

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CARMÍNICO
E ANÁLISE POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Aluno: PAULO ROBERTO NOGUEIRA CARVALHO

Orientador: CAROL HOLLINGWORTH COLLINS



CAMPINAS - 1996

UNIVERSIDADE	IQ
T/UNICAMP	C2532
	28129
	667/96
	X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/07/96
Nº C.	

CM-00090753-5

Carvalho, Paulo Roberto Noguei
ra

Extração de ácido carminico e
análise por cromatografia líquida
de alta eficiência
T/UNICAMP/C253e
DEVOLVER NOME LEIT. (28129/96)

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

C253e

Carvalho, Paulo Roberto Nogueira.
Extração de ácido carmínico e análise por cromatografia
líquida de alta eficiência. / Paulo Roberto Nogueira
Carvalho. — Campinas, [SP : s.n.], 1996.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas.
Instituto de Química.

1. Ácido carmínico - extração. 2. Ácido carmínico -
análise. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. I.
Carol Holligworth Collins. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Dedico este trabalho à minha esposa e amiga **CÁSSIA REGINA LYMONIA CARVALHO**, com quem tenho partilhado todas as alegrias e tristezas e que soube, durante todo esse período, entender a minha ausência; Aos meus filhos, **PRISCILA** e **ANDRÊ**, que, com suas presenças, renovam sempre minhas esperanças; Ao meu pai, **OLÉRIO NOGUEIRA DE CARVALHO**, que não conseguiu ver, em vida, esta realização de seu filho, mas que, dentro do meu coração participou até o final. À minha mãe, **MARIA DA GLÓRIA DO NASCIMENTO CARVALHO**, pelo carinho e amor e pela fé que nos mostra a presença de Deus; Aos meus irmãos, **CARLOS ALBERTO**, **ANTÔNIO CARLOS** e **ROSANA**, pelo amor e confiança.

AGRADECIMENTOS

Vários profissionais contribuíram decisivamente para a concretização deste trabalho, em especial minha orientadora **Dra. Carol Hollingworth Collins** que, pela atenção e pelo carinho que me dedicou, desde o mestrado, conquistou minha admiração, meu respeito e minha amizade;

Ao amigo, **Jair Sebastião da Silva Pinto**, que participou, em grande parte dos estudos apresentados, com dedicação e profissionalismo;

Às amigas, **Marta Gomes da Silva e Enieluce Brito Parra**, que souberam, durante todo esse tempo, reconhecer as dificuldades por que passava e em nenhum momento exigia mais do que eu podia oferecer;

Aos meus amigos e colegas de trabalho **Dilza Maria Bassi Mantovani, Roberto Machado de Moraes e Marcelo Antônio Morgano**, que souberam sempre entender minhas dificuldades e, além do incentivo constante, contribuíram diretamente para o êxito deste trabalho;

A todos os outros amigos e colegas do **Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada** e de outras áreas do **ITAL**, que sempre me incentivaram e com os quais, sabia poder sempre contar. Em especial às amigas, **Maria Jandira Stefanini**, **Vera Lúcia Bonifácio** e **Lurdes Bueno Martins**, que me auxiliaram tanto na execução dos estudos como na manutenção de um ótimo ambiente de trabalho e à **Cláudia Aparecida da Silva, Elizabete Spina** e **José Álvaro R. Mattos**, pela contribuição nas análises das amostras estudadas;

Ao **Dr. Olavo Rusig**, pela amizade e atenção que tem demonstrado desde que nos conhecemos e, cujo saber, é motivo de minha admiração e respeito;

Ao Dr. Eidiomar Angelucci, a quem devo muito do que aprendi e que além de mestre tem sido um grande amigo;

Ao Dr. Issao Shirose, que sempre mostrou paciência e conhecimento nos esclarecimentos de minhas dúvidas.

À Dra. Vera Lúcia Pupo Ferreira, pela contribuição na análise de cor das amostras estudadas;

A todas as outras pessoas que de modo direto ou indireto participaram deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Matéria-prima	2
2.2 Ácido carmínico	7
2.3 Carmim	9
2.4 Toxicidade	12
2.5 Tecnologias de produção de carmim	13
2.6 Aplicações industriais	18
2.7 Métodos analíticos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Material	22
3.1.1 Matéria-prima	22
3.1.2 Reagentes	22
3.1.3 Equipamentos	22
3.1.4 Softwares	23
3.2 Métodos	24
3.2.1 Metodologias utilizadas para a análise da matéria-prima e dos produtos resultantes das metodologias estudadas	24
3.2.2 Planejamento experimental	27
a) Estudo dos fatores significativos	27
b) Estudo de otimização do processo de produção de carmim	30
3.2.3 Estudo de aplicação do carmim produzido e análise de cor	35

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Caracterização dos materiais	36
4.2	Estudos sobre a produção de carmim de cochonilha	39
4.2.1	Resultados dos estudos dos fatores significativos na produção de carmim de cochonilha	39
4.2.2	Resultado do estudo de pH e tempo de reação na extração do carmim de cochonilha (Simplex sequencial)	43
4.2.3	Resultados das superfícies de resposta nos estudos de extração de carmim de cochonilha	44
4.2.4	Tecnologia proposta	53
4.2.5	Avaliação das condições propostas para a extração de carmim de cochonilha	55
4.3	Estudo da aplicação do carmim produzido em <i>amostras modelo</i> e análise de cor	58
4.4	Análises por cromatografia líquida de alta eficiência	64
4.4.1	Estabelecimento das condições cromatográficas	64
4.4.2	Aplicação das condições cromatográficas obtidas na análise de carmim	69
4.4.3	Validação do método analítico para produtos coloridos com carmim	72
5	CONCLUSÃO	82
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
	APÊNDICE	92

EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CARMÍNICO E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

Aluno: Paulo Roberto Nogueira Carvalho

Orientador: Carol Hollingworth Collins

RESUMO

A preocupação dos consumidores com o uso de substâncias artificiais em alimentos tem aumentado muito nos últimos anos e feito com que os fabricantes procurem substitutos para os corantes artificiais ainda utilizados. O carmim de cochonilha, nome dado ao complexo de alumínio e cálcio do ácido carmínico (ácido 7- β -D-glicopiranosil-9,10-diidro-3,5,6,8-tetraidroxi-1-metil-9,10-dioxo-2-antraceno-carboxílico), extraído das fêmeas da cochonilha (*Dactylopius coccus* (Costa)), tem sido muito utilizado nesta substituição.

Este trabalho procurou desenvolver e otimizar uma tecnologia de produção de carmim, avaliar as aplicações do produto obtido em amostras de alimentos e estabelecer um método analítico, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para o estudo de alimentos coloridos com este pigmento.

Os resultados obtidos, através da utilização de planejamentos fatoriais fracionais, delineamento simplex e estudos de superfícies de respostas, indicaram um rendimento total do processo maior que 70%, superior aos encontrados na literatura para condições semelhantes, com um teor de ácido carmínico de 43%. A coloração do produto obtido foi mais escura que a da amostra comercial utilizada como referência. As amostras coloridas com o carmim produzido nas condições do estudo apresentaram, no sistema CIE L* a* b*, menos luminosidade, menos vermelho (+a*) e mais azul (-b*) que as amostras coloridas com o carmim comercial de referência. O método de análise por CLAE utilizou colunas de fase reversa (C18), com uma fase móvel constituída por uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico 1,19M (19:81). Foi avaliada a detecção por arranjo de diodos (DAD) e por fluorescência. Estas condições otimizadas permitem uma fácil quantificação

do ácido carmínico, mesmo na presença de outros corantes. As curvas de calibração foram lineares até 220 $\mu\text{g/mL}$. O limite de detecção foi de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para o DAD (490nm) e de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ para o detector de fluorescência, com precisões de $\pm 2,8\%$ (DAD) e $\pm 6,8\%$ (fluorescência com integração manual). As recuperações médias, obtidas para amostras fortificadas de água (baixa concentração de proteína) e leite (alta concentração de proteína) foram de 99,8% e 96,8%, respectivamente, mostrando que o novo procedimento propicia excelente recuperação, seletividade, exatidão e precisão.

EXTRACTION AND ANALYSIS OF CARMINIC ACID BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Candidate: Paulo Roberto Nogueira Carvalho

Surpevisor: Carol Hollingworth Collins

ABSTRACT

The preoccupation of consumers with the use of artificial coloring agents in foods has increased recently, as a result producers of foods products have looked for natural substitutes for these artificial coloring agents. Carmine from cochineal, the name given to the complex of aluminum and calcium with carminic acid (7- β -D-glucopyranosyl-9,10-dihydro-3,5,6,8-tetrahydroxyl-1-methyl-9,10-dioxo-2-antracene-carboxylic acid) extracted from females of the cochineal family (*Dactylopius coccus* (Costa)) has frequently been used for this substitution.

The present project aims to optimize the technology for carmine production, evaluate applications of the product obtained in foodstuffs and develop an analytical method based on high performance liquid chromatography (HPLC). Determination of the carmine content of some foodstuffs was used to evaluate the analytical procedure.

Optimization of the preparation was studied using fractional factorial planning, simplex and response surfaces, resulting in a process yield of 70%, higher than those of the literature, with a carminic acid content of 43%. The coloration of the carminic acid complex was somewhat darker than the commercial reference sample.

Analysis by HPLC used a C18 column with an acetonitrile - 1.19M formic acid (19 : 81) mobile phase. Diode array (DAD) and fluorescence (FD) detectors were compared. The calibration curves were linear up to 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while the detection limits were 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DAD) or 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FD) with precisions of $\pm 2.8\%$ (DAD) or $\pm 6.8\%$ (FD). Recuperations of 99.8% (fortified water, representative of a low

protein sample) and 96.8% (fortified milk, a high protein sample) were obtained, showing the excellent recuperation, selectivity, accuracy and precision of the determination.

1 INTRODUÇÃO

A cor é, sem dúvida, um dos atributos mais importante dos alimentos, principalmente quando se observa que cada vez mais os alimentos são expostos nos postos de vendas à observação e seleção dos consumidores. O impacto causado pelas cores dos alimentos sobrepõe a todos os outros e constitui o primeiro critério de aceitação ou rejeição de um produto. Estudos têm demonstrado que diferentes cores, em um mesmo alimento, podem induzir a sensação de diferentes sabores e ser o seu sucesso ou o fracasso (BIERREN, 1963).

A arte de colorir alimentos é muito antiga e os produtos usados para tal fim, bastante variados. Assim, muitas substâncias hoje comprovadamente tóxicas, foram utilizadas como corantes para alimentos. Os inúmeros casos de toxicidade apresentados por aditivos para alimentos, onde incluem-se os corantes, determinaram o estabelecimento de normas em diversos países, que vão desde a proibição ou restrição do uso, à liberdade de utilização de determinados corantes (ANGELUCCI, 1989 e 1991). Estas normas são geralmente baseadas em ensaios toxicológicos ou justificativa de carácter tecnológico e contam com o apoio de instituições internacionais como o JECFA (*Joint FAO/WHO of Expert Committee on Food Additives*) e a IARC (*International Agency for Research on Cancer*), para estas avaliações (NAZÁRIO, 1989).

Além disso, a preocupação dos consumidores com o uso de substâncias artificiais em alimentos tem aumentado muito nos últimos anos e feito com que a indústria busque substitutos para os corantes artificiais ainda utilizados. Essa substituição tem esbarrado em características como estabilidade, solubilidade, preço e fornecimento onde, de modo geral, os corantes artificiais levam

vantagens. Destes, a estabilidade tem sido colocada como a maior desvantagem apresentada pelos corantes naturais.

Contudo, um pigmento tem feito da estabilidade sua principal característica e, com isto, conquistado cada vez mais o mercado (SATO *et alii*, 1992). Este corante é o carmim de cochonilha, que apresenta como princípio ativo o ácido carmínico.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma tecnologia de produção de carmim de cochonilha e desenvolver uma técnica analítica, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, procurando simplificar os passos pré-cromatográficos.

Para isso, separamos o trabalho em três etapas que compreendem, na primeira parte, desenvolver e otimizar uma tecnologia de produção de carmim de cochonilha, avaliando as modificações necessárias para se obter um produto que atenda às especificações técnicas, na segunda parte avaliar a aplicação deste pigmento em amostras de alimento, comparando com um padrão comercial e, finalmente, estabelecer um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência para produtos coloridos com este pigmento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Matéria-prima

A cochonilha (*Dactylopius coccus* (Costa)) é um pequeno inseto, hospedeiro do cacto da espécie *Opuntia ficus-indica* (Mill), nativo de regiões andinas. As fêmeas adultas deste inseto apresentam altas concentrações de

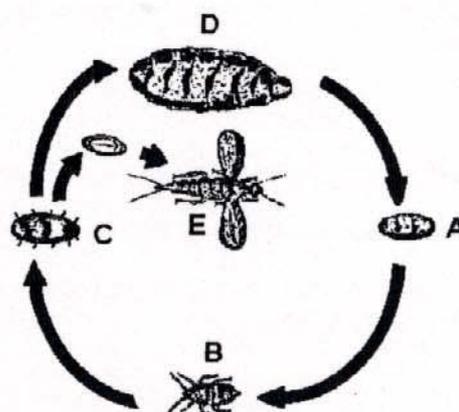
ácido carmínico e são, desde a época dos Incas, utilizados como matéria-prima para a coloração dos mais variados objetos.

O Tabela 2.1 apresenta a classificação completa da cochonilha, cujo ciclo de vida apresentado na Figura 2.1 é descrito como:

- A = ovo: os ovos apresentam superfícies lisas e lustrosas, semitransparentes, com coloração variando de roxa a lilás. Seu tamanho é, em média, de 1mm de comprimento por 0,5mm de largura.
- B = ninfa 1: conhecida como ninfa migrante, tem a forma oval, de cor roxa e tamanho de 0,8mm de comprimento por 0,4mm de largura. Possui antenas, patas e olhos e, neste estágio, se movimenta à procura de um lugar para se fixar.
- C = ninfa 2: neste estágio o inseto apresenta forma ovóide, de cor roxa escura e brilhante, coberto por uma matéria cerosa. Seu tamanho é geralmente 2,5mm de largura. Possui antenas e patas bastante reduzidas, o que a diferencia do estágio de ninfa 1. Nesta parte de seu desenvolvimento a cochonilha permanece viva no seu *habitat*.
- D = fêmea adulta: apresenta-se na forma enclausurada de cor roxa brilhante, coberta por uma substância pegajosa branca. Não apresenta asas e possui um aparelho bucal com o qual se fixa ao fruto e se alimenta. Seu tamanho varia de acordo com as condições de clima e período de reprodução.
- E = macho adulto: menor que as fêmeas, apresenta asas, antenas e patas delgadas. Seu corpo é de cor roxa com pouca cera. Seu desenvolvimento passa pelas formas pré-pulpa e pulpa.

TABELA 2.1 Classificação da cochonilha (MONTESINOS *et alii*, 1989)

Reino	Animal
Phylum	Artropoda
Classe	Inseto
Ordem	Homoptera
Sub-ordem	Sternorrhyncha
Super-família	Coccoidea
Família	Dactylopidae
Gênero	Dactylopius
Espécie	<i>Dactylopius coccus</i> (Costa) <i>Dactylopius confusus</i> (Cockerell)

FIGURA 2.1 Ciclo de vida da cochonilha (MONTESINOS *et alii*, 1989).

A cochonilha tem um período de vida ao redor de 130 dias, com maturidade sexual por volta de 100 dias. Durante sua existência deposita uma média de 500 ovos.

As fêmeas adultas da cochonilha são colhidas manualmente, antes da postura, usando-se uma espátula. A seguir são secas através da exposição ao sol por longos períodos (4 a 5 horas por dia, por aproximadamente uma semana) ou

à sombra por 25 a 30 dias, ou ainda através do uso de estufas, a 65°C durante 4 horas. A umidade final deverá ser inferior a 10%.

O produto seco é limpo, através da separação de impurezas oriundas da colheita e classificado.

O primeiro critério para a classificação é o tamanho, onde produtos retidos em peneira de 2mm são considerados "de primeira", em peneiras de 1mm são considerados "de segunda" e de 0,2mm para produtos "de terceira" (MONTESINOS *et alii*, 1989).

Outras características são também utilizadas para a classificação da matéria-prima, principalmente para a cochonilha destinada à exportação. O Tabela 2.2 apresenta alguns critérios utilizados pelo governo peruano para esta separação.

A existência da cochonilha (*Dactylopius coccus* (Costa)) depende de uma espécie vegetal pertencente à família das cactáceas, conhecida como figueira-da-índia, cuja classificação é apresentada no Tabela 2.3.

TABELA 2.2 Classificação da cochonilha destinada à exportação pelo Peru
(MONTESINOS *et alii*, 1989).

Conteúdo	Primeira	Segunda
Umidade (Max.)	10%	12%
Ácido carmínico (Min.)	18%	12%
Cinzas (Max.)	5%	8%
Impurezas (Max.)	3%	5%
Adulterações (Max.)	0%	3%

TABELA 2.3 Classificação da Figueira-da-Índia (MONTESINOS *et alii*, 1989).

Reino	Vegetal
Divisão	Fanerógama
Classe	Dicotiledónea
Sub-classe	Arquiclamídea (Coripétala)
Ordem	Cactacea (Opuntiales)
Família	Cactaceae
Sub-família	Opunticidaeae
Gênero	Opuntia
Espécie	<i>Opuntia ficus-indica</i> (Miller) <i>Opuntia pilifera</i> (Weber) <i>Opuntia tomentosa</i> (Salm Dyck) <i>Opuntia megacantha</i>

Nativa do continente americano, a planta tem se aclimatado com êxito em muitas regiões do mundo onde é conhecida por diferentes nomes como: *nopal* ou *chumbera* (México), *chumbo* ou *chardon Índica* (Espanha), *tuna espanhola* (Venezuela), e *figueira-da-índia* (Brasil).

