



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA

“EXTRACCION Y ACETILACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA GRANA  
COCHINILLA (*Dactylopius coccus* COSTA)”

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C O

P R E S E N T A:

BELEM GÓMEZ HERNÁNDEZ

Asesores: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

M. en C. Julio Rodríguez Baños

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO 2006.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. José Roberto Villagómez Ibarra y el M. en C. Julio Rodríguez Baños.

	<b>Pág.</b>
<b>CONTENIDO</b>	<b>i</b>
<b>CONTENIDO</b>	<b>i</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>iii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>viii</b>
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cría y ciclo biológico</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Extractos</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Importancia de los metabolitos</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Colorantes</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Reacciones Químicas</b>	<b>14</b>
<b>II ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Importancia de la grana cochinilla</b>	<b>18</b>
<b>III JUSTIFICACIÓN</b>	<b>34</b>
<b>IV OBJETIVO</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Objetivos Específicos</b>	<b>35</b>
<b>V PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Obtención y Tratamiento de la muestra</b>	<b>36</b>
	<b>36</b>

<b>5.2 Obtención de Extractos</b>	<b>36</b>
<b>5.2.1 Extracto etanólico</b>	<b>37</b>
<b>5.2.2 Extracto acuoso</b>	<b>37</b>
<b>5.3 Separación de los compuestos por cromatografía en columna</b>	<b>38</b>
<b>5.3.1 Cromatografía en capa fina</b>	<b>39</b>
<b>5.4 Reacciones de los Extractos</b>	<b>39</b>
<b>5.4.1 Extracto etanólico</b>	<b>40</b>
<b>5.4.2 Extracto acuoso</b>	<b>40</b>
<b>5.5 Técnicas utilizadas para el análisis</b>	
<b>VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>6.1 Extracto etanólico</b>	<b>42</b>
<b>6.2 Reacción de acetilación del Extracto Etanólico</b>	<b>54</b>
<b>6.3 Reacción de acetilación del Extracto Acuoso</b>	<b>72</b>
<b>VII CONCLUSIONES</b>	<b>76</b>
<b>VIII PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS</b>	<b>77</b>
<b>VIII BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>78</b>

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del nopal.	2
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la grana cochinilla.	4
Tabla 3. Grados de calidad para la comercialización de la grana.	4
Tabla 4. Análisis proximal de la grana cochinilla <i>Dactylopius coccus</i> Costa.	5
Tabla 5. Especificaciones químicas para el carmín según F.D.A.	27
Tabla 6. Coloraciones adquiridas por el carmín dependiendo de la sal metálica empleada.	28
Tabla 7. Cromatografía en columna del extracto etanólico.	43
Tabla 8. Cromatografía en columna de las fracciones no coloridas del extracto etanólico.	45
Tabla 9. Cromatografía en columna del extracto etanólico de la grana cochinilla tratado con $\text{Ac}_2\text{O}$ .	56
Tabla 10. Cromatografía en columna de fracciones coloridas del extracto etanólico de la grana cochinilla tratadas con $\text{Ac}_2\text{O}$ .	56
Tabla 11. Recromatografía en columna de la fracción 24 del extracto etanólico de la grana cochinilla tratada con $\text{Ac}_2\text{O}$ .	57
Tabla 12. Datos de RMN de $^1\text{H}$ en $\text{CDCl}_3$ del Hexaacetato de <i>Myo</i> -Inositol 9.	59
Tabla 13. Datos de espectro de masa en $\text{CHCl}_3$ del Hexaacetato de <i>Myo</i> -Inositol 9.	59
Tabla 14. Cromatografía en columna del extracto acuoso acetilado.	72

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Grana cochinilla.	2
Figura 2. Invernadero de producción de grana cochinilla	19
Figura 3. Estructuras de Polihidroxiciclohexanos y polihidroxiciclohexeno.	21
Figura 4. Estructura del Metoxi-(+)-Pinitol 4 y Metoxi(-)-Quebranchitol 5.	23
Figura 5. Estereoisómeros de inositol.	23
Figura 6. Estructuras del Pentaacetato de Metoxi-Inositol 6, Sequoyitol 7, <i>Myo</i> -Inositol 8 y Hexaacetato de <i>Myo</i> -Inositol 9.	24
Figura 7. Primera estructura propuesta del ácido carmínico 10 y Ácido carmínico 11.	25
Figura 8. Estructuras propuestas para Ácido kermésico R= Ac 12, Ácido Carmínico R=CO-[CH-(OH)] <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub> 12 y Coccinin 13.	33
Figura 9. Estructura de los ácidos grasos obtenidos del extracto etanólico.	44
Figura 10. Espectro de masa experimental (a) del éster etílico del Ácido Dodecanoico 14 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.	46
Figura 11. Espectro de masa experimental (a) del éster metílico del Acido 14-metil-Hexadecanoico 15 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.	47

Figura 12. Espectro de masa experimental (a) del éster etílico del ácido Tetradecanoico 16 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.	48
Figura 13. Espectro de masa experimental (a), del éster metílico del ácido Dodecanoico 17 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.	49
Figura 14. Espectro de masa experimental (a) del éster metílico del ácido Tetradecanoico 18 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.	50
Figura 15. Espectro de masa experimental (a) del éster metílico del ácido 8,11-Octadecadienoico 19 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138, con un 99 % de calidad.	51
Figura 16. Espectro de masa experimental (a) del éster metílico del ácido Eicosanoico 20 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138, con un 99 % de calidad.	52
Figura 17. Espectro de masa experimental (a) del ácido 9,12-(z,z)-Octadecadienoico 21 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.	53
Figura 18. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz del extracto etanólico en $\text{D}_2\text{O}$ .	55
Figura 19. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz del Hexaacetato de <i>Myo</i> -Inositol en $\text{CDCl}_3$ .	60
Figura 20. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (a) experimental a 400 MHz del Hexaacetato de <i>Myo</i> -Inositol y (b) referencia a 360 MHz (ampliación de 5 a 5.7 ppm) en $\text{CDCl}_3$ (Mukherjee, <i>et. al.</i> ,1988).	61

Figura 21. Espectro de masa experimental (a) del Hexaacetato de <i>Myo</i> -Inositol 9 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.	62
Figura 22. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del Pentaacetato de $\alpha$ -Glucosa del catálogo Aldrich, en $\text{CDCl}_3$ .	64
Figura 23. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz de la $\alpha,\alpha$ -Octaacetil trehalosa, en $\text{CDCl}_3$ .	65
Figura 24. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz de la $\alpha,\alpha$ -Octaacetil trehalosa, en $\text{CDCl}_3$ .	66
Figura 25. Espectro de masa experimental (a) de la $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa y (b) referencia en la base de datos Wiley 138 con un 90 % de calidad.	67
Figura 26. Estructuras del Sinuatol 22, $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa 23 y Pentacetato de $\alpha$ -Glucosa 24.	68
Figura 27. Cromatograma de gases de la fracción 27 obtenido de la acetilación del extracto etanólico.	69
Figura 28. Espectro de masa experimental (a) del Pentaacetato de $\alpha$ -Glucosa 24 obtenido de la fracción 27 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138 con un 90 % de calidad.	70
Figura 29. Espectro de RMN $^1\text{H}$ a 400 MHz de la fracción 27, (1) Hexaacetato de <i>Myo</i> -Inositol, (2) Pentaacetato de $\alpha$ -Glucosa y (3) $\alpha,\alpha$ -Octaacetil trehalosa, en $\text{CDCl}_3$ .	71
Figura 30. Estructura del triacetato de 1,2,3-propanotriol 25.	73
Figura 31. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz del triacetato de 1,2,3-propanotriol, en $\text{CDCl}_3$ .	74

**Figura 32. Espectro de masa experimental (a) del triacetato de  
1,2,3-propanotriol 25 y (b) referencia en la base de datos  
Wiley 138.**

**75**

## BREVIATURAS

<b>No.</b>	<b>Número (abreviatura en inglés)</b>
<b>Pág.</b>	<b>Página</b>
<b>g</b>	<b>Gramo</b>
<b>ppm</b>	<b>Partes por millón</b>
<b><math>\alpha</math></b>	<b>Alfa</b>
<b><math>\beta</math></b>	<b>Beta</b>
<b><math>\gamma</math></b>	<b>Gama</b>
<b>h</b>	<b>hora</b>
<b>°C</b>	<b>grado Celsius</b>
<b>MHz</b>	<b>Mega Hertz</b>
<b>J</b>	<b>Constante de acoplamiento</b>
<b>EtOH</b>	<b>Etanol</b>
<b>AcOEt</b>	<b>Acetato de etilo</b>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	<b>Cloroformo</b>
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	<b>Cloroformo deuterado</b>
<b>D<sub>2</sub>O</b>	<b>Agua deuterada</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Agua</b>
<b>Hex.</b>	<b>Hexano</b>
<b>ml</b>	<b>Mililitros</b>
<b>M/Z</b>	<b>Masa/carga</b>
<b>P.M.</b>	<b>Peso molecular</b>
<b>p.f.</b>	<b>Punto de fusión</b>
<b>F.D.A</b>	<b>Food and Drugs Administrations</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>pH</b>	<b>Potencial Hidrógeno</b>

<b>Rf</b>	<b>Factor de referencia de desplazamiento</b>
<b>d</b>	<b>Densidad</b>
<b>N</b>	<b>Normalidad</b>
<b>nm</b>	<b>Nanómetro</b>
<b>Hz</b>	<b>Hertz</b>
<b>Amps.</b>	<b>Amperes</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloruro de sodio</b>
<b>HCl</b>	<b>Ácido clorhídrico</b>
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Ácido sulfúrico</b>
<b>Uv</b>	<b>Ultravioleta visible</b>
<b>máx.</b>	<b>Máxima</b>
<b>%</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Núm.</b>	<b>Número</b>
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	<b>Anhídrido acético</b>
<b>Me</b>	<b>Metilo</b>
<b>Kg</b>	<b>Kilogramo</b>
<b>cm</b>	<b>Centímetro</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetro</b>
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	<b>Resonancia magnética nuclear de protón</b>
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	<b>Resonancia magnética nuclear de carbono</b>
<b>TMS</b>	<b>Tetrametil silano</b>
<b>IE</b>	<b>Impacto electrónico</b>
<b>eV</b>	<b>Electrón Volts</b>
<b>m</b>	<b>Metro</b>

## **A G R A D E C I M I E T O S**

Primeramente doy gracias a Dios por que me ha concedido la vida y por que he culminado una etapa más de estudios en mi vida, y por el presente trabajo.

Al Dr. José Roberto Villagómez Ibarra por su amplio apoyo brindado para la elaboración del presente trabajo de investigación; así como también al M. en C. Julio Rodríguez Baños por el tiempo dedicado en la estructuración del trabajo aquí mostrado.

A ambos por la confianza que me tuvieron para la culminación de esta investigación y por la paciencia que asumieron durante el presente. Estos son los resultados.

A cada uno de los miembros del jurado, quienes con sus observaciones realizadas en el trabajo se concluyó de manera rápida, gracias.

A mi amiga Carol, quién de manera especial estuvo conmigo en las buenas y malas dando consejos de ánimo, y por el apoyo incondicional que me brindó durante la carrera; gracias amiga, eres única, cuenta conmigo siempre, te quiero.

A Gaby por sus consejos de aliento que mostró en los días difíciles.

A todos en general, con mucho cariño (al lector) espero le sirva de mucho y recuerda siempre:

“Si tienes ganas de hacer cosas y tener éxito. Decide lo que quieres, decide lo que eres, disponte a cambiarte por ello, establece tus prioridades y empieza a trabajar.”

## **AGRADECIMIENTO**

A la familia Villanueva Soto, de la colonia Jaltepec, municipio de Tulancingo, Hgo., quienes con su trabajo y producción de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) para la realización del proyecto de investigación aquí presente, por la explicación y respuesta a mis preguntas realizadas en la visita efectuada; además los exhorto a que no desistan en la producción de esta materia prima, aunque talvez aún no se ha tenido resultados como lo esperan pero sin lugar a duda con posteriores investigaciones que se espera se lleven a cabo, con la finalidad de no perder la producción y continuar su estudio, para darle una mejor aplicación a la misma.

## **D E D I C A T O R I A:**

A mis papás (papá y mamá) los quiero mucho y este trabajo de investigación está dedicado a ustedes porque nunca me dejaron sola, siempre estuvieron cuando los necesité y por todo el apoyo que me han brindado hasta el momento, por sus sabios consejos, ánimo y atención. Por sus desvelos y preocupaciones que les causé durante la carrera, este es uno de los frutos obtenidos con mucho esfuerzo y dedicación; y que lo logre deshaciéndome de los obstáculos presentes, gracias a las oraciones y consejos obtenidos de ustedes.

También dedico este trabajo a mis hermanos (as), a quienes también quiero mucho, que pasaron por muchas cosas que quizá no deberían, sinceramente les agradezco por estar conmigo siempre, por todo el apoyo moral que me mostraron en esta larga jornada, ahora vemos aquí los resultados y que esto lo tengan siempre presente y espero que también ustedes hermanos, luchen por lo que quieren y no desistan, es difícil, pero no imposible. Siempre se logra lo que quieres, si te lo propones y luchas para conseguirlo. Es una gran experiencia, espero lo entiendan.

Para toda mi familia les dedico mi trabajo y espero siempre tengan Éxito en la vida y que Dios los cuide siempre.

## R E F L E X I O N E S

Si lo que estas recorriendo es el camino de tus sueños, comprométete con él.

No dejes la puerta de salida abierta con la disculpa: "En realidad no era esto lo que yo quería". Esta frase -tan utilizada- guarda dentro de sí misma la semilla de la derrota.

Asume tu camino. Aunque debas dar pasos inciertos, aunque sepas que puedes hacerlo mejor de lo que lo estás haciendo.

Si aceptas tus posibilidades en el presente, con toda certeza mejorarás en el futuro.

Pero si niegas tus limitaciones jamás te verás libre de ellas.

Enfrenta el camino de tus sueños con valor, no tengas miedo a la crítica de los demás.

Y -sobre todo- no te dejes paralizar por tu propia crítica.

Dios estará contigo en las noches de insomnio y enjugará con su amor tus lágrimas ocultas.

Dios es el Dios de los valientes.

Aspira al éxito, no a la perfección.

Nunca renuncies al derecho que tienes de equivocarte, por que , sino, perderás la capacidad de aprender cosas nuevas y de avanzar en tu vida .

Recuerda que el miedo siempre se oculta bajo las ansias de perfección.

Encarar tus miedos, y permitirte a ti mismo el derecho de ser humano puede, paradójicamente, hacerte una persona muchísimo más feliz.

## I INTRODUCCION

El nopal es una planta que pertenece a la familia *Cactaceae*, endémica del continente Americano. Con una distribución desde Canadá hasta la república de Argentina, (Téllez, *et. al.*, 2003). El nopal (*Opuntia ssp.*) se encuentra distribuido en casi todo el mundo exceptuando las regiones cercanas a los polos y algunos desiertos (Granados, *et. al.*, 1991). México es considerado como uno de los centros de origen de la planta del nopal; tradicionalmente ha sido uno de los alimentos utilizados como verdura de mayor consumo del pueblo mexicano; tanto que lo encontramos en las regiones áridas y semiáridas de México y del mundo. El género *Opuntia* comprende plantas perennes, suculentas, simples o cespitosas, arborescentes, arbustivas o rastreras. El tronco bien definido o con ramas desde la base, erectas, extendidas o postradas, artículos globosos, claviformes, cilíndricos o aplanados que se conocen como cladodios, muy carnosos o leñosos. Limbo de hojas pequeño, cilíndrico, carnoso, caduca muy pronto. Aréolas axilareas con espinas, pelos, glóquidas y a veces glandulares; por lo general, las de la parte superior de los artículos son las productoras de flores (Sheinvar, 2004).

El nopal es una planta silvestre que también se cultiva en nuestro país y sobrevive en regiones desérticas y frías, no requiere de mucha agua para su cultivo, por lo que es una buena fuente de ingresos para muchos agricultores que no cuentan con los recursos necesarios y viven en zonas áridas o semiáridas. En los últimos años en estas plantas se ha encontrado que también se produce una plaga denominada cochinilla silvestre (figura 1), constituida taxonómicamente por varias

especies de insectos que se multiplican y dispersan rápidamente, y que además destruyen sus plantas huéspedes, lo que ocasiona considerables pérdidas económicas entre los productores de nopal y tuna (Téllez, *et. al.*, 2003).



**Figura 1. Grana cochinilla.**

La clasificación taxonómica del nopal es la que sigue de acuerdo al sistema Barthlott y Hunt 1983, (Scheinvar, 2004).

**Tabla 1. Clasificación taxonómica del nopal.**

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Embryophyta Siphonogama</i>
División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Dialipetalae</i>
Orden	<i>Cactales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i> Lindl.
Subfamilia	<i>Opuntioideae</i> Schum.
Género	<i>Opuntia</i> Mill.
Subgénero	<i>Opuntia (Platyopuntia)</i>
Especie	<i>ficus indica</i> , var. <i>atlixco</i>

Fuente: Scheinvar, 2004.

La grana cochinilla es un insecto fitófago del orden *homoptera*, familia *Dactylopiidae*; pertenece al género *Dactylopius*, vive sobre cactáceas de los géneros *Opuntia* y *Nopalea* y es conocida debido a que contiene ácido carmínico en su cuerpo, por lo que es cultivado para la obtención del carmín comercial, con respecto a la cochinilla silvestre que se emplea artesanalmente. El carmín es utilizado como colorante natural de tonalidades rojo púrpura en las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica. Dentro de la superfamilia *Coccoidea*, también se incluyen la cochinilla algodonosa y las lapillas. A la superfamilia *Coccoidea* pertenece la familia *Dactylopiidae*, formada por nueve especies del género *Dactylopius*. Costa en 1835 fue quien denominó a la cochinilla *Dactylopius coccus* siendo este el nombre que prevalece hasta nuestros días. Su clasificación taxonómica se muestra en la tabla 2.

Las cochinillas son un tanto ovaladas, de 3.5-5.5 mm de longitud. La cara es convexa dorsal muestra de 9 a 11 segmentos, pero no hay contracciones entre la cabeza, el tórax y el abdomen. La cochinilla *Dactylopius coccus* se distingue fácilmente de la grana corriente por el color rojo característico y además de que no contiene mucho algodón como la corriente (Ferris, 1955). El insecto tiene un par de antenas de siete artejos y tres pares de patas muy poco aparentes. La superficie del cuerpo está provista de glándulas tubulares que segregan cera, cuya fusión por calor influye en la diferencia de color por la concentración del ácido carmínico entre las que se encuentra: grana jaspeada o plateada, y grana negra (Téllez, *et. al.*, 2003).

**Tabla 2. Clasificación taxonómica de la grana cochinilla.**

Clase	<i>Insecta</i>
Orden	<i>Homoptera</i>
Suborden	<i>Sternorrhyncha</i>
Superfamilia	<i>Coccoidea</i>
Familia	<i>Dactylopiidae</i>
Género	<i>Dactylopius</i>
Especie	<i>coccus</i>

Fuente: Bojorquez, *et. al.*, 1990, Pérez, 1992, Reyes, 1991.

El análisis químico realizado por Rodríguez, *et. al.*, 1988 a *Dactylopius coccus* presentó valores del 15 y 20 % de ácido carmínico en peso seco (tabla 3), mientras que la especie silvestre contiene tan solo un 7 % del mismo.

**Tabla 3. Grados de calidad para la comercialización de la grana.**

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

Fuente: Piña, 1979.

El sistema inmune de la cochinilla ha sido poco estudiado. Sin embargo, existe la propuesta de que el ácido carmínico presente en la hemolinfa realiza un papel en la defensa del insecto; a pesar de la posible actividad del ácido carmínico como

agente defensivo de la cochinilla, el gusano telero (*Laetilia coccidivora*), predador importante de la cochinilla, es capaz de tomar el colorante, almacenarlo en el sistema digestivo y posiblemente usarlo para su propio provecho (Eisner, *et. al.*, 1994). En la tabla 4 se puede observar el análisis proximal realizado por López, a la grana cochinilla, reportando en porcentaje de sus componentes (Téllez, 2003).

**Tabla 4. Análisis proximal de la grana cochinilla *Dactylopius coccus* Costa.**

Proteínas	32.27%
Grasas (lípidos)	1.59%
carbohidratos	20.0%
Cenizas	11.03%
Fibra cruda	9.38%
Extracto libre de nitrógeno	45.73%

Fuente: López, 2000.

## 1.1 Cría y ciclo biológico

A partir del comienzo de la ovoposición, las hembras pueden vivir alrededor de 30 días mientras que los machos adultos al no alimentarse viven tan solo 3 días, durante los cuales puede fecundar a varias hembras. Los machos miden aproximadamente 1 mm de longitud y estos son ágiles por que pueden volar, mientras que las hembras miden unos 2 mm de longitud y son ápteras. Durante su desarrollo la grana cochinilla pasa por los estadios de huevo, ninfa y adulto. El estadio de huevo es liso, lustroso y ovalado, cuyas dimensiones son de 0.72 X

0.33 mm, y la ninfa de hembra como de macho, es roja, cuerpo oval alargado mide 0.83 X 0.43 mm, con un par de ojos esféricos, antenas de seis a siete segmentos, patas largas y delgadas (Marín, *et. al.*, 1977). Posteriormente la ninfa I comienza a diferenciarse a color rojo oscuro, ovoide y aumenta de tamaño, 2.67 X 2.0 mm, las antenas y las patas reducidas no presentan los filamentos característicos del primer instar y se incrementa tanto el número de poros agrupados como el número de poros por grupo. Las hembras alcanzan hasta cerca de dos veces su tamaño inicial, debido a la presencia de las larvas en desarrollo; produciendo materia roja colorante. Las larvas alcanzan la madurez en 14 días y salen del cuerpo de la madre ya muerto. Sólo una pequeña porción de larvas se convierte en machos, debido a la temperatura del invernadero; a temperatura mayor de 35 °C nacen más machos, y de 25 a 35 °C nacen más hembras. Durante la primera quincena, las hembras jóvenes caminan por la planta y los machos vuelan. El ciclo vital dura seis semanas y se puede producir en una estación de 3 a 5 generaciones de insectos (Téllez, *et. al.*, 2003).

## **1.2 Extractos**

La extracción es un proceso de obtención cuyo objetivo es adquirir los compuestos de interés de la materia prima. Los extractos garantizan niveles constantes de los principios activos de la materia prima y permite una dosificación más precisa y efectiva de nuestro objeto de estudio. Antiguamente era difícil determinar la potencia de un extracto concentrado debido a las grandes variaciones de calidad de la materia prima provocada por las técnicas empleadas

en el cultivo, recolección y fabricación de las mismas; actualmente los extractos estandarizados permiten solventar este problema.

De tal modo que un extracto estandarizado consiste en la preparación de la materia prima que contiene los principios activos de la misma. La estandarización es la mejor manera de asegurar que el extracto contiene los principios activos necesarios para obtener el efecto deseado. Los extractos pueden ser líquidos o sólidos de la materia prima en estudio.

### **1.3 Importancia de los metabolitos**

Un metabolito es cualquier sustancia producida por las reacciones químicas que se llevan a cabo dentro de los organismos vivos, que generalmente se refiere al producto final como: carbohidratos, lípidos, proteínas, colorantes, entre otros.

Los metabolitos primarios o secundarios, tienen diferentes e importantes funciones en los seres vivos, los metabolitos ayudan en el desarrollo y funcionamiento del organismo.

**Los carbohidratos** son componentes estructurales de las paredes de las células vegetales y de la madera de los árboles (Carey, 1999). Están formados por unidades estructurales de monosacáridos, que se pueden clasificar según el número de unidades de sacáridos que se combinen en una molécula. En la mayoría de los carbohidratos, cada carbono lleva un grupo funcional, cuya naturaleza cambia al alternar la molécula entre formas de cadena abierta y

hemiacetal. Se clasifican como: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (Devore, *et. al*, 1994).

