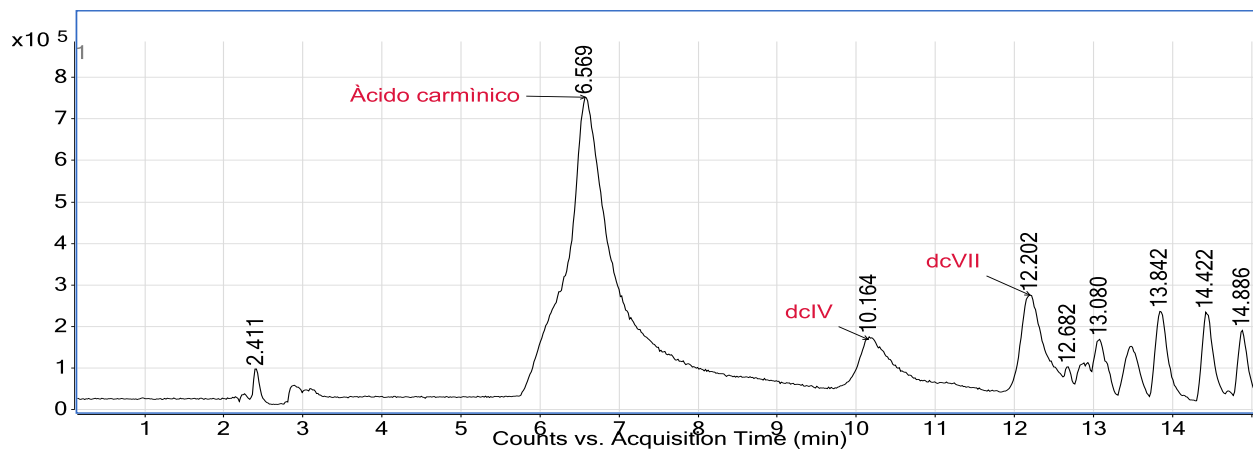


Figura 49. Cromatograma fracción 3 (250 µL) de SPE de lana envejecida por 4 meses, teñida con fórmula rojo cochinilla.

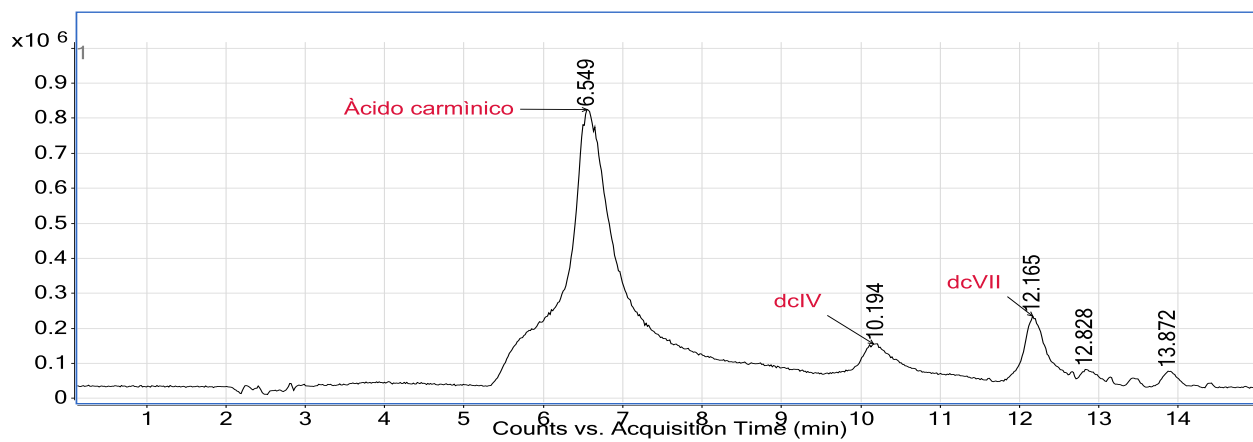


Figura 50. Cromatograma fracción 3 (250 µL) de SPE de lana envejecida por 4 meses, teñida con fórmula rojo anaranjado.