A figueira-da-índia é descrita como “um arbusto ereto e ramoso, composto de artículos ou segmentos carnosos, verde-claros e armados de espinhos vigorosos, cuja flores amarelas são sésseis, hermafroditas, solitárias, sendo o fruto uma baga vermelha, amarela esverdeada ou branca, segundo as variedades” (FERREIRA, 1995). Sua altura varia de 1 a 4,5 m.

2.2 Ácido carmínico

A confusão que reinou durante muito tempo sobre a fórmula estrutural correta do ácido carmínico, tem origens nos trabalhos de LIEBERMANN e VOSWINCKEL de 1897 (LLOYD, 1980) onde, de modo errado estes autores consideraram o ácido coccínico idêntico ao ácido m-hidroxiuvítico (Figura 2.2). Como o ácido cochonílico pode ser descarboxilado para o ácido coccínico pelo aquecimento com água a 170°C, ele foi apresentado como precursor do ácido coccínico. Estes autores também propuseram as estruturas III e IV, como produtos da sublimação do ácido cochonílico ou de seu aquecimento a 200 - 210°C.

Duas das carboxilas do ácido cochonílico foram atribuídas como resultado da oxidação da estrutura anelar adjacente do ácido carmínico e, conseqüentemente, o anel A do ácido carmínico foi apresentado com um único grupo carboxilado na posição 4. Esta concepção errada foi utilizada em vários trabalhos posteriores.

A confusão só começou a ser elucidada quando OVEREEN e VAN DER KERK (1964) argumentaram a improbabilidade da reação proposta e

apresentaram a fórmula correta para o ácido cochonílico e do anel A do ácido carmínico.

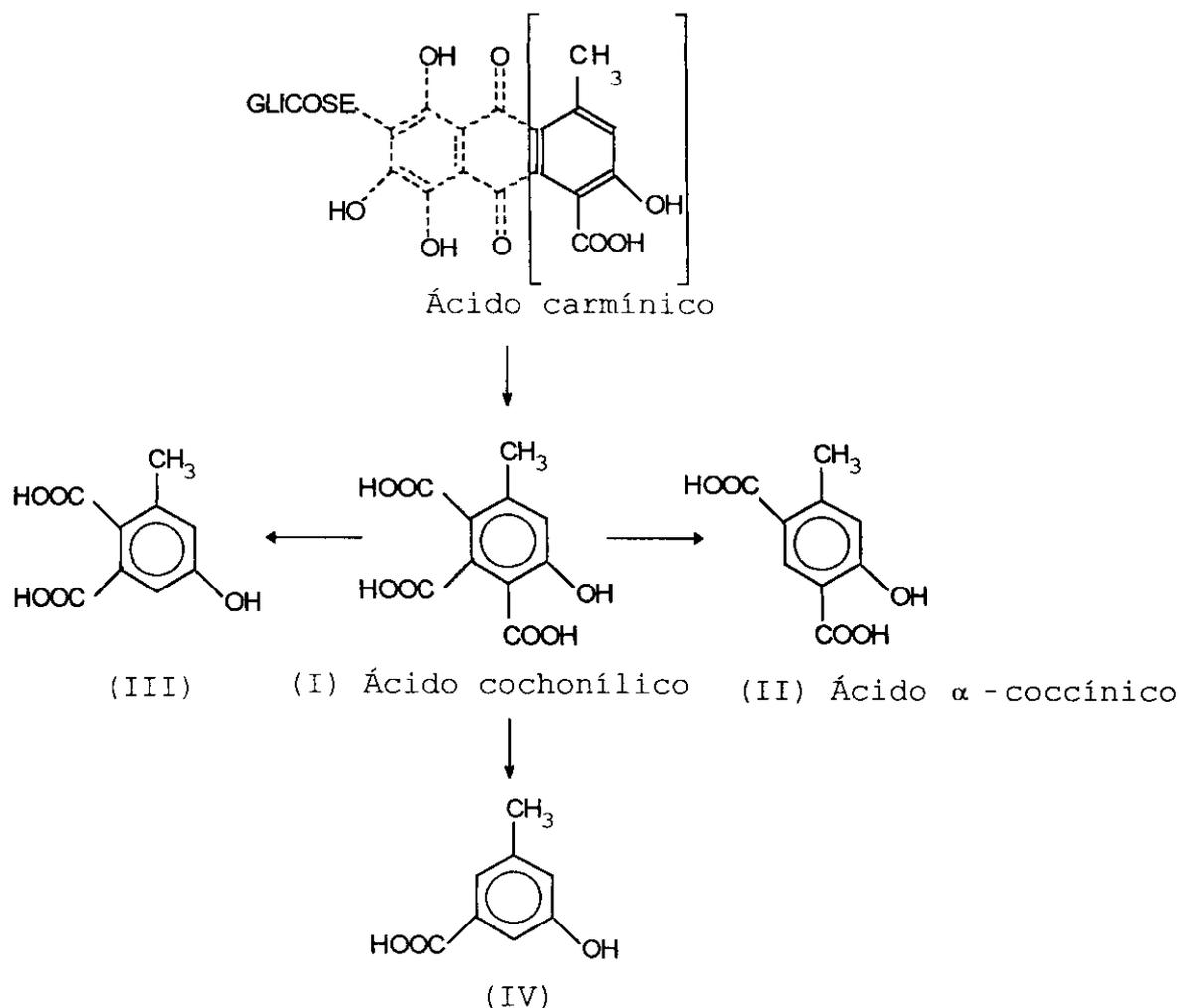


FIGURA 2.2 Estruturas propostas por LIERBERMAN e VOSWENKER para produtos de degradação do ácido carmínico (LLOYD, 1980).

A natureza do grupo substituinte na posição 7 da antraquinona foi estabelecida por ALI e HAYNES em 1959 (LLOYD, 1980), como uma unidade glicosídica. Assim, a estrutura do ácido carmínico pode ser descrita como: ácido

7-β-D glicopiranosil - 9, 10 - diidro - 3,5,6,8 - tetraidroxi - 1 - metil - 9, 10 - dioxo - 2 - antracenocarboxílico (Figura 2.3).

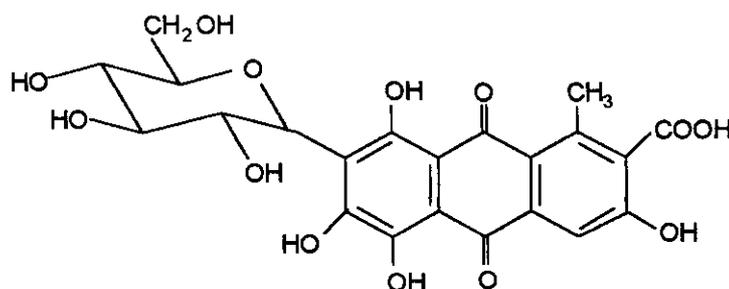


FIGURA 2.3 Fórmula estrutural do ácido carmínico.

2.3 Carmim

O ácido carmínico tem sido extraído e separado da cochonilha utilizando a sua propriedade de formar complexos com metais. Os estudos da complexação do ácido carmínico foram baseados na complexação da alizarina com cálcio e alumínio (LLOYD, 1980). Esta versão do complexo, apresentada na Figura 2.4, foi mantida durante muito tempo até que MELOAN *et alii* (1971), através do uso de modelos moleculares, demonstraram que a presença da carboxila na posição 4 poderia evitar a formação do quelato devido a impedimentos estéricos.

MELOAN *et alii* postularam, em 1971, também que se a carboxila fosse inserida na posição 2 não haveria tal impedimento e formulou a estrutura apresentada na Figura 2.5, que é atualmente aceita.

O produto obtido pela extração e separação do ácido carmínico da cochonilha, na forma de quelato, é denominado carmim de cochonilha e tem sido

apresentado como um pó de cor roxa viva e brilhante, insolúvel em água e éter de petróleo e solúvel em amoníaco. O Tabela 2.4 apresenta a composição química de carmins comerciais citados por alguns autores.

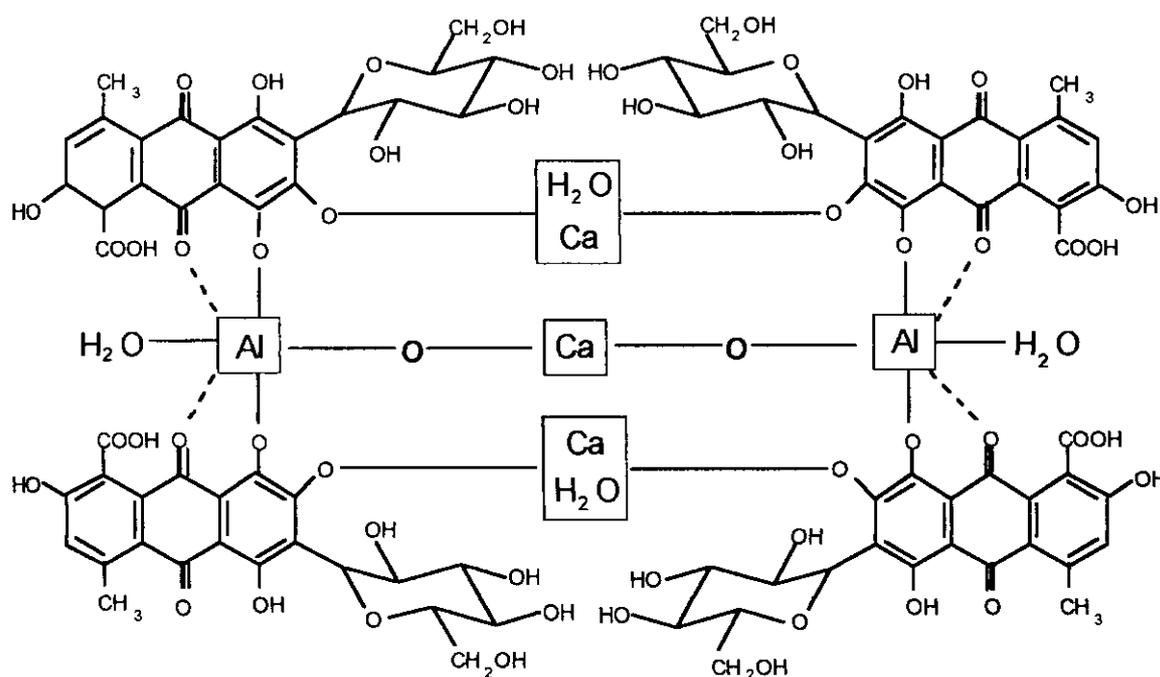


FIGURA 2.4 Estrutura proposta para o complexo alumínio/cálcio do carmin, baseado na complexação da alizarina com cálcio e alumínio (LLOYD, 1980)

As especificações técnicas para os corantes de cochonilha têm sido estabelecidas por vários países (ANON, 1968; FAO, 1969 e INCOTEC, 1978). A FAO/WHO (1977 e 1981), apresenta especificações técnicas para o carmin, que são seguidas pela legislação brasileira (LARA, 1984). Estas especificações definem o carmin como a "laca de alumínio ou cálcio-alumínio obtida de um extrato aquoso de cochonilha...". O Apêndice apresenta as especificações técnicas utilizadas no Brasil.

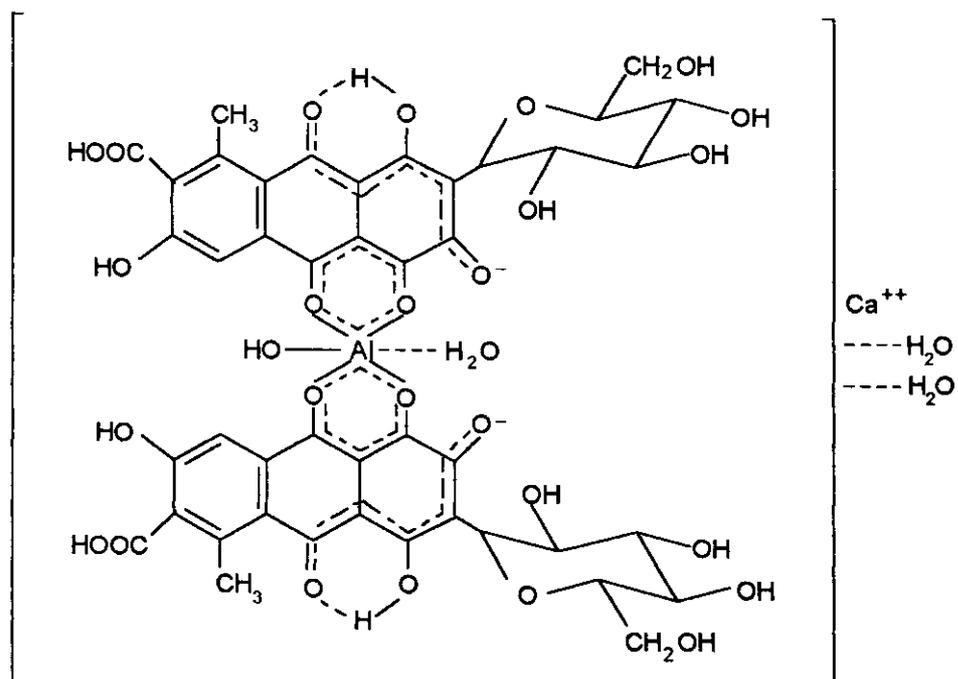


FIGURA 2.5 Estrutura do complexo alumínio/cálcio do ácido carmínico proposta por MELOAN *et alii* (1971)

TABELA 2.4 Composição química de alguns carmins comerciais.

	CASSANO (1962)	MOTTIER (1974)	RANDICH (1975)	PRADO (1985)	RIOS (1989)
Ácido carmínico (%)	56	40 - 45	54,68	62,04	55,34
Matéria nitrogenada (%)	20	18 - 20	28,35	17,23	18,6
Cinzas (%)	7	6 - 12	5,85	9,12	12,5
Umidade (%)	20	13 - 20	12,27	13,82	13,4

2.4 Toxicidade

A toxicidade dos pigmentos da cochonilha foi exaustivamente estudada. BARALE *et alii* (1978) realizaram testes microbiológicos para avaliar a mutagenicidade do ácido carmínico e todos os resultados foram negativos. A atividade mutagênica também foi objeto de estudo de LOPRIENO *et alii* (1992) e todos os testes *in vitro* e *in vivo* indicaram ausência deste efeito.

A carcinogenicidade destes pigmentos foram avaliadas em diversos estudos (FORD *et alii*, 1987; MORI *et alii*, 1991 e LOPRIENO *et alii*, 1992) que não demonstraram efeitos adversos.

A possibilidade do ácido carmínico induzir a formação de radicais livres foi estudada por GUTTERIDGE e QUINLAN (1986). Os resultados indicaram que, quando utilizados nas concentrações habituais (para colorir alimentos), ele não apresenta este efeito.

GRANT *et alii* (1987) avaliaram a teratogenicidade e embriotoxicidade do carmim em ratos e GRANT e GAUNT (1987) avaliaram os efeitos deste corante em três gerações destes animais. Não foram detectados efeitos adversos em ambos os estudos.

A IDA (Ingestão diária aceitável) para o carmim está estabelecida, pela FAO, em 0 - 5mg/kg de peso corpóreo desde 1982 (NAZÁRIO, 1989).

2.5 Tecnologias de produção de carmim

As tecnologias para a produção do carmim de cochonilha são amplamente citadas na literatura, com grandes variações entre as técnicas descritas. Os produtos resultantes destas metodologias apresentam aspectos diferentes dos carmins de cochonilha atualmente comercializados no Brasil. Essas alterações tecnológicas têm sido mantidas como segredos industriais, dificultando as explorações industriais deste segmento.

Os processos de produção do carmim têm como base a extração do ácido carmínico da cochonilha com soluções aquosas, complexação do ácido carmínico com sais de alumínio, separação do precipitado e secagem.

Essas tecnologias envolvem desde um pré tratamento da matéria-prima, visando a remoção da cera presente no inseto, (ALCABÉS, 1970 e PRADO, 1985) até extração direta com diversos sistemas de solventes. A água à ebulição é utilizada nos métodos Alemão (OVIEDO e GIBAJA, 1977), Chinês (PRADO, 1985), Francês (OVIEDO e GIBAJA, 1977), Napier (PRADO, 1985) e Thorpe (OVIEDO e GIBAJA, 1977). Soluções de sais, como citrato de sódio [ALCABÉS, 1970 e método Carré (PRADO, 1985)], carbonato de cálcio (método Inglês (RIOS, 1989)) e carbonato de potássio [método Muspratt (PRADO, 1985)] e soluções de hidróxido de potássio (método Napier) são também citadas para a extração do ácido carmínico da cochonilha.

Alguns métodos citam uma clarificação do extrato antes da reação para a formação do carmim [método Carré (PRADO, 1985) e ALCABÉS, 1970].

A reação para a formação do carmim tem como ponto comum, em quase todos os processos, o uso do sulfato de alumínio e potássio. Algumas tecnologias empregam apenas este sal (métodos Alcabés, Alemão, Carré, Chinês, Napier e

Thorpe), outras o utilizam em combinação com tartarato de potássio (método Francês), bioxalato de potássio, (método Muspratt), albumina (método Napier), carbonato de cálcio (RIOS, 1989) e acetato de cálcio (PRADO, 1985).

A secagem do produto final é realizada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz [ALCABÉS, 1970 e métodos Carré, Madame Cenette (OVIEDO e GIBAJA, 1977), Chinês, Inglês e Napier] ou em estufa a uma temperatura entre 35 a 40°C (métodos Alemão, Francês e Thorpe).

A seguir são descrito, de modo resumido, estes processos.