**Los lípidos** conocidos también como ácidos grasos, son llamados ácidos monocarboxílicos de número par de átomos de carbono (Devore, *et. al.*, 1994). En los lípidos se incluyen las grasas, aceites, esteroides, ceras y compuestos relacionados. Los lípidos pueden clasificarse como: Lípidos simples donde se incluyen ésteres de ácidos grasos y un alcohol; Lípidos complejos donde podemos encontrar fosfolípidos, glucolípidos, entre otros. Otros lípidos precursores y sus derivados incluyen: ácidos grasos, glicerol, esteroides, aldehídos, grasas y cuerpos cetónicos, alcoholes adicionales al glicerol y a los esteroides; así como vitaminas liposolubles y hormonas (Bohinski, 1991).

**Las ceras** son una mezcla de ésteres, aunque diferente por el hecho de que tanto el alcohol como el ácido que la constituyen tienen cadena de hidrocarburos larga y lineal. Las ceras naturales y sintéticas tienen muchas aplicaciones comerciales. En la naturaleza suelen ser productos cuya función biológica es servir como capa química protectora de frutas (Bohinski 1991). La cera de cochinilla es un producto que aún no se le ha dado el uso adecuado, por lo que no tiene valor comercial, dado a la falta de estudios y evaluaciones correspondientes. Sin embargo, investigaciones realizadas indican que la cera de cochinilla es un producto natural que presenta propiedades adecuadas para ser utilizados en el encerado de frutos de alta calidad y probablemente un buen sustituto de la cera de abeja y de candelilla (Vázquez, 2003).

**Los ácidos grasos** son ácidos carboxílicos alifáticos, se presentan sobre todo como ésteres en las grasas y aceites naturales; también existen en forma no esterificada como ácidos grasos libres. Por lo general, los ácidos grasos presentes en las grasas naturales consisten en derivados de cadena lineal y contienen un número par de átomos de carbono, ya que se sintetizan a partir de unidades de dos carbonos. La cadena puede estar saturada o no saturada. Los ácidos grasos insaturados contienen uno o más enlaces dobles, y pueden subdividirse como sigue:

**Ácidos Monoinsaturados** los cuales contienen un enlace doble y presentan el tipo de isomería geométrica, la cual depende de la orientación de los átomos o grupos alrededor de los ejes de los enlaces dobles de la molécula (Espinoza, *et. al.*, 2004).

**Ácidos poliinsaturados** con dos o más enlaces dobles. El eicosanoide es un derivado de los ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono, destacando el ácido araquidónico, presente en las [membranas](#) de las [células](#) corporales, y es uno de los ácidos grasos esenciales requeridos por la mayoría de los mamíferos.

**Los triacilgliceroles** (triglicéridos) son la principal forma de almacenamiento de los ácidos grasos en los seres vivos, los triacilgliceroles son ésteres de ácidos grasos con el glicerol, como tal representa un porcentaje importante del peso corporal en los seres vivos. En las grasas presentes en la naturaleza es muy pequeña la proporción de moléculas de triacilglicerol con el mismo residuo de ácido graso en las tres posiciones del éster. Casi la totalidad de dichas moléculas son acilgliceroles mixtos (Murray, *et. al.*, 2001).

## 1.4 Colorantes

Dentro de las sustancias que producen los seres vivos se encuentran un tipo de metabolitos que se caracterizan por producir color y que han sido aprovechados por el hombre en diversas formas. Estas sustancias se conocen como colorantes y se definen como aquel compuesto que se utiliza para dar color a diversos productos comerciales como: alimentos, bebidas, cosméticos, textiles, medicamentos, entre otros. El color que proporciona depende de varios factores: estructura química, estabilidad, forma de fijación, origen y lugar donde se va a aplicar (finar, 1998).

En la industria textil, un colorante es una sustancia que penetra y permanece coloreando uniformemente las fibras textiles. Si el colorante conserva el mismo tono y concentración a través de la vida de la tela a la cual ha sido aplicada se habla de permanencia. Cada colorante deberá ser seleccionado para llenar los requisitos de calidad exigidos en función de su uso final (finar, 1998).

Para que una sustancia actúe como colorante deben cumplirse determinadas condiciones:

Debe tener un color apropiado, poder fijarse por sí misma al tejido, una vez fijada debe ser persistente, esto es, estable a la luz, debe ser resistente a la acción del agua, en cierta extensión a los ácidos y álcalis diluidos; en particular referente a los álcalis se debe tener en cuenta la naturaleza alcalina de la sosa de lavado (finar, 1998).

Para el químico, un colorante es una combinación de estructuras no saturadas conteniendo ciertos grupos conocidos como cromóforos y auxocromos. Witt le dio el nombre de cromóforos al grupo con enlaces múltiples; además de que son los responsables de la absorción de la luz. Los cromóforos imparten color a la molécula y los auxocromos intensifican el color y mejoran la afinidad del colorante por la fibra. La combinación de cromóforos y la estructura no saturada es llamada cromógeno (Espinoza, *et. al.*, 2004).

Por otro lado Nietzki (1879) aportó que la intensidad del color se debía al aumento del peso molecular del compuesto (Devore, *et. al.*, 1994). La intensidad del color, químicamente hablando significa el cambio de color en la forma siguiente:

Amarillo → naranja → rojo → púrpura → violeta → azul →  
verde → negro.

Los colorantes se clasifican de forma general en naturales y sintéticos, según su procedencia.

El hombre se ha servido de los colorantes desde hace miles de años y los primeros tuvieron un origen natural, aunque los que se emplean hoy en día son en su mayoría artificiales. Hacer una distinción clara entre los colorantes naturales y artificiales es difícil, porque al final lo natural debe ser tratado químicamente para que sea estable, identificable y uniforme en el tono. Los colorantes naturales o también llamados no certificados, se obtienen de fuentes naturales, ya sean vegetales, animales, minerales y microorganismos; debido a que se consideran inocuos para la salud y son permitidos sin restricciones, están exentos de certificación (Bianco, *et. al.*, 1981).

Los colorantes vegetales juntamente con los colorantes animales, constituyeron principalmente las materias exclusivas para la tintorería y el estampado. Después del descubrimiento de los colorantes sintéticos muchos productos importantes como la rubia y el índigo fueron sustituidos por los colorantes del grupo del alquitrán (Espinoza, 2004).

A continuación se describe una serie de colorantes naturales, sus propiedades y usos en diferentes alimentos.

**E-100 Curcumina** colorante natural que es obtenido de *Curcuma longa* L., Familia: Zingiberáceas. La curcumina es el colorante de la cúrcuma, especie obtenida del rizoma de la planta del mismo nombre, producida y cultivada en la India. Por presentar un color amarillo, la curcumina se utiliza como colorante en mostazas, preparados para sopas, caldos y algunos productos cárnicos. El colorante de la cúrcuma se absorbe relativamente poco en el intestino, y aquel que es absorbido se elimina rápidamente por vía biliar. Tiene una toxicidad muy pequeña. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la dosis diaria admisible es, provisionalmente de hasta 0.1 mg/Kg de colorante y 0.3 mg/Kg de oleorresina.

**E-101 Riboflavina** es una vitamina del grupo B, concretamente la denominada B<sub>2</sub>. Es la sustancia que da color amarillo al suero de la leche, alimento que es la principal fuente de aporte junto con el hígado. Como colorante tiene la ventaja de ser estable frente al calentamiento. Este aditivo es relativamente poco utilizado, cuando se emplea como colorante no pueden hacerse indicaciones acerca del enriquecimiento vitamínico en la publicidad del alimento. En España se limita su uso en el yogur a 100 mg/Kg y en las conservas de pescado a 200 mg/Kg. En otros productos no tiene limitación.

**E-120 Cochinilla** (ácido carmínico) es probablemente el colorante con mejores características tecnológicas entre los naturales, pero se utiliza cada vez menos debido a su alto costo. Confiere a los alimentos en los que se le añade un color rojo muy agradable utilizándose en conservas vegetales y mermeladas, hasta 100 mg/kg en helados y productos cárnicos, en lácteos como en yogur y queso fresco 20 mg/kg de producto y en bebidas tanto alcohólicas como no alcohólicas no se conocen efectos adversos para la salud producidos por este colorante.

**E-141** son complejos cúpricos de clorofila y clorofilinas. Las clorofilas son los pigmentos responsables del color verde de las hojas de las plantas y de los frutos inmaduros. El interés por la clorofila en alimentos no estriba tanto en su uso como aditivo, sino para evitar que se degrade el alimento durante el procesado y almacenamiento, cuando se encuentra presente en forma natural en los alimentos de origen vegetal.

Otros colorantes naturales utilizados en la industria de los alimentos son los siguientes:

**E-150** Caramelo

**E-153** Carbón medicinal vegetal

**E- 160** Carotenoides

**E- 160 a**  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -caroteno

**E- 160 b** Bixino, Norbixina (Rocou, Annato)

**E- 160 c** Capsantina, capsorrubina

**E- 160 d** licopeno

**E- 160 e**  $\beta$ -apo-8'-carotenal

**E- 160 f** Éster etílico del ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenoico.

## 1.5 Reacciones Químicas

Los procesos químicos están relacionados con cambios en la naturaleza de las sustancias que participan en ellos, los cuales a partir de sustancias reaccionantes denominadas reactivos se obtienen nuevas sustancias totalmente diferentes, denominadas productos. Los reactivos rompen sus enlaces originales para formar otro tipo de enlaces diferentes y distribuyendo sus átomos también de manera diferente. Las características que se observan son cambios en las propiedades químicas de las sustancias reaccionantes y una variación de energía que se pone de manifiesto en el transcurso del proceso. La velocidad de la reacción aumenta en presencia de un catalizador, sustancia que no resulta alterada o se regenera, por lo que el proceso continúa.

La importancia de dichas reacciones es notoria en muchos aspectos de la vida diaria, en fenómenos tales como explosiones, procesos vitales como la alimentación, respiración, entre otras. Todas las sustancias que a diario utilizamos son o fueron producto de reacciones químicas (Carpi, 2003).

Existen diferentes tipos de reacciones, dependiendo de lo que se pretende realizar y pueden ser: Reacciones de adición, oxidación, reducción, síntesis y de descomposición, entre otras (Carey, 1999).

## II ANTECEDENTES

El nopal es una planta cactácea que interactúa en mayor o menor proporción con diversos insectos, cuando alguno de estos se presenta en abundancia y daña en forma significativa los intereses del cultivo se le considera plaga. Entre estas plagas destaca la cochinilla silvestre que es muy peligrosa por lo que se debe eliminar, ya que cuando se disemina mucho esta plaga se debe destruir la planta. Por otro lado, se encuentra la cochinilla fina que produce un tinte (ácido carmínico) utilizado como colorante en alimentos, fármacos, cosméticos, entre otros. En el mundo se producen más de mil toneladas al año, mismas que se procesan para elaborar diversos derivados del colorante natural (Portillo, 2003).

Desde épocas precolombinas este insecto fue utilizado para pintar y teñir. Durante la Colonia, la nueva España fue el primer abastecedor mundial, de manera que esta actividad se ubicó como una de las más productivas de la grana cochinilla (Portillo, *et. al.*, 2003). Sin embargo, en la Independencia inició un decaimiento en su producción por lo que los españoles trasladaron los cultivos a Perú y las Islas Canarias, lo que disminuyó la demanda del producto. Aunado al desarrollo de tintes a base de anilinas más económicos que el colorante de la grana, provocó la desatención en el cultivo del insecto.

El origen geográfico de la grana cochinilla se basa en dos teorías, la primera dice que fue en la zona Mixteca del estado de Oaxaca, donde los nopales hospederos del insecto fueron llevados a Perú durante el siglo XVII; la segunda teoría indica que fue en Perú donde se originó y fue traída a la nueva España antes de la

conquista (Piña, 1979). Otras investigaciones basadas en el estudio de los textiles de las culturas preincaicas que son más antiguas que las culturas mixteca y zapoteca de nuestro país explican que el cultivo y uso de la cochinilla surgió en ambos países antes de la llegada de los españoles (Ottestatter, 1990).

La creciente demanda de ácido carmínico en las industrias para pigmentar alimentos, fármacos y cosméticos, ha motivado el interés por producir grana cochinilla del nopal *Dactylopius coccus* Costa en diferentes regiones del mundo. En Perú, Islas Canarias y Chile que son productores importantes del insecto; la cría de la cochinilla se hace principalmente a cielo abierto, tanto en plantaciones establecidas como en nopaleras silvestres.

Otros insectos productores de pigmentos rojos empleados en Europa antes de la introducción de la cochinilla americana fueron:

**Cochinilla de Polonia** (*Porphyrophora polonica*), es parásito de la raíz de la *Sleranthus perennis*, su principal colorante es el ácido carmínico y el ácido kermésico (Roquero, 2000).

**Cochinilla de Armenia** (*Porphyrophora hameli*) parásito de las especies *Aeluropus litorales* y *Phragmites communis*, se obtenían el ácido carmínico (Roquero, 2000).

**Grana kermes** (*Kermes vermilio*) parásito de la coscoja cuyo nombre científico es *Quercus coccifera*, utilizado para la obtención del ácido kermésico y flavokermésico. La concentración de pigmento para estos colorantes es más baja que la de la cochinilla *Dactylopius coccus* (Roquero, 2000).

Durante la época colonial el cultivo de la cochinilla fue ampliamente promovida por los españoles en diversas regiones de la nueva España, constituyendo el segundo producto de exportación a Europa después de la plata. Los extranjeros que residían en Sevilla eran ingleses, flamencos, franceses y hombres provenientes de las principales ciudades italianas, fueron los que negociaron la cochinilla a otros países (Téllez, 2003).

El éxito del cultivo de cochinilla era contundente, se sembraban miles de hectáreas de nopal y el monocultivo de la grana pronto se convirtió en la base de la economía de las Islas Canarias España. Con el caos administrativo y económico que prevalecía en México después de la Guerra de Independencia, la cochinilla proveniente de las Islas Canarias pronto acaparó el mercado mundial; para el año de 1870 la producción fue de más del doble que la del Nuevo Mundo y seis veces mayor que la de Oaxaca. El negocio de la grana estaba vinculado a la consignación de buques y al [carboneo](#), pues los barcos británicos que hacían escala en Santa Cruz, en su viaje de vuelta aprovechaban su estadía para cargarla. Los mejores años de producción en México fueron de 1845 a 1866, pues solo en este último se exportaron al mercado británico más de tres millones de libras. Los fletes de retorno a Europa constituyeron el elemento clave para entender el comercio de la cochinilla en este siglo. La política [librecambista](#) inglesa propiciada a partir de 1846, liberó las exportaciones canarias de cargas y gravámenes arancelarios, así como el alentador efecto de las franquicias insulares, lo anterior a partir de 1852 favoreció la importación de abonos y un gran impulso productivo y comercial de grana (Roquero, 2000). Cuando en la Exposición Internacional de Londres (1862) se presentaron los avances de la Química en relación a los colorantes artificiales obtenidos a partir de la hulla se

aceleró el proceso de crisis en la exportación de la grana. Actualmente el abastecimiento comercial de la grana cochinilla para cubrir en parte las necesidades de mercado interno de México proviene principalmente de Perú, entre otros productores como son las islas Canarias, Italia y Francia (Téllez, 2003).

## **2.1 Importancia de la grana cochinilla**

Debido a la creciente demanda de productos naturales, principalmente en la industria alimentaria, es de gran importancia el estudio de colorantes de origen natural en el que destacan principalmente el ácido carmínico, por su estabilidad y rendimiento, proviniendo de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa). Es de importancia su investigación ya que la obtención de dicho colorante no se encuentra difundido en México, así como también la producción de la grana cochinilla y por consiguiente la explotación de las regiones áridas donde se desarrolla el hábitat natural de la cochinilla que es el nopal, con lo que repercutirá a la economía nacional. Esto se debe principalmente al giro total de la utilización de los tradicionales colorantes sintéticos algunos de ellos dañinos para el ser humano a diferencia de los colorantes naturales, lo que ha permitido que esa actividad se utilice como complemento para cubrir el mercado interno. Además, se sabe que estos insectos causan daño externo a los tallos de la planta y a las raquetas. Cuando vive es de color negro cubierta de polvo blanco y se reproduce en diferentes especies de nopal de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, este insecto

es el producto formado por los cuerpos secos de las hembras adultas al morir y deshidratarse (figura 2), (Brana, 1964).



**Figura 2. Invernadero de producción de grana cochinilla**

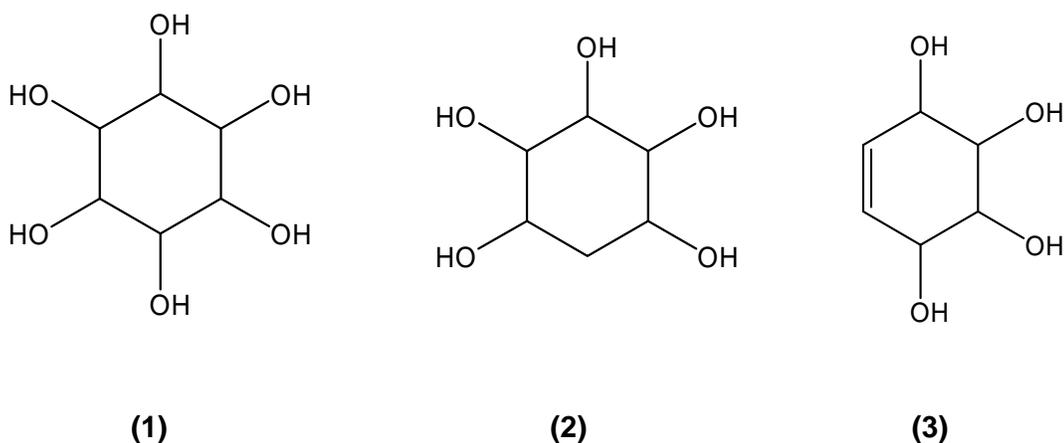
En investigaciones recientes de la grana cochinilla, llevados a cabo en nuestro grupo de trabajo (Espinoza, *et. al.*, 2004); se encontraron carbohidratos (azúcares) importantes como la trehalosa, la cual se obtuvo del extracto etanólico de la grana cochinilla en buen rendimiento; una de sus propiedades importantes es que no sufre mutarrotación y es fácil de manipularla. La trehalosa protege las estructuras biológicas del daño contra la desecación, el frío, altas temperaturas, choque térmico y otros tipos de estrés. Se ha propuesto que la trehalosa protege a los organismos contra los diferentes tipos de estrés mencionados, porque estabiliza a las enzimas, proteínas y membranas deshidratadas. Recientemente se ha reportado que bajo esta condición la matriz formada por la trehalosa impide los cambios conformacionales de las proteínas. Este último efecto, a nivel de

movimiento de dominios de enzimas, da como resultado la inhibición de la función catalítica (Sampedro, 2002).

También se han aislado ácidos grasos de cadena lineal, que son importantes en los seres vivos, como el ácido linoleico **19** y el linolénico. El ácido linoleico es un ácido graso esencial para el organismo humano. Una parte de este ácido debe ser saturado con hidrógeno para que los alimentos sean más estables, lo que hace que se originen grasas hidrogenadas y de configuración *trans*, que en nuestro organismo se comportan como las grasas saturadas; el ácido linoleico es un componente estructural muy importante de la piel y cuando es aplicado tópicamente tiene un efecto profundo sobre ella, evitando la pérdida de agua *trans* epidérmica, mejorando la circulación en los capilares de la piel y regulando el proceso de formación de la piel (Gaullier, *et. al.*, 2004, Bohinski, 1991).

En el caso de los inositoles ó alcoholes hexahídricos cíclicos: son derivados de la glucosa, pero se desconocen las vías metabólicas por las que tiene lugar este proceso. Se ha demostrado que tanto los microorganismos como las plantas llevan a cabo la conversión de la glucosa en inositol. Investigaciones con isótopos, acerca de la conversión por la levadura de la glucosa en *Myo*-Inositol han indicado que no existe una ciclación directa de la hexosa y que el inositol se forma por condensación de los fragmentos formados por degradación de la glucosa (Charalampous, 1957). Fisher (1945) sugirió que el inositol es un intermediario entre los carbohidratos y los compuestos aromáticos, lo que implicaría la existencia de relaciones metabólicas entre el inositol y el ácido siquimico (Schumm, 1998).

Recientemente a los ciclitoles se les han dado una importante atención de estudio por sus diversas actividades biológicas, por ejemplo el 1,4,5-trifosfato de *Myo*-Inositol es un segundo mensajero que controla muchos procesos celulares por generación interna de calcio. Los polihidroxiciclohexanos tales como Inositol **1** y Quercitol **2** y polihidroxiciclohexenos como el Conduritol **3**, tienen 9, 16 y 6 estereoisómeros respectivamente (figura 3) (Mukherjee, *et. al.*, 1984). De esta familia de ciclitoles, los inositoles son los de mayor importancia, en particular el *Myo*-Inositol **8** (figura 6) se considera un miembro de la familia del complejo B, por lo que se encuentra en casi todas las células y es necesario para la adecuada formación de las membranas celulares, asimismo para las transmisiones nerviosas y para transportar las grasas fuera del organismo (Carrillo, 2004). El inositol se encuentra en el cerebro humano, estómago y riñón, su función es ayudar a reponer la flora bacteriana. El inositol se encuentra en formas naturales en numerosos alimentos, como el germen de trigo, artículos leguminosos y tejidos animales. El cuerpo humano también puede sintetizarlo mediante la acción de bacterias (Schumm, 1998).

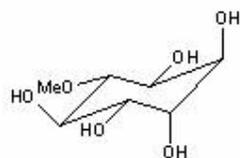


**Figura 3. Estructuras de Polihidroxiciclohexanos y Polihidroxiciclohexeno.**

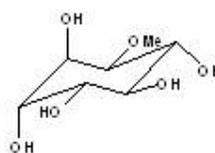
El isómero más importante de los inositoles es el ópticamente inactivo meso-inositol conocido como *Myo*-Inositol **8** (figura 6), profundamente distribuido entre plantas y animales; existe en grandes cantidades (1 g por 100 ml, aprox.) en el semen del verraco (Peter, *et. al.*, 1998). El *Myo*-Inositol **8** posee un plano de simetría con 5 grupos hidroxilo ecuatoriales y 1 grupo hidroxilo axial, está presente en todo organismo vivo, el *Myo*-Inositol se ha aislado también de dos tipos de plantas específicamente en hojas de *Podocarpus sellowii* y *Croton celtidifolius* colectadas de Caruaru, Pernambuco y en la parte subtropical del sur en Santa Catarina Brasil respectivamente (Mukherjee, *et. al.*, 1984).

El *Myo*-Inositol **8** es un precursor en el ciclo del fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>), una fuente de dos mensajeros: diacilglicerol (DAG) y trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) que controla muchos procesos celulares por generación interna de calcio. Otro isómero del inositol (*D-chiro*-inositol) es considerado uno de los constituyentes significativos de mediador de cálculos de insulina (Carrillo, 2004).

De los nueve estereoisómeros de inositol, siete tienen forma aquirales y una pareja enantiomérica *L* y *D-chiro*. El *myo*-inositol está presente en todo organismo vivo. El *D*- y *L-Chiro*-inositol son compuestos que se obtienen de forma natural a partir de Metoxi-(+)-Pinitol **4** y Metoxi-(-)-Quebranchitol **5**, respectivamente (figura 4). Los otros seis restantes no se encuentran de forma natural y se requieren de muchas rutas sintéticas para su obtención. Los inositoles están próximamente emparentados con los alcoholes hexaédricos de cadena lineal (Rex, *et. al.*, 1975).



(4)



(5)

Figura 4. Estructura del Metoxi-(+)-Pinitol 4 y Metoxi(-)-Quebranchitol 5.

A los 9 estereoisómeros de inositol se les antepone un prefijo: *cis-*, *epi-*, *allo-*, *myo-*, *muco-*, *neo-*, *scyllo-*, *L-chiro-* y *D-chiro-* como se muestra en la figura 5.