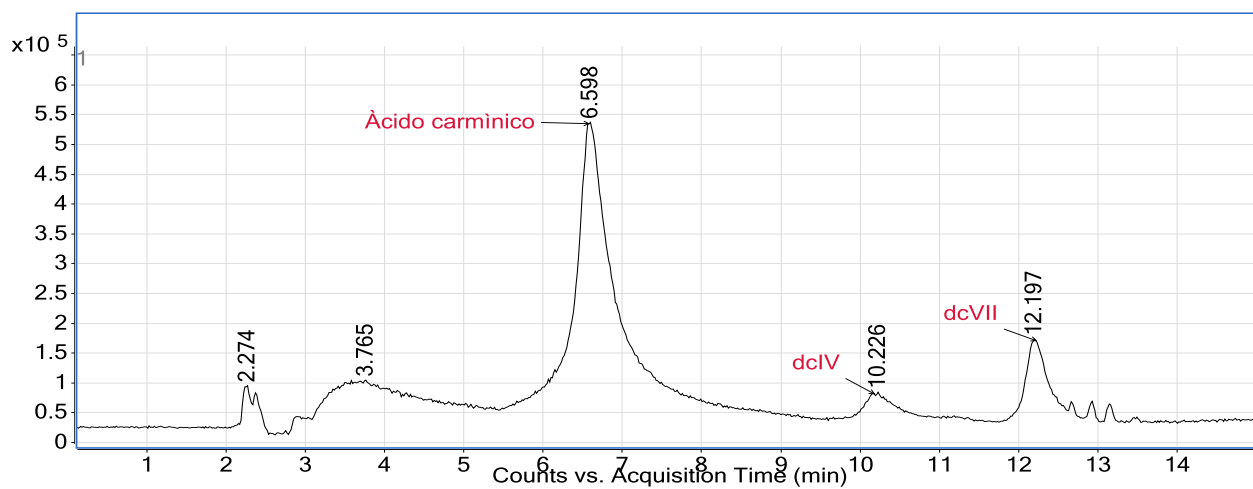


Figura 51. Cromatograma fracción 3 (250 µL) de SPE de lana envejecida por 4 meses, teñida con fórmula rojo mexicano.

Con respecto a la formulación morada, la tela perdió color con su envejecimiento. Y al realizar la extracción Statho no había un color rojo el cual observar, lo cual pasaba con las demás telas. Al analizar la figura 52, no hay presencia del ácido carminico y solo se observan impurezas de la lana en baja abundancia.

Es por esto que se descarta la identificación del ácido carmínico y sus metabolitos en grana cochinilla utilizando la formulación morada.