- Método Alcabés (ALCABÉS, 1970)

Tratar 40g da matéria prima (cochonilha moída) com 40mL de éter etílico e 25mL propanol e extrair o princípio ativo com um litro de uma solução contendo 12g de carbonato de cálcio e 14g de ácido cítrico, com aquecimento por 15 minutos. Deixar em repouso por duas horas e filtrar o extrato. Adicionar 1,6g carvão ativo, deixar em repouso por 30 minutos e filtrar novamente. Adicionar 16g de sulfato de alumínio e potássio e aquecer à ebulição por mais 15 minutos. Deixar em repouso por 2 horas e separar o precipitado por filtração e secar ao abrigo da luz por “algumas semanas”.

- Método Alemão (OVIEDO e GIBAJA, 1977)

Extrair os pigmentos de 50g da matéria prima (cochonilha moída) com água à ebulição por 15 minutos. Filtrar o extrato e adicionar ao filtrado 8g sulfato de alumínio e potássio. Aquecer a mistura por 15 minutos à ebulição e deixar em repouso. Separar o precipitado por filtração e secar em estufa em temperatura entre 35 e 40°C, por 15 minutos.

- Método Carré (PRADO, 1985)

O método Carré foi base para o estudo de Alcabés (ALCABÉS, 1970) e os procedimentos utilizados são coincidentes em várias etapas.

Extrair os pigmentos de 80g de cochonilha pulverizada, com três litros de uma solução, contendo 25g de carbonato de sódio e 22,5g de ácido cítrico, à ebulição por 15 minutos e deixar em repouso por uma hora. Filtrar, adicionar 3g de carvão ativo, deixar em repouso por 10 minutos e adicionar 25g de sulfato de alumínio e potássio. Aquecer à ebulição por 5 minutos e deixar em repouso por 2 horas. Separar o precipitado por filtração e secar ao abrigo da luz.

- Método Madame Cenette (OVIEDO E GIBAJA, 1977)

Extrair o princípio ativo de 50g de cochonilha com três litros de água à ebulição por 15 minutos. Adicionar 1,25g de nitrato de potássio, aquecer à ebulição por mais 5 minutos e deixar em repouso por 2 horas. Filtrar e adicionar ao filtrado 2,5g de tetraoxalato de potássio, aquecer à ebulição por mais 5 minutos, deixar em repouso por mais duas horas e adicionar 8g de sulfato de alumínio e potássio. Separar o material precipitado e secar em estufa a 35-40°C por 15 minutos e em dessecador por 48 horas.

Alguns artigos omitem a etapa de adição de nitrato de potássio.

- Método chinês (PRADO, 1985)

Extrair os pigmentos de 50g de cochonilha com 1,5 litros de água em ebulição por 10 minutos. Adicionar 0,5g de sulfato de alumínio e potássio e filtrar. Precipitar o carmim com uma solução de cloreto estano, adicionando "gota-a-gota", filtrar e secar .

- Método inglês (RIOS, 1989)

Extrair os pigmentos de 460g de cochonilha em pó com 30 litros de solução contendo 15g de carbonato de cálcio, em ebulição por 15 minutos. Adicionar 30g de sulfato de alumínio e potássio e aquecer à ebulição por mais 15 minutos. Adicionar 15g de albumina e aquecer a mistura, com agitação, até a coagulação. Separar o precipitado por decantação e secar ao abrigo da luz.

- Método francês (OVIEDO e GIBAJA, 1977)

Extrair o ácido carmínico de 50g de cochonilha com 3 litros de água em ebulição, por 15 minutos. Adicionar, ao extrato, 2g de tartarato ácido de potássio e aquecer à ebulição por mais 5 minutos. Adicionar 5g de sulfato de alumínio e potássio e aquecer por mais 10 minutos. Deixar em repouso por 2 horas, filtrar e secar em estufa entre 35 e 40°C.

- Método Muspratt (PRADO, 1985)

Extrair os pigmentos da cochonilha com uma solução de carbonato de potássio ou carbonato de sódio em ebulição. Precipitar o carmim com ácido fraco ou sais como bioxalato de potássio ou bitartarato de potássio e sulfato de alumínio e potássio. O precipitação pode ser acelerada pela adição de gelatina ou albumina.

- Método Napier

Extrair o ácido carmínico da cochonilha com uma solução de hidróxido de sódio e precipitar o carmim com sulfato de alumínio e potássio e um auxiliar, como clara de ovos. Separar o precipitado na forma de escamas.

- Método Prado (PRADO, 1985)

Retirar a cera da matéria-prima com benzeno, em refluxo, por 4 horas. Eliminar o solvente através do aquecimento em estufa a 100°C por 30 minutos. Extrair o ácido carmínico com uma solução aquosa contendo 25% de etanol, em refluxo por 12 horas. Trocar o solvente a cada 2 horas. Separar o álcool do extrato através de aquecimento à ebulição por 5 minutos. Filtrar, adicionar 0,482g de sulfato de alumínio e potássio e 0,321g de acetato de cálcio por grama de ácido carmínico e aquecer à ebulição por 10 minutos. Separar o precipitado por filtração e secar em estufa a 60°C por 30 minutos.

Método Rios (RIOS, 1989)

Extrair os pigmentos com 200mL de solução de citrato de sódio em ebulição por 10 minutos e filtrar. Reextrair os pigmentos remanescentes no resíduo com água em ebulição por 10 minutos e filtrar. Repetir o processo de extração com água mais uma vez e combinar os extratos. Concentrar a mistura final e adicionar sulfato de alumínio e potássio e carbonato de cálcio nas concentrações estequiométricas para a formação do complexo. Aquecer à ebulição por mais 10 minutos, deixar esfriar e filtrar. Secar em estufa a 60°C por 30 minutos.

- Método Thorpe (OVIEDO e GIBAJA, 1977)

Extrair o ácido carmínico de 50g de cochonilha pulverizada com 3 litros de água em ebulição por 10 minutos. Filtrar o extrato ainda quente e adicionar 8g de sulfato de alumínio e potássio. Aquecer à ebulição por mais 15 minutos, deixar em repouso por 5 horas e filtrar. Secar em estufa entre 35 e 40°C.

2.6 Aplicações industriais

A substituição dos corantes artificiais pelos naturais tem sido crescente nos últimos anos e, mesmo esbarrando em problemas como estabilidade, solubilidade e preço, esses pigmentos têm sido cada vez mais utilizados. Várias revisões têm apresentado as vantagens e desvantagens desta troca (SHIMANO, 1973; RAYNER, 1993; VON ELB, 1986; COULSON, 1981; MARUSZEWSKA e GERTING, 1978; ANAND, 1983 e ANDRES, 1987).

O carmim de cochonilha tem feito da estabilidade a sua melhor característica nesta substituição (KEARSLEY e KATSABOXAKIS, 1980). SUNADA e KATO (1969), estudaram o efeito da radiação (raios gama) sobre corantes para alimentos e concluíram que o carmim apresentou boa resistência à radiação usada.

Os corantes de cochonilha têm sido utilizados com sucesso em vários tipos de alimentos. OHLEN e BERTELSEN (1989) apontam a eficiência deste tipo de pigmento em substituição a corantes artificiais em salame. O uso em produtos cárneos também é citado por PETIT *et alii.* (1986), MADSEN *et alii.* (1993), e MESLE (1972). VON ELBE (1977) apresenta o uso do carmim em produtos lácteos.

Outros alimentos, como bebidas (WALKER, 1982 e YURNA *et alii.*, 1982), chocolate (ILANY, 1975) e produtos de confeitaria (TADAMASA, 1981; GROTHUS, 1981 e LEES, 1975) têm sido coloridos, com sucesso, com esse pigmento.

2.7 Métodos analíticos

É possível encontrar na literatura métodos baseados em diferentes princípios analíticos para o estudo do carmim e de ácido carmínico, como cromatografia em papel, cromatografia em coluna aberta, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese.

MC NEAL (1976), utilizou cromatografia em papel, espectrofotometria e reações químicas específicas para identificar o ácido carmínico e vários outros corantes em produtos cárneos.

PRADO (1985) avaliou a utilização de dezessete fases móveis para a separação, por cromatografia em papel, dos pigmentos presentes no carmim de cochonilha. Das fases estudadas a mistura de hidróxido de amônio - piridina - n-butanol (6:3:2) foi a que apresentou melhor resultado.

Utilizando cromatografia em coluna aberta com fase estacionária composta por aminoetilcelulose e celite, KENMOCHI e KATAYAMA (1977) separaram e identificaram os pigmentos de um corante de cochonilha. A fase móvel utilizada foi uma solução-tampão de amônia com gradiente de pH.

A cromatografia em camada delgada é, sem dúvida, a técnica mais utilizada para a análise dos pigmentos do carmim. MARSHAL e HOROBIN (1974) estudaram a separação dos pigmentos do carmim de cochonilha utilizando a cromatografia em camada delgada com celulose como fase estacionária e uma mistura de acetona-ácido acético-água (1 : 1 : 1), como fase móvel, complementada por filtração em gel. O ácido carmínico separado foi quantificado por espectrofotometria a 490nm, utilizando uma absorvidade molar igual a 8595.

ANDREY (1979) utilizou a cromatografia em camada delgada, associada à cromatografia de troca catiônica (Dowex 50W), para a análise de ácido

carmínico em suco de laranja. A fase estacionária utilizada na CCD foi celulose e o cromatograma foi desenvolvido com uma mistura de sulfato de amônio em ácido acético e ácido clorídrico. O pigmento foi quantificado por espectrofotometria.

Três diferentes fases estacionárias e três diferentes fases móveis para cromatografia em camada delgada foram avaliadas por ANDRZEJEWSKA (1981) para a análise de corante de cochonilha em produtos cárneos. A recuperação conseguida pela metodologia foi de 90%.

HIRATA *et alii* (1983) conseguiram uma recuperação de 80% na aplicação da cromatografia em camada delgada para a análise de corantes naturais, entre os quais o carmim, em produtos de peixe. O método, contudo, apresenta passos laboriosos de extração e clarificação.

Óxido de magnésio, ativado a 130°C, foi utilizado como fase estacionária por MASLOWSKA (1985) para a separação de vários corantes, entre os quais o carmim, por cromatografia em camada delgada. A fase móvel utilizada foi uma mistura de citrato de sódio em metanol.

EGGINGER (1987) utilizou cromatografia em camada delgada para analisar uma série de corantes naturais hidrossolúveis, como o pigmento de cochonilha. A fase estacionária utilizada foi celulose microcristalina e polietilenoiminocelulose (4:1), desenvolvida com uma mistura de fenol (5%): acetato de etila: isobutanol: ácido acético: ácido fórmico: ácido clorídrico (30:5:20:5:5:1). EGGINGER (1991) também utilizou sílica-gel como fase estacionária para a separação do ácido carmínico em produtos cárneos. Vários sistemas de solventes foram utilizados como fase móvel neste trabalho.

YAMADA *et alii* (1993) analisaram várias amostras de alimentos utilizando a separação, por cromatografia em camada delgada, de produto de cochonilha pré-metilados. O método envolve a metilação com diazometano e separação em

placas de sílica gel. A fase móvel utilizada foi uma mistura de clorofórmio-metanol-água (65:35:10). O composto indicador, caracterizado como o ácido 3,6-di-o-metilcarminico, foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência.

Dois estudos utilizaram a técnica de eletroforese para a determinação de pigmentos de cochonilha. YAMAMOTO *et alii* (1973) utilizaram membrana de acetato de celulose para separar três corantes (amaranto, pigmento de cochonilha e ácido lacáico) e MASLOWSKA e GRONOWSKA (1984) utilizaram eletroforese em papel para separar complexos metálicos de corantes de alimentos.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido pouco citada na separação dos pigmentos do carmim e, quando feito, não tem utilizado vantagens inerentes à técnica.

WELLNITZ e BENTLER (1986) recomendam um método de detecção de pigmentos de cochonilha em produtos cárneos, baseados na separação e identificação por cromatografia em camada delgada e confirmação por cromatografia líquida de alta eficiência.

JALÓN *et alii* (1989) apresentam a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de ácido carminico em iogurte. Os autores utilizaram cromatografia em fase reversa (C_{18}) com fase móvel formada por uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico. As recuperações do método chegam a 95,3% e permitem a detecção de concentrações de ácido carminico superiores a 0,10mg/kg. A grande desvantagem da metodologia são os processos pré-cromatográficos longos e laboriosos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Matéria-prima

a) A matéria-prima utilizada para o estudo de extração foi uma cochonilha seca, obtida no mercado e caracterizada em nosso laboratório quanto a sua composição centesimal e concentração de ácido carmínico.

b) O corante carmim de cochonilha utilizado como padrão comercial foi obtido no mercado, junto a empresas da área de corantes para alimentos.

c) Padrão de ácido carmínico marca Sigma[®], código 3522, lote nº 44H2502.

3.1.2 Reagentes

Todos os reagentes e solventes foram utilizados de acordo com suas especificações (ex: p.a., para cromatografia, etc.)

3.1.3 Equipamentos

a) Cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian[®], modelo 5.000, acoplado a um detector espectrofotométrico, UV/visível, marca Varian[®], modelo UV100 e integrador/registrator marca Varian[®], modelo 4290.

b) Cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Varian[®], modelo 8.500, acoplado a um detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, marca Shimadzu[®], modelo SPD-M6A, e um sistema de aquisição de dados (microcomputador) marca Acer[®], modelo 915V (II) com impressora marca NEC[®], modelo P6300.

- c) Coluna cromatográfica LiChroCART[®], com 250mm de comprimento por 4mm de diâmetro interno, recheada com partículas de 5 μ m, LiChrospher[®] 100, RP18 (E. Merck[®])
- d) Detector cromatográfico espectrofluorimétrico, modular, marca Varian[®], modelo 2070.
- e) Espectrofotômetro UV/Vis. marca Hitachi[®], modelo U2000, com "auto sipper" e amostrador automático marca Hitachi[®], modelo AS1000.
- f) Espectrômetro de emissão em plasma, marca BAIRD[®], modelo ICP2000, versão simultânea.
- g) Espectrômetro marca MacBeth[®], modelo Comcor 1500 plus

Demais equipamentos de uso comum em laboratório, como estufa a vácuo, estufa ventilada, chapas de aquecimento, evaporador rotativo, aparelho de ultra-som, etc.

3.1.4 Softwares

Foram utilizados, no desenvolvimentos dos trabalhos os seguintes *softwares*:

- a) Mathcad 5.0 for Windows (Matasoft, INC[®])
- b) Excel 5.0 for windows (Microsoft[®])
- c) Statgraphics 4.0 (Statistical Graphics Corp.[®])

d) *Software* de estatística desenvolvido pela equipe do professor ROY EDWARD BRUNS, chamado, neste trabalho, como “Quimiometria” (BRUNS *et alii*, 1994)

3.2 Métodos

3.2.1 Metodologias utilizadas para a análise da matéria-prima e dos produtos resultantes das tecnologia estudadas

a) Umidade

Baseado no método descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), que se fundamenta na evaporação da água presente nos alimentos e pesagem do resíduo não volatilizado.

b) Matéria graxa

Segundo STOLDT-WEIBULL (DIEMAIR, 1963), onde o teor de substâncias solúveis em éter etílico são determinadas após destruição das proteínas, carboidratos e outros componentes, com ácido clorídrico.

c) Cinzas

Baseado no método descrito por HORWITZ (1975), que mede a perda decorrente da incineração da amostra a 550°C.

d) Proteínas

Segundo KJELDHAL (HORWITZ, 1980), que fundamenta-se na digestão ácida do alimento em presença de catalisadores, formação de amônia, destilação da amônia em meio ácido e titulação com ácido.

e) Ácido carmínico

Segundo FAO/WHO (1981) onde o teor de ácido carmínico é calculado a partir da absorvância de uma solução ácida a 494nm.

f) Minerais

Segundo ANGELUCCI e MANTOVANI (1986) e IMO INDUSTRIES. INC. (1990), que avalia os minerais por espectrometria de plasma após digestão ácida ou incineração da amostra.

g) Análises cromatográficas

O produto comercial e o obtido pela tecnologia proposta foram analisados quanto a sua composição de pigmentos, procurando avaliar as possíveis diferenças existentes. Procurou-se também padronizar uma metodologia analítica através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise de produtos coloridos com o carmim.

Como amostras foram utilizados leite e água coloridos com o carmim produzido pelo estudo e uma amostra de iogurte cujo rótulo indicava o uso do carmim como corante.

As amostras de água foram apenas filtradas e injetadas no cromatógrafo. Para as amostras de leite e iogurte, onde a grande afinidade dos corantes com as proteínas dificulta a sua separação (PUTTEMANS *et alii*, 1985), foram avaliados dois processos de extração.

MÉTODO A

Cinco gramas de amostra foram pesadas em um erlenmeyer de 50mL. A seguir foram adicionados 20,0mL de uma solução de fosfato de sódio 0,5M (ajustado para pH = 5 com Na OH), 0,1g de papaina. A mistura foi agitada por 2 minutos e colocada em repouso por uma noite. Após este período o extrato foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, filtrado e o volume completado para 25,0mL. Após filtração em membrana de 0,45 μ m o extrato foi injetado no cromatógrafo.

MÉTODO B

Cinco gramas de amostra foram pesadas em um erlenmeyer de 50mL. A seguir foram adicionados 3,0mL de NH₄OH 50% (v/v) e o extrato deixado em agitação por 5 minutos. Após este tempo o pH do extrato foi corrigido para 2 com HCl e agitado. A seguir a mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos, filtrada e o volume completado para 25mL com água. Após filtração em membrana de 0,45mm o extrato foi injetado no cromatógrafo.

Foram avaliadas a precisão, exatidão, sensibilidade, linearidade e seletividade da condição analítica escolhida.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência utilizada foi baseado na técnica descrita por JALON *et alii* (1989). A fase móvel foi uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico 1,19M, eluída através de uma coluna de fase reversa (C₁₈). Foi utilizado um sistema de detecção constituído de um detector de arranjo de diodos (DAD) e um detector de fluorescência, instalados em sequência.