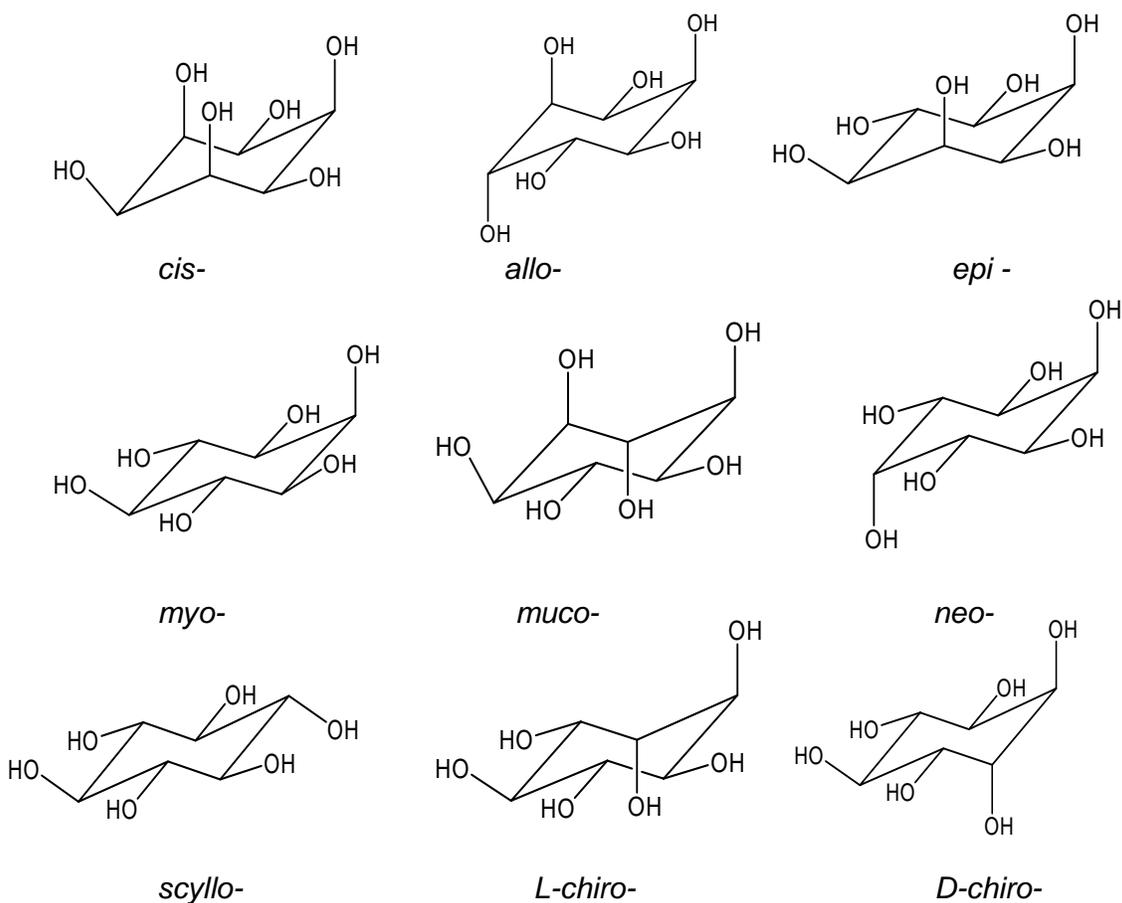
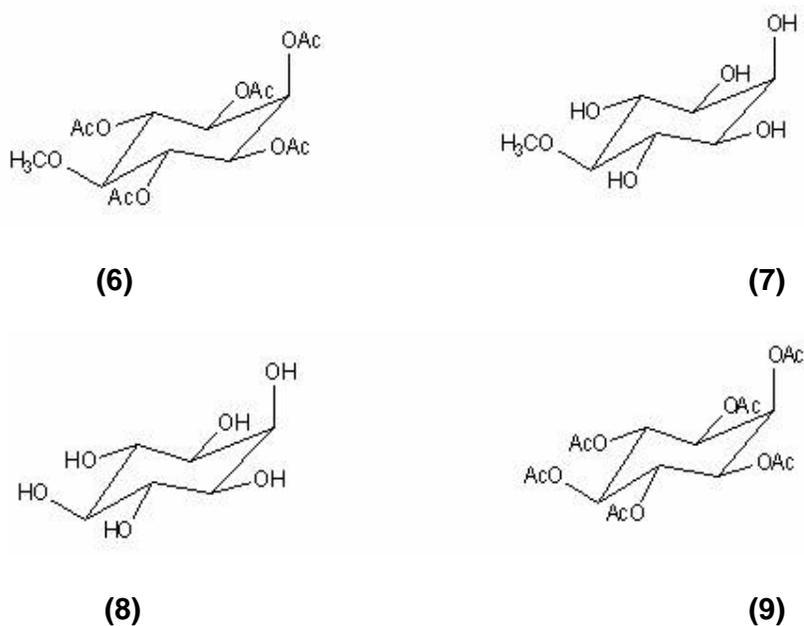


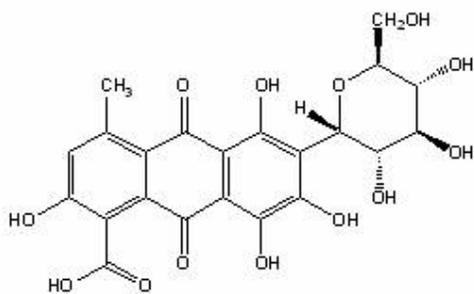
Figura 5. Estereoisómeros de inositol.

Se encontró que el Hexaacetato de *Myo*-Inositol **9**, fue aislado de las hojas de las plantas *Podocarpus sellowii* y *Croton celtidifolius* (Mukherjee, *et. al.*, 1984); primero se aisló el Pentaacetato de Metoxi-Inositol **6** por acetilación del extracto crudo, posteriormente este compuesto por hidrólisis con amoníaco seco y metanol a temperatura baja se obtuvo el Sequoyitol **7**, el cual se llevó a cabo a una reacción de demetilación con 57% de ácido hidro-iodico acuoso con temperatura y a reflujo; el producto se identificó como *Myo*-Inositol **8**, la acetilación de este último con anhídrido acético y piridina seca en un baño de agua caliente se obtiene el Hexaacetato de *Myo*-Inositol **9** como producto final (figura 6) (Mukherjee, *et. al.*, 1984).

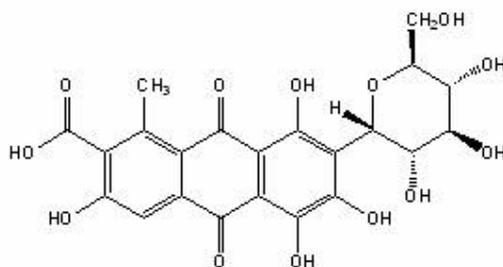


**Figura 6. Estructuras del Pentaacetato de Metoxi-Inositol 6, Sequoyitol 7, *Myo*-Inositol 8 y Hexaacetato de *Myo*-Inositol 9.**

En cuanto al ácido carmínico de acuerdo a estudios previos se descubrió en 1920 y la primera estructura **10**, fue propuesta por Dimroth y Kamerer donde el grupo carboxilo se encuentra entre el hidroxilo y la cetona de la antraquinona. Posteriormente Ali y Haynes determinaron la estructura correcta **11** (figura 7) donde el grupo carboxilo se encuentra entre el metilo y el hidroxilo.



(10)



(11)

**Figura 7. Primera estructura propuesta del ácido carmínico 10 y Ácido carmínico 11.**

El Ácido Carmínico **11** es un polvo pardo rojizo oscuro o rojo brillante, soluble en agua, alcohol, bases y ácidos. Su coloración en soluciones acuosas varía con el pH. A pH de 4.8 presenta una coloración rojo-amarilla, rojo magenta a pH neutro y rojo azulado o violeta a pH alcalino.

El ácido carmínico se obtiene por extracción del insecto *Dactylopius coccus* (cochinilla), cristaliza en alcoholes como prismas rojos, su punto de fusión no es claro, oscurece a 120° y tiene Rf 0.17 en 1-propanol:amoníaco (d.8809):agua (6:3:1) y 0.12 en 1-butanol:piridina:H<sub>2</sub>O (3:1:1). Tiene un color rojo profundo en agua y es de amarillo a rojo en soluciones ácidas. Uv máx. (agua): 500 nm ( $\epsilon$  6800); (0.02 N HCl): 490-500 nm ( $\epsilon$  5800); (0.0001 N NaOH): 540 nm ( $\epsilon$  3450). Ligeramente soluble en éter. Prácticamente insoluble en éter de petróleo, benceno y cloroformo (The Merk Index, 1996, Ohen, 1965).

El carmín es un producto muy estable, no se han detectado variaciones en su contenido de ácido carmínico en productos almacenados durante 4 años; además es insoluble en agua y en alcohol y soluble en medios alcalinos, el carmín es un polvo casi impalpable de color rojo o morado, tiene mejor resistencia al calor y a la oxidación química al compararse con los colorantes sintéticos, tiene buena estabilidad a la luz y su principal propiedad radica en su enorme poder colorante que supera indiscutiblemente al de cualquier otro colorante. Es la laca de aluminio del ácido carmínico que se obtiene al formular un complejo entre el ácido y el aluminio, y debe cumplir con las siguientes especificaciones marcadas por Food and Drugs Administration (F.D.A.).

**Tabla 5. Especificaciones químicas para el carmín según F.D.A.**

Material volátil (135° C por 3 h)	20%
Ceniza	12%
Plomo	10 ppm máximo
Arsénico	1 ppm máximo
Acido Carmínico	50% mínimo
Microorganismos viables de <i>Salmonella</i>	Ninguno

Fuente: Téllez, *et. al.*, 2003.

Las presentaciones comerciales del carmín, características y ejemplos de uso se mencionan a continuación.

**Carmín ácido estable** colorante que posee una coloración rojiza clara, presenta un mínimo de 2.5% de ácido carmínico. Disponible únicamente en polvo. Se utiliza en productos de pH bajo y en donde la base principal sea agua o alcohol, ejemplos: bebidas fermentadas, base para bebidas, aderezos para ensaladas.

**Carmín ácido líquido** Solución color rojo magenta, compuesto por carmín, agua, hidróxido de amonio, sodio y glicerina, contiene como mínimo 3.3% de ácido carmínico. Está diseñado para alimentos con un pH superior a 3.0 ejemplo: yogurt, malteadas (Norma oficial Mexicana, 1994).

**Carmín laca** De color rojo magenta, tiene como mínimo 50% de ácido carmínico. Se puede emplear en productos de base aceitosa independientemente del pH, ejemplo: productos farmacéuticos, cosméticos, confitería.

La facilidad del ácido carmínico para formar complejos con metales es explotada en la manufactura de carmines, el carmín procesado adquiere diferentes coloraciones dependiendo de la sal metálica a la que esté unido, ejemplos de esto se muestran en la tabla 7.

**Tabla 6. Coloraciones adquiridas por el carmín dependiendo de la sal metálica empleada.**

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

Fuente: Official Journal of the European Communities 1994.

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

Estudios realizados han demostrado que el carmín es estable en un amplio rango de pH siendo comparable su estabilidad a la del rojo núm. 2 en bebidas carbonatadas (Schul, 1993).

Los carmines pueden ser aislados diluyendo disolventes como agua a altas temperaturas o en forma insoluble a un pH inferior a 7.0 por adición de una sal de calcio a la solución. Han sido publicadas muchas técnicas para la obtención del carmín de cochinilla, sin embargo las condiciones de proceso no se detallan ya que son celosamente guardadas por cada industria o investigador (Bojorquez, *et. al.*, 1990; García, *et. al.*, 1990; Valdés, 1993).

La riqueza de las técnicas de teñido es digna de rescatarse, ya que ello ayudará a conservar y difundir el conocimiento de nuestro patrimonio cultural, además de promover una conciencia ecológica para preservar las especies de plantas y animales utilizadas tradicionalmente para obtener tintes. Por su parte Felipe III decía que la grana fina debe ser considerada como si fuera oro o plata. El virrey Enríquez dictó normas para explotar y exportar la grana a Filipinas y España desde las regiones de lo que es hoy en día los estados de Oaxaca y Puebla. Se exhiben diversas muestras de plantas, árboles y semillas de las que se obtiene colorantes naturales. Entre ellos se encuentran la ya conocida grana cochinilla, el palo brasil, el añil, la flor de calabaza, el nogal americano, el huisache, el capulín, el zacate y el girasol, entre otros (Roquero, 2004).

El añil es uno de los colorantes más antiguos que se ha utilizado por más de 4 mil años e incluso su preparación se describe en textos transcritos. En la actualidad el añil se emplea para teñir telas como la mezclilla, aunque cada día se recurre más a los tintes sintéticos. Estos últimos fueron publicados a partir de 1856, cuando William Perkin logró sintetizar la anilina púrpura. Con ello, el uso de colorantes naturales decayó y la producción de los químicos ha cobrado gran auge al desarrollar más y nuevos colores para la vida moderna y el arte (Espinoza, *et. al.*, 2004).

Se mencionan algunos colorantes de origen vegetal como el índigo donde la India parece ser el lugar de su nacimiento, cuyo nombre oficial es el de indigotina. Siendo este el colorante conocido más antiguo. El índigo se obtenía a partir de plantas del grupo indigofera, pero, en la actualidad se preparan sintéticamente. Después se supo que las plantas no lo contienen como tal, sino que, por hidrólisis del ácido clorhídrico o mediante enzimas que existen en la planta triturada se convierte en indóxilo, y éste, por oxidación con el oxígeno atmosférico produce la indigotina (Devore, *et. al.*, 1994).

Otro de los colorantes de origen vegetal es la alizarina de la planta *Rubbia tinctorum* constituyente principal de la raíz de rubia, planta originaria de Asia y del sur de Europa. La alizarina se encuentra en forma de glicósido, que por fermentación es liberada del organismo, además de ser el primer colorante cuya constitución pudo ser explicada y actualmente sintetizada (Marmion, 1979).

Posteriores investigaciones demostraron la naturaleza de otros derivados polihidroxiantraquinónicos tales como la púrpura, la pseudo purpurina y la purpuro xantina que se hallan en la rubia; asimismo otros colorantes extraídos del *ruibarbo* y del *aloe* como lo es la aloemodina. Posteriormente se estudian detenidamente algunos colorantes y pigmentos de las maderas como son morina, quercitina, entre otros, así mismo algunos colorantes de frutas y flores (Espinoza, *et. al.*, 2004).

Las materias colorantes de los hongos, estudiados por Kogl revelaron la existencia de derivados terpenilquinónicos y antraquinónicos en ellos, de indiscutible interés científico (Espinoza, 2004).

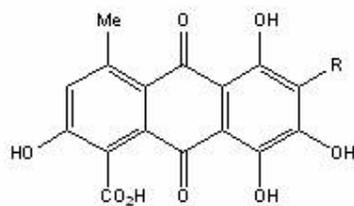
Algunos de los colorantes naturales de origen animal son los extraídos de conchas de ciertos mariscos del mediterráneo como: Murex, Brandaris y Murex Trunculus y la púrpura de tiro que se obtenía de la extracción de una especie rara de moluscos (Hutchings, 1994).

En la segunda mitad del siglo XIX (1880) debido a los brillantes trabajos de Baeyer, se puso en claro la constitución del índigo, lo cual sirvió de base a los trabajos de Heumann Pflieger que condujeron a sus síntesis. Animados por el éxito de estos investigadores, se iniciaron numerosos trabajos; lo cual dieron sus frutos pero ninguno logró alcanzar la importancia industrial del índigo y la alizarina, que llegaron a prepararse en grandes cantidades.

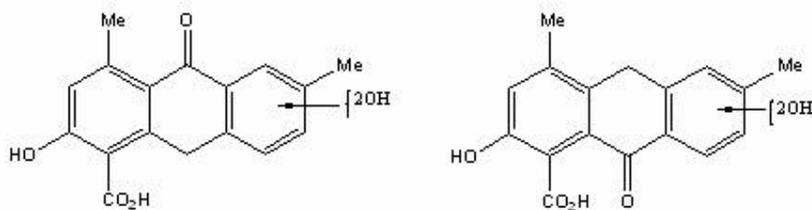
En 1902 Friendlander demuestra que la antigua púrpura es la 6,6-di-bromo-índigo y así mismo llega a la conclusión de que la melanina de los tejidos animales es un derivado del indol (Espinoza, 2004).

En 1869 Gaeber y Neubeurg sintetizan el amarillo directo y las antocianinas llegaron a ser preparadas sintéticamente por Barrer, Robinsón y Wilstaer (Espinoza, 2004).

De acuerdo a lo anterior, los colorantes naturales han sido importantes para diferentes industrias, por lo cual algunos investigadores se han dedicado a la investigación de algunas reacciones que ayuden a identificar otros derivados, es el caso de Miyagawa que en 1926 demostró la ozonólisis de ácido carmínico en agua, resultaba ácido oxálico y una pequeña cantidad de un producto poco colorido ópticamente activo; este último con permanganato de bario da un ácido amorfo ópticamente activo, probablemente  $C_6H_{12}O_5$ , el cual no se parecía a ninguna metil-pentosa conocida. Por analogía del ácido kermésico **12** donde  $R=Ac$ , Miyagawa sugirió la estructura **12** para el ácido carmínico donde  $R=CO-[CH(OH)]_4-CH_3$ , pero fue criticado por Todd (1941), siendo difícil de explicar la formación del coccinín **13** cuando el ácido carmínico está disuelto con el álcali (figura 8). Lo mejor era aceptar que el ácido carmínico **11** tuviera el compuesto C-glucosil como se muestra en la figura 7, (Fieser, *et. al.*, 1944).



(12)



(13)

**Figura 8. Estructuras propuestas para Ácido kermésico R= Ac 12, Ácido Carmínico R=CO-[CH-(OH)]<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub> 12 y Coccinin 13.**

Una oxidación similar del ácido carmínico dió una solución, la cual parecía tener muy bajas cantidades de los dos mismos azúcares. La ozonólisis del ácido carmínico 11 dió como resultado los mismos azúcares en rendimientos ligeramente mejores, uno de ellos fue identificado como arabinosa. La cromatografía en papel mostró que los azúcares también fueron formados por la ozonólisis de Barbalon. Estos resultados muestran que el ácido carmínico 12 tiene un fragmento de D-glucopiranosil (Ali, *et. al.*, 1956).

### III JUSTIFICACIÓN

México es un país que produce gran cantidad de nopal para consumo. Dentro de los muchos ecosistemas en el país destacan diferentes especies de nopal, entre ellas la *Opuntia ficus indica* (L. Mill.) variedad *atlisco*, la cual es comúnmente atacada por algunas plagas de insecto, una de ellas es la grana cochinilla cuyo nombre científico es *Dactylopius coccus* Costa, donde su importancia principal es la producción de colorante que por años ha sido significativo por su aplicación y es conocido como ácido carmínico, formado por una antraquinona glicosídica; que durante la época de la colonia alcanzó una alta producción y exportación. Este colorante se fue sustituyendo por los colorantes sintéticos que en la actualidad se sabe de algunos trastornos como el cáncer en el ser humano, lo que ha permitido el resurgimiento de la importancia del uso de los colorantes naturales.

Los estudios de *Dactylopius coccus* se han enfocado principalmente a conocer y extraer el colorante, sin embargo poco se sabe de otras sustancias importantes que puede contener.

El presente trabajo de investigación plantea conocer los componentes que constituyen la grana cochinilla, a partir de los extractos polares (EtOH, H<sub>2</sub>O), y a través de la reacción de acetilación obtener derivados menos polares, purificación e identificación de los mismos, y su análisis estructural a través de métodos espectroscópicos.

## IV OBJETIVO

A partir de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) obtenida de invernadero llevar a cabo la extracción, purificación e identificación de los componentes, así como el análisis de reacciones que modifiquen las estructuras de los metabolitos presentes.

### 4.1 Objetivos Específicos

- a) Obtener la materia prima (grana cochinilla) de invernadero.
- b) Obtener extractos de la materia prima.
- c) Transformar químicamente las sustancias, aplicando una reacción de acetilación y facilitar la obtención en el laboratorio.
- d) Separar y purificar los componentes de la grana cochinilla mediante la técnica de cromatografía en columna.
- e) Analizar estructuralmente los compuestos obtenidos de la acetilación, mediante las técnicas de: Espectrometría de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y masa acoplado a cromatografía de gases.

## **V PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 Obtención y Tratamiento de la muestra**

Los insectos se separan de las plantas con pequeñas escobillas y se matan por inmersión en agua hirviendo, por calor de horno o por exposición a los humos de combustión de azufre o de carbón. Si se utiliza el calor los insectos adquieren un color negro purpúreo y se les conoce como grana negrilla, mientras que los muertos por los humos toman un color gris purpúreo y se conocen como grana jaspeada o cochinilla plateada. La primera cosecha de la estación suele contener la mayor parte de la materia colorante. Una vez recolectada la grana cochinilla es necesario eliminar el polvo y partículas indeseadas seleccionando el material mas adecuado para la obtención de los principios activos.

Se consiguió 1kg de grana plateada producida en invernadero, localizado en Jaltepec, municipio de Tulancingo, Hidalgo. Dicho invernadero pertenece a la familia Villanueva Soto, quienes han sido colaboradores del presente y en otros trabajos relacionados con el estudio de la grana cochinilla en la UAEH.

### **5.2 Obtención de Extractos.**

#### **5.2.1 Extracto etanólico.**

Para darle el uso adecuado a la grana cochinilla se procedió a la molienda que consiste en la desintegración de la misma con la finalidad de facilitar la extracción de los constituyentes, realizando la destrucción mediante mortero y pistilo.

El método de extracción utilizado fue por maceración durante 3 días, colocando la grana cochinilla previamente molida en un matraz de fondo plano utilizando como disolvente EtOH a temperatura ambiente repitiendo la operación con el mismo disolvente por tres ocasiones. El extracto se concentró en un rotavapor, con la finalidad de obtener los rendimientos de la misma.

### **5.2.2 Extracto acuoso.**

Utilizando agua destilada como disolvente, se procedió a la obtención de extractos llevando a cabo el mismo procedimiento que el extracto etanólico; pero en este caso la materia prima no se trituró.

### **5.3 Separación de los Compuestos por Cromatografía en Columna.**

La cromatografía es una técnica de separación extraordinariamente versátil que presenta distintas variantes. En toda separación cromatográfica hay dos fases (sólida, líquida o gas) una móvil y otra estacionaria, que se mueven una con respecto de la otra manteniendo un contacto íntimo. La muestra se introduce en la fase móvil y los componentes de la muestra se distribuyen entre la fase estacionaria y la móvil. Los componentes de la mezcla a separar invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación. Si un componente está la mayor parte del tiempo en la fase móvil el producto se mueve rápidamente, mientras que si se encuentra la mayor parte en la fase estacionaria, el producto queda retenido y su salida es mucho más lenta.

Para el análisis de los extractos se utilizó la técnica de cromatografía en columna de 50 cm de longitud y 2 cm de diámetro, consiste utilizando gel de sílice 60 micras, marca Merck, con un tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (70-230 mesh ASTM). Los disolventes utilizados fueron purificados por medio de destilación fraccionada. Utilizando como disolvente en la fase estacionaria, hexano. Posteriormente se colocó el extracto respectivo previamente homogeneizado con gel de sílice, realizando la elusión con mezcla de Hex-AcOEt, AcOEt, AcOEt-EtOH, EtOH, EtOH-H<sub>2</sub>O en orden creciente de polaridad, hasta concluir la cromatografía, el gradiente de elusión se realizó generalmente a 20 % de las proporciones, por ejemplo Hex-AcOEt 8:2, 6:4, y así sucesivamente.

### **5.3.1 Cromatografía en capa fina.**

La cromatografía en capa fina se realizó mediante placas comerciales de aluminio marca Kieselgel, recubiertas con gel de sílice para cromatografía con un espesor de 0.25 mm y de 5X2.5 cm. para observar el factor de referencia de desplazamiento (Rf) de las fracciones aisladas, a continuación las placas cromatográficas se observaron en una cámara de ultravioleta Model C-65, finalmente se usó como revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, molibdato de fósforo, y/o ácido clorhídrico acuoso al 10%, para ver mejor el Rf de cada fracción.