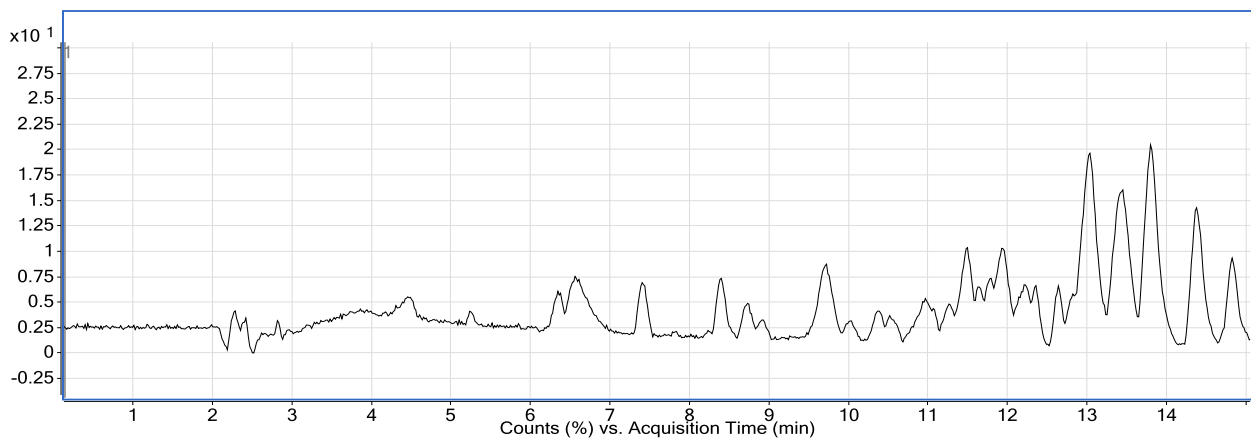


Figura 52. Cromatograma fracción 3 (250  $\mu$ L) de SPE de lana envejecida por 4 meses, teñida con fórmula morada.

Es importante resaltar que este método es únicamente cualitativo, por lo que solo se puede llegar al resultado que, si una tela fue teñida con grana cochinilla, mas no cuanto hay del tinte.

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

- Se estableció un método analítico confiable y eficiente capaz de identificar a los analitos de interés de forma cualitativa, para usarse en muestras del patrimonio cultural.
- Se diseñó un método cromatográfico con el cual se puede identificar el ácido carmínico y sus metabolitos en el tinte de grana cochinilla.
- Se logró obtener un método de tinción exitoso en textiles de lana teñidas con grana cochinilla en diferentes formulaciones obtenidas de testimonios oaxaqueños.
- Se diseñó y optimizó un método de extracción seguido de un método de *clean-up* para la extracción textil de lana teñida con grana cochinilla.
- Se logró identificar al ácido carmínico y a sus metabolitos dcII, dcIV y dcVII en extractos de lana teñida con formulación rojo mexicano, rojo anaranjado y rojo cochinilla, con el método desarrollado SPE-HPLC-ESI-MS teniendo como ventajas la pequeña cantidad de muestra necesitada para el análisis, los tiempos cortos de análisis y menor precio económico.
- El método SPE-HPLC-ESI-MS no fue el adecuado para telas teñidas con formulación morada.
- Al realizarse el estudio de envejecimiento, después de 4 meses de exposición a radiación UV y humedad, identificó al ácido carmínico y a sus metabolitos en lanas teñidas con formulación rojo mexicano, rojo anaranjado y rojo cochinilla.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

<sup>1</sup>Iquimica.unam.mx. (2018). LANCIC. [online] tomada de la URL: <https://iquimica.unam.mx/lancic> consultada por última vez el 22/08/18.

<sup>2</sup>Labunam.unam.mx. (2018). Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural. [online] tomada de la URL: <http://labunam.unam.mx/micrositio/LANCIC/> consultada por última vez el 22/08/18.

<sup>3</sup>Labunam.unam.mx. (2018). Antecedentes. [online] tomada de la URL: <http://labunam.unam.mx/micrositio/LANCIC/antecedentes.php> consultada por última vez el 22/08/18.

<sup>4</sup> *Rojo mexicano, La grana cochinilla en el arte*. Museo del palacio de bellas artes del viernes 10 de nov 2017 al 04 de feb 2018.

<sup>5</sup>Jacob Annie. Catherine Larrère (1993). *L'invention de l'économie au XVIIIe siècle. Du droit naturel à la physiocratie.. In: Études rurales*. Sauvage et domestique, sous la direction de André Micoud et Valentin Pelosse n°129-130.

<sup>6</sup> Sánchez Silva, C. and Suárez Bosa, M. (2006). *Evolution of Cochineal world production and marketing, XVIth-XIXth centuries*. Revista de Indias, LXVI ,237.

<sup>7</sup> Contreras, S. A. C. (1996). *Capital comercial y colorantes en la Nueva España, segunda mitad del siglo XVIII*. Zamora, Michoacán: El Colegio de Michoacán.



---

<sup>8</sup> A. Roquero (2006). Tintes y tintoreros de América. Catálogo de materias primas y registro etnográfico de México, Centroamérica, Andes Centrales y Selva Amazónica.