Outros sistemas de separação (colunas cromatográficas e fases móveis) também foram testados.

3.2.2 Planejamento experimental

Para o estudo da tecnologia de produção de carmim de cochonilha foram utilizados alguns artifícios, procurando uma orientação dos caminhos a seguir. Para isso foi determinada a composição de minerais do corante comercial utilizado como padrão.

Uma busca na literatura sobre as tecnologias de produção de carmim já publicadas e alguns ensaios preliminares indicaram onde situar nossos experimentos.

a) Estudo dos fatores significativos

Durante trabalhos preliminares com a extração do corante foi observada a influência de um grande número de fatores no rendimento e qualidade do produto final. Para avaliar a importância desses fatores e selecionar os significativos foi utilizado um delineamento fatorial fracionado com os seguintes fatores: pH de extração, pH de reação (quelação), concentração dos reagentes (sulfato de alumínio e potássio e acetato de cálcio) e sistema de adição dos sais (juntos ou separados).

O delineamento fatorial fracionado foi escolhido em virtude da necessidade de se economizar a matéria prima conseguida e que, após caracterizada, foi utilizada em todo o estudo.

Os fatores estudados, no total de cinco foram os seguintes: pH de extração 2 (-) e 12 (+), pH de precipitação 6 (-) e 8 (+), massa de sulfato de alumínio e potássio 0,25g (-) e 0,5g (+), massa de carbonato de cálcio 0,1g (-) e 0,17g (+) e forma de adição dos sais (sulfato de alumínio e potássio e carbonato

de cálcio) separados , com a adição do sulfato de alumínio e potásio antes (-) e juntos (+).

Como resultados foram observados os rendimentos em massa e em ácido carmínico de cada ensaio. Os ensaios foram conduzidos de maneira aleatória com a geração da ordem sendo casualizados pelo *software* utilizado (*Statgraphics*). O Tabela 3.1 apresenta o delineamento utilizado.

Os procedimentos de extração e produção do quelato utilizados neste estudo foram os seguintes: foram pesados aproximadamente 5g de matéria-prima e adicionados a 1000mL de uma solução aquosa com pH corrigido para os valores do estudo. A solução foi aquecida à ebulição por 30 minutos, esfriada e o pH foi corrigido para os valores estabelecidos para a reação de quelação. Os reagentes necessários à formação do quelato foram adicionados, na proporção e situação (juntos ou separados) descritas no planejamento experimental, e a mistura foi aquecida à ebulição por 15 minutos. A solução foi resfriada e o material precipitado foi separado por filtração à vácuo. O corante retido pelo papel de filtro (Whatman 42) foi seco em estufa à vácuo (270 kPa) em temperatura inferior a 60°C. O material resultante foi pesado, triturado e o teor de ácido carmínico foi determinado por espectrofotometria. A Figura 3.1 apresenta o fluxograma deste processo.

TABELA 3.1 Planejamento fatorial fracional 2^{5-1} utilizado neste estudo.

Ordem de ensaio	t	Fatores				
		A	B	C	D	E
7	e	-	-	-	-	+
1	a	+	-	-	-	-
9	b	-	+	-	-	-
4	abe	+	+	-	-	+
14	c	-	-	+	-	-
13	ace	+	-	+	-	+
6	bce	-	+	+	-	+
2	abc	+	+	+	-	-
5	d	-	-	-	+	-
16	ade	+	-	-	+	+
15	bde	-	+	-	+	+
10	abd	+	+	-	+	-
12	cde	-	-	+	+	+
3	acd	+	-	+	+	-
11	bcd	-	+	+	+	-
8	abcde	+	+	+	+	+

t = tratamento

A = pH de extração 2 (-) e 12 (+)

B = pH de precipitação 6 (-) e 8 (+)

C = massa de sulfato de alumínio e potássio 0,25g (-) e 0,5g (+)

D = massa de carbonato de cálcio 0,10g (-) e 0,17g (+)

E = ordem de adição dos sais, separado (-) e juntos (+)

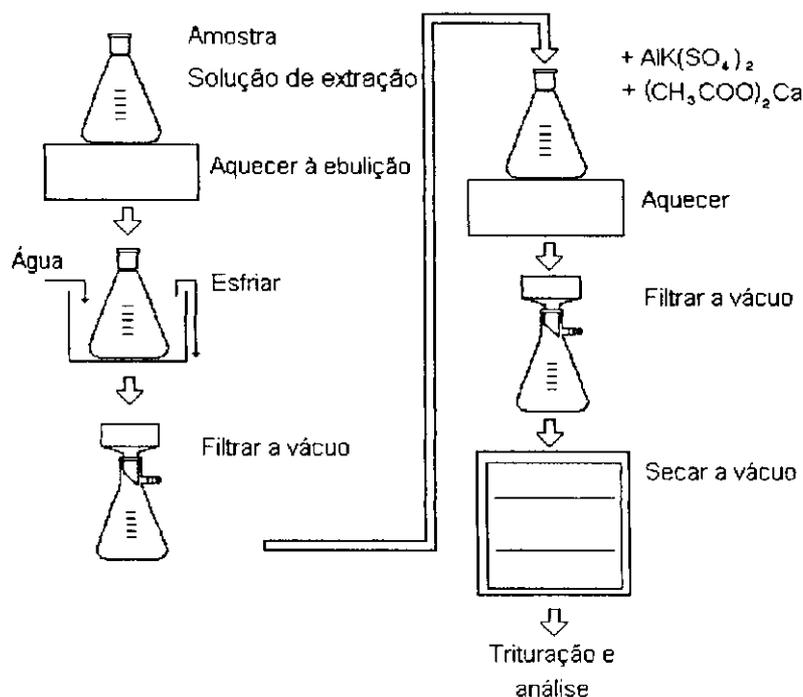


FIGURA 3.1 Fluxograma do processo de produção de carmin de cochonilha utilizado no estudo dos fatores significativos

b) Estudo de otimização dos processo de produção de carmin

Com o conhecimento dos fatores que afetam o rendimento do processo de extração do ácido carmínico da cochonilha, foram realizados estudos procurando otimizar o rendimento desse processo com base nas alterações dos valores desses fatores.

Para avaliar o melhor pH para a formação do quelato e o tempo necessário para esta reação, foi utilizado um delineamento Simplex sequencial

(BRUNS et alii, 1994), partindo de um pH = 7 e um tempo de aquecimento de 30 minutos. As variações iniciais foram de 1 unidade de pH e de 15 minutos para o tempo de aquecimento.

O ensaio foi conduzido com o auxílio do software "Quimiometria".

Os procedimentos de extração do pigmentos utilizados neste ensaio foram os seguintes: foi pesado aproximadamente 1g de matéria-prima que foi adicionado a 250mL de uma solução aquosa de NaOH 0,4%. O extrato foi aquecido à ebulição por 30 minutos, esfriado e o pH foi corrigido para 4, com a utilização de HCl. O material precipitado foi separado por filtração e o pH do extrato foi então corrigido aos valores estipulados pelo modelo. Os reagentes necessários à formação do quelato foram adicionados ao extrato, na concentração estequiométrica, e a mistura foi aquecida até a ebulição por períodos de tempo dados pelo modelo. O extrato foi resfriado e o material precipitado foi separado por filtração à vácuo. O corante retido pelo papel de filtro (Whatman 42) foi seco em estufa a vácuo (270 kPa) em temperatura inferior a 60°C. O material resultante foi pesado, triturado e o teor de ácido carmínico foi analisado por espectrofotometria.

Dois estudos de superfície de resposta foram conduzidos visando a otimização do rendimento do processo.

No primeiro delineamento foram estudados o pH de extração, a concentração de sulfato de alumínio e potássio e de acetato de cálcio. Cada fator foi estudado em três níveis e o modelo utilizado foi o descrito por BOX e BEHNKEN (1960). O Tabela 3.2 apresenta o delineamento utilizado e a relação entre os valores codificados e os níveis de cada fator estudado.

Os procedimentos de extração utilizados nesta parte do trabalho foram similares ao descrito para o estudo do tempo de aquecimento e pH de precipitação com as alterações das variáveis agora avaliadas.

As concentrações dos sais utilizados apresentaram, no ponto 0, o valor estequiométrico para a precipitação do ácido carmínico contido na matéria prima utilizada.

A segunda superfície de resposta foi conduzida visando a otimização do processo de extração do ácido carmínico da matéria prima (etapa inicial do processo de extração). Foram estudados, como fatores, o volume de solução de NaOH 0,4% e o tempo de aquecimento. O modelo escolhido foi o modelo central composto rotacional, com cinco níveis para os dois fatores.

O ponto central de cada fator foi estipulado em 60 minutos para o tempo de aquecimento e 30mL para o volume, com uma variação de 30 minutos e 10mL respectivamente. O Tabela 3.3 apresenta o delineamento utilizado.

Os procedimentos de extração utilizados para o desenvolvimento desta parte do estudo foi similar ao apresentado anteriormente, com as alterações nas variáveis estudadas.

TABELA 3.2 Delineamento BOX-BEHNKEN utilizado na otimização do rendimento do processo, com base nos fatores: pH de extração, massa de sulfato de alumínio e potássio e acetato de cálcio.

Ordem dos Ensaios	Fatores		
	pH de extração	AlK(SO ₄) ₂	(CH ₃ COO) ₂ Ca
13	-1	-1	0
6	1	-1	0
5	-1	1	0
2	1	1	0
1	-1	0	-1
3	1	0	-1
7	-1	0	1
11	1	0	1
14	0	-1	-1
12	0	1	-1
8	0	-1	1
9	0	1	1
4	0	0	0
15	0	0	0
10	0	0	0

Fatores	Níveis codificados		
	-1	0	+1
pH de extração	2	7	13
AlK(SO ₄) ₂ (g)	0,40	0,80	1,20
Acetato de cálcio (g)	0,13	0,26	0,39

TABELA 3.3 Delineamento central composto rotacional utilizado na otimização da extração do ácido carmínico com base nos fatores tempo e volume de extração.

Ordem dos ensaios	Delineamento	
	Volume	Tempo
7	-1	-1
3	1	-1
2	-1	1
9	1	1
5	$-\sqrt{2}$	0
1	$\sqrt{2}$	0
14	0	$-\sqrt{2}$
6	0	$\sqrt{2}$
8	0	0
12	0	0
4	0	0
13	0	0
11	0	0
10	0	0

Fatores	Níveis codificados				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$\sqrt{2}$
Volume de NaOH 0,4% (mL)	17,58	30	60	90	102,42
Tempo (minutos)	15,86	20	30	40	44,14

3.2.3 Estudo de aplicação do carmim produzido e análise de cor.

Amostras de carmim comercial e do carmim produzido nas condições estabelecidas pelo estudo foram diluídas com uma solução aquosa de hidróxido de amônio e utilizadas para avaliar a aplicação em produtos com baixa transmitância (leite) e de alta transmitância (água).

A concentração utilizada para o estudo foi de 6,0 e 12,0mg de carmim por 100mL de água e de 6,0mg de carmim por 100mL de leite.

A análise da cor das amostras diluídas em água foi realizada no sistema CIE $L^* a^* b^*$, por meio do espectrômetro Comcor 1500 plus, utilizando uma cápsula de fundo de vidro óptico munida de um adaptador de fundo branco ($L^*=90,67$; $a^* = -1,1$ e $b^* = 5,40$) que tem a finalidade de refletir a luz transmitida até o fotodetector (Figura 3.2).

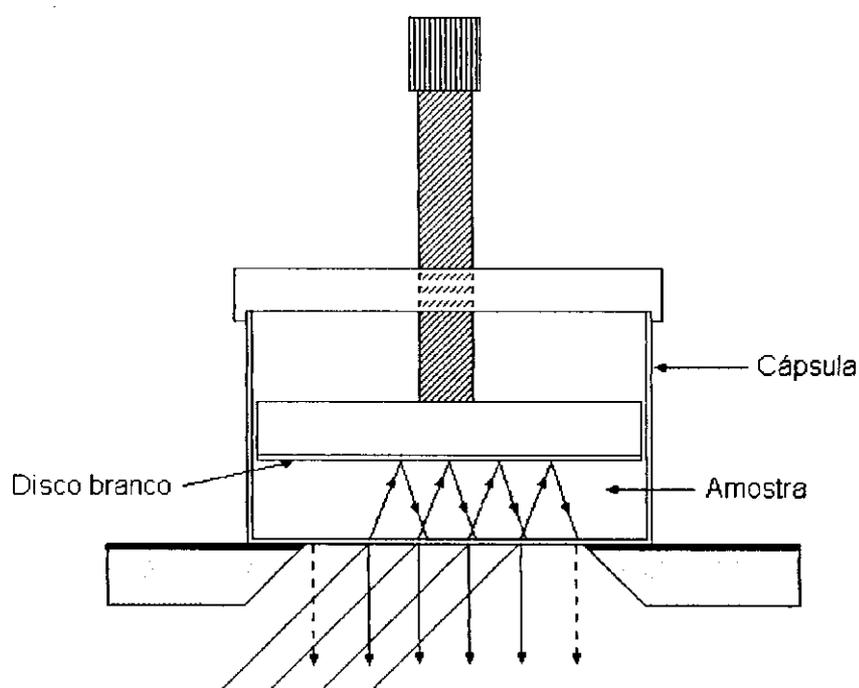


FIGURA 3.2 Cápsula e adaptador de fundo branco para regular a espessura de amostras translúcidas para a leitura de cor (FERREIRA et alii, 1989).

O equipamento para a leitura da cor recebeu a configuração DREOL, com leituras feitas sob iluminante C a um ângulo de 10°, no intervalo de 400 a 740nm. Foram determinadas as curvas espectrais das amostras.

Para a escolha da melhor condição de leitura da cor, em amostras transparentes foram realizadas leituras em diversas espessuras de camadas, utilizando o adaptador de fundo branco e duas amostras de carmim comercial com tonalidades semelhantes. Foram realizadas leituras em camadas de 2, 4, 7, 10 e 15mm, selecionando a espessura de 7mm por refletir melhor as diferenças entre as amostras.

Foi realizado, também, um estudo da variação de cor dos pigmentos utilizados neste trabalho (ácido carmínico, carmim comercial e carmim produzido nas condições do estudo) em diferentes pH.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos materiais

A cochonilha utilizada no estudo foi avaliada quanto a sua composição centesimal e os resultados destas avaliações estão apresentados no Tabela 4.1.

TABELA 4.1 Composição centesimal da cochonilha utilizada como matéria-prima neste estudo.

Determinação	Concentração (%) ¹	Erro-padrão da média ²
Umidade	8,88	0,06
Cinzas	4,56	0,08
Matéria graxa	5,06	0,06
Proteínas (%N x 6,25)	50,09	0,20
Ácido carmínico	15,86	0,12

¹ Média aritmética de três repetições analíticas

² Erro padrão absoluto

Estes valores, comparados com o citado pela literatura (Tabela 4.2), indicam baixa concentração de carmim, possivelmente resultado de uma matéria-prima menos fresca que a trabalhada pelos outros autores. Observa-se também uma baixa concentração de matéria graxa que, quando se verifica a utilização de métodos similares entre os artigos, só pode ser explicada como uma característica da cochonilha seca utilizada nesse estudo.

De acordo com o Tabela 2.2, a cochonilha utilizada em nossos estudos pode ser considerada "de segunda", pela sua concentração de ácido carmínico inferior a 18%.

No Tabela 4.3 é apresentada a composição mineral da matéria-prima utilizada neste estudo.

TABELA 4.2 Composição centesimal da cochonilha (*Dactylopius coccus*, Costa) apresentado em alguns artigos.

Determinações	VARGAS <i>et alii</i> (1974)	RANDICH (1975)	PRADO (1985)	RIOS (1989)
Umidade (%)	10 - 20	11,50	8,05	7,36
Cinzas (%)	15 - 30	3,09	4,53	4,08
Matéria graxa (%)	6 - 8	8,71	14,71	16,16
Proteínas (%)	15 - 30	46,37	51,83	48,42
Ácido carmínico (%)	9 - 10	17,50	20,87	23,80

TABELA 4.3 Composição de minerais da cochonilha utilizada como matéria-prima neste estudo.

Minerais	Concentração ¹ (mg/100g)	Erro-padrão da média
Cálcio	135,50	18,30
Magnésio	149,37	10,60
Ferro	40,46	0,39
Fósforo	717,05	48,79
Sódio	25,13	2,79
Potássio	996,72	69,35
Zinco	12,37	0,98
Alumínio	16,29	0,32

¹ Média aritmética de três repetições analíticas.

O resultado da avaliação da composição de minerais do corante comercial utilizado como padrão está apresentado no Tabela 4.4. Observou-se a predominância dos elementos alumínio, cálcio, sódio, fósforo e potássio. O teor de ácido carmínico desta amostra foi de 45%.

TABELA 4.4 Composição de minerais da amostra do corante carmim de cochonilha utilizado como referência comercial nesse estudo.

Elemento	Concentração (mg/100g)	Elemento	Concentração (mg/100g)
Alumínio	1.344,08	Bário	0,40
Berílio	tr	Cálcio	1.686,10
Cádmio	nd	Cobalto	nd
Crômio	0,07	Cobre	1,12
Ferro	7,43	Potássio	66,03
Lítio	tr	Magnésio	10,83
Manganes	0,12	Sódio	406,20
Níquel	0,03	Fósforo	122,53
Chumbo	nd	Selênio	nd
Vanádio	0,01	Zinco	3,69

nd = não detectado

tr = traços

4.2 Estudos sobre a produção de carmim de cochonilha.

4.2.1 Resultados dos estudos dos fatores significativos na produção de carmim de cochonilha (delineamento fatorial fracionado).