## 5.4 Reacciones de los Extractos

### 5.4.1 Extracto etanólico

Al extracto etanólico se sometió a una reacción de acetilación con anhídrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ), con la finalidad de hacer menos polares los componentes de la cochinilla y de ser más fácil su obtención en el laboratorio, la técnica utilizada es como se menciona a continuación, de acuerdo a la referencia citada (Allevi, *et. al.*, 1998).

- Se pesó 3 g del extracto etanólico y se colocó en un matraz balón de 500 ml, se le añadió 330 ml de  $\text{Ac}_2\text{O}$ , se calentó a  $100^\circ\text{C}$  durante 1 h en una parrilla de calentamiento con agitación magnética, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- A esa solución se le adicionó 6 g de diacetato de plomo dihidratado  $\{(\text{Ac})_2\text{Pb} \cdot 2\text{H}_2\text{O}\}$  como catalizador y se agitó durante 8 h a temperatura ambiente.
- Posteriormente se añadió 20 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y dejó en agitación constante por una noche en 200 ml de diclorometano.
- Se filtró en un embudo de talle corto con algodón.
- El filtrado se lavó con  $\text{NaCl}$  acuoso al 5%, posteriormente se evaporó el disolvente en una parrilla de calentamiento.
- Al residuo del paso anterior se le agregó 100 ml de  $\text{EtOH}$  y se dejó en reposo por 16 h.
- Finalmente se filtró, evaporó y se obtuvo un sólido rojizo amarillento.

El producto final se purificó en una cromatografía en columna siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental.

#### **5.4.2 Extracto acuoso**

Al extracto acuoso se le aplicó la misma técnica de reacción que al extracto etanólico, a diferencia de que este último al producto final se lavó con una mezcla de AcOEt:H<sub>2</sub>O en proporción 9:1, luego el residuo se lavó con CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O con la misma proporción mencionada. Se obtuvo un sólido rojizo en AcOEt que pesó 1.1133 g, con CHCl<sub>3</sub> el sólido pesó 0.3724 g y finalmente con H<sub>2</sub>O fue un peso de 0.203 g. Posteriormente el sólido en AcOEt se purificó en una cromatografía en columna.

#### **5.5 Técnicas utilizadas para el análisis**

La identificación de los constituyentes activos, es el proceso de establecer la estructura molecular de los constituyentes aislados y para ello se emplean métodos físicos, espectrométricos y métodos químicos.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C fueron realizados en un equipo Jeol eclipse a 400 y 100 MHz respectivamente, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) y agua deuterada (D<sub>2</sub>O) según se indique en cada espectro. Los espectros de masa se determinaron en un espectrómetro Hewlett Packard modelo 5989 de impacto electrónico (IE) a 70 eV, con una temperatura de 250 °C en la interfase y 50 °C en el inyector, acoplado con una columna HP1 de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 micras. Los puntos de fusión se determinaron en un equipo tipo Thermolyne Corporation Subsidiary of Sybron

Corpotation Dubuque Iowa, U.S.A. Model No. MP-12615, serie No. 26, Volts 120. Amps 2.1, Watts 250, Hz 50/60, phase 1. Para observar los Rf's de las fracciones de acuerdo a las placas cromatográficas se utilizó una cámara de ultravioleta Model C-65.

## VI RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 Extracto etanólico

La materia prima seca se molió 184.8161 g, se extrajo por maceración con EtOH dejando reposar por 3 días, se filtró y evaporó el disolvente. Este proceso se repitió 3 veces y se obtuvo un total de extracto de 45.1810 g con un rendimiento del 24.45%.

A partir de 12 g del extracto etanólico se procedió a una cromatografía en columna empacada de sílica gel utilizando la técnica general descrita en la parte experimental, de la cromatografía se colectaron 242 fracciones de 20 ml cada una que fueron eluidas con la mezcla de disolventes como se observa en la tabla 8. Posteriormente se estudiaron solo aquellas de consistencia grasa que no son coloridas y se reunieron para su análisis de acuerdo al Rf 0.4 en AcOEt.

**Tabla 7. Cromatografía en columna del extracto etanólico.**

FRACCIÓN	POLARIDAD %	MEZCLA
1 – 3	100	Hex
4 – 13	90 : 10	Hex : AcOEt
14 – 25	80 : 20	Hex : AcOEt
26 – 31	70 : 30	Hex : AcOEt
32 – 43	60 : 40	Hex : AcOEt
44 – 51	50 : 50	Hex : AcOEt
52 – 56	30 : 70	Hex : AcOEt
57 – 61	20 : 80	Hex : AcOEt
62 – 67	100	AcOEt
68 – 80	80 : 20	AcOEt : EtOH
81 – 87	70 : 30	AcOEt : EtOH
88 – 125	50 : 50	AcOEt : EtOH
126 – 146	30 : 70	AcOEt : EtOH
147 – 162	20 : 80	AcOEt : EtOH
163 – 180	100	EtOH
181 – 221	80 : 20	EtOH : H <sub>2</sub> O
222 – 242	50 : 50	EtOH : H <sub>2</sub> O

De la parte grasa de la cromatografía en columna del extracto etanólico (tabla 7), se obtuvieron 90 fracciones no coloridas que se reunieron obteniéndose X fragmentos, ver tabla 9. Posteriormente se analizaron por espectrometría de masa y se observaron una serie de ácidos grasos, que se reportan por primera

vez en la grana cochinilla, se muestra la estructura de cada uno de ellos en la figura 9. Sin embargo se obtuvieron como compuestos en forma de mezcla y se mencionan por la importancia que desempeñan en el organismo de los seres vivos, sus respectivos espectros de masa se muestran en las figuras 10 a 17.



**Ester etílico del ácido  
Dodecanoico (14)**



**Ester metílico del ácido 14-metil-  
Hexadecanoico (15).**



**Ester etílico del ácido  
Tetradecanoico (16).**



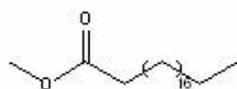
**Ester metílico del ácido  
Dodecanoico (17).**



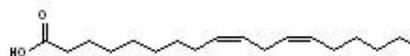
**Ester metílico del ácido  
Tetradecanoico (18).**



**Ester metílico del ácido  
8,11-Octadecadienoico (19).**



**Ester metílico del ácido  
Eicosanoico (20).**



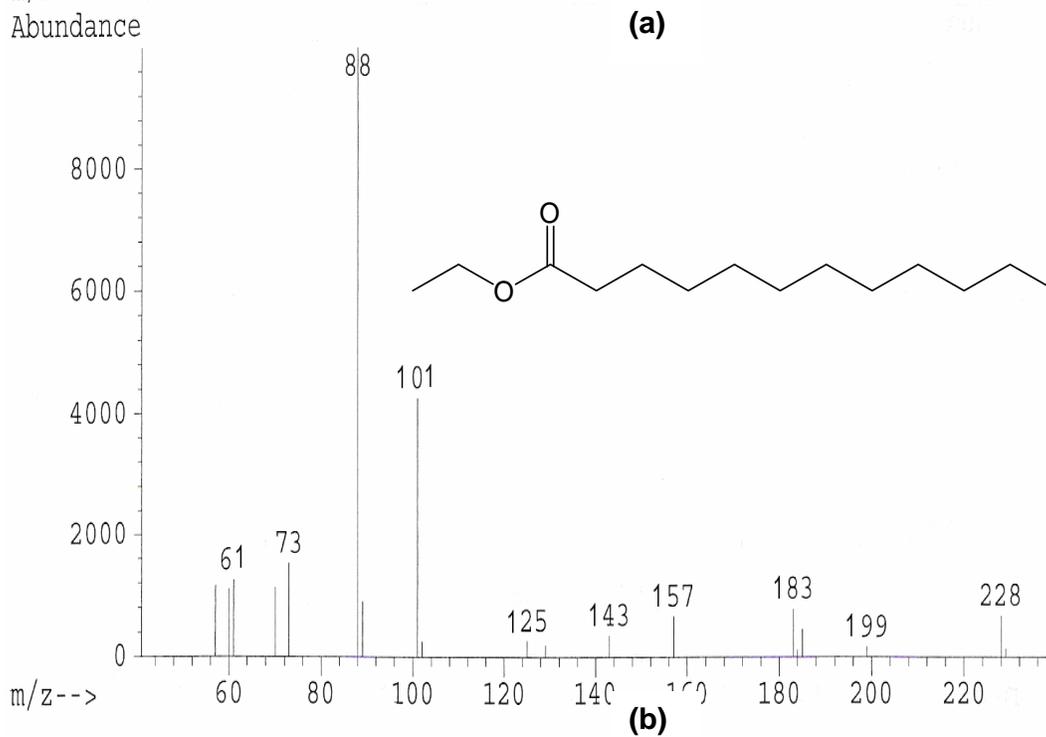
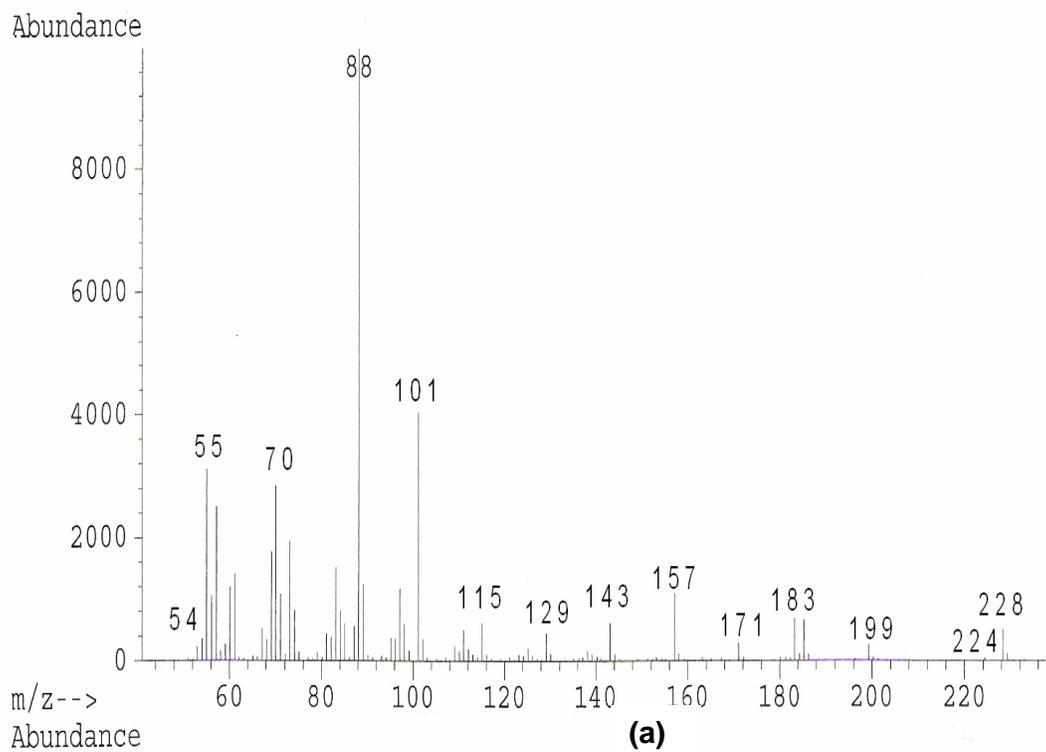
**Ácido 9,12-(z,z)-Octadecadienoico  
(21).**

**Figura 9. Estructura de los ácidos grasos obtenidos del extracto etanólico.**

**Tabla 8. Cromatografía en columna de las fracciones no coloridas del extracto etanólico.**

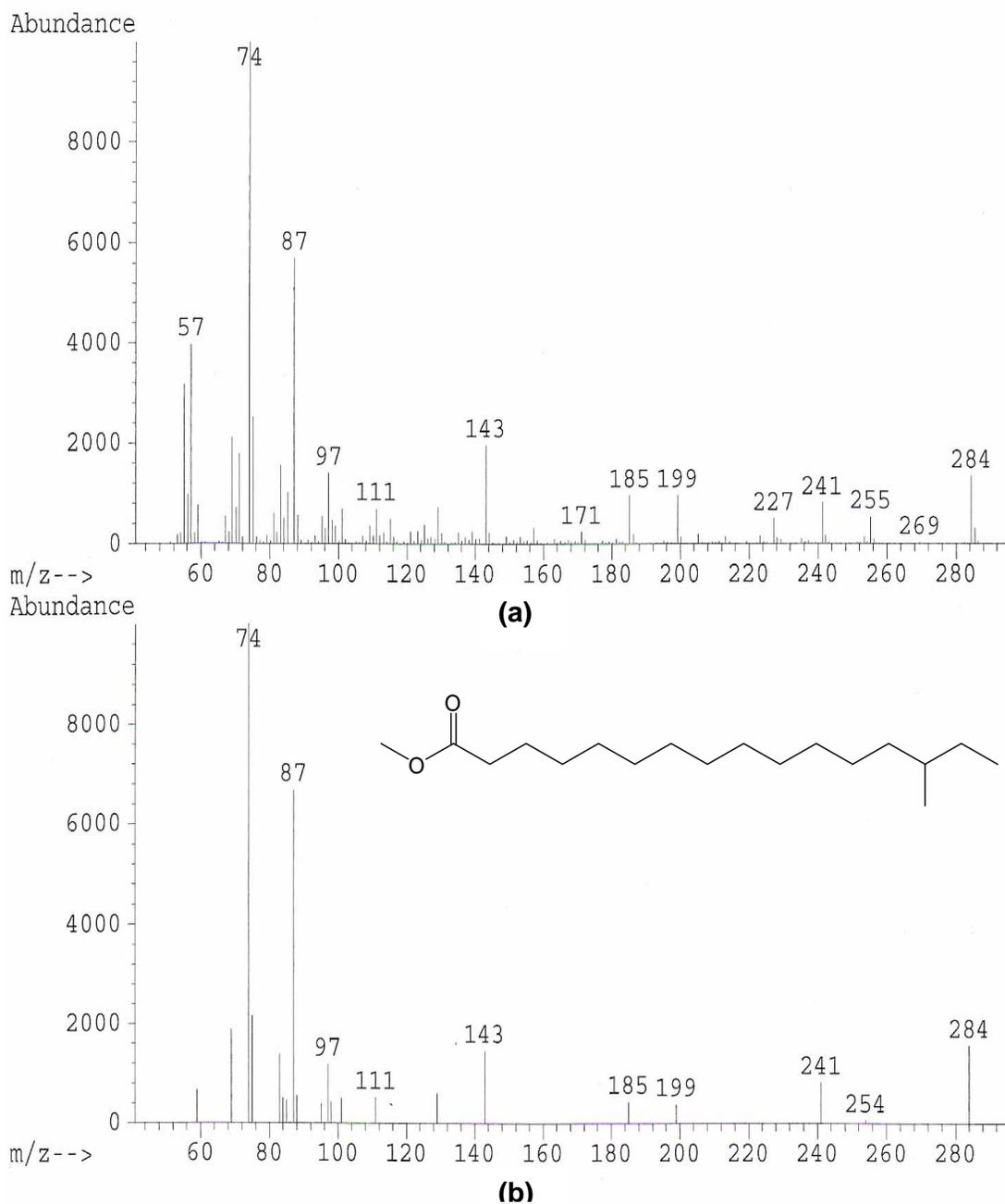
FRACCIONES	FRACCIONES REUNIDAS
1-3	I
4 – 28	II
29 – 49	III
41 – 50	IV
51 – 60	V
61 – 70	VI
71 – 76	VII
77 – 80	VIII
81 – 84	IX
85 – 90	X

En la fracción reunida I de la tabla 8, al evaporar el disolvente se observaron cristales blancos, los cuales se analizaron por espectrometría de masa; de acuerdo a los datos obtenidos se encuentra presente en dicha muestra el éster etílico del ácido dodecanoico **14**, el cual tiene un 94% de calidad, con respecto a la base de datos y el ión molecular 228 corresponde al P.M. del compuesto donde se observa su espectro de masa en la figura 10.



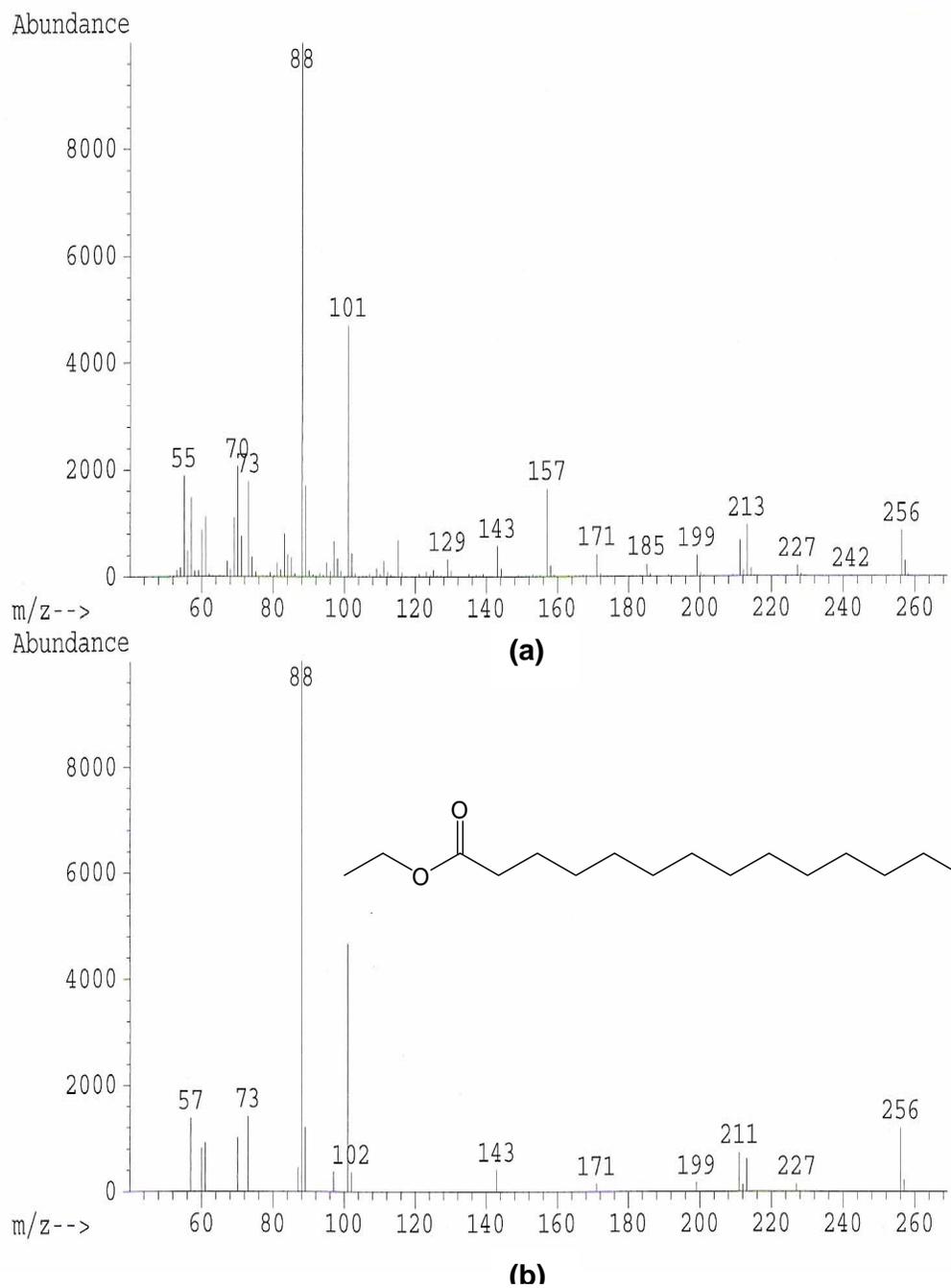
**Figura 10. Espectro de masa experimental (a) del éster etílico del ácido Dodecanoico 14 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.**

Otro de los compuestos que sobresale en la fracción I de la tabla 9 es el éster metílico del ácido 14-metil-hexadecanoico **15**, presente en un 98 % de calidad respecto a la base de datos vista en figura 11.



**Figura 11. Espectro de masa experimental (a) del éster metílico del ácido 14-metil-Hexadecanoico **15** y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.**

En la figura 12 se observa el espectro de masa para el éster etílico del ácido tetradecanoico **16** presentando un 95 % de calidad como se observa en la figura.



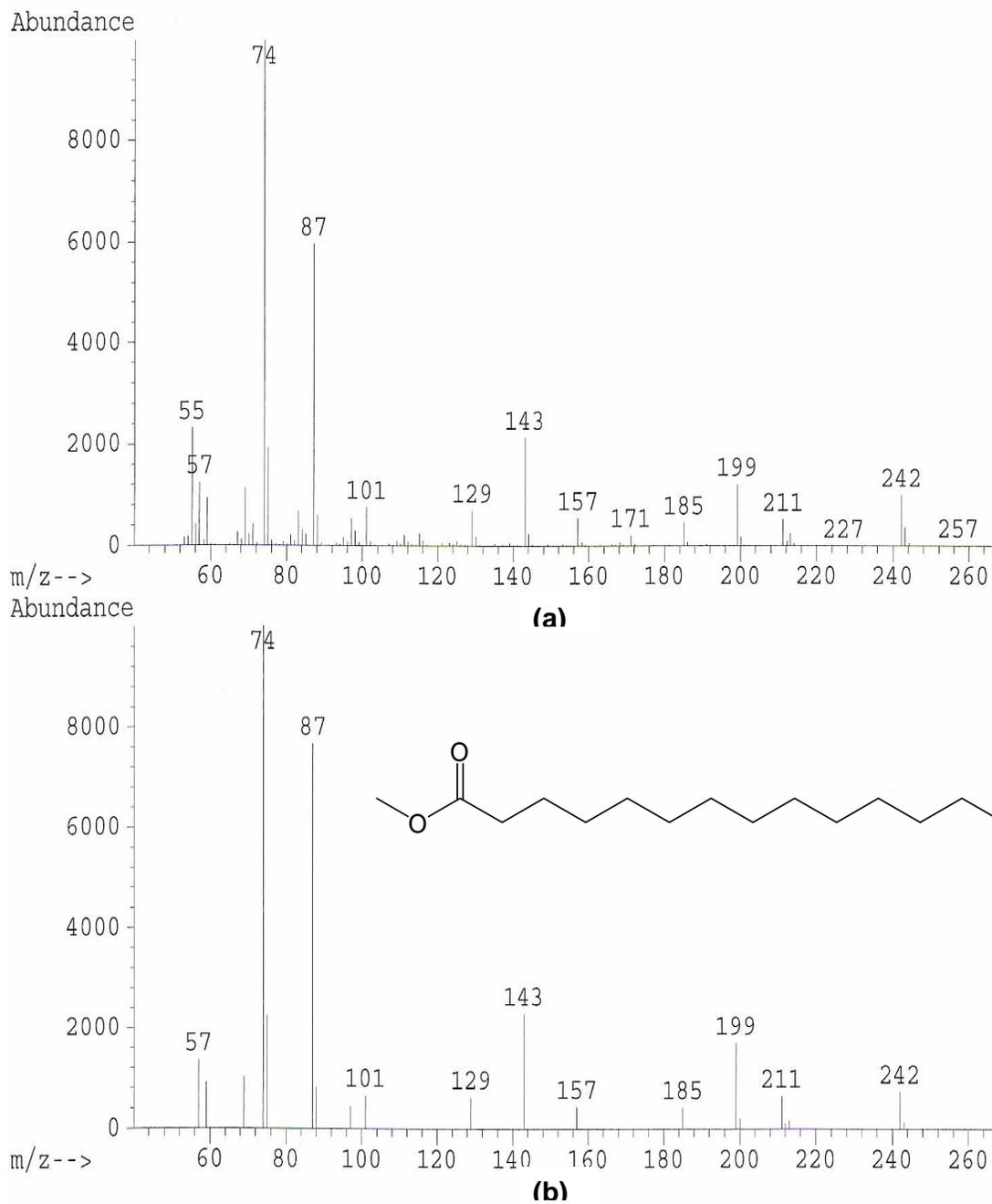
**Figura 12. Espectro de masa experimental (a) del éster etílico del ácido Tetradecanoico **16** y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.**

Otro de los compuestos que resalta en la fracción I, es el éster metílico del ácido dodecanoico **17** con un 97 % de calidad de acuerdo a la figura 13.