<sup>9</sup> V.C. Moran, H.G. Zimmermann (1991). Biological control of jointed cactus, *Opuntia aurantiaca* (Cactaceae), in South Africa, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 37, 5-27.

<sup>10</sup> Wrigth, N.P.(1963). *A Thousand Years od Cochineal: A Lost Traditional Mexican Industry is on Its Way Back*. Imprenta Benjamin Franklin.

<sup>11</sup> Morón, M., Terrón, R. (1988) *Entomología práctica*, México, D.F.: Instituto de Ecología A. C.

<sup>12</sup> F.L.C. Baranyovits (1978). Cochineal carmine: an ancient dye with a modern role, *Endeavour*, 2, 85-92.

<sup>13</sup> Aquino G., (2000) *Producción de Grana Cochinilla*, SAGARPA.

<sup>14</sup> Pérez Sandi y Cuen, M. y R. Becerra. (2001). *Nocheztli el insecto del rojo carmín*. CONABIO. Biodiversitas

<sup>15</sup> H. Hofenk-de Graaff, (2004). *The Colourful Past: Origins, Chemistry and Identification of Natural Dyestuffs*, Archetype Publications Ltd., London.

<sup>16</sup> Sánchez, C., Suárez, M., (2006). *Evolución de la producción y el comercio mundial de la grana cochinilla, siglos XVI-XIX*. *Revista de Indias*.

<sup>17</sup> Ferreira, E. S., Hulme, A. N., McNab, H., & Quye, A. (2004). The natural constituents of historical textile dyes. *Chemical Society Reviews*, 33(6),329-36.

---

<sup>18</sup> Gamboa, Nadia & Leidinger, Walter. (1988). *La química del ácido carmínico*. Revista de Química de la PUCP. II. 127.

<sup>19</sup> Peggie, D. A., Hulme, A. N., McNab, H., & Quye, A. (2008). Towards the identification of characteristic minor components from textiles dyed with weld (*Reseda luteola* L.) and those dyed with Mexican cochineal (*Dactylopius coccus* Costa). *Microchimica Acta*, 162(3-4), 371-380.

<sup>20</sup> Wouters, J., & Rosario-Chirinos, N. (1992). Dye analysis of pre-Columbian Peruvian textiles with high-performance liquid chromatography and diode-array detection. *Journal of the American Institute for Conservation*, 31(2), 237-255.

<sup>21</sup> J. Wouters, C.M. Grzywacz, A. Claro (2011). A comparative investigation of hydrolysis, Methods to analyze natural organic dyes by HPLC-PDA- nine methods, twelve biological sources, ten dye classes, dyed yarns, pigments and paints, *Stud. Conserv.* 56, 231-249.

<sup>22</sup> Dolan, J., Snyder, L. and Kirkland, J. (2013). *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley. 108-115

<sup>23</sup> Ndorbor T, Wang Y, Huaijing D, Zhizhang D, Kolawole JA, et al. (2013). Chromatographic and Molecular Simulation Study on the Chiral Recognition of Atracurium Besylate Positional Isomers on Cellulose Tri- 3, 5-Dimethylphenylcarbamate (CDMPC) Column and its Recognition Mechanism. *Journal of Chromatography and Separation Techniques*, 27, 143-165.

<sup>24</sup> Kirkland, J. J., Yau, W. W., Stoklosa, H. J., & Dilks Jr, C. H. (1977). Sampling and extra-column effects in high-performance liquid chromatography; influence of peak skew on plate count calculations. *Journal of chromatographic science*, 15(8), 303-316.

---

<sup>25</sup> R. J. Hamilton and P. A. Sewell (1977). *Introduction to High-Performance Liquid Chromatography*, Chapman and Hall, London, Chapter 3.

<sup>26</sup> Creel A., Howard F., (1993). Prospects for the Analysis of High Molar Mass Polymers Using MALDI Mass Spectrometry. *Trends in Polymer Science*, Reading (UK), Ed: Pure and Applied Macromolecular Chemistry Group Macro Group UK, 1.