Os valores encontrados com a utilização do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} para o estudo dos fatores significativos na produção do carmim estão apresentados no Tabela 4.5. Os resultados estatísticos estão apresentados no Tabela 4.6 e Figura 4.1.

TABELA 4.5 Delineamento fatorial fracional 2^{5-1} utilizado neste estudo.

Ordem do ensaio	t	Fatores					Rendimento (%)
		A	B	C	D	E	
7	e	-	-	-	-	+	17
1	a	+	-	-	-	-	44
9	b	-	+	-	-	-	7
4	abe	+	+	-	-	+	10
14	c	-	-	+	-	-	22
13	ace	+	-	+	-	+	60
6	bce	-	+	+	-	+	15
2	abc	+	+	+	-	-	30
5	d	-	-	-	+	-	12
16	ade	+	-	-	+	+	39
15	bde	-	+	-	+	+	11
10	abd	+	+	-	+	-	42
12	cde	-	-	+	+	+	20
3	acd	+	-	+	+	-	40
11	bcd	-	+	+	+	-	22
8	abcde	+	+	+	+	+	45

t = tratamentos

A = pH de extração 2 (-) e 12 (+)

B = pH de precipitação 6 (-) e 8 (+)

C = massa de sulfato de alumínio e potássio 0,25g (-) e 0,5g (+)

D = massa de carbonato de cálcio 0,10g (-) e 0,17g (+)

E = ordem de adição dos sais, separado (-) e juntos (+)

TABELA 4.6 Estimativa dos efeitos dos fatores estudados.

tratamento	Efeitos principais e interações			Estimativa dos efeitos
a	A	+	BCDE	= 23,00
b	B	+	ACDE	= -9,00
ab	AB	+	CDE	= -5,00
c	C	+	ABDE	= 9,00
ac	AC	+	BDE	= 1,00
bc	BC	+	ADE	= 1,50
abc	ABC	+	DE	= 0,00
d	D	+	ABCE	= 3,25
ad	AD	+	BCE	= 2,25
bd	BD	+	ACE	= 11,25
abd	ABD	+	CE	= 6,75
cd	CD	+	ABE	= -3,25
acd	ACD	+	BE	= -4,75
bcd	BCD	+	AE	= -0,25
abcd	ABCD	+	E	= -0,25
abcde	MÉDIA	+	ABCDE	= 27,25

Supondo que os efeitos das interações de três, quatro e cinco fatores são desprezíveis, podemos concluir que foram significativos os efeitos principais do fator A (pH de extração), B (pH da reação de complexação) e C (massa do sulfato de alumínio e potássio) e as interações BD (pH da reação de quelação e massa de acetato de cálcio) e CE (massa do sulfato de alumínio e potássio e ordem de adição dos sais). Os baixos valores de rendimentos observados podem ser

atribuídos à precocidade dos ensaios e foram otimizados no decorrer dos trabalhos.

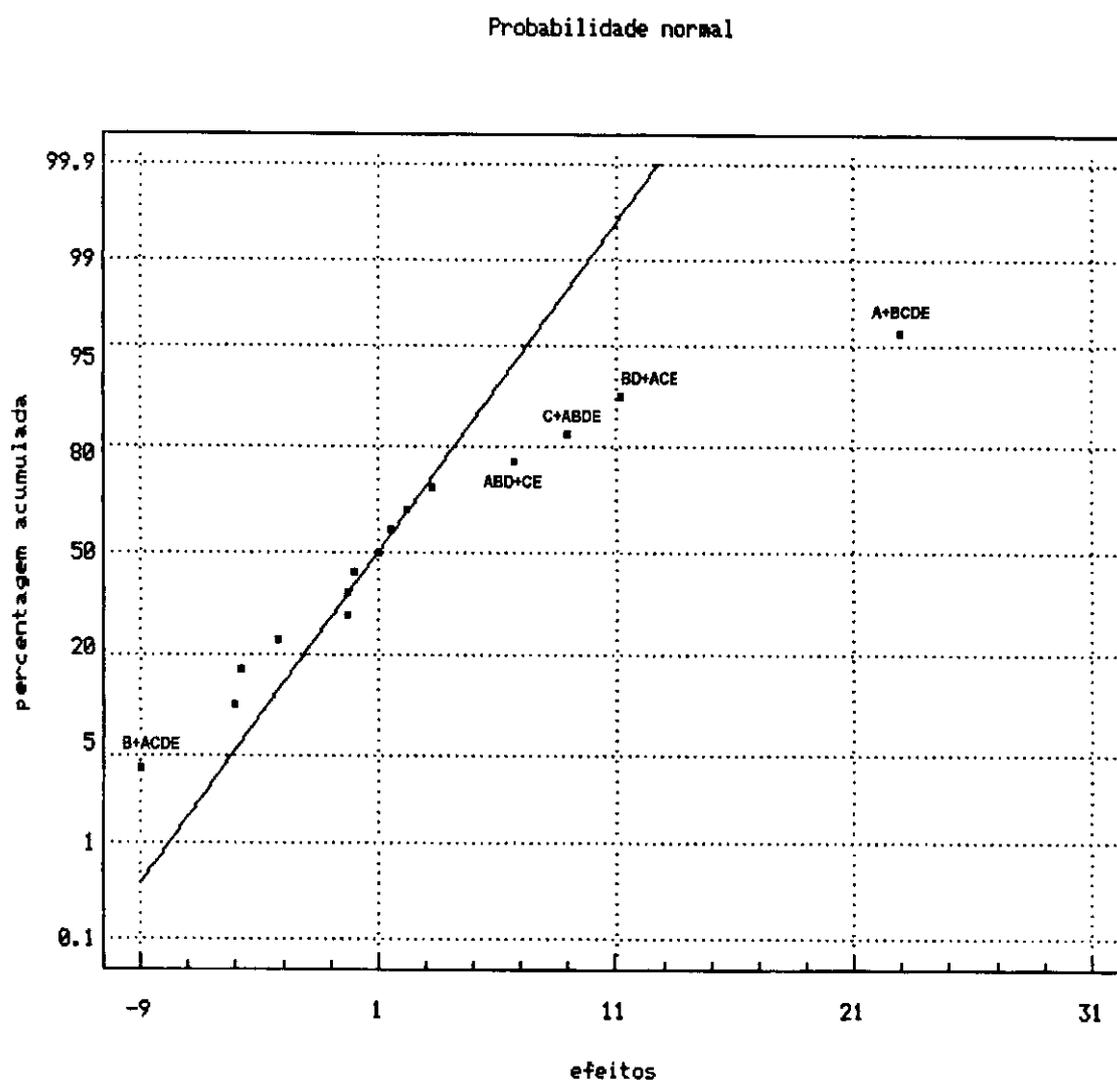


FIGURA 4.1 Gráfico de probabilidade normal dos efeitos observados no estudo utilizando o delineamento fatorial fracionado.

Durante o estudo foi observado que a elevação do pH para a extração do ácido carmínico e sua subsequente alteração, para a reação de quelação,

promovia a separação do material protéico do extrato, ocasionado pela desnaturação das proteínas em pH 13 e sua precipitação em pH inferior a 4.

4.2.2 Resultado do estudo de pH e tempo de reação na extração do carmim de cochonilha (Simplex sequencial).

O Tabela 4.7 e a Figura 4.2 apresentam a evolução do modelo simplex sequencial utilizado para o estudo de pH e tempo para a reação de quelação e os resultados obtidos. Observou-se que os melhores rendimentos foram encontrados em pH 6 e com 30 minutos de reação. Estabeleceu-se, assim, o pH inicial para a reação de quelação igual a 6 e o tempo de aquecimento de 30 minutos.

TABELA 4.7 Evolução do delineamento simplex sequencial e resultados obtidos.

Ensaio nº	pH	Tempo (min.)	Rendimento (%)
1	7	30	56
2	6	45	68
3	6	30	74
4	5	45	69
5	5	30	70
6	6	15	57

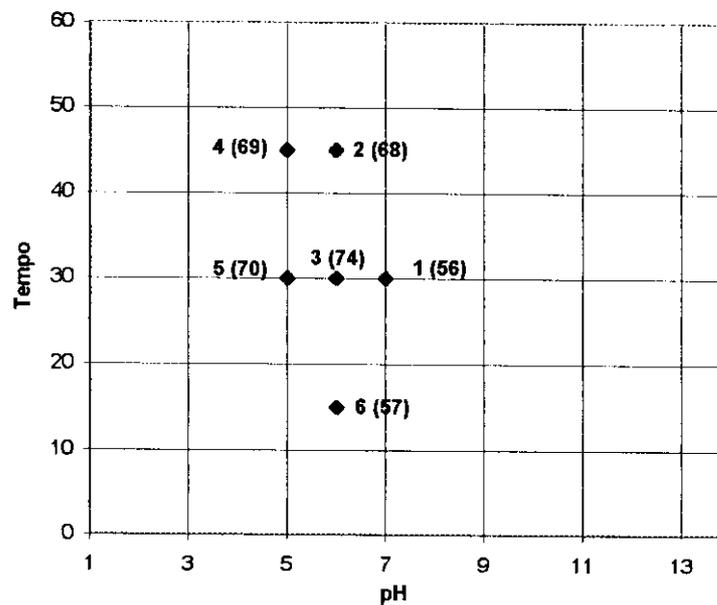


FIGURA 4.2 Modelo da evolução do simplex sequencial utilizado para avaliar pH e tempo da reação de quelação.

4.2.3 Resultado das superfícies de resposta no estudo de produção do carmim de cochonilha.

a) Estudo de pH de extração, concentração de sulfato de alumínio e potássio e acetato de cálcio

Os resultados dos ensaios da superfície de resposta delineada, para a otimização do pH de extração e concentração dos sais de alumínio e cálcio estão apresentados no Tabela 4.8.

TABELA 4.8 Resultados obtidos para o estudo dos fatores pH de extração, concentração de sulfato de alumínio e potássio e acetato de cálcio, com base no delineamento BOX-BEHNKEN.

Ordem dos Ensaio	Fatores			Rendimento (%)
	pH de extração	AlK(SO ₄) ₂	Ca(CH ₃ COO) ₂	
13	-1	-1	0	54,43
6	1	-1	0	65,29
5	-1	1	0	67,57
2	1	1	0	92,19
1	-1	0	-1	69,48
3	1	0	-1	91,70
7	-1	0	1	73,09
11	1	0	1	94,19
14	0	-1	-1	44,79
12	0	1	-1	72,07
8	0	-1	1	50,00
9	0	1	1	57,10
4	0	0	0	62,18
15	0	0	0	67,57
10	0	0	0	67,19

Os rendimentos (R) observados podem ser descritos pela seguinte equação (4.1):

$$R = 65,64 + 9,85 x_1 + 9,30 x_2 - 0,46 x_3 + 15,17 x_1^2 - 10,95 x_2^2 + 1,29 x_3^2 + 3,44 x_1 x_2 - 0,28 x_1 x_3 - 5,05 x_2 x_3$$

(1,74) (1,06) (1,06) (1,06) (1,57) (1,57) (1,57) (1,51) (1,51) (1,51)

onde: x_1 , x_2 , x_3 representam os fatores: pH de extração, concentração de sulfato de alumínio e potássio e concentração de acetato de cálcio, respectivamente e os

números entre parênteses representam os erros-padrão dos coeficientes da equação.

O Tabela 4.9 apresenta a análise de variância do modelo escolhido. Os valores obtidos indicam que não há evidência de falta de ajuste no modelo. O valor de "F" calculado (1,59) não é estatisticamente significativo ao nível de 5%.

TABELA 4.9 Análise de variância para o ajuste do modelo escolhido

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Regressão	9	3018,89	335,43	27,39
Resíduo	5	61,23	12,25	
Falta de ajuste	3	43,13	14,38	1,59
Erro puro	2	18,10	9,05	
Total	14	3080,12		

% de variação explicada pelo modelo= 98,01

A análise estatística dos coeficientes da equação proposta, indicam que existe uma interação significativa (ao nível de 5%) entre a concentração de sulfato de alumínio e potássio e a concentração de acetato de cálcio. Deste modo foram construídas superfícies de resposta para os valores de acetato de cálcio, fixados em -1 (0,13g), 0 (0,26g) e +1 (0,39g), representados pelas seguintes equações:

$$(+1) R = 66,48 + 9,57 x_1 + 4,25 x_2 + 15,17 x_1^2 - 10,95 x_2^2 + 3,44 x_1 x_2 \quad (4.2)$$

$$(0) R = 65,65 + 9,85 x_1 + 9,30 x_2 + 15,17 x_1^2 - 10,95 x_2^2 + 3,44 x_1 x_2 \quad (4.3)$$

$$(-1) R = 67,40 + 10,13 x_1 + 14,35 x_2 + 15,17 x_1^2 - 10,95 x_2^2 + 3,44 x_1 x_2 \quad (4.4)$$

As Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 apresentam as superfícies de resposta descrita pelas equações anteriores (4.1, 4.2 e 4.3).

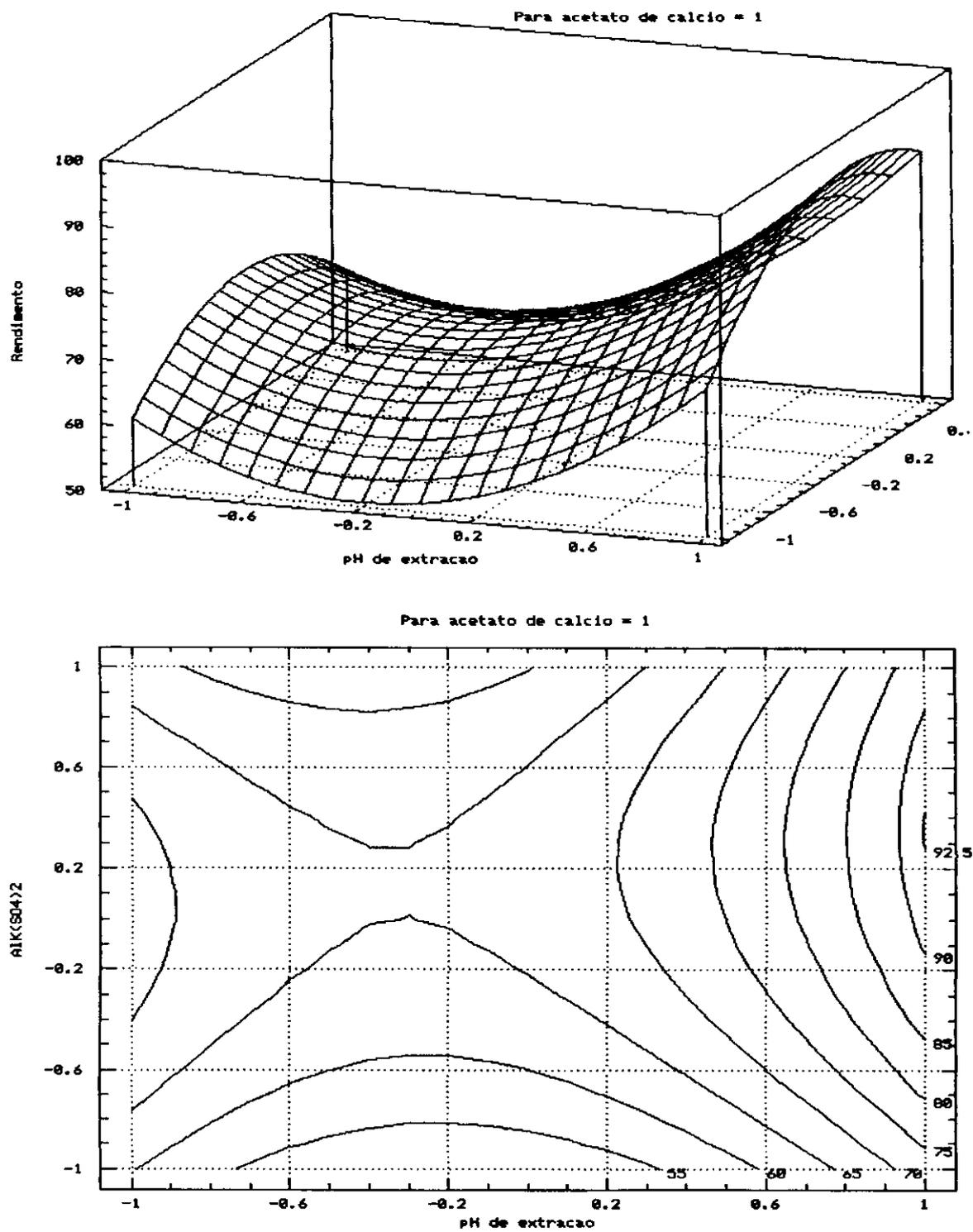


FIGURA 4.3 Superfície de resposta e curvas de nível para a equação ajustada à concentração de acetato de cálcio em nível 1.