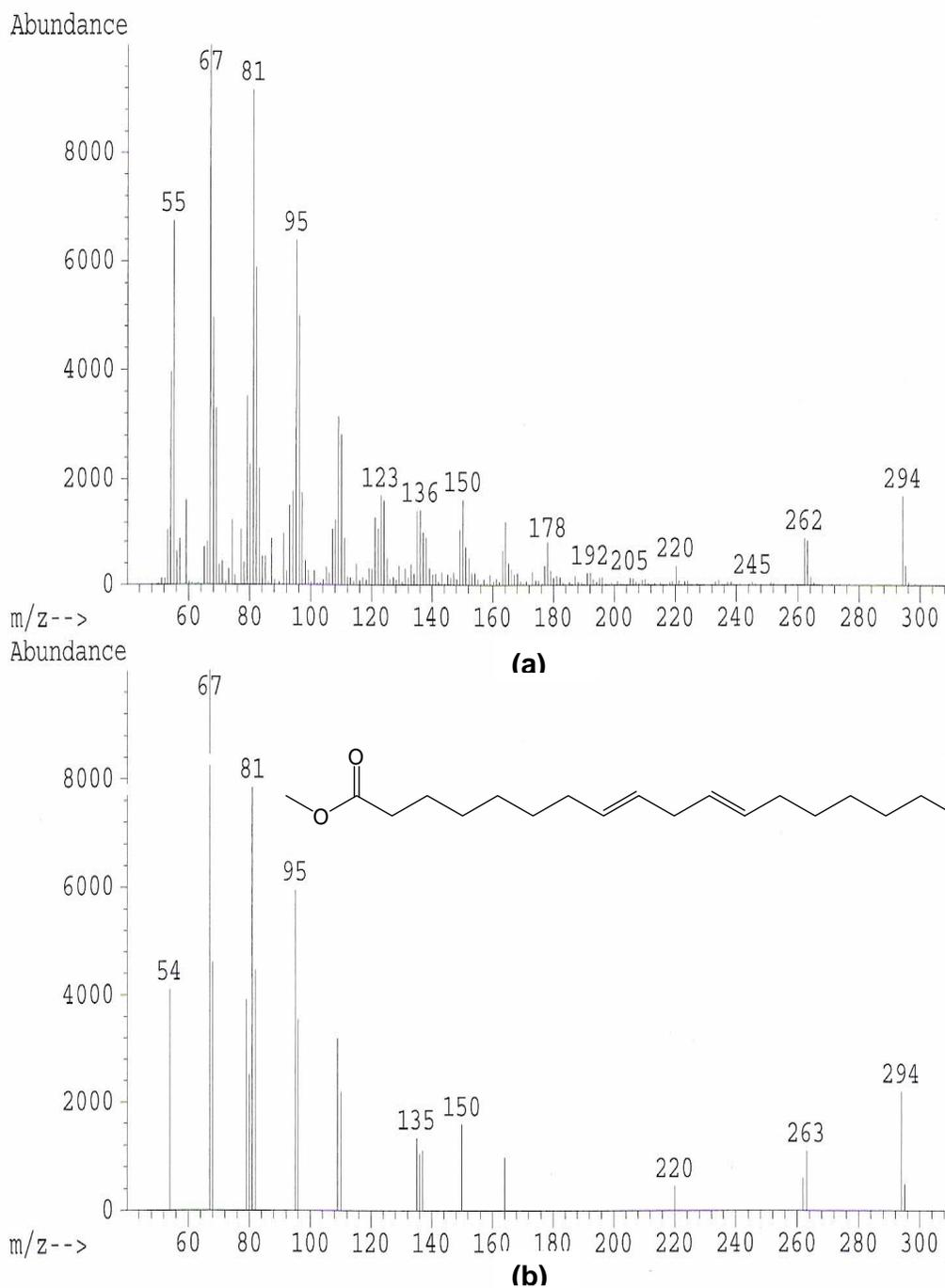


**Figura 13. Espectro de masa experimental (a), del éster metílico del ácido Dodecanoico 17 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.**

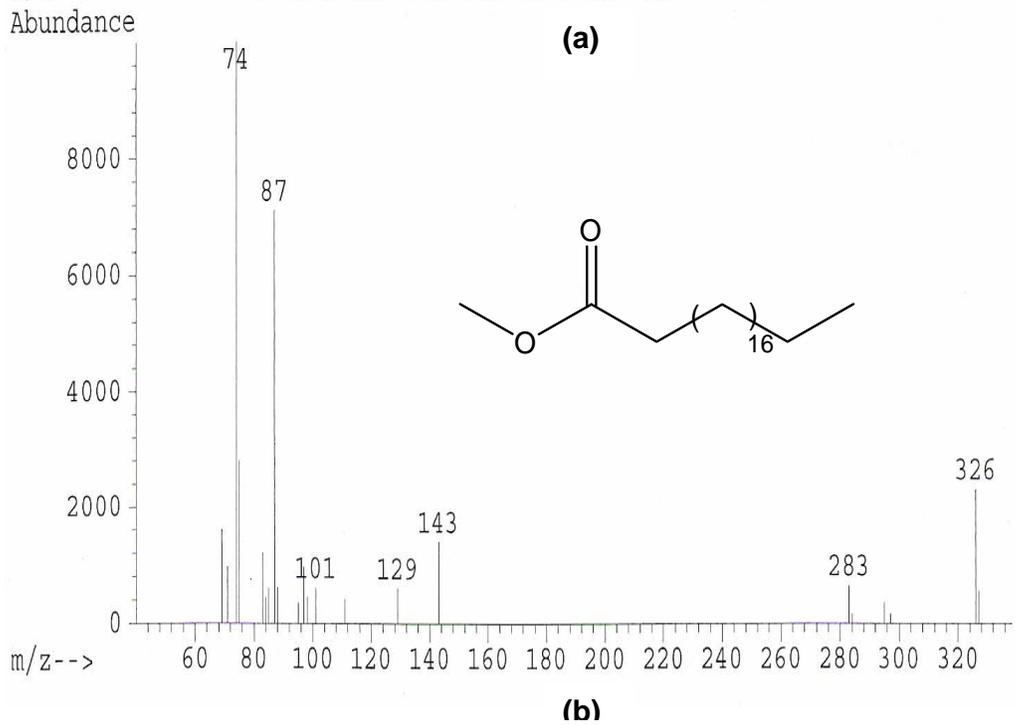
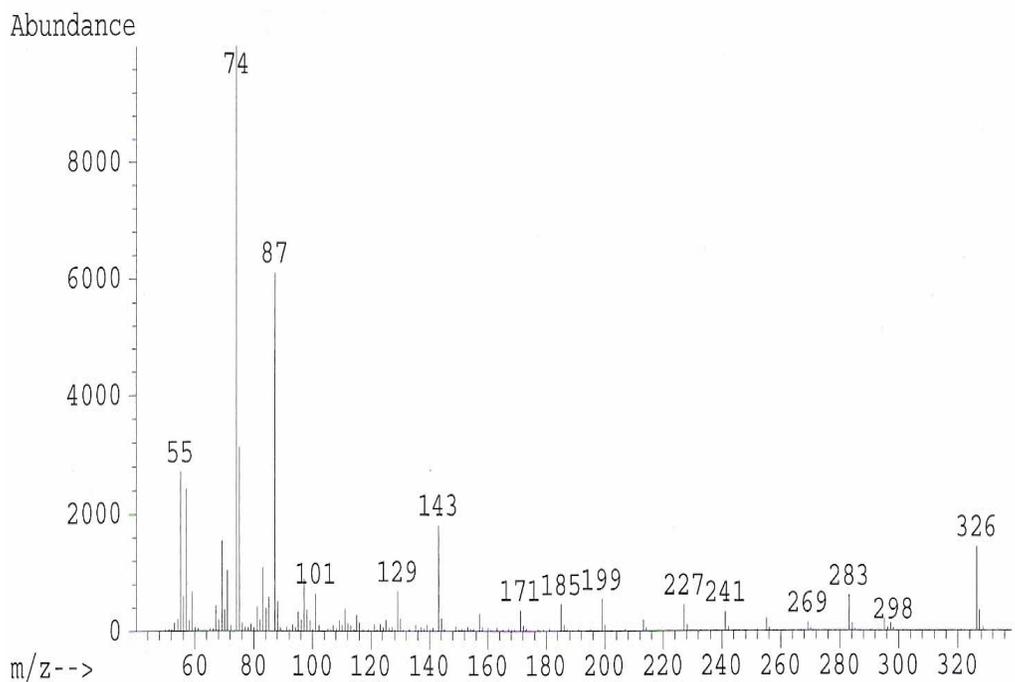
Además se encontró el éster metílico del ácido Tetradecanoico **18** con un 98% de calidad en esta fracción I, con respecto a la referencia de la figura 14.



**Figura 14. Espectro de masa experimental (a) del éster metílico del ácido Tetradecanoico 18 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.**

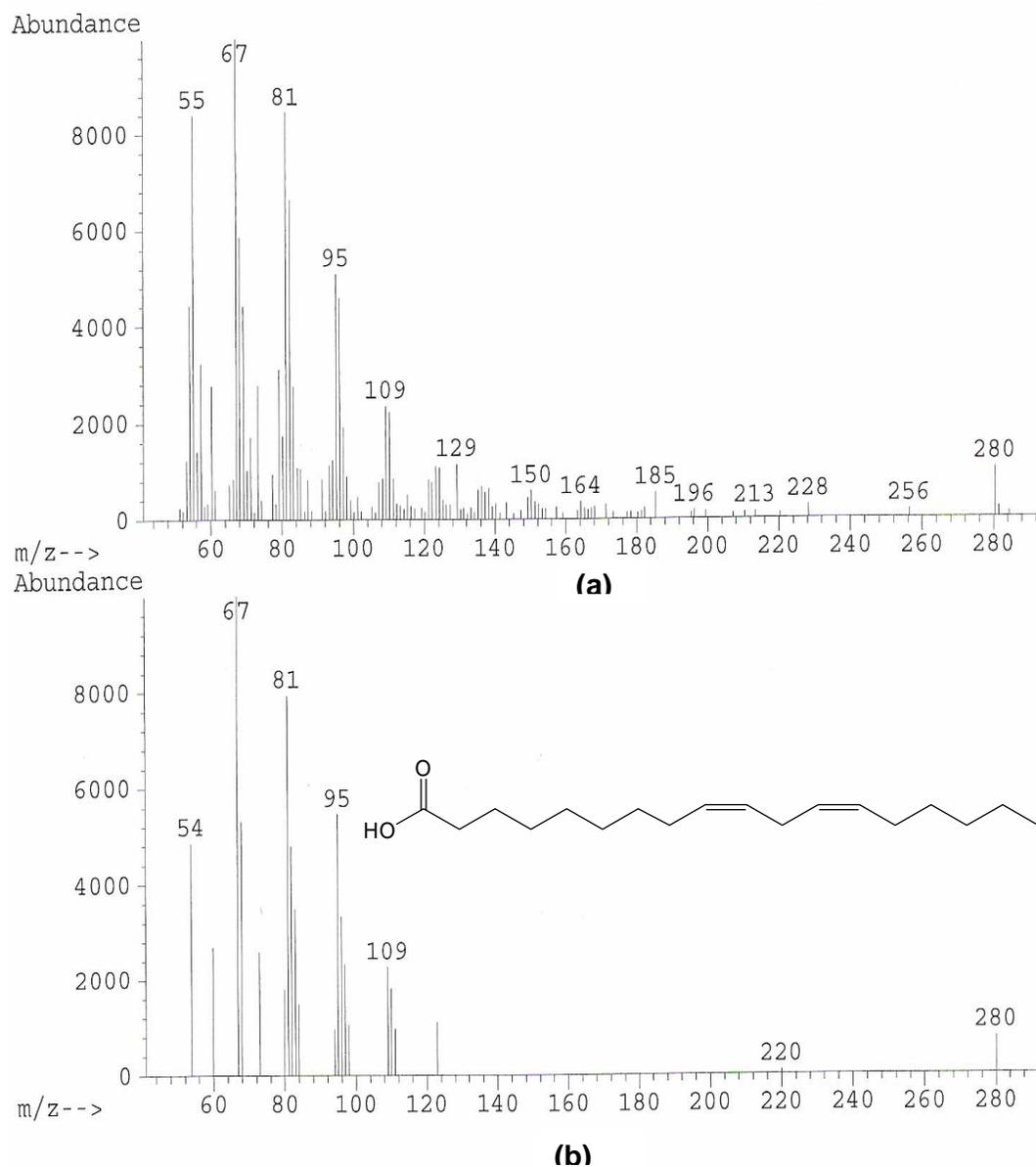


**Figura 15. Espectro de masa experimental (a) del éster metílico del ácido 8,11-Octadecadienoico 19 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138, con un 99 % de calidad.**



**Figura 16. Espectro de masa experimental (a) del éster metílico del ácido Eicosanoico 20 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138, con un 99 % de calidad.**

De las fracciones II y X se observó con un 99 % de calidad del ácido 9,12-(z,z)-Octadecadienoico **21**, de acuerdo al pico base 280 de la figura 17 y los iones moleculares 67, 81 y 95 son semejantes por lo cual se deduce que se trata de este compuesto.



**Figura 17. Espectro de masa experimental (a) del ácido 9,12-(z,z) Octadecadienoico **21** y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.**

## 6.2 Reacción de acetilación del Extracto Etanólico

Debido a que el extracto etanólico mostró una mezcla compleja de compuestos polihidroxilados en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 18), las señales que se observan en la región de 3 a 4 ppm y a la alta polaridad de estos compuestos, se procedió a hacer reaccionar los hidroxilos con  $\text{Ac}_2\text{O}$  como se explica en la parte experimental. Al llevar a cabo la reacción se observó que cambió la solubilidad del producto, porque antes de reaccionar era insoluble en  $\text{AcOEt}$  y después de llevar a cabo la reacción se disolvió en el disolvente mencionado; además de que se comparó en cromatografía en placa con el extracto y el  $R_f$  0.4 Hex: $\text{AcOEt}$  1:1 se observó mayor en el producto de la reacción, por ello se sometió a una cromatografía en columna como se menciona en la parte experimental obteniéndose 116 fracciones; las cuales fueron eluidas con la mezcla de disolventes como se muestra en la tabla 10. Posteriormente se analizaron por cromatografía en placa de acuerdo a eso se juntaron las fracciones coloridas mostrando  $R_f$  de 0.5 a .2 en  $\text{AcOEt}$  ver tabla 11, a las fracciones menos polares se les realizó un estudio que se mencionan con detalle más adelante.

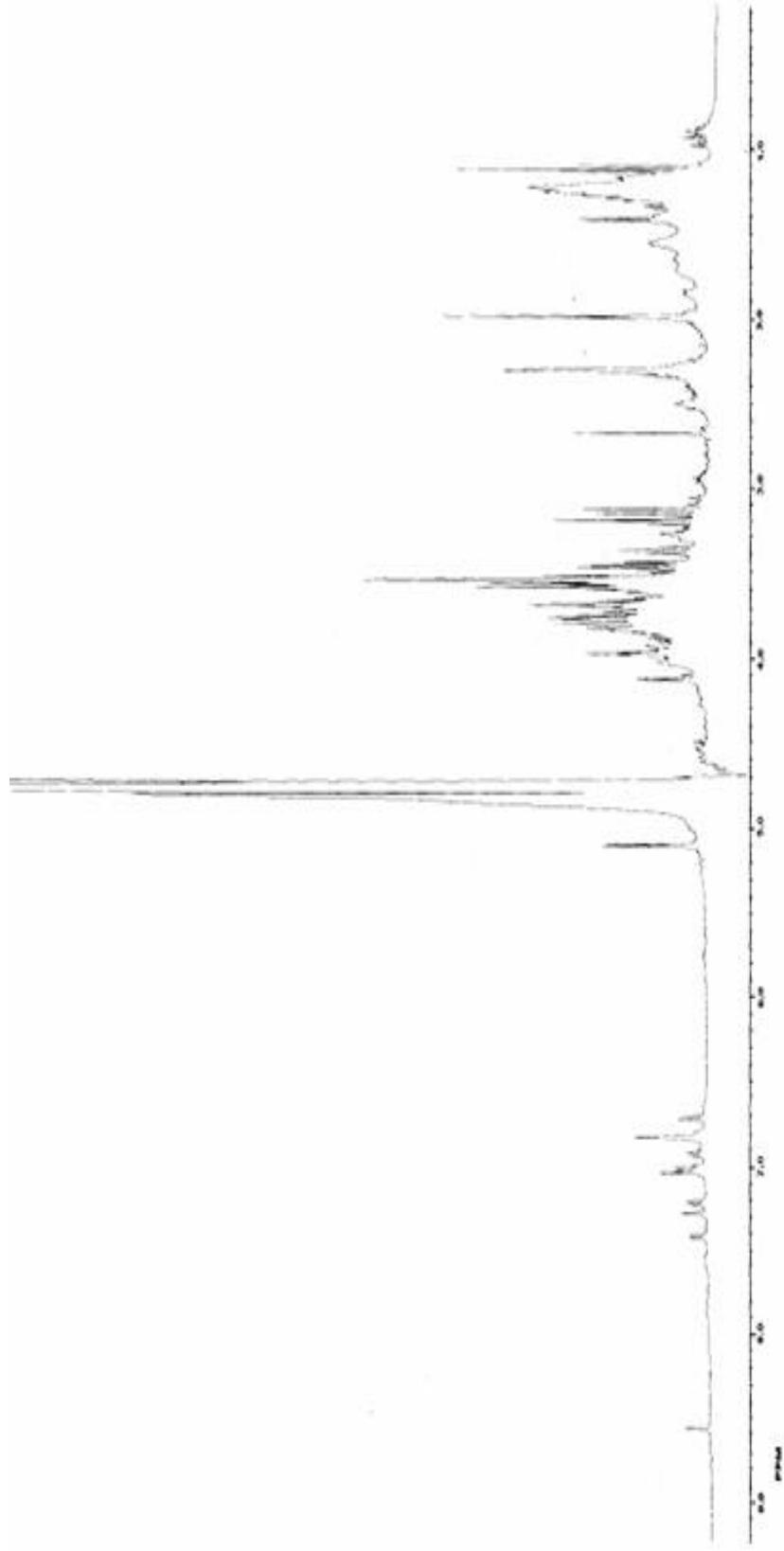


Figura 18. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz del extracto etanólico en  $\text{D}_2\text{O}$ .

**Tabla 9. Cromatografía en columna del extracto etanólico de la grana cochinilla tratado con Ac<sub>2</sub>O.**

FRACCION	POLARIDAD %	MEZCLA
1 – 9	100	Hex
10 – 36	20 : 80	Hex: AcOEt
37 – 70	100	AcOEt
71 – 95	50 : 50	AcOEt : EtOH
96 – 116	100	ETOH

**Tabla 10. Cromatografía en columna de fracciones coloridas del extracto etanólico de la grana cochinilla tratadas con Ac<sub>2</sub>O.**

FRACCIONES	FRACCIONES REUNIDAS
56 – 64	I
66 – 76	II
80 – 86	III
88 – 94	IV
96 – 104	V
106 – 116	VI

De la tabla 9 las fracciones 24 y 28 una vez evaporado el disolvente se cristalizó la muestra, se analizaron por espectrometría de masa y de RMN de <sup>1</sup>H, de acuerdo a los resultados de RMN de <sup>1</sup>H se observa similitud en las señales de desplazamiento de ambos, por lo tanto, se hizo una comparación en cromatografía en placa, lo que aseveró que la fracción 24 tiene un Rf de 0.2 y 0.4

en Hex:AcOEt 1:1; por lo tanto la muestra, cristales amarillos pesó 0.8 g y se purificó mediante una recromatografía en columna, utilizando la técnica general descrita en la parte experimental, se obtuvieron 64 fracciones de 7 ml cada una, utilizando como eluyentes mezcla de disolventes como se observan en la tabla 11.

**Tabla 11. Recromatografía en columna de la fracción 24 del extracto etanólico de la grana cochinilla tratado con Ac<sub>2</sub>O.**

FRACCION	POLARIDAD %	MEZCLA
1 – 4	100	Hex
5 – 10	80 : 20	Hex : AcOEt
11 – 21	60 : 40	Hex : AcOEt
22 – 29	40 : 60	Hex : AcOEt
30 – 36	20 : 80	Hex : AcOEt
37 – 39	100	AcOEt
40 – 45	90 : 10	AcOEt : EtOH
46 – 49	80 : 20	AcOEt : EtOH
50 – 54	60 : 40	AcOEt : EtOH
55 – 59	50 : 50	AcOEt : EtOH
60 – 64	20 : 80	AcOEt : EtOH

En la fracción número 13 de la tabla 11, una vez evaporado el disolvente se observaron pequeños cristales incoloros, se tomó punto de fusión el cual fue de 214° C de acuerdo a la revisión bibliográfica se encontró que nuestro compuesto coincidía con el Hexaacetato de *Myo*-Inositol **9** su punto de fusión es de

214° a 215°C (Mukherjee, *et. al.*, 1988). Posteriormente se analizó mediante las técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  y espectrometría de masa, con los espectros confirmamos que se trataba del Hexaacetato de *Myo*-Inositol **9**. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 19) mostró señales en la región 5 a 5.61 ppm para los protones de los metinos y de 2 a 2.21 ppm para los protones correspondientes a los metilos del grupo acetilo, estos resultados fueron comparados con los reportados en la bibliografía (figura 20), donde se observan claramente los desplazamientos de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para el Hexaacetato de *Myo*-Inositol **9** que corresponden a 4 señales múltiples en la misma frecuencia para ambos, el espectro (**b**) es de acuerdo a Mukherjee, *et.al.*, (1988) y el espectro (**a**) obtenido experimentalmente de la fracción 13.

En la tabla 12 se muestran los datos de RMN  $^1\text{H}$  para el Hexaacetato de *Myo*-Inositol, también se compararon con datos del espectro de masa reportado (Mukherjee, *et. al.*, 1988), y experimental con 94 % de calidad como se puede observar en la tabla 13.

De acuerdo a los estudios realizados al insecto grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) por primera vez se reporta este compuesto, Hexaacetato de *Myo*-Inositol; aunque también fue aislado de dos tipos de plantas, *Podocarpus sellowii* y *Croton celtidifolius* colectadas de Caruaru, Pernambuco y en la parte subtropical del sur en Santa Catarina Brasil, respectivamente (Mukherjee, *et. al.*, 1988).