<sup>27</sup> Harvey, D., (2002). *Química Analítica Moderna*, Madrid: Mc Graw Hill / Interamericana de España s.a., 570.

<sup>28</sup> Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer, Pacific Northwest National Laboratory; Battelle Memorial Institute tomada de la URL: <http://collaboratory.emsl.pnl.gov/projects/AAAS/fticr/sld001.htm> consultado por última vez 19/03/19

29 Emilio Gelpí. (2014). Métodos y mecanismos de ionización, *Manual de Proteómica*, 127-172.

<sup>30</sup> Scigelova, M., Bodas, B. and Schwartz, J.(2014). "Espectrómetro de masas de trampa iónica cuadrupolar", *Manual de Proteómica*; 313-328

31 Lee Q. Huang, Anthony Paiva, Ramadas Bhat, Mel Wong, (1996). Characterization of large, heterogeneous proteins by electrospray ionization-mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 7, 1219-1226.

<sup>32</sup> Gates, P., (2004). *Quadruple & Triple Quadrupole (QQQ) Mass Analysis*, The University of Bristol, School of Chemistry; mass spectrometry resource, 26, 195.

---

<sup>33</sup> Métodos Espectrométricos en Química Orgánica, (2006). Departamento de química orgánica; Facultad de ciencias naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

<sup>34</sup> Lech, K., Witkoś, K., & Jarosz, M. (2014). HPLC–UV–ESI MS/MS identification of the color constituents of sawwort. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(15), 3703–3708.

<sup>35</sup> Mantzouris, D., Karapanagiotis, I., Valianou, L., & Panayiotou, C. (2011). HPLC–DAD–MS analysis of dyes identified in textiles from Mount Athos. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(9), 3065-3079.

<sup>36</sup> Serrano, A., van den Doel, A., van Bommel, M., Hallett, J., Joosten, I., & van den Berg, K. J. (2015). Investigation of crimson-dyed fibres for a new approach on the characterization of cochineal and kermes dyes in historical textiles. *Analytica chimica acta*, 897, 116-127.

<sup>37</sup> Petroviciu, I., Berghe, I. V., Cretu, I., Albu, F., & Medvedovici, A. (2012). Identification of natural dyes in historical textiles from Romanian collections by LC-DAD and LC-MS (single stage and tandem MS). *Journal of Cultural Heritage*, 13(1), 89-97.

<sup>38</sup> Stathopoulou, K., Valianou, L., Skaltsounis, A. L., Karapanagiotis, I., & Magiatis, P. (2013). Structure elucidation and chromatographic identification of anthraquinone components of cochineal (*Dactylopius coccus*) detected in historical objects. *Analytica chimica acta*, 804, 264-272.

<sup>39</sup> Serrano, A., Sousa, M. M., Hallett, J., Lopes, J. A., & Oliveira, M. C. (2011). Analysis of natural red dyes (cochineal) in textiles of historical importance using HPLC and multivariate data analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(2), 735-743.

---

<sup>40</sup> Karapanagiotis, I., Daniilia, S., Tsakalof, A., & Chryssoulakis, Y. (2007). Identification of red natural dyes in post-byzantine icons by HPLC. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 28(5), 739-749.

<sup>41</sup> A. Chieli, J. Sanyova,(2016). *Spectrochimica Acta Parta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 162, 86-92.

<sup>42</sup> Peggie, D. A. (2007). Development and application of analytical methods for the identification of dyes on historical textiles. PhD thesis, The University of Edinburgh, UK.

<sup>43</sup> Del Rio, I. (2006). Grana Cochinilla Fina, Regalo de México para el mundo, Instituto Estatal de Ecología de Oaxaca, 3-27.

<sup>44</sup> González Villarruel, A. (2014). Palimpsesto: el huipil restaurado atribuido a la Malinche, Conservación del arte plumario, CONACULTA, 9-29.

<sup>45</sup> Marie-Claire Hennion, (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 856, 3-54.