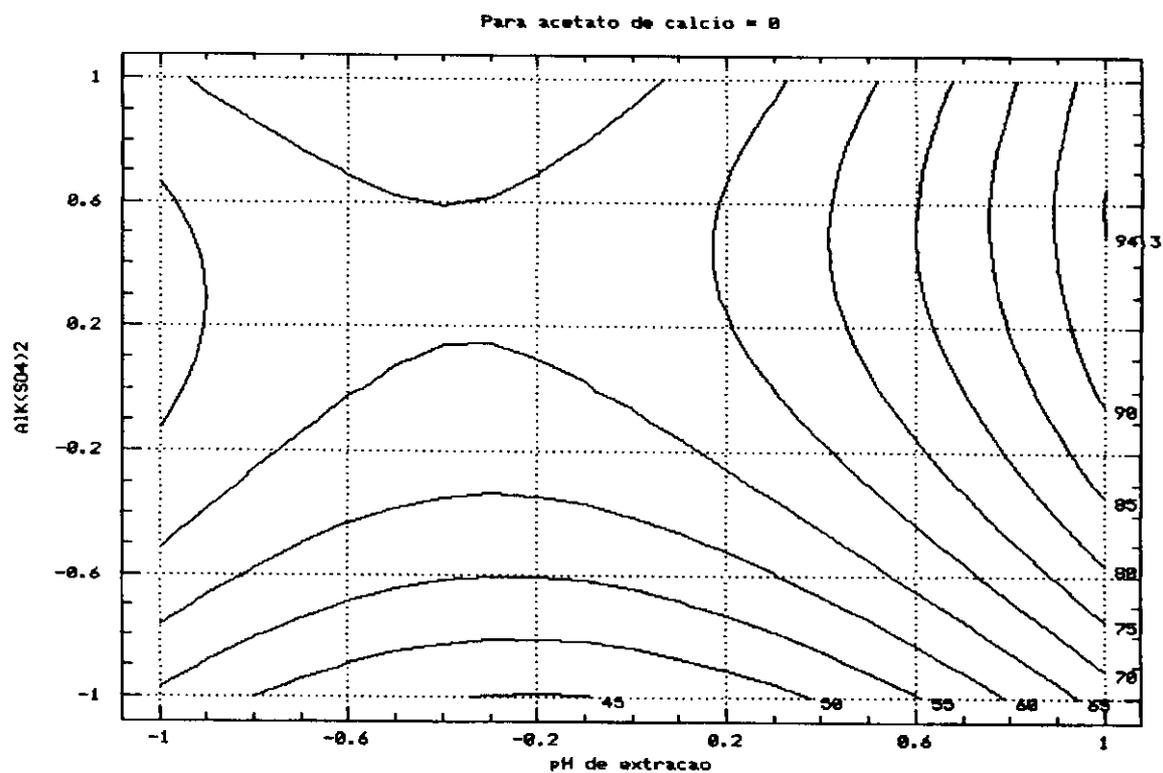
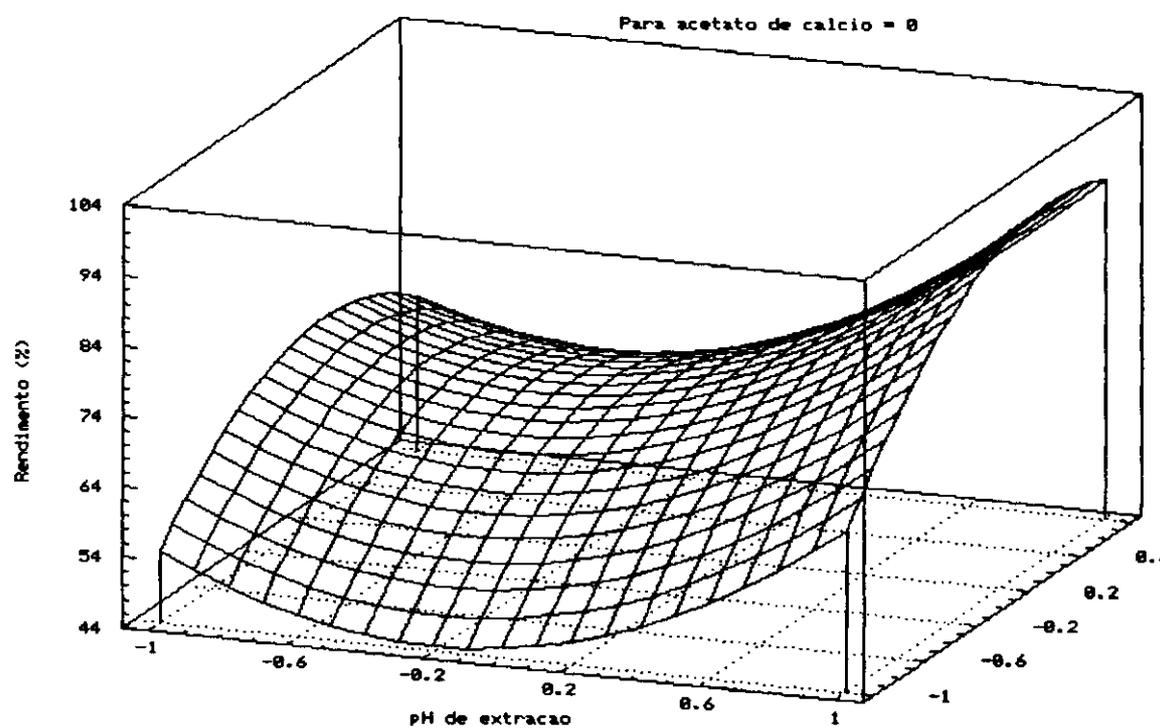


FIGURA 4.4 Superfície de resposta e curvas de nível para a equação ajustada à concentração de acetato de cálcio em nível 0

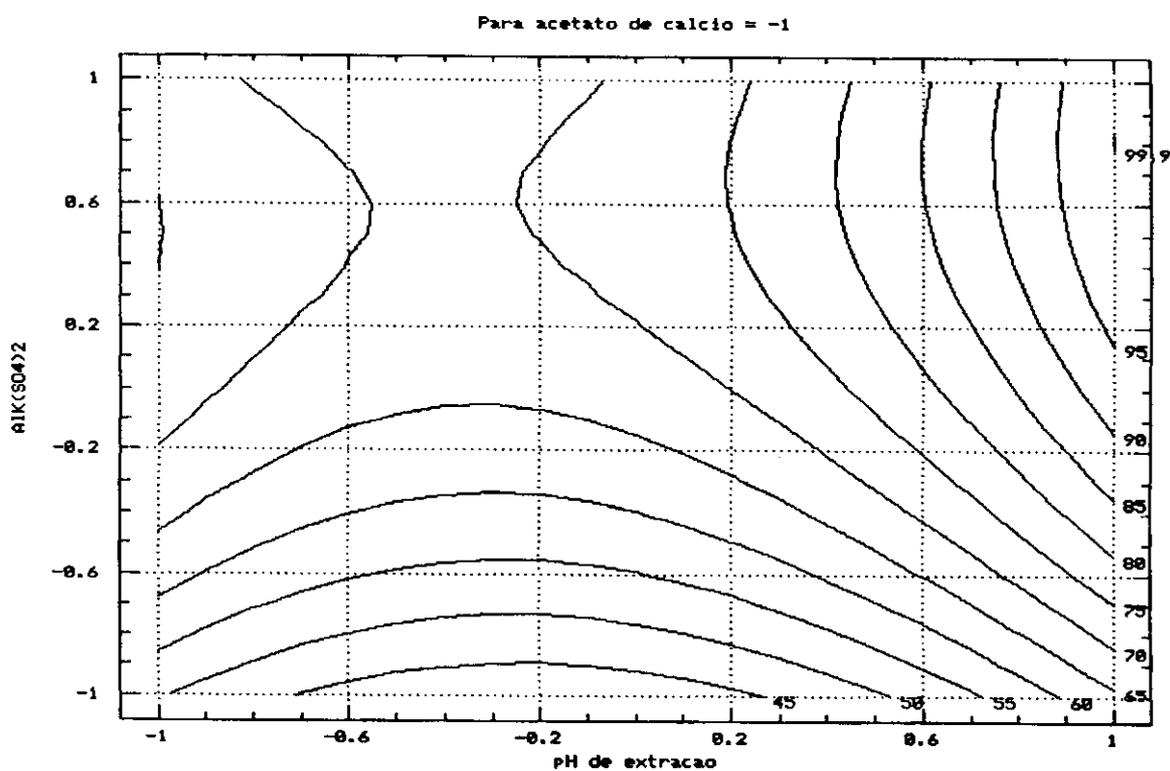
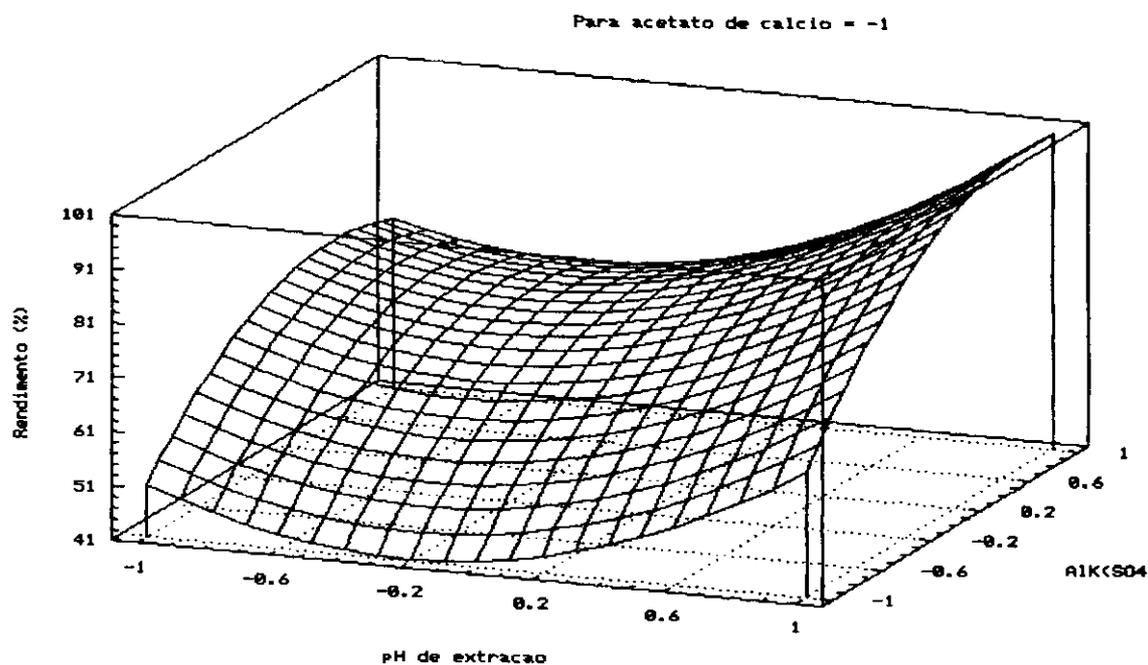


FIGURA 4.5 Superfície de resposta e curvas de nível para a equação ajustada à concentração de acetato de cálcio em nível -1

O maior rendimento foi obtido para a concentração de acetato de cálcio igual a -1 (0,13g). Assim, fixando-se, na equação de rendimento máximo (4.4), o valor de pH em 13 ($x_1 = 1$) e o rendimento (R) em 99,90%, obtem-se o valor de 1,14g, que corresponde à quantidade ideal de sulfato de alumínio e potássio, para as condições do estudo.

b) Estudo de volume de NaOH e tempo de aquecimento dos processo de extração.

Os resultados dos ensaios para otimização do tempo e volume de extração do ácido carmínico da matéria-prima estão apresentados no Tabela 4.10.

O ajuste da equação polinomial do segundo grau para os valores obtidos fornece a seguinte equação:

$$R = 65,31 + 4,23 x_1 - 1,02 x_2 - 3,76 x_1^2 - 1,55 x_2^2 - 1,44 x_1 x_2 \quad (4.5)$$

(1,07) (0,93) (0,93) (0,97) (0,97) (1,32)

onde: R = rendimento observado; x_1 e x_2 = fatores: volume e tempo de extração, respectivamente. Os números entre parentes representam os erros padrão dos coeficientes da equação.

A Figura 4.6 apresenta a superfície de resposta descrita pela equação anterior (4.5).

O Tabela 4.11 apresenta a análise de variância do modelo escolhido. Os valores obtidos indicam que não há evidência de falta de ajuste no modelo. O valor de "F" calculado (0,14) não é estatisticamente significativo ao nível de 5%.

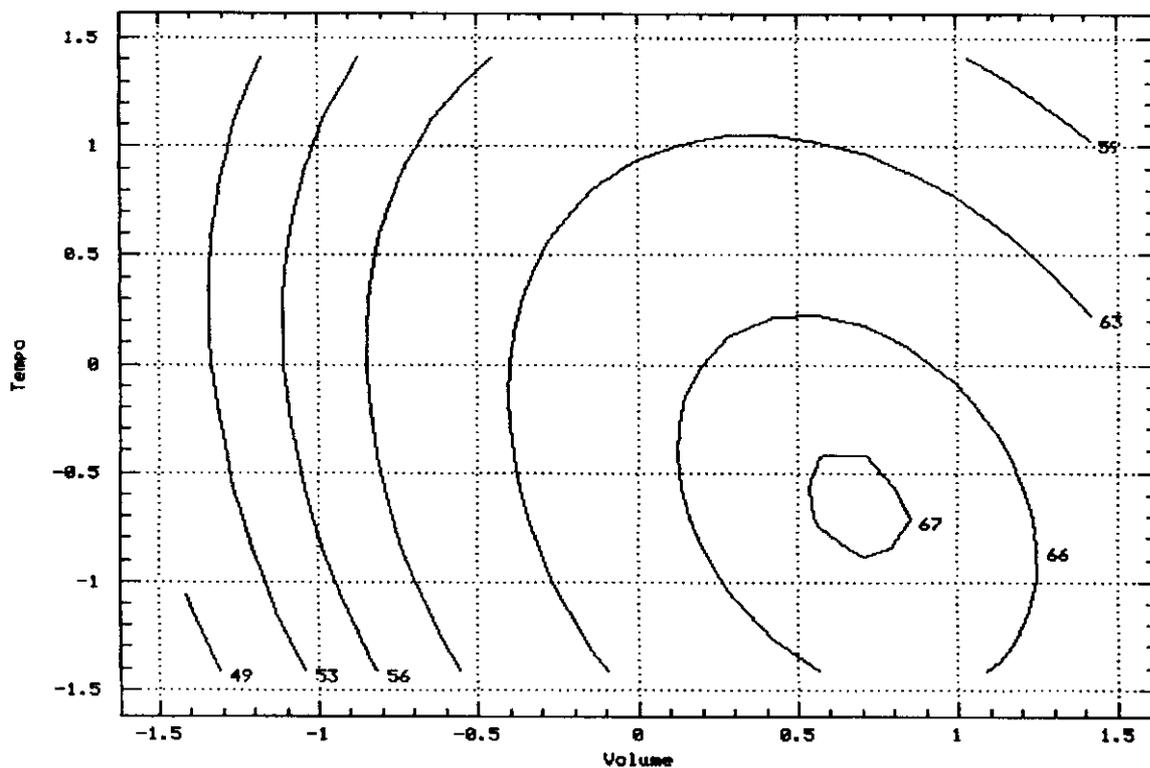
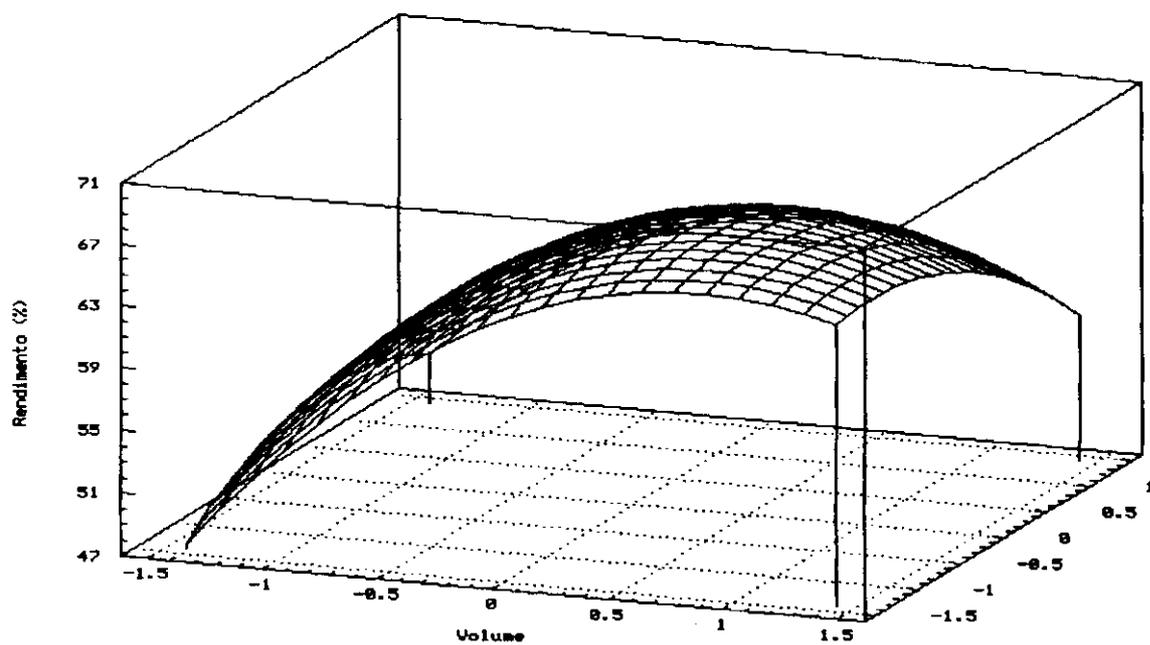


FIGURA 4.6 Superfície de resposta e curvas de níveis para a equação ajustada ao estudo de extração de ácido carmínico.

TABELA 4.10 Resultados obtidos para o estudo de tempo e volume de extração com base no delineamento central composto rotacional.

Ordem dos ensaios	Fatores		Rendimento (%)
	Volume	Tempo	
7	-1	-1	56,19
3	1	-1	65,93
2	-1	1	55,87
9	1	1	61,06
5	$-\sqrt{2}$	0	51,32
1	$\sqrt{2}$	0	64,71
14	0	$-\sqrt{2}$	63,49
6	0	$\sqrt{2}$	61,38
8	0	0	67,30
12	0	0	63,81
4	0	0	63,60
13	0	0	69,74
11	0	0	64,34
10	0	0	63,07

TABELA 4.11 Análise de variância para ajuste do modelo.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Regressão	5	273,33	54,67	11,58
Resíduo	8	37,76	4,72	
Falta de ajuste	3	3,04	1,01	0,14
Erro puro	5	34,72	6,94	
Total	13	311,09		

% de variação explicada pelo modelo = 87,87

Desenvolvendo a equação polinomial proposta para maximizar o rendimento (4.5) obteve-se, para a variável x_1 , o valor de 0,648 e para a variável x_2 , o valor de -0,567, que representam 79,44mL e 24,33 minutos para o volume e o tempo de extração, respectivamente, nas condições do estudo. Observa-se ainda que a variável “tempo” não apresenta participação significativa no modelo estudado.