**Tabla 12. Datos de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  del Hexaacetato de *Myo*-Inositol 9.**

Hidrógeno (Posición)	Experimental en ppm y J en Hz.	Reportado en ppm y J en Hz.
Me <sub>2</sub>	2.2108 (s)	2.21
Me <sub>4,5,6</sub>	2.0194 (s)	2.02
Me <sub>1,3</sub>	2.0011 (s)	2.00
2	5.6042 (t) J=2.92	5.604 (t) J=2.80
4, 6	5.5007 (t) J=10.06	5.500 (t) J=10.10
5	5.1792 (t) J=10.8	5.19 (t) J=10.10
1, 3	5.083 y 5.1087 (dd) J=2.94	5.09 y 5.12 (dd) J=2.80

**Tabla 13. Datos de espectro de masa en  $\text{CHCl}_3$  del Hexaacetato de *Myo*- Inositol 9.**

Experimental en M/Z	Reportado en M/Z
433 (0.1)	390(0.4)
373 (2.0)	373 (2.1)
330 (1.0)	330 (0.9)
252 (4.0)	252 (2.4)
241 (6.0)	241 (4.9)
210 (6.4)	210 (50.3)
168 (100)	168 (58.1)
157 (42.1)	157 (23.0)
126 (56)	126 (27.9)
115 (57)	115 (29.8)
73 (90)	73 (9.4)
61 (0.2)	43

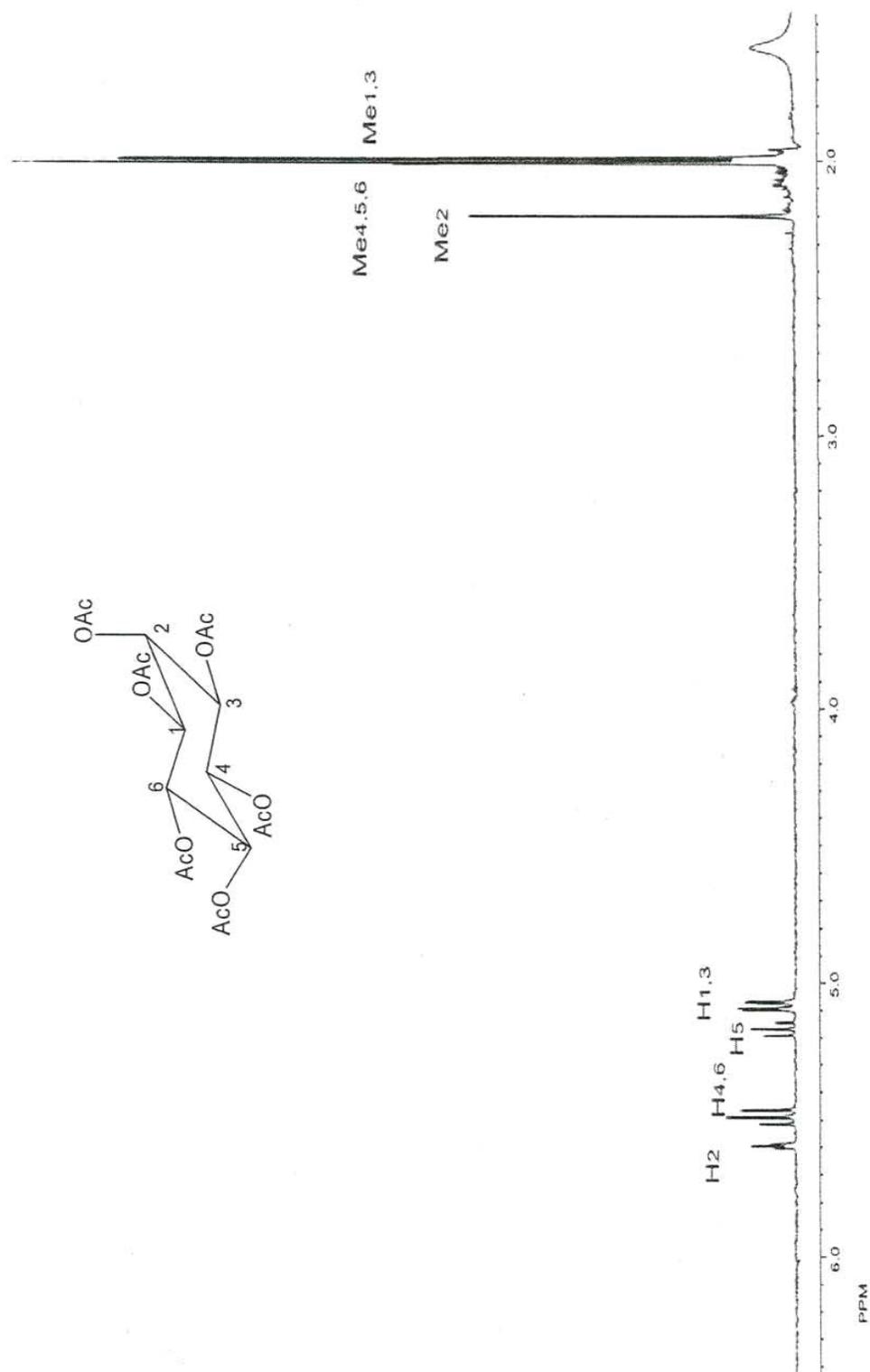
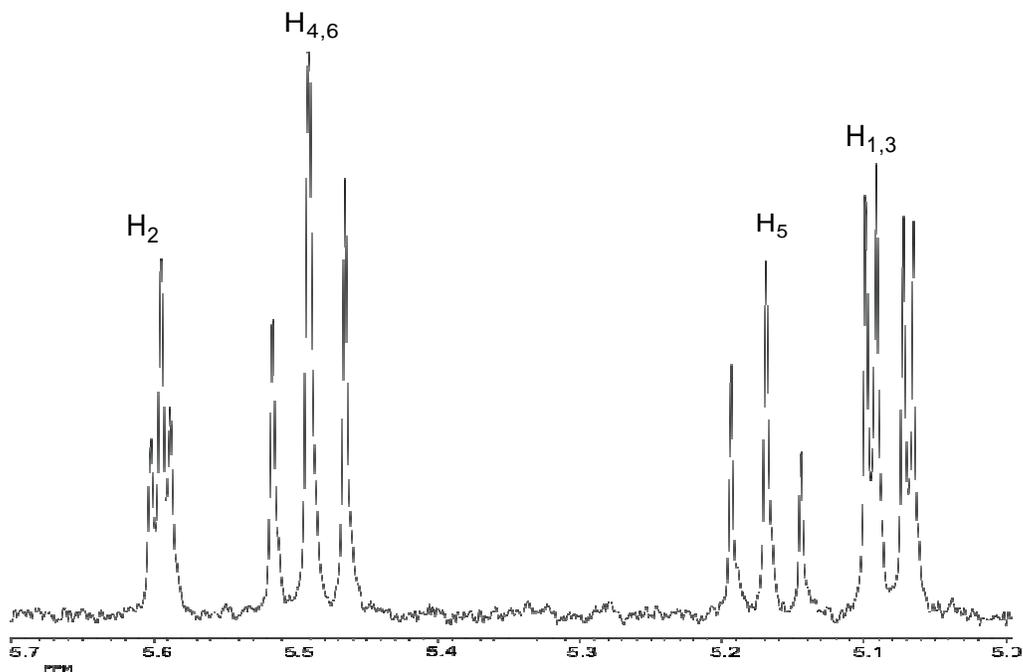
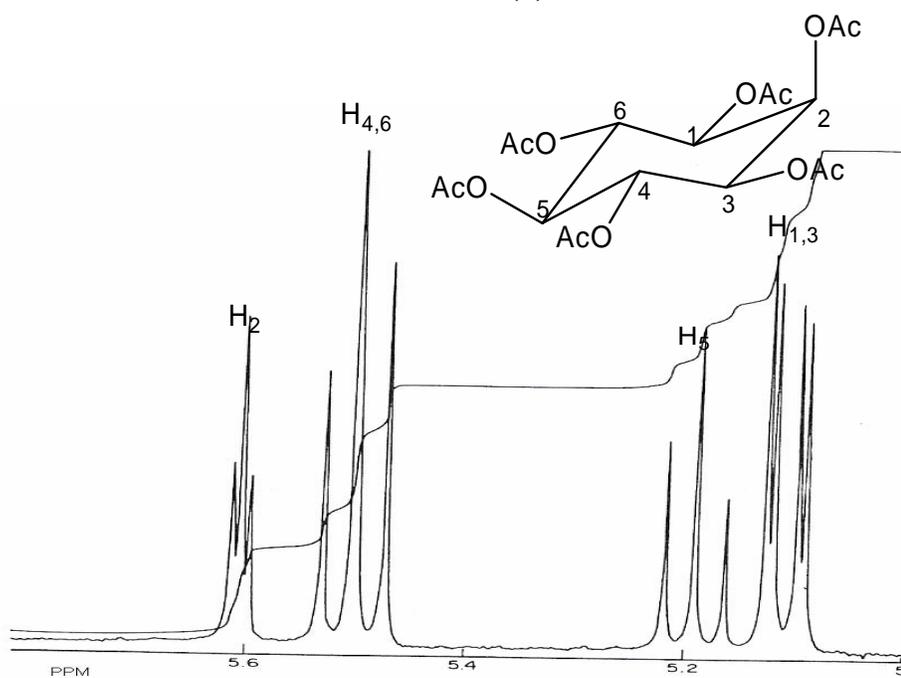


Figura 19. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz del Hexaacetato de Myo-Inosito en  $\text{CDCl}_3$



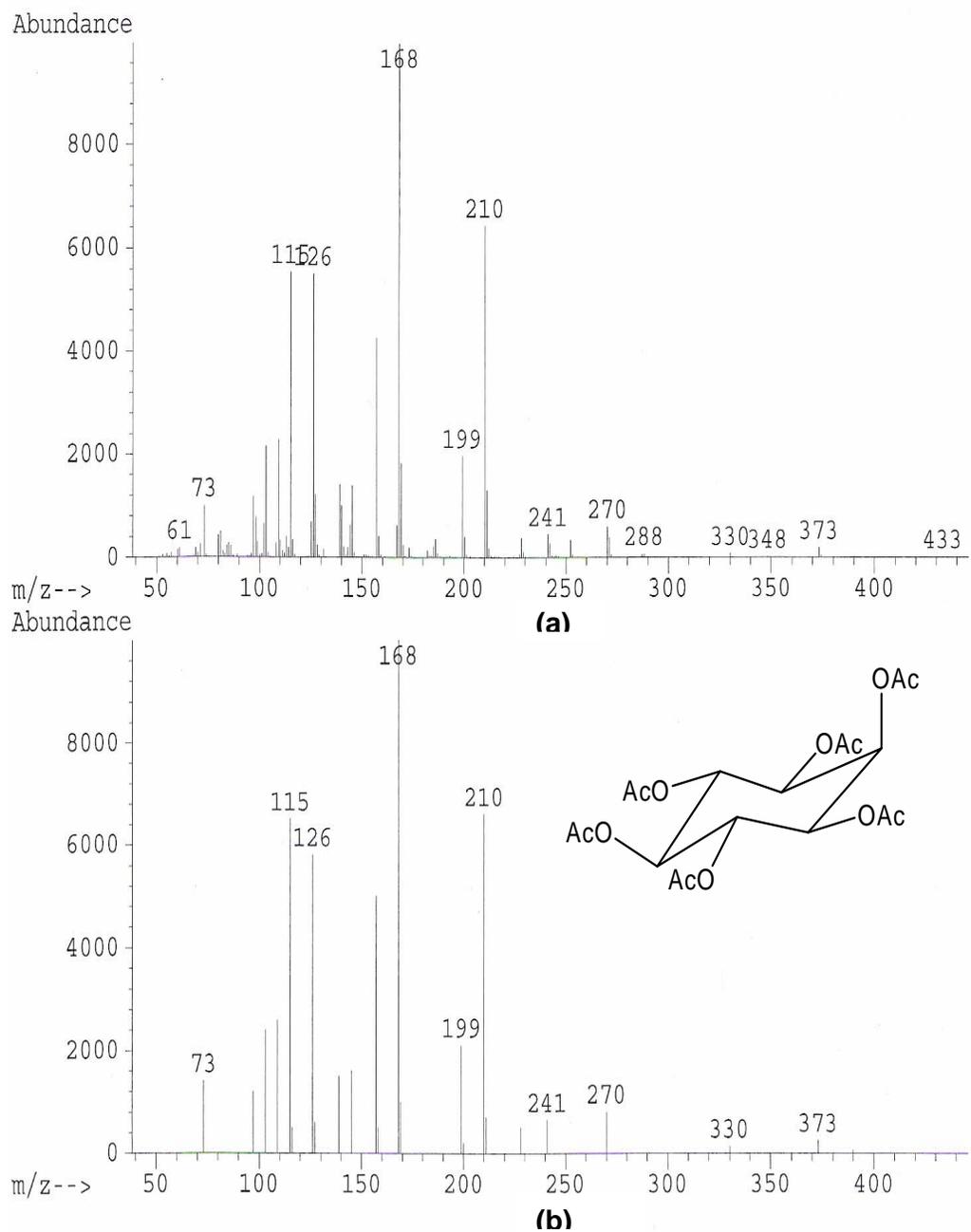
(a)



(b)

Figura 20. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (a) experimental a 400 MHz del Hexaacetato de *Myo*-Inositol 9 y (b) referencia a 360 MHz (ampliación de 5 a 5.7 ppm) en  $\text{CDCl}_3$  (Mukherjee, *et.al.*, 1988).

En la figura 21 se observa el espectro de masa del Hexaacetato de *Myo*-Inositol con un 94 % de calidad.



**Figura 21. Espectro de masa experimental (a) del Hexaacetato de *Myo*-Inositol 9 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138.**

De la fracción 17 y 18 de la cromatografía en columna de la fracción 24, una vez evaporado el disolvente se observaron cristales blancos (tabla 12), se tomó el punto de fusión el cual es de 84-90° C, se determinó el espectro de masa, en el cual nos señalaba el nombre de un compuesto que no coincidía con las señales observadas para el compuesto en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . En este último (figura 23) se observan señales para metilos de acetilos cerca de 2.0 ppm, también se observan señales entre 4.0 y 4.3 ppm, además de otras señales entre 5.0 y 5.6 ppm. Al revisar los espectros de compuestos similares, se encontró que el que mas se le parece de RMN de  $^1\text{H}$  es el de pentaacetato de  $\alpha$ -glucosa (figura 22), por lo que se determinó el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 24), y se encontró que el espectro puede asignarse para la  $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa, además de que la trehalosa es un compuesto que se ha encontrado en la grana en buen rendimiento.

Para la figura 25 se observa el espectro de masa de la  $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa **23**, aunque el equipo lo reconoce como octaacetil sinuatol **22** (figura 26), debido que es el que más se parece en la base de datos, sin embargo como se ha mencionado se deduce que se trata de la  $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa por las características observadas en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 23), el cual fue comparado con la  $\alpha$ -glucosa acetilada **24** del catálogo Aldrich.

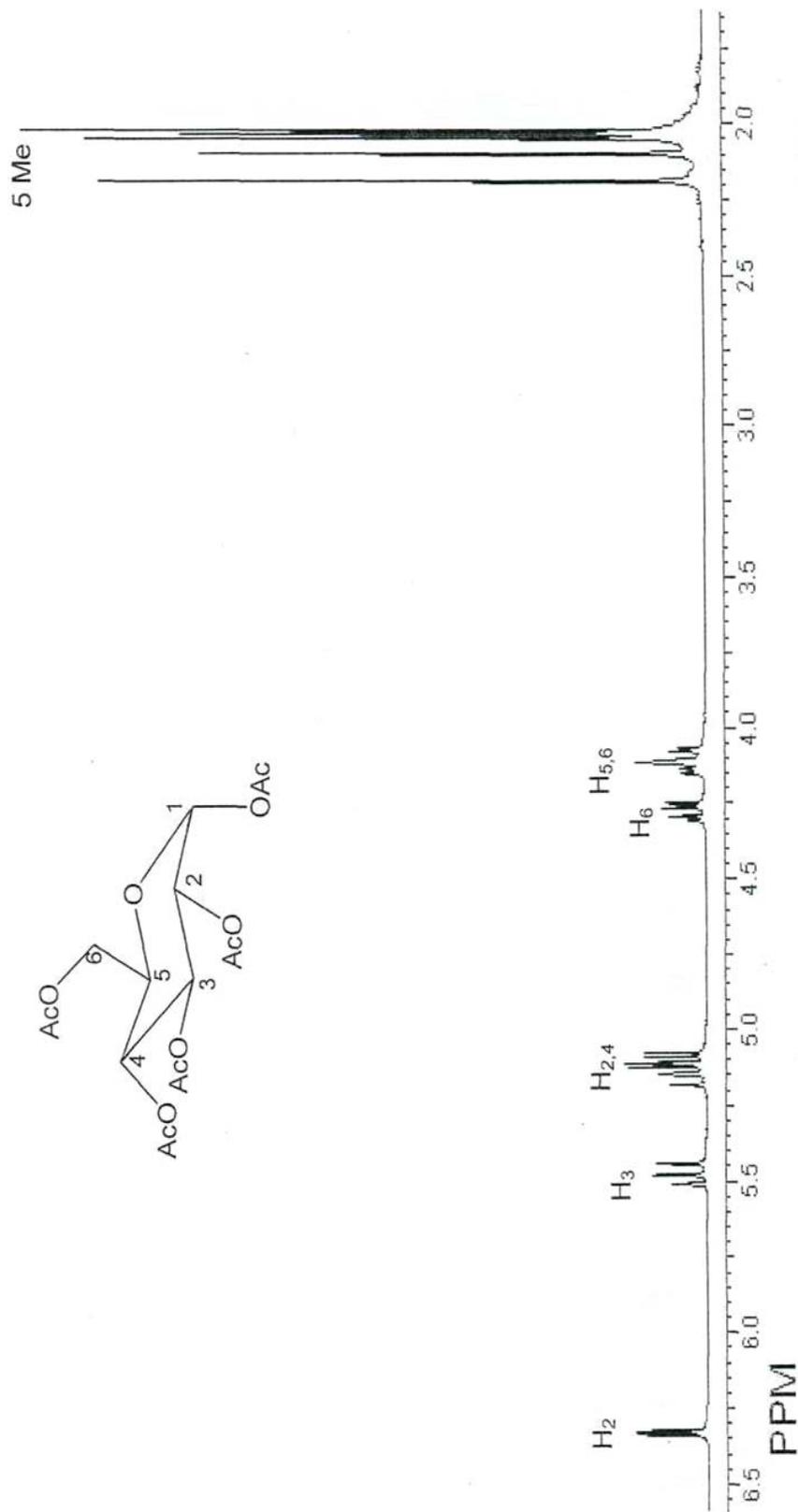


Figura 22. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del Pentaacetato de  $\alpha$ -Glucosa del catálogo Aldrich, en  $\text{CDCl}_3$ .

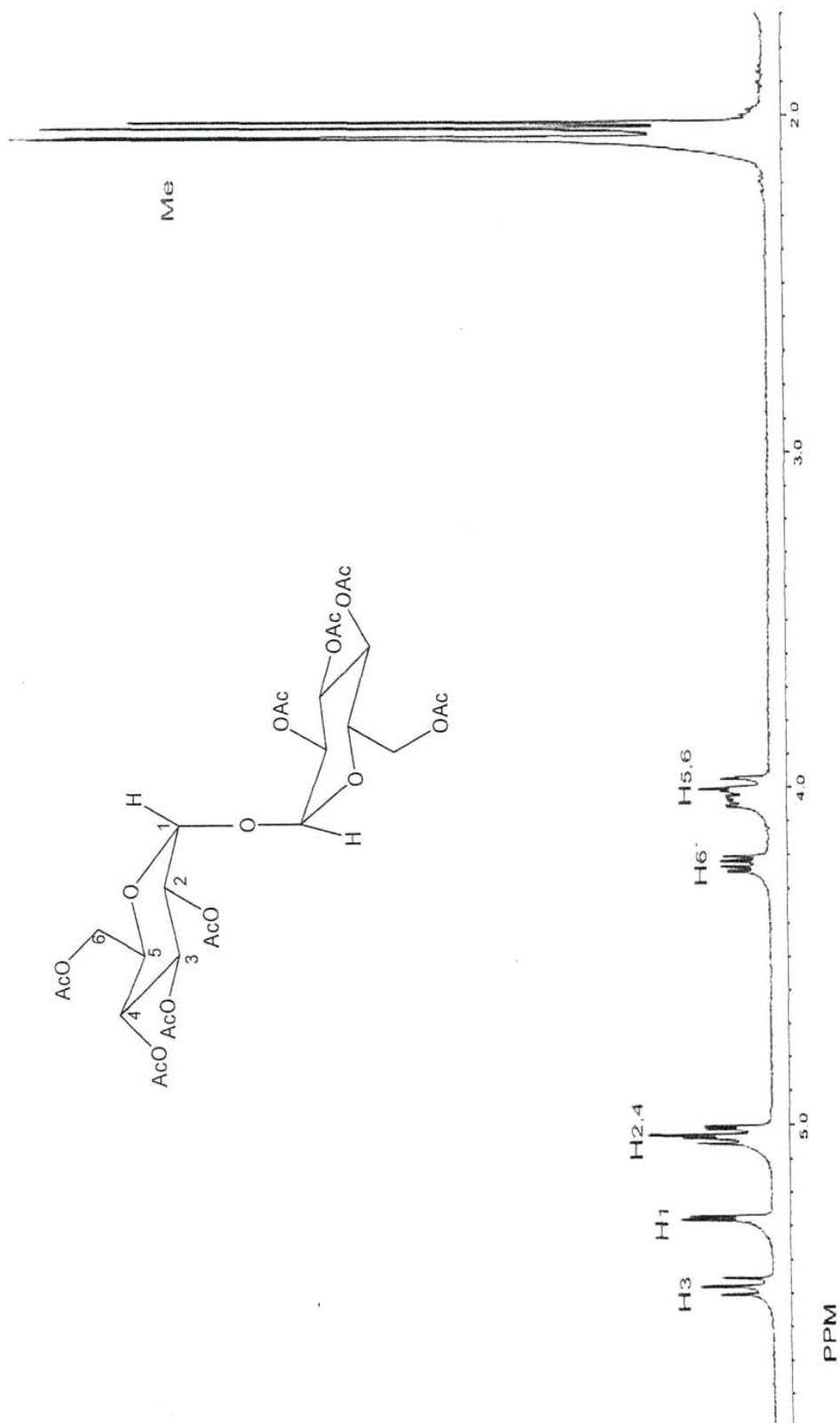


Figura 23. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz de la  $\alpha, \alpha'$ -Octaacetil trehalosa, en  $\text{CDCl}_3$ .