4.2.4 Tecnologia proposta

Com os resultados obtidos foi possível definir a tecnologia para a produção do caramim de cochonilha.

Os valores observados no estudo de extração do ácido carmínico da matéria-prima apresentaram um baixo rendimento (\cong 67%) sendo, portanto, o

aspecto limitante do processo. Sugere-se uma reciclagem do resíduo desta extração, procurando aumentar a eficiência da tecnologia.

O tempo de extração estabelecido foi de aproximadamente 25 minutos (medidos após a entrada em ebulição) para uma proporção de solvente igual a 80mL/g de amostra. O solvente utilizado foi uma solução de NaOH 0,4% (pH \cong 13).

Após a extração, o extrato é resfriado, seu pH corrigido para 4 com HCl e filtrado. O resíduo é reciclado para nova extração e o filtrado tem seu pH acertado para 6. Os sais são então adicionados ao extrato.

A concentração de sulfato de alumínio e potássio estabelecida equivale a 150% do valor estequiométrico, ou seja, para cada grama de ácido carmínico deve-se utilizar 0,72g de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$.

A concentração de acetato de cálcio encontrada que apresentou maior rendimento foi igual a 50% do valor estequiométrico, sugerindo a participação de outra fonte de cátion na formação do quelato, nas condições utilizadas neste estudo. O valor estabelecido para cada grama de ácido carmínico foi igual a 0,08g de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

A mistura é aquecida à ebulição por 30 minutos, resfriada e o material precipitado é separado por filtração. O corante obtido é seco em estufa a vácuo em temperatura inferior a 60°C, triturado e envasado. A Figura 4.7 apresenta o fluxograma do método estabelecido.

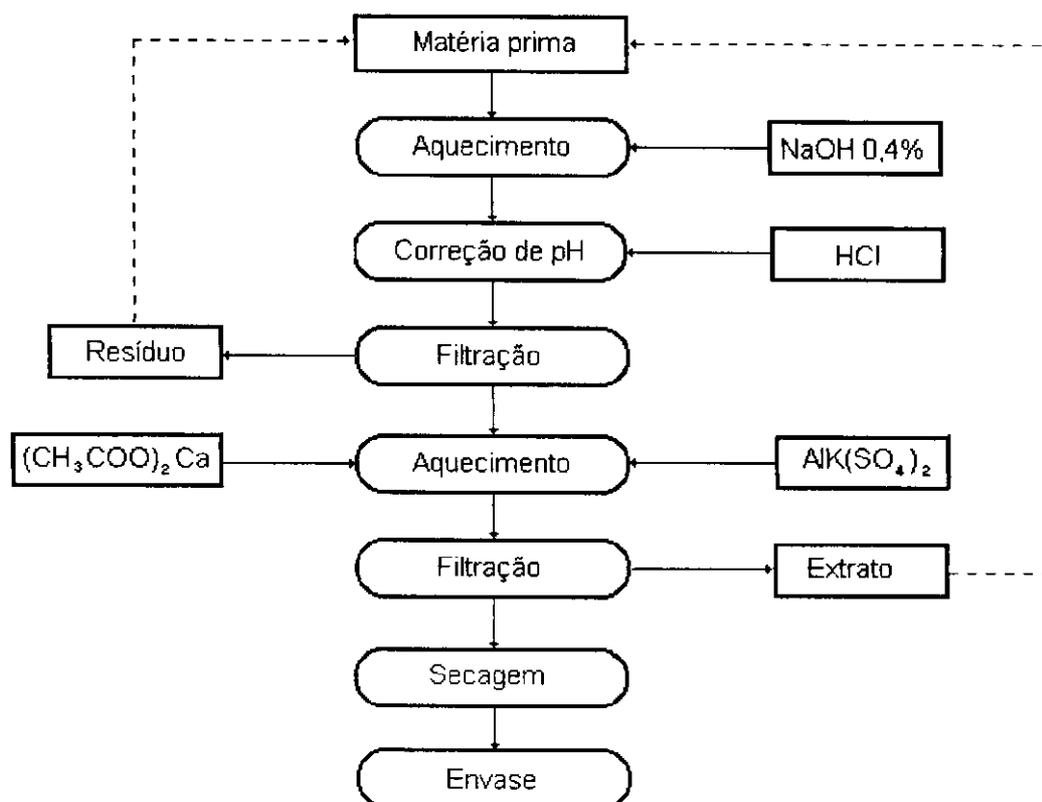


FIGURA 4.7 Fluxograma do processo estabelecido para a extração do corante de cochonilha.

4.2.5 Avaliação das condições propostas para produção do carmim de cochonilha.

Estabelecidos os valores dos processos estudados na extração do carmim de cochonilha, realizou-se a comprovação de sua eficiência, através de três ensaios. Procurou-se avaliar o balanço de massas e o rendimento em ácido carmínico.

O Tabela 4.12 apresenta os valores obtidos em cada um dos ensaios e o resultado médio.

TABELA 4.12 Resultados do estudo do processo de produção de carmim de cochonilha estabelecido neste estudo.

	Ensaio			Média \pm EP
	1	2	3	
Resíduo da 1ª filtração (g)	3,74	3,93	4,08	3,92 \pm 0,10
% de ácido carmínico	10,12	8,23	12,50	10,28 \pm 1,24
Extrato da 2ª filtração (g)	910	1245	950	1035 \pm 106
% de ácido carmínico	0,015	0,011	0,010	0,01 \pm 0,002
Carmim (g)	2,82	2,52	2,69	2,68 \pm 0,09
% de ácido carmínico	41,07	42,21	44,85	42,71 \pm 1,12
Rendimento (%)	73,02	67,07	76,07	72,05 \pm 2,64

EP = erro-padrão da média

O rendimento do processo de extração (1ª etapa) foi de 74,59%, pouco superior ao observado no modelo estudado (67%). A reação de complexação apresentou um rendimento de 91,25%, inferior ao valor teórico de rendimento máximo (99,9%).

O rendimento total do processo foi de 72,05%, em média, superior aos valores observados na literatura onde OVIEDO e GIBAJA (1977), avaliando quatro processos de produção de carmim (métodos Alemão, Madame Cenette, Frances e Thorpe), obtiveram rendimentos inferiores a 70%. PRADO (1985) obteve rendimento de 73,28% utilizando um sistema de extração com tempo superior a 12 horas, com troca constante de solventes. RIOS (1989), conseguiu rendimento de 65,05% utilizando sucessivas extrações do carmim da matéria-prima previamente desengordurada.

O teor de ácido carmínico do produto final (42,71%) deve ser melhorado quando se trabalhar com matéria prima de melhor qualidade. A cochonilha utilizada, com 15,86% de ácido carmínico, é considerada “de segunda” e é de qualidade inferior às utilizadas por PRADO (20,87%) e RIOS (23,80%).

A cor do carmim obtido é mais escura que a cor da amostra comercial e foi decorrente da quantidade de sulfato de alumínio e potássio utilizada. O valor otimizado para máximo rendimento resulta em um produto com coloração diferente (mais escuro) que o comercial.

O Tabela 4.13 apresenta o resultado das análises da composição centesimal do produto obtido.

TABELA 4.13 Composição centesimal do carmim obtido através do processo estabelecido.

	Amostras			Média \pm EP
	1	2	3	
Umidade (%)	16,04	13,26	13,43	14,24 \pm 0,90
Proteína (%N x 6,25) (%)	24,19	24,58	24,08	24,28 \pm 0,15
Cinzas (%)	9,04	8,91	9,64	9,20 \pm 0,22
Ácido carmínico (%)	41,07	42,21	44,85	42,71 \pm 1,12

EP = erro-padrão (absoluto) da média

Os resultados das concentrações de umidade, proteínas, cinza e ácido carmínico encontrados estão dentro das especificações da legislação brasileira.

Para um estudo do carmim obtido foi realizadas também a análise dos minerais presentes. O Tabela 4.14 apresenta o resultado dessas determinações. Os teores de alumínio e fósforo observados, bem superiores aos encontrados no corante comercial utilizado como referência (Tabela 4.4), pode ser resultado da

formação de fosfato de alumínio, em consequência da alta concentração de fósforo da matéria-prima (Tabela 4.3)

TABELA 4.14 Resultados das análises de minerais do carmim obtido nas condições estabelecidas neste estudo.

Minerais (mg/100g)	Amostras			Média \pm EP
	1	2	3	
Cálcio	704,18	549,61	598,71	617,50 \pm 45,60
Magnésio	5,04	2,74	4,24	4,01 \pm 0,67
Ferro	3,22	2,50	2,66	2,79 \pm 0,22
Fósforo	725,92	672,03	738,46	712,14 \pm 20,38
Sódio	512,57	267,83	494,36	424,92 \pm 78,72
Potássio	80,86	44,11	76,34	67,10 \pm 11,57
Zinco	4,75	4,44	4,41	4,53 \pm 0,11
Alumínio	2385,60	2732,40	2636,41	2584,80 \pm 103,38

EP = erro-padrão da média

4.3 Estudo da aplicação do carmim produzido em amostras modelos e análise da cor.

O Tabela 4.15 apresenta os dados de cores no sistema CIE L* a* b*, para as amostras de água e leite coloridas com o carmim comercial e com o carmim produzido em nosso laboratório. Observa-se que todas as amostras coloridas com o carmim obtido nas condições estabelecidas neste estudo, apresentaram menos luminosidade (L*), menos vermelho (+a*) e mais azul (-b*) que as amostras coloridas com o carmim comercial. Observa-se ainda que as amostras de água coloridas com o carmim comercial nas concentrações de 12,0mg/100g apresenta tonalidade amarela (+b*), o que não aconteceu nas amostras coloridas com o carmim produzido pelo estudo. Os espectros de reflectância destas amostras estão apresentados na Figura 4.8.

TABELA 4.15 Cor no sistema CIE L* a* b*, das amostras de água (em camada de 7mm de espessura) e de leite, coloridas com o carmim comercial e com o carmim produzido pelas condições estabelecidas neste estudo.

Amostra	L*	a*	b*
Água + carmim comercial (6,0mg/100g)	46,70	42,04	-1,22
Água + carmim comercial (12,0mg/100g)	35,61	52,59	5,84
Água + carmim produzido (6,0mg/100g)	40,83	38,35	-6,86
Água + carmim produzido (12,0mg/100g)	26,42	45,70	-3,70
Leite + carmim comercial (6,0mg/100g)	66,83	32,27	-2,32
Leite + carmim produzido (6,0mg/100g)	62,08	27,55	-9,37

L* = luminosidade, a* = vermelho, b* = amarelo, -b* = azul

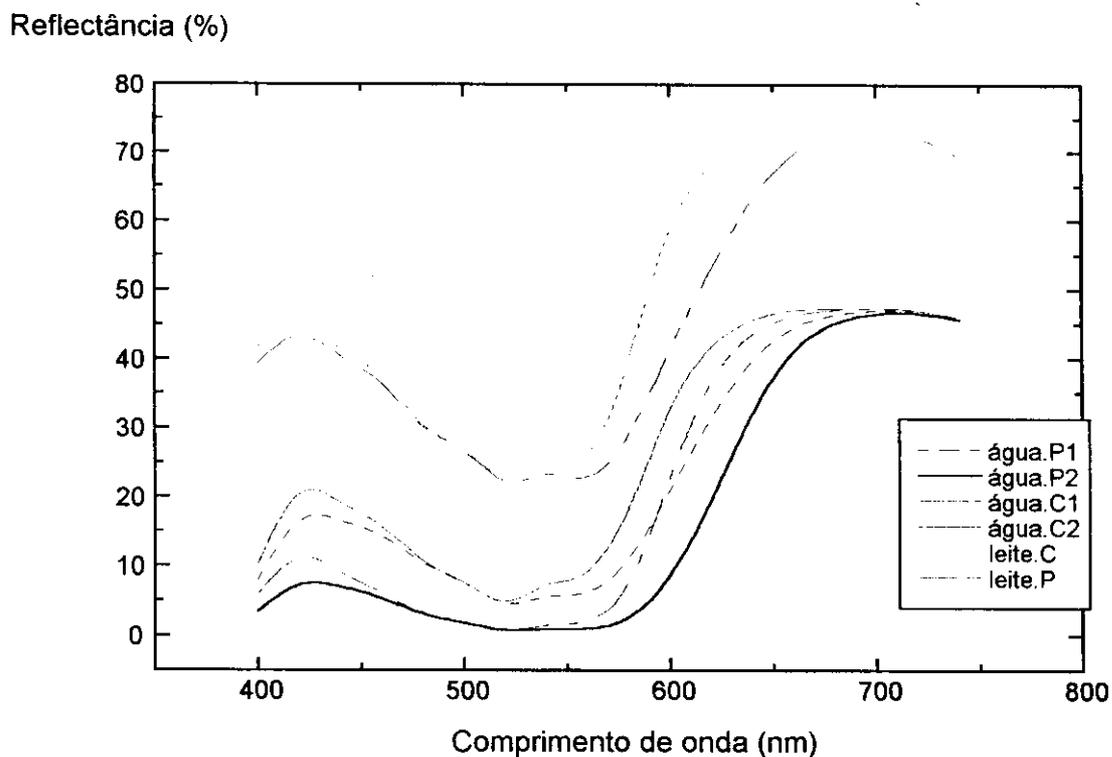


FIGURA 4.8 Espectro de reflectância das amostras de água (em camada de 7mm de espessura) e de leite, coloridas com carmim. (P1 e P2 = carmim produzido - 6,0mg/100g e 12,0mg/100g respectivamente; C1 e C2 = carmim comercial - 6,0mg/100g e 12,0mg/100g respectivamente; leite = 6,0mg/100g)

O resultado do estudo de cor dos pigmentos (ácido carmínico, carmim comercial e carmim produzido nas condições estabelecidas pelo estudo) em diferentes pH indicaram, como se esperava, variações de cor em toda a faixa estudada (Tabela 4.16).

TABELA 4.16 Cor no sistema CIE L*, a*, b* das amostras estudadas em diferentes pH.

Ácido carmínico ¹				Carmim comercial ²				Carmim do estudo ³			
pH	L*	a*	b*	pH	L*	a*	b*	pH	L*	a*	b*
2.00	66.16	16.32	21.73	2.15	61.97	22.30	8.44	2.50	58.97	24.02	8.41
3.67	66.00	15.42	23.86	4.11	58.65	30.31	3.66	3.54	57.43	27.57	1.69
5.52	66.01	25.27	8.17	6.00	51.35	36.16	-2.32	5.88	51.79	34.06	-7.80
6.31	55.48	34.75	-0.51	7.09	53.98	38.02	-0.86	7.10	51.00	34.99	-7.71
8.02	55.74	33.06	-3.81	7.78	53.91	38.22	-0.58	8.05	49.68	36.12	-6.89
8.70	54.15	24.26	-5.76	9.93	50.92	35.98	-3.14	9.66	48.23	34.07	-7.64
11.98	54.13	21.10	-9.73	12.01	48.20	32.67	-7.31	11.94	46.32	30.37	-10.68

1 Padrão de ácido carmínico

2 Carmim comercial (utilizado como referência no estudo)

3 Carmim produzido nas condições estabelecidas pelo estudo.

O ácido carmínico apresentou uma cor vermelha máxima em pH próximo a 7, o que também foi uma das características de ambos os carmins estudados. O carmin comercial apresentou, em pH maiores a 3, valores de vermelho superiores ao carmin produzido nas condições do estudo (Figura 4.9).

Todos os pigmentos estudados apresentaram um comportamento amarelo/azul (+b/-b) similares nos diferentes pH, com valores máximos de amarelo em pH fortemente ácido e valores máximos de azul em pH fortemente básico. Observou-se, ainda, que os carmins estudados apresentaram nestas tonalidades (amarelo/azul), valores similares em pH próximo a 3 e acima de 9, com o carmin produzido pelas condições estabelecidas neste estudo apresentando uma cor mais azul em todos os outros pH estudados (Figura 4.10).

A luminosidade das três amostras diminuíram com o aumento do pH (Figura 4.11).

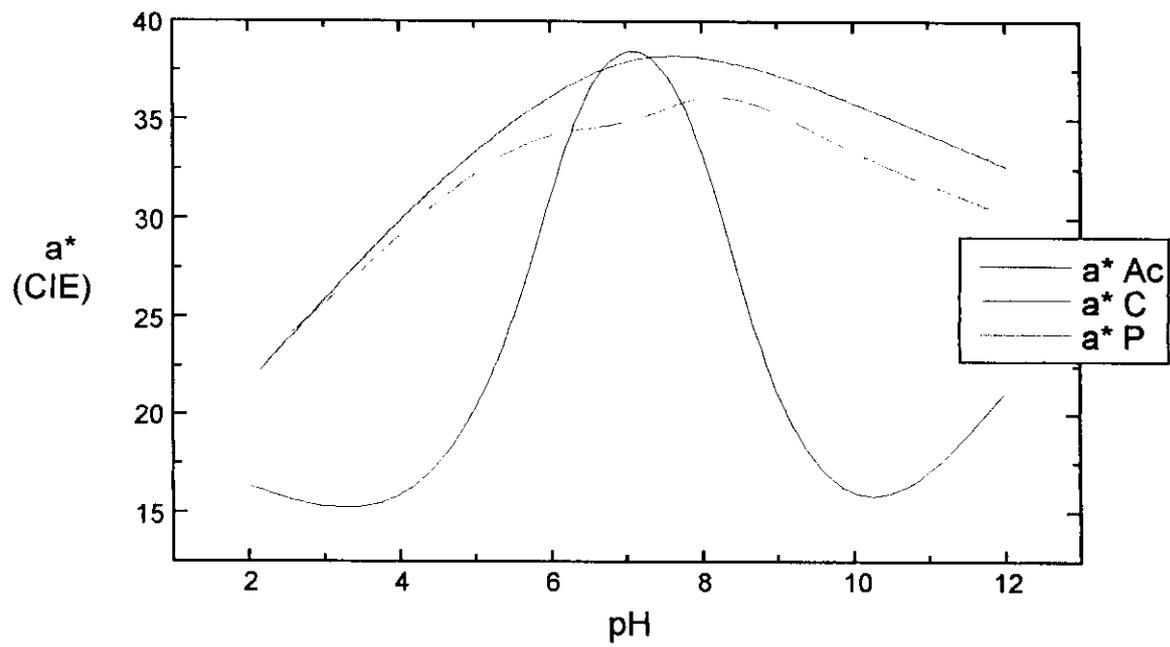


FIGURA 4.9 Variação da cor vermelha (CIE a^*) para as amostras de ácido carmínico (Ac), carmim comercial (C) e carmim produzido pelas condições do estudo (P), em diferentes pH.

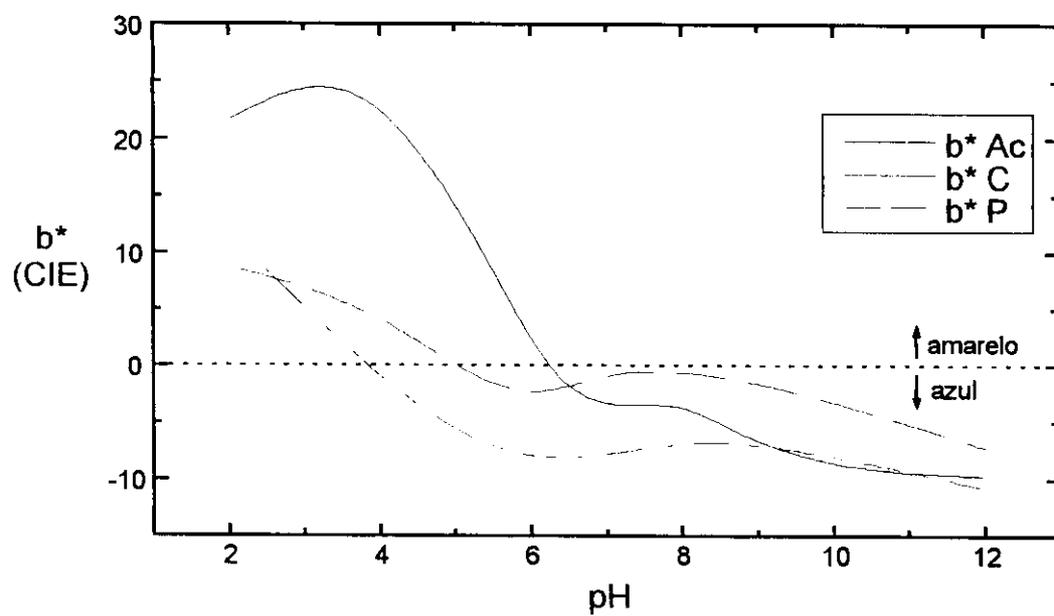


FIGURA 4.10 Variação das cores amarela e azul (CIE b^*) para as amostras de ácido carmínico (Ac), carmim comercial (C) e carmim produzido pelas condições do estudo (P), em diferentes pH.

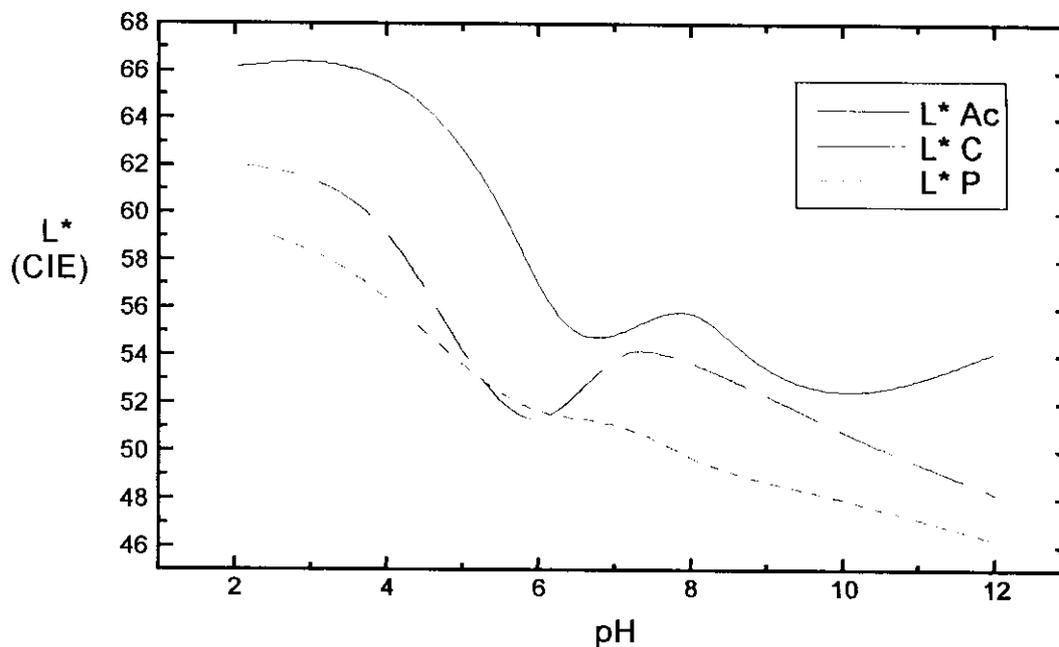


FIGURA 4.11 Variação da luminosidade (CIE L*) para as amostras de ácido carmínico (Ac), carmim comercial (C) e carmim produzido pelas condições do estudo (P), em diferentes pH.

4. 4. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.4.1. Estabelecimento das condições cromatográficas.

Além das condições cromatográficas descritas no item 3.2 foram avaliadas a utilização das colunas NH₂ e CN com diferentes sistemas de fases móveis com metanol, acetona, acetonitrila e água, para a separação dos pigmentos do carmim. Os resultados sempre foram inferiores ao obtido com a coluna C₁₈.

Utilizando coluna C₁₈, com uma fase móvel constituída por uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico 1,19M (19:81), com uma vazão de 0,5mL/min., o tempo de retenção do ácido carmínico foi de aproximadamente 11 minutos, com uma boa resolução dos compostos com espectros similares. A Figura 4.12 apresenta o cromatograma tridimensional, planar e bidimensional e o espectro de absorção do padrão de ácido carmínico utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD).

A propriedade fluorescente do ácido carmínico, descrita por STAPELFELDT *et alii.* (1993), foi utilizada, neste estudo, para avaliar a factibilidade da análise desta substância através do uso de um detector de fluorescência instalado em sequência ao DAD. Os comprimentos de onda utilizados para excitação ($\lambda = 470\text{nm}$) e emissão ($\lambda = 600\text{nm}$) foram escolhidos em função das características espectrais do ácido carmínico (Figura 4.13) e as limitações do detector utilizado (λ_{ex} máximo de trabalho igual a 470nm).

As Figuras 4.14 e 4.15 apresentam as curvas padrões de ácido carmínico construídas com os valores apresentados no Tabela 4.17, obtidos através do uso dos detectores de arranjo de diodos ($\lambda = 490\text{nm}$) e fluorescência ($\lambda_{\text{ex.}} = 470\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em.}} = 600\text{nm}$). Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99 e as equações obtidas foram:

- detecção por absorção a $\lambda = 490\text{nm}$

$$y = - 0,48 + 143,56 x$$

- detecção por fluorescência com $\lambda_{\text{ex}} = 470\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 600\text{nm}$

$$y = - 1,01 + 218,70 x$$

onde:

y = área (mAbs./min. - DAD) ou altura (mm - fluorescência) do pico cromatográfico e x = concentração em mg/mL do ácido carmínico.

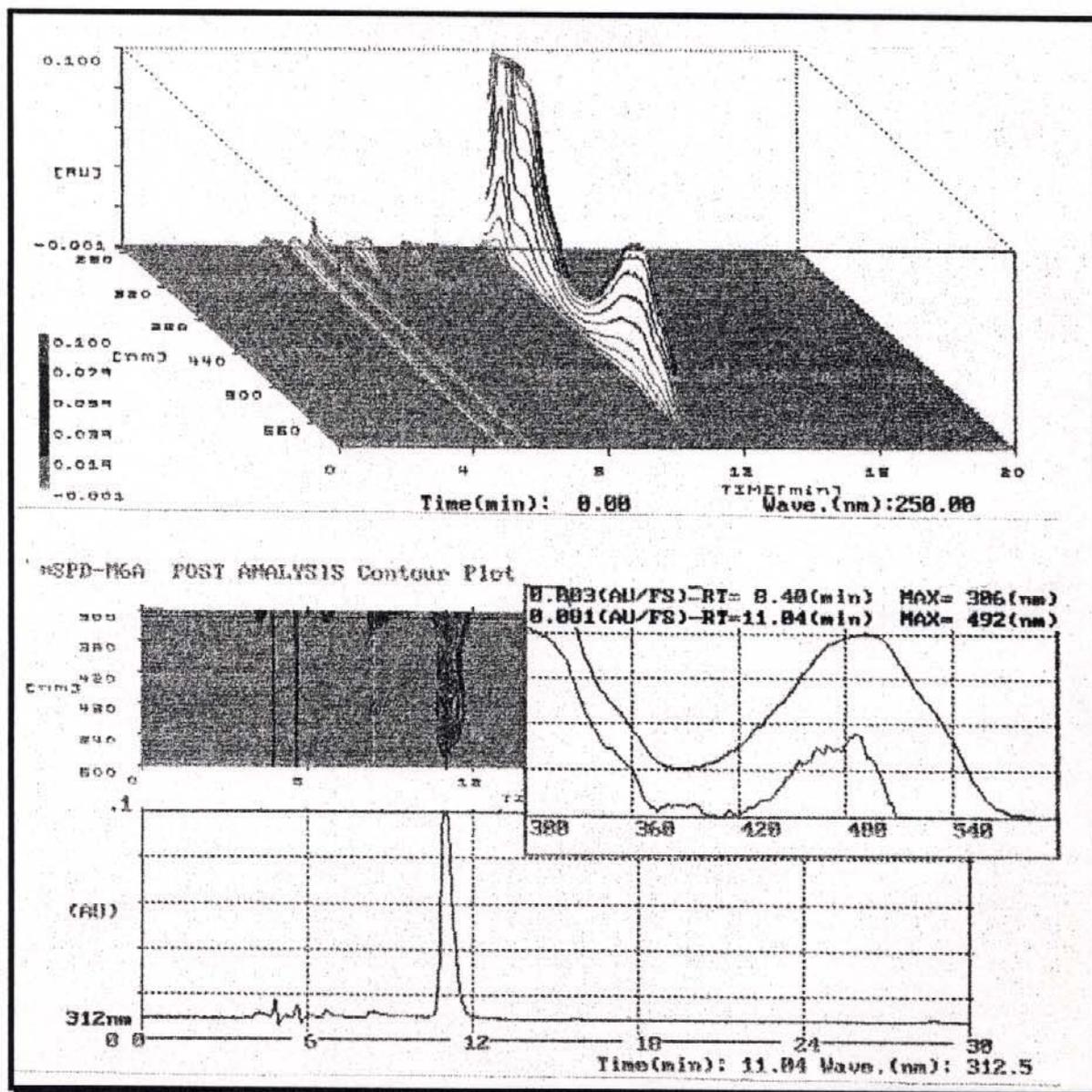


FIGURA 4.12 Cromatograma tridimensional; planar e bidimensional e espectro de absorção do padrão de ácido carmínico (0,232mg/mL), utilizado neste estudo. As condições cromatográficas estão descritas no texto (Ítem 3.2).

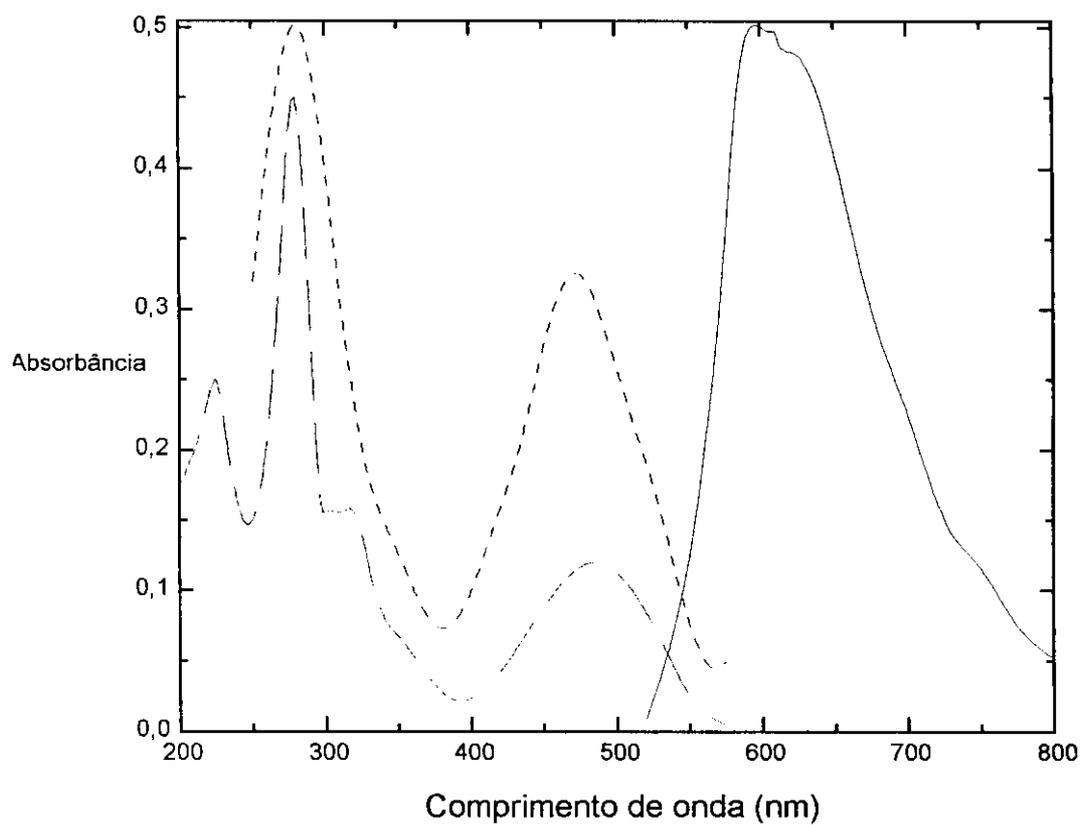


FIGURA 4.13 Espectro de absorção (- - -), excitação (....., $\lambda_{em} = 590\text{nm}$) e emissão (———, $\lambda_{ex} = 490\text{nm}$) de uma solução aquosa de ácido carmínico (10^{-5} M) em solução aquosa de HCl 0,01M e NaCl 0,99M a 25°C . Fonte: STAPELFELD *et alii* (1993)

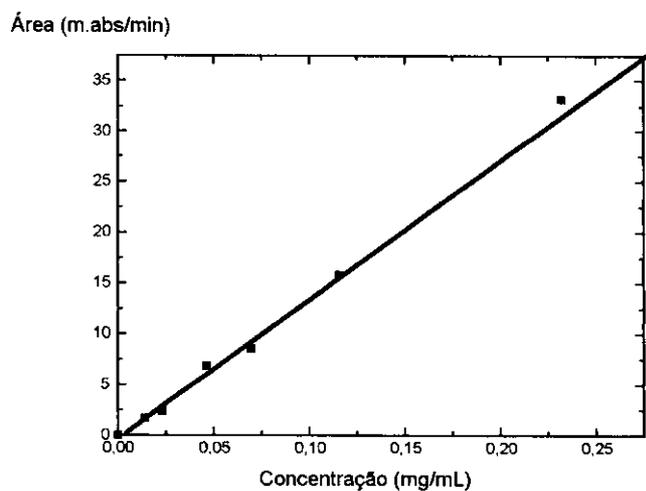


FIGURA 4.14 Curva-padrão do ácido carmínico obtida com detector de arranjo de diodos, com quantificação em 490nm.

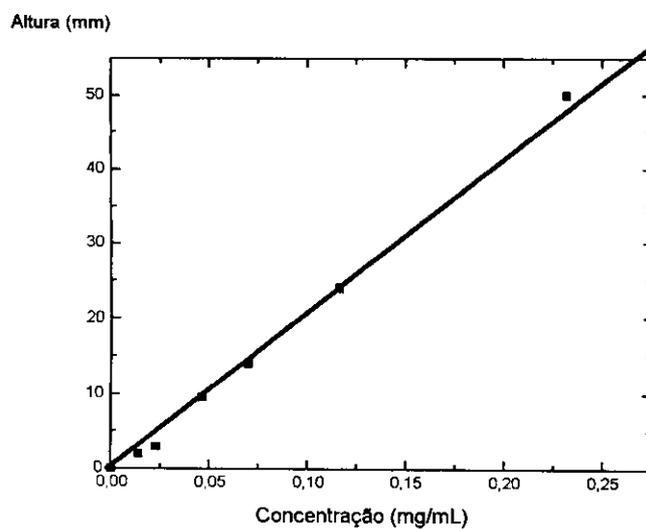


FIGURA 4.15 Curva-padrão do ácido carmínico obtida com detector de fluorescência, com quantificação em comprimentos de onda de excitação de 470nm e