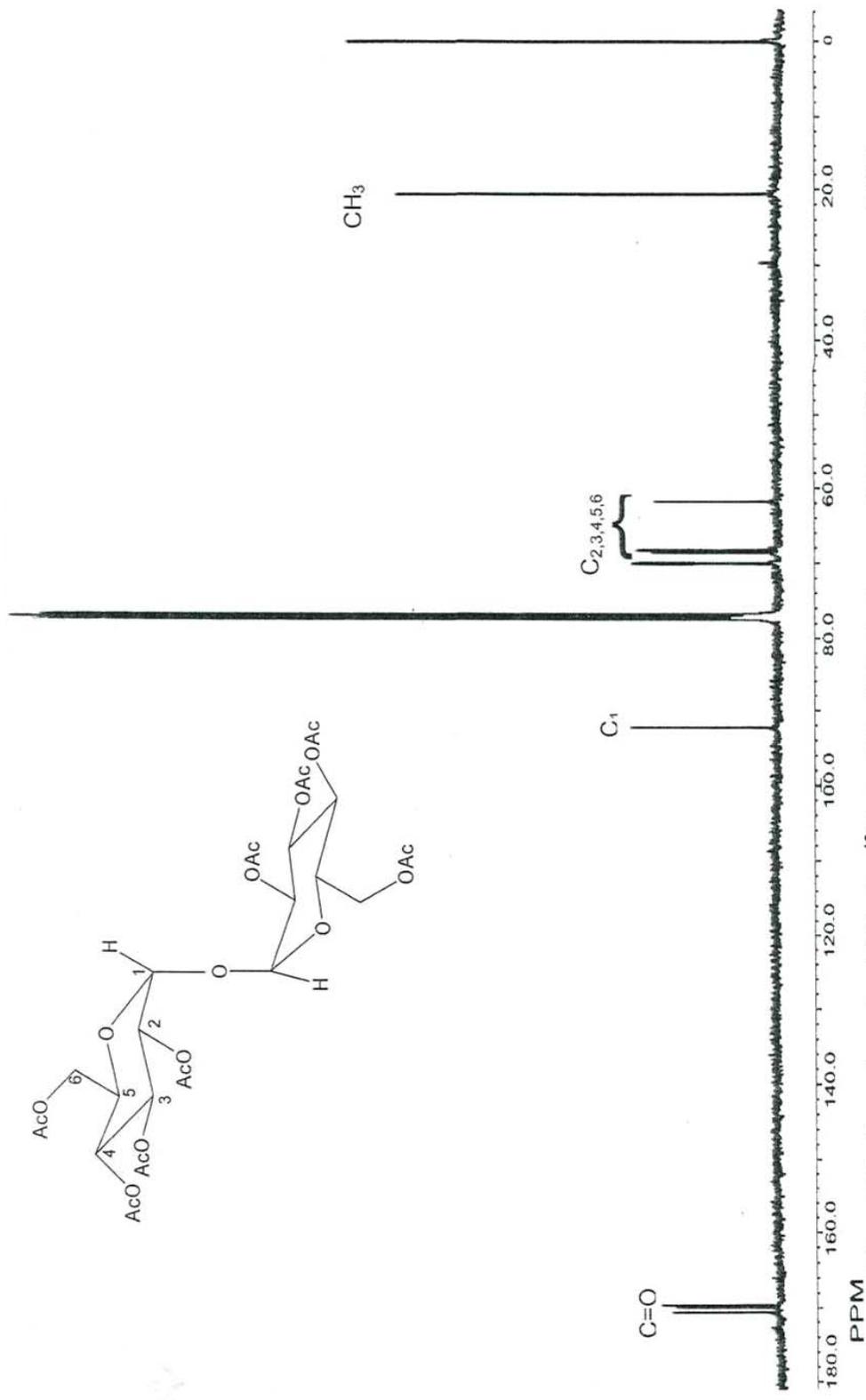
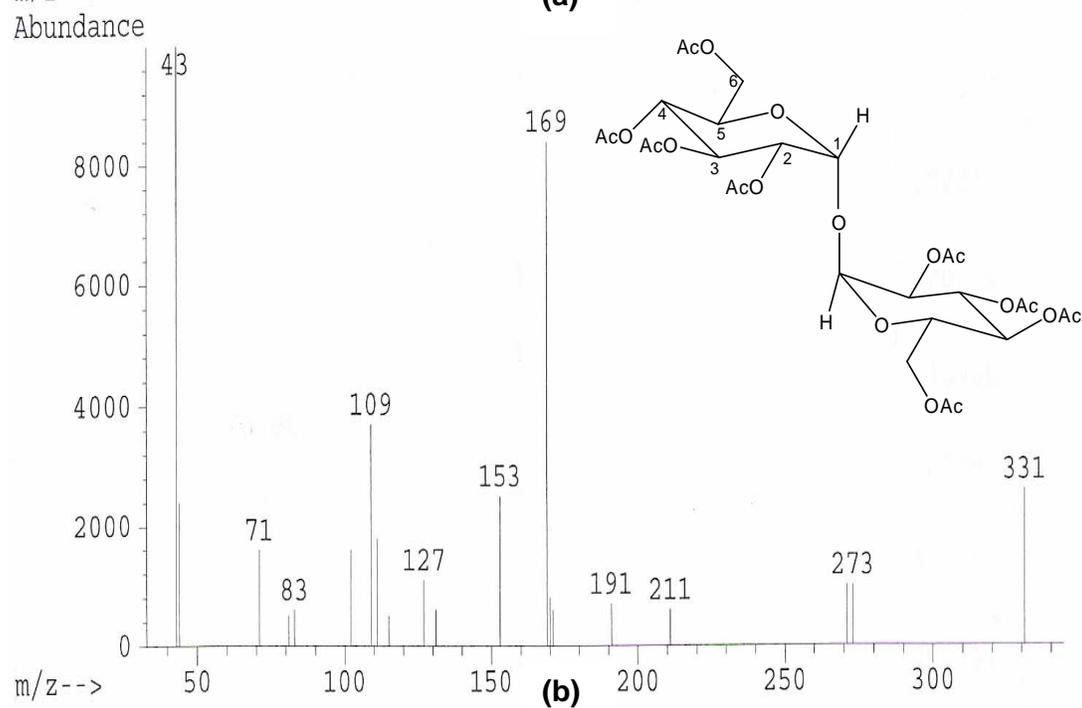
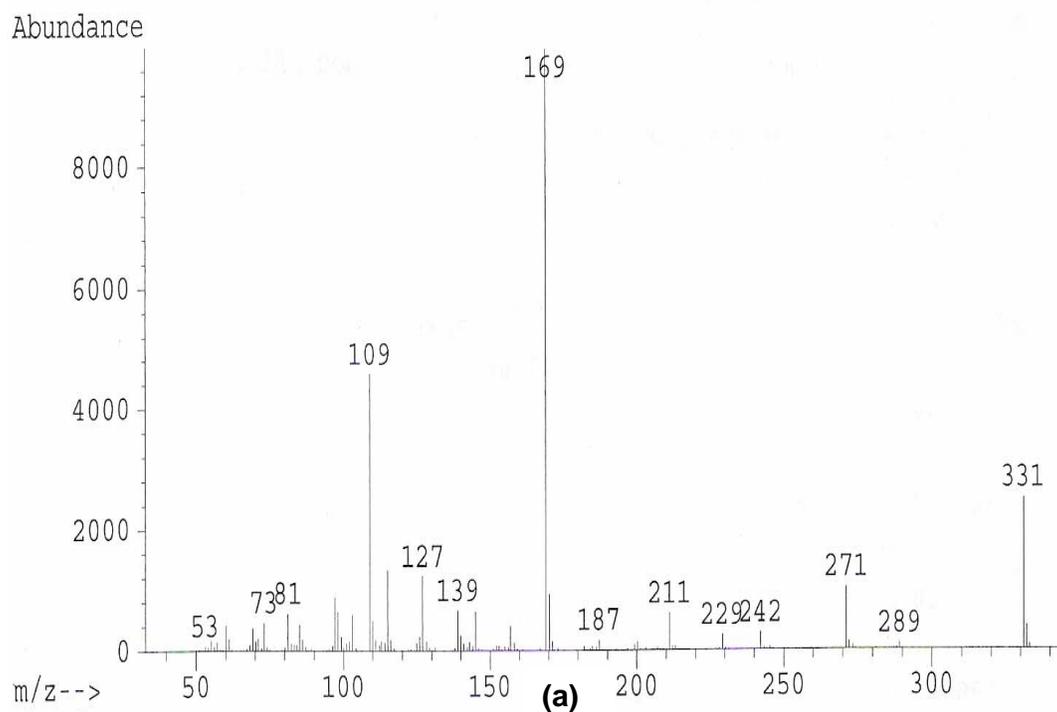


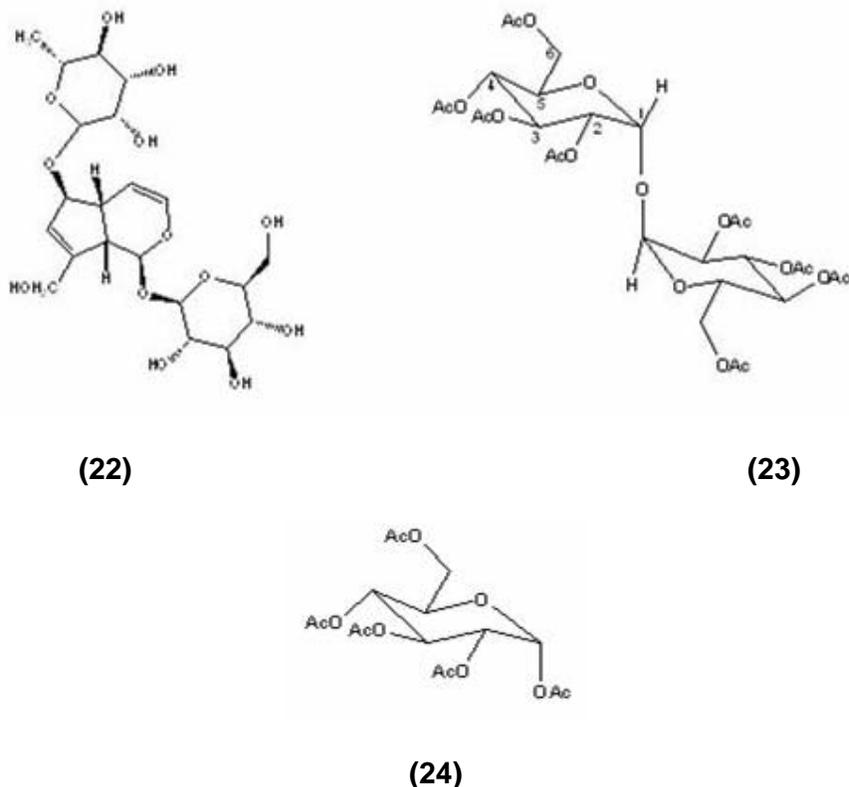
Figura 24. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz de la  $\alpha, \alpha$ -Octaacetil trehalosa, en  $\text{CDCl}_3$ .



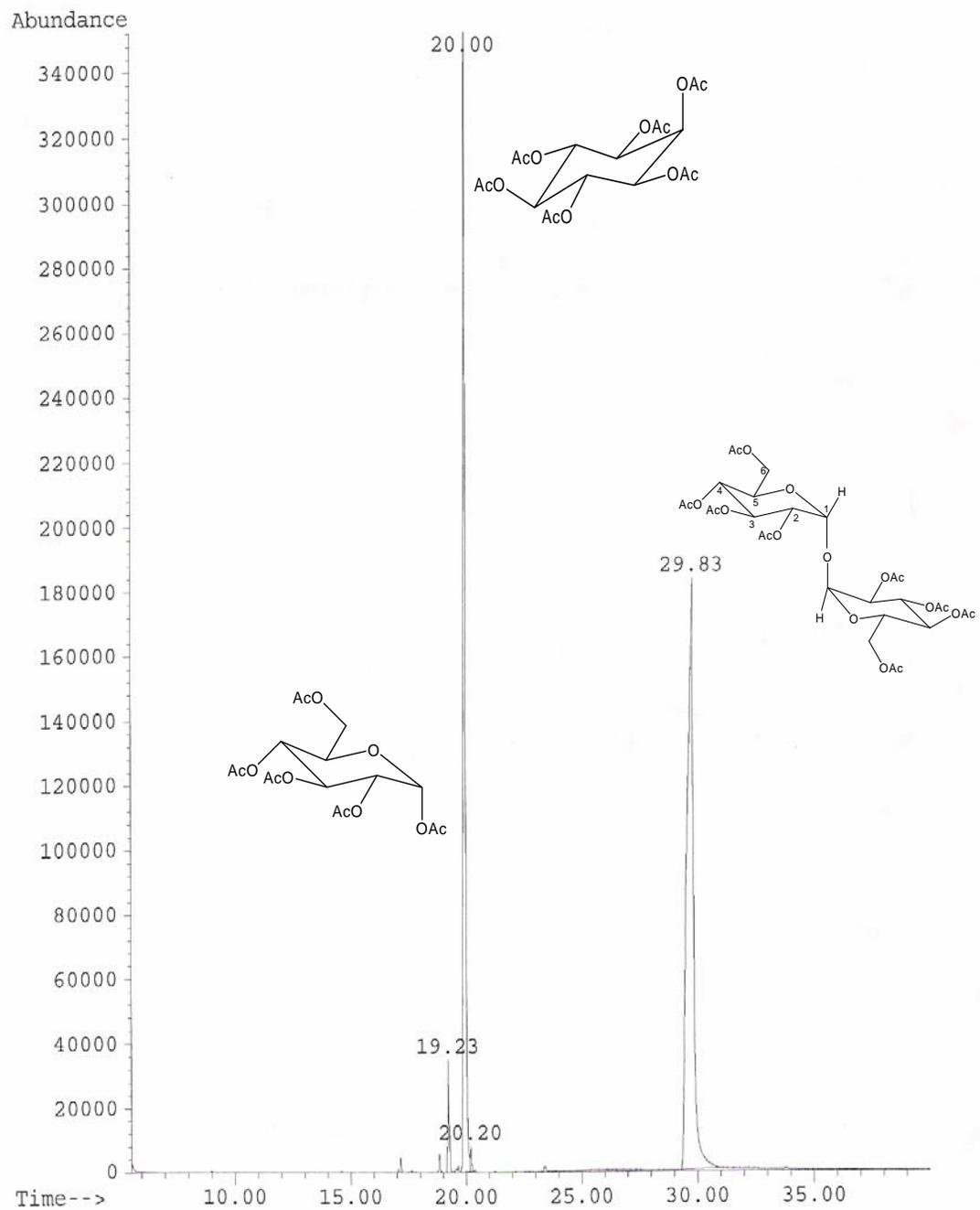
**Figura 25. Espectro de masa experimental (a) de la  $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa y (b) referencia en la base de datos Wiley 138 con un 90 % de calidad.**

Otra de las fracciones analizadas por espectrometría de masa y de RMN  $^1\text{H}$  es la fracción 27 en forma de cristales amarillos de tabla 10, donde el cromatograma de gases figura 27 indica que se encuentran presentes 3 compuestos importantes. A 19.23 minutos se observa el pentaacetato de  $\alpha$ -glucosa **24**, cuyo espectro de masa se muestra en la figura 28; a 20.00 sobresale el *Myo*-Inositol **9** cuyo espectro de masa aparece en la figura 21 y a 29.83 minutos la  $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa **23** su espectro de masa se observa en la figura 25 .

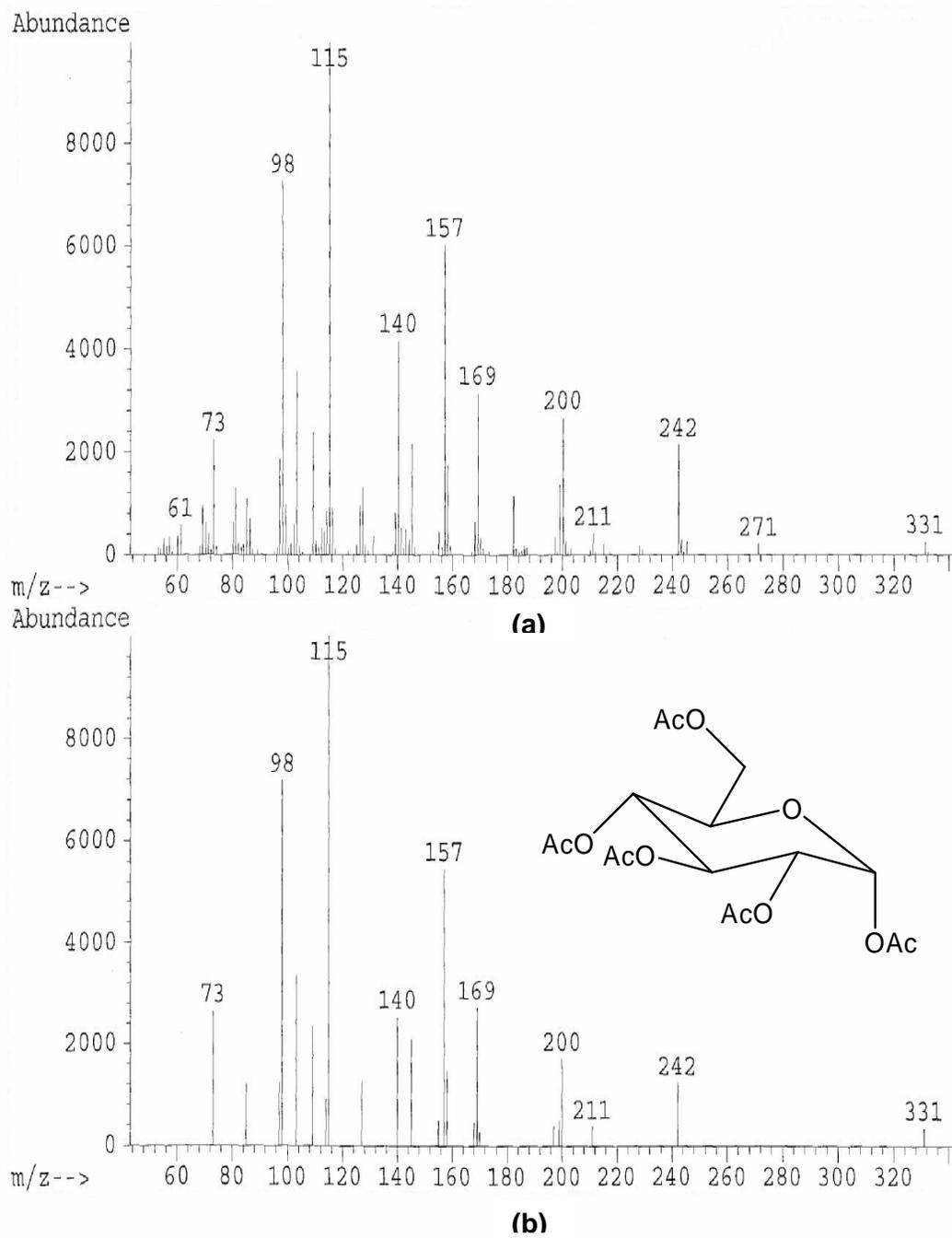
Además en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  figura 29 es imposible observar señales que indique la presencia de enlaces dobles como indica la estructura del sinuatol **22**, por lo tanto se indica que es la  $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa **23**.



**Figura 26. Estructuras del Sinuatol 22,  $\alpha,\alpha$ -octaacetil trehalosa 23 y Pentacetato de  $\alpha$ -Glucosa 24.**



**Figura 27. Cromatograma de gases de la fracción 27 obtenido de la acetilación del extracto etanólico.**



**Figura 28. Espectro de masa experimental (a) del Pentaacetato de  $\alpha$ -Glucosa 24 obtenido de la fracción 27 y (b) referencia en la base de datos Wiley 138 con un 90 % de calidad.**

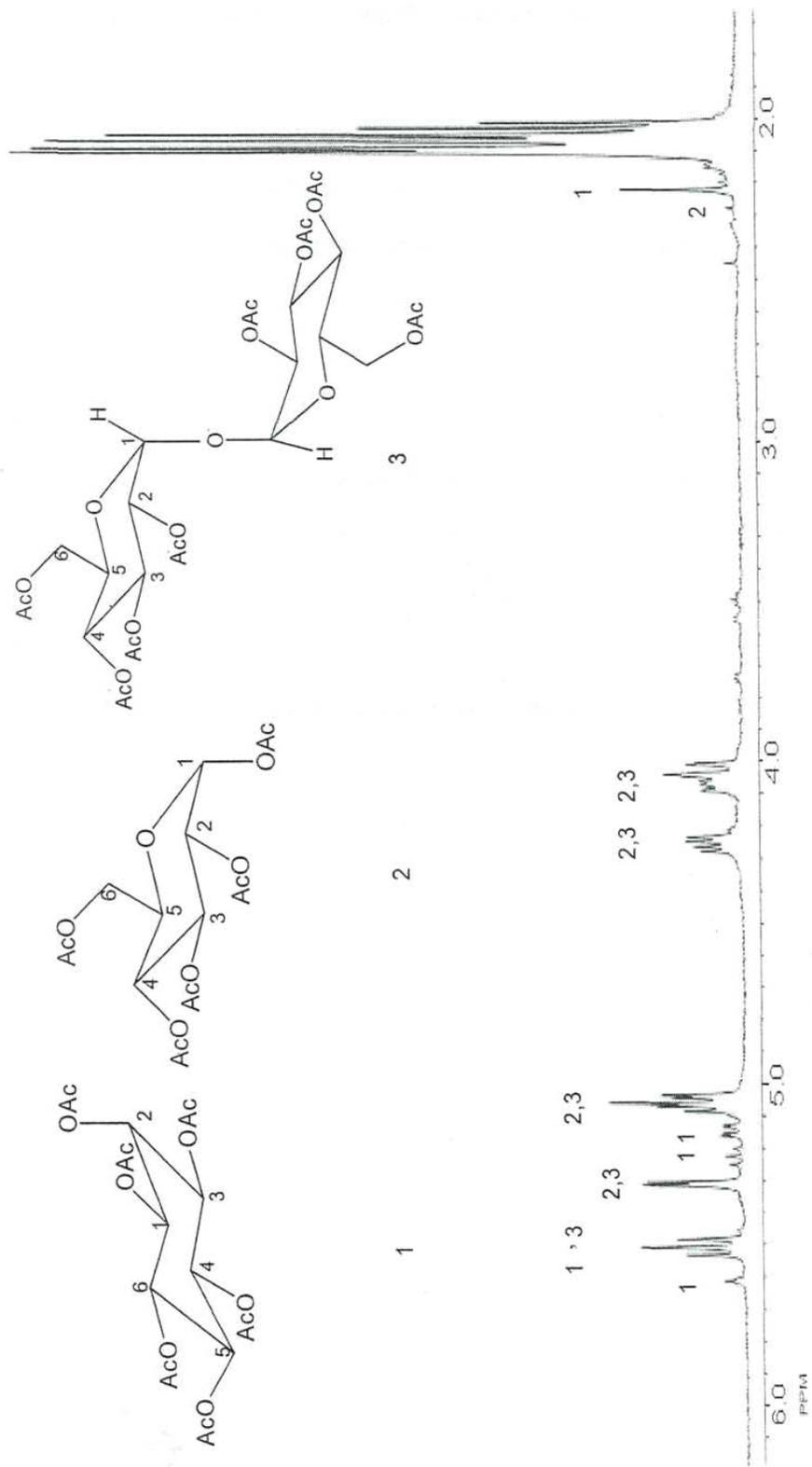


Figura 29. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz de la fracción 27, (1) Hexaacetato de Myo-Inositol, (2) Pentaacetato de  $\alpha$ -Glucosa y (3)  $\alpha, \alpha$ -Octaacetil trehalosa, en  $\text{CDCl}_3$ .

### 6.3 Reacción de acetilación del Extracto Acuoso

Se pesó 74.3 g de grana seca, y extrajo con H<sub>2</sub>O, repitiendo el mismo procedimiento del extracto etanólico, aunque del extracto acuoso solo se seco una parte para meter posteriormente a la reacción de acetilación, de aquí no se calculó rendimiento.

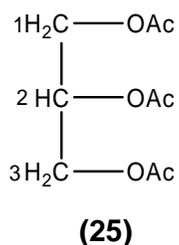
Del extracto acuoso, después de la reacción de acetilación al producto final, de acuerdo a lo realizado en la parte experimental, el sólido obtenido en AcOEt (1.1133 g) se metió a cromatografía en columna de la cual se obtuvieron 160 fracciones de 8 ml cada una las cuales se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14. Cromatografía en columna del extracto acuoso acetilado.**

FRACCION	POLARIDAD %	MEZCLA
1 – 6	100	Hex.
7 – 11	80 : 20	Hex : AcOEt
12 – 16	60 : 40	Hex : AcOEt
17 – 22	40 : 60	Hex : AcOEt
23 – 51	20 : 80	Hex : AcOEt
52 – 82	100	AcOEt
83 – 106	80 : 20	AcOEt : EtOH
107 – 124	60 : 40	AcOEt : EtOH
125 – 136	40 : 60	AcOEt : EtOH
137 – 150	20 : 80	AcOEt : EtOH
151 - 160	100	EtOH

Todas estas fracciones (tabla 15) fueron analizadas por cromatografía en placa de las cuales para la fracción 22 se observó en la placa que era un compuesto con mejor Rf 0.4 AcOEt que los comparados en la misma, ya que solo se observó en la placa el Rf indicado, se analizó por resonancia magnética nuclear, el cual indicó que se trata del triacetato de 1,2,3-propanotriol **25** (figura 30), además de la revisión bibliográfica realizada estos datos coinciden con nuestro compuesto (Espinoza, *et. al.*, 2004).

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 31) realizado en  $\text{CDCl}_3$  se observó una señal múltiple en 5.25 ppm característica del protón 2, dos señales doble de doble en la región 4.1-4.4 ppm característicos para los protones 1 y 3 de la molécula, también se observaron señales simples en 2 ppm características para los protones de los metilos del grupo acetilo.



**Figura 30. Estructura del triacetato de 1,2,3-propanotriol 25**

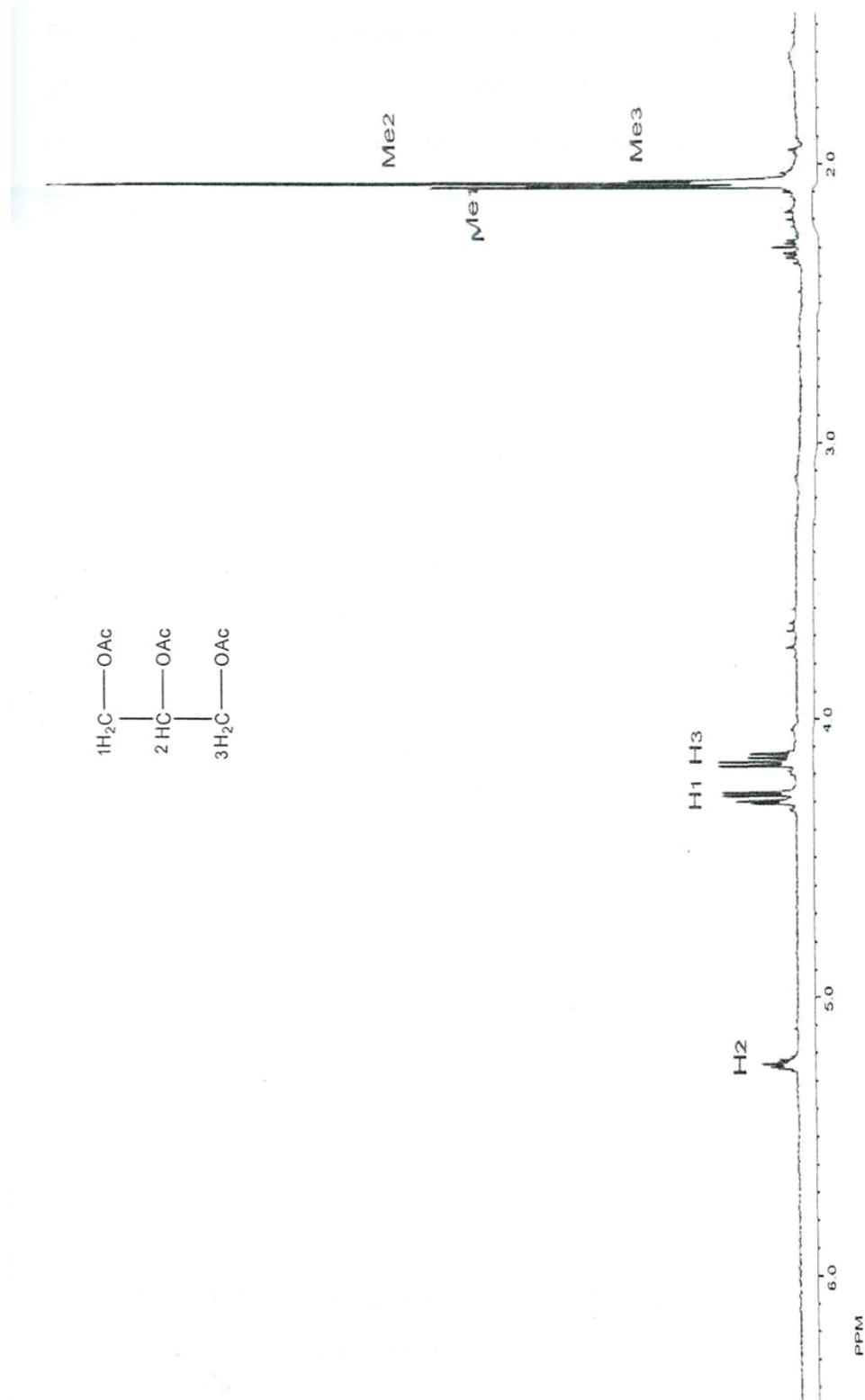
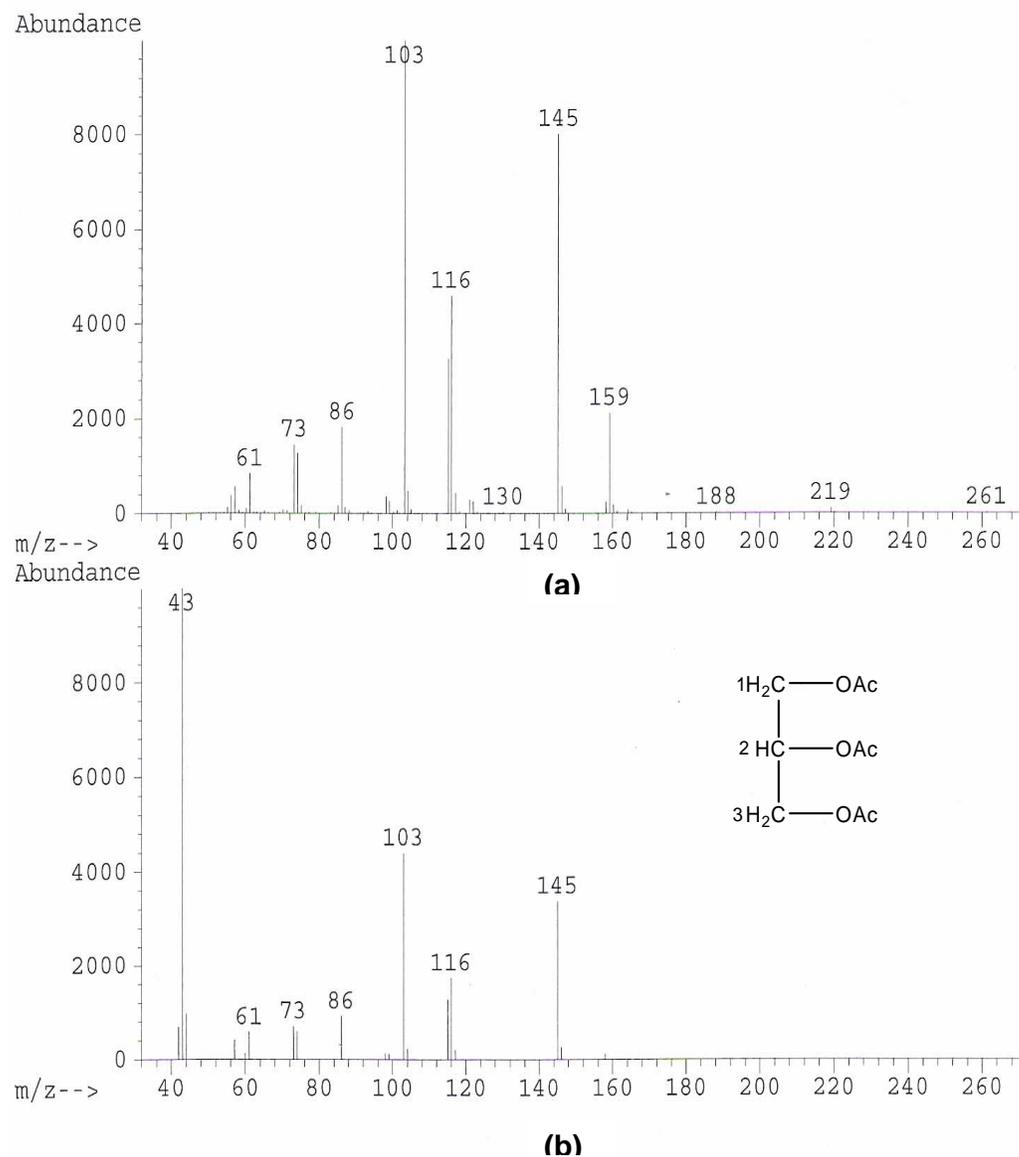


Figura 31. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz del triacetato de 1,2,3-propanotriol, en  $\text{CDCl}_3$ .

En la figura 32 se muestra el espectro de masa del triacetato de 1,2,3-propanotriol **24** con un 86 % de calidad, el cual poco coincide con la referencia, pero con referencia a la figura 31 se confirma que se trata de este compuesto.



**Figura 32. Espectro de masa experimental (a) del triacetato de 1,2,3-propanotriol **25** y (b) referencia en base de datos Wiley 138.**

## VII CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos; así como con los espectros de RMN y de masa, se encontró que al llevar a cabo la reacción de acetilación al extracto etanólico, se identificaron los compuestos de Hexaacetato de *Myo*-Inositol y  $\alpha,\alpha$ -Octaacetil-trehalosa.
- Se reporta por primera vez en la grana cochinilla, el *Myo*-Inositol que se encuentra en el organismo de los seres vivos.
- Del extracto acuoso acetilado se obtuvo el triacetato de glicerol, el cual tiene una función importante en el ciclo de Krebs dentro del metabolismo.
- En el extracto etanólico donde no hubo reacción se identificaron ácidos graso que por primera vez se reportan de la materia prima en estudio, los cuales son: Éster etílico del ácido dodecanoico, Éster metílico del ácido 14-metil hexadecanoico, Éster etílico del ácido tetradecanoico, Éster metílico del ácido dodecanoico, Éster metílico del ácido tetradecanoico, Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico, Éster metílico del ácido Eicosanoico y Ácido 9,12-(z,z)-octadecadienoico. En la parte polar del extracto etanólico el compuesto que sobresale es la trehalosa que ya ha sido reportada en investigaciones anteriores en el mismo grupo de trabajo.

## VIII PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

Por otra parte anteriormente se mencionó que la cera de cochinilla es un producto que aún no tiene valor comercial porque no se le ha dado algún uso, esto es por falta de estudios y evaluaciones correspondientes. Sin embargo, la cera de cochinilla es un producto natural que hidrolizada presenta propiedades adecuadas para ser utilizados en el encerado de frutos de alta calidad y probablemente como un buen sustituto de la cera de abeja y de candelilla. Para esto se sugiere que se estudie mas adelante.

Se espera que las fracciones coloridas del extracto etanólico se analicen mas adelante y se le de la importancia sobre estudios de nuevos compuestos que aporten algún beneficio a los productores de la grana cochinilla.

## VII BIBLIOGRAFIA

1. Ali, M. A. and Haynes L. J., **1956**. *Journal Chemical Society*. C-Glycosyl Compounds Part III Carminic Acid. pág. 1033.
2. Allevi,<sup>a</sup> P., Anastacia,<sup>a</sup> M., Bingham,<sup>b</sup> S., Ciuffreda,<sup>a</sup> P., Fiecchi,<sup>a</sup> A., Cighetti,<sup>a</sup> G., Muir,<sup>b</sup> M., Scala,<sup>a</sup> A. and Tyman,<sup>\*,b</sup> J., **1998** *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, síntesis de ácido carmínico, y los principales colorantes de la cochinilla. Pág. 575.
3. Bianco, A., Guiso, M., Lavarone, C., Passacantilli, P. and Trogolo, C. **1981**. *Phytochemistry*. 6-O-alfa-Sinuosylaucubin from *verbascum sinuatum*. Vol. **20**, pág. 465.
4. Biocons. **1988**. Label Clean-up has led to an increased used of Natural Colors. *Food Engineering*. (1). pág. 64.
5. Bohinski, Robert C., **1991**. *Bioquímica*. Quinta edición. Edición Pearson Education. pág. 418
6. Bojorquez, I. E. y Santiago, M. L. **1990**. Anteproyecto de norma para extracto de cochinilla y carmín colorante orgánico natural. Aditivo para alimentos. Tesis. Facultad de Química. UNAM.
7. Brana, D. D., **1964**. Cochineal: aboriginal dyestuff from Nueva España, Actas y memorial del XXXVI Congreso Internacional de Americanistas. Departamento f Geography. The University of Texas. Austins Texas. pág. 77.
8. Bravo, H. H., **1978**. *Las cactáceas de México*. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México.
9. Burge, P. S., O'Brien, I. M., Harries, M. G., Pepys, J., **1979**. Occupational [asthma](#) due to inhaled carmine. *Clin Allergy*; 9: pág.185.
10. Cal, A. **1987**. *Natural Colors Systems*. Food processing. pág. 46

11. Carey, F. A., **1999**. Química Orgánica. Editorial McGraw Hill, Tercera edición. pág. 896.
12. Carpi A, Ph.D. 2003. *Visionlearning*. Reacciones Químicas. Vol.1 pág. 6.
13. Carrillo, T. B. I., **2004**. Tesis de licenciatura. Estudio químico de hojas y tallo de *Mimosa púdica*. Centro de Investigaciones Químicas. UAEH. Pachuca Hgo.
14. Charalampous, F. C. j., **1957** *Biol. Chem.*, Vol. **225**. pág. 595.
15. Chiara, J. L. and Valle, N., **1995**. *Tetrahedron: Asymmetry*. Synthesis of L-*chiro*-Inositol and (-)-Conduritol F from D-Sorbitol by a Highly Stereoselective Intramolecular Pinacol Coupling Promoted by Samarium Diiodide. Vol. **6**. No. 8, pág. 1985.
16. Corona, G.S., **1996**. Estandarización de un proceso de extracción para la obtención de ácido carmínico a partir de la grana cochinilla. Tesis profesional. FESC UNAM.
17. Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D., **1993**. Bioquímica celular y Molecular. Segunda Edición. Editorial Omega. S.A. Barcelona, España.
18. De Lotto, G., **1974**. *J. Entomol. Society South* On the status and identity of the cochineal insects (Homoptera: coccoidea: Dactylopiidae). Vol. **37**. No. 1. pág. 167.
19. Devore, G. y Muñoz, E. M. **1994**. Química Orgánica. Editorial Publicaciones Cultural. Tercera reimpresión. Pág. 643.
20. Domínguez, X. A., **1973**. Métodos de Identificación Fotoquímica. Editorial Limusa. Primera Edición. pág. 896.
21. Eisner, T., Ziegler, R., McCormick, J. L., Eisner, M., Hoebeke, E. R., Meinwald, J. and Birkäuser, V. B., **1994**. Defensive use of an acquired substance (carminic acid) by predaceous insect larvae. pág. 610.

22. Espinoza, C. S. y Pérez, P. V. *et. al.*, **2004**. Aislamiento e Identificación de Metabolitos de *Dactylopius coccus* Costa. Tesis de licenciatura, UAEH.
23. Ferris, G. F., **1955**. Atlas of the scale insects of Nort America. Series IV. The Diaspididae (Part IV). Stanford University Press, Stanfor. pág. 172.
24. Fieser, and Fieser. Textbook of Organic Chemistry, Heat, Boston, **1994**, pág. 857.
25. Fieser, L. F., Fieser, M., **1966**. Química Orgánica Superior 2. ed Grijalbo S.A Barcelona México D.F. pág.1598.
26. Finar, L. I. **1998**. Química Orgánica Colorantes. pág. 842.
27. Fisher, H. O. L., **1945**. Harvey Lectures, 40. pág. 156.
28. Frank, E. L. and James F. L., **1996**, *Journal of Chromatography A*; Vol. **732**, No. 2,3. High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid,  $\alpha$ -and  $\beta$ -bixin, and  $\alpha$  -and  $\beta$  -norbixin,and the determination of carminic acid in foods. Pág. 394.
29. García, C. Z. y Zaragoza, S. N. **1990**. Estudio de la estabilidad del colorante de cochinilla y sus aplicaciones en alimentos. Tesis. FESC UNAM.
30. Gaullier J.M., Halse J., Hoye K., Kristiansen K., Fagertun H., Vik H. y Gudmundsen, O. **2004**. *American Journals. Clin. Nutrition*. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. Vol. **7**. pág. 1118
31. Granados, S. D. y Castañeda, P. A. D. **1991**. El Nopal, historia, fisiología, genética e importancia frutícula. Editorial Trillas. Primera Edición. pág. 141.

32. Hong, Z., Cui-Rong, S., Ishurd, O., Yuan-Jiang, P. and Li-Sheng, D. **2004**. *Carbohydrate Research*. Determination of the structures of four new isomeric cyclitols. Vol. **339**. pág. 2027.
33. Hutchings, J. B., **1994**. Food Colors and Appearance, Blackie, London.
34. Jamshid, L. M., Mahammad, H. S., Ali, M., **1998** *Haji-Shabani Talanta*. Spectrophotometric Determination of Nitrite Based on its Catalytic Effect on the Oxidation of Carminic Acid by Bromate. Vol. **46** pág. 1379.
35. Jerry, M. A. D. Organic Chemistry Reaction Mechanisms and Structure Second Edition. Ed. Mc Graw Hill Book Company.
36. Jill, G., y Roy, G., **1997**. *Carbohydrate Research*. Reactions of the ketone derived from (+)-3,4,5-tri-O-benzyl-1,2-O-isopropylidene-*myo*-inositol: preparation of racemic derivatives of *epi*-inositol and of 4-C-methyl-*epi*-(+)-*iso*-laminitol and 4-C-methyl-*myo*-inositol (+)-laminitol. Vol. **229**, pág. 77.
37. Kuni, T. and Armstrong, E. L., **1976**. *Biochemistry*. Isolation Characterization, and Function of 6-Mycolyl-6'-acetyltrehalose in the H37Ra Strain of Mycobacterium Tuberculosis. Vol. **15**. No 2.
38. López, G., **2000**. *Revista de la Sociedad Química*. México. Análisis proximal de la cochinilla grana *Dactylopius coccus* Costa. Vol. **44** (Número especial). pág. 87.
39. Manash, P. S., Mysore, S. S., Kana, M. S., Rajesh, G. G. and Mohan, B. **2005**. *Tetrahedron*. Sulfonate protecting groups. Synthesis of O- and C-methylated inositols: D- and L-Ononitol, D- and L-Laminitol, Mytilitol and *scyllo*-Inositol methyl ether. Vol. **61**. pág. 4437.

40. Marín, L. R. y Cisneros, F. V., **1977**. *Rev. Per. Entomol.* Biología y morfología de la cochinilla del carmín. *Dactylopius coccus* Costa (Homóptera: Dactylopiidae). Vol. 20, No. 1. pág. 115.
41. Marmion, D. M., **1979**. Handbook of U.S. Colorants for foods, drugs and cosmetics. Editorial John Willey and Sons, New York.
42. Marmion, D. M., **1984**. Handbook of U.S. Colorants for foods, drugs and cosmetics. Editorial John Willey and Sons. Tercera edición.
43. Moore, L. **1991**. The Natural vs. Certified. Food Engineering. No. 8. pág. 69.
44. Moyna, P. y Difabio, J. L., **1979**. Composition of cactaceae mucilages. Planta médica, 43. pág. 207.
45. Mukherjee, R. and Cleane, L. C. M., **1988**. *Phytochemistry*. Stereoconfiguration of Sequoyitol by high resolution  $^1\text{H}$  NMR. Vol. **27**, No. 1, pág. 279.
46. Mukherjee, R. and Edgardo, M. **1984**. *Phytochemistry*. Cyclitols from croton celtidifolius. Vol. **23**, No. 11, pág. 2682.
47. Murray, R. K., Mayes, P. A., Granner, D. K., Rodwell, V. W. **2001**. Bioquímica de Harper. 15<sup>va</sup> edición. Editorial El Manual Moderno. pág. 290.
48. N. Engl. **1999**. *J. Med.*, Vol. **340**. pág. 1314.
49. Norma Oficial Mexicana NOM 118-SSA-**1994**. Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes inorgánicos. Especificaciones sanitarias. Secretaria de salud.
50. Norma Oficial Mexicana NOM 119-SSA-**1994**, Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes Orgánicos. Naturales Especificaciones sanitarias. Secretaria de salud.

51. Official Journal of the European Communities. **1994** European Parliament and Council Directive 94/36 EC on Colours for use in Foodstuffs.
52. Ohen, J., **1965**. *J. Chem. Soc., Indian*. Compuestos C–glicosidicos. Vol. **2**. pág. 1033.
53. Ottestatter, G. **1990**. Colorantes Alimenticios. Ayer Hoy-Mañana. Industria alimentaria. Núm. 9. pág. 3.
54. Pérez, D.J.A. **1992**. Anteproyecto de una planta procesadora de grana cochinilla para la obtención de sus principales derivados. Tesis. Universidad La Salle.
55. Peter, A. M., Robert, K. M., Victor, W. R.I y Daryl, K. G., **1998**. Bioquímica de Harper, Editorial el Manual Moderno. pág. 187.
56. Piña, L. I. **1979**. La grana o cochinilla del nopal. Publicación de los Laboratorios Nacionales de Fomento industrial.
57. Pistara, V., Luigi, B. P., Catelani, G. C. A., D'Andrea, F. and Fisichella S., **2000**. *Tetrahedron Letters*. A new highly diastereoselective synthesis of *epi*-inositol from D-galactose. Vol. **41**, pág. 3253.
58. Portillo, L. y Viguera, A. L. **2003**. Departamento de Botánica y Zoología. CUCBA-Universidad de Guadalajara.
59. Rasimas, J. P. and Blanchard, G. J. **1995**. *American Chemical Society*. A Study of the Fluorescence and Reorientation Dynamics of Carminic Acid in Primary Alcohols.
60. Rasimas, J. P., Berglund, K. A. and Blanchard, G. J. **1996** *Journal Phys. Chemistry*. A Molecular Lock-and-key Approach to Detecting Solution Phase Self-Assembly. A Fluorescence and Absorption study of Carminic Acid in Aqueous Glucose Solutions. Vol. **100**. No. 17. pág. 7220.

61. Restrepo, I., **1992**. La contaminación Atmosférica en México. Sus causas y sus efectos. Comisión Nacional de Derechos Humanos.
62. Rex, T. G., **1975**, *Phytochemistry*. (+)-Pimpollitol: a di-o-methyl D-(+)-chiro-inositol from pinus radiata. Vol. **14**, pág. 755.
63. Reyes, Q. R. **1991**. Evaluación de la estabilidad y aplicación de una mezcla de colorantes de rojo cochinilla y rojo Núm. 3. Tesis profesional. FESC UNAM.
64. Rolf, Z., Leslie, A. W. et al. **1999**. *European Journal of Biochemistry*. A novel lipoprotein from the hemolympha of the cochineal insect, *Dactylopius Confusus*. Vol. **261**. pág. 285.
65. Roquero, A. **2000**. La grana cochinilla y sus tintes. (<http://www.jornada.unam.mx/2000/02/04/eco-grana.html>).
66. Sampedro J. G. **2002**. *RBE*. La levadura acumula trehalosa para proteger proteínas y membranas durante el estrés. Vol. 21. Núm. 4. pág. 258.
67. Sanfilippo, C., Patti, A., Piattelli, M. and Nicolosi, G., **1998**. *Tetrahedron: Asymmetry*. Convenient access to both enantiomers of new azido- and aminoinositols via a chemoenzymatic route. Vol. **9**. pág. 2809.
68. Sheinvar, L. **2004**. Flora cactológica del estado de Querétaro diversidad y riqueza. Ciencia y Tecnología. Edición Fondo de cultura económica. pág. 59.
69. Schul, J., **1993**. An ancient but still young colorant. Resumen del trabajo presentado en: The first International Symposium on Natural Colorants for Food, Nutraceuticals, Beverages and Confectionary. Nov. 7-10 Amherst, Massachusetts.
70. Schumm, D. E., Ph. D. **1998**. Principios de Bioquímica Editorial El Manual Moderno. S.A de C.V. México.

71. Streitwieser, A. J. y Clayton, H. H. **1985**. Química Orgánica. Ed. Interamericana. México.
72. Suárez, M. L., Massieu, J. R., Cravioto, G. R. y Guzman, G. J., **1954**. Nuevos datos sobre contenido en aminoácidos indispensables en alimentos mexicanos. Ciencia. México. Núm. 24. pág. 19.
73. Téllez, J. S. *et. al.*, **2003**. Condiciones de reproducción de cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) para optimizar la producción del ácido carmínico. Tesis de licenciatura. UAEH.
74. The Merck Index. (1996). Merck and co. Tenth edition. Inc. Rahway, N.J. USA. p. 1370.
75. Todd, A. Reports, 194, 38, pág. 214.
76. Valdés, M. S. E., *et al.*, **1993**. Evaluation of the stability of cochineal pigment and Oits potential use in food products. Resumen del trabajo presentado en "The first International Symposium on Natural Colorants for Food, Nutraceuticals, Beverages and Confectionary". Nov. 7-10 Amherst, Massachusetts.
77. Vázquez, C. E., **2003**. Bioquímica y Biología Molecular. Instituto de Química. UNAM.
78. [http://www.visionlearning.com/library/module\\_viewer.php?mid=54&l=s](http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=54&l=s)
79. <http://www.hector.sorzano.com/articulos/hexafosfato.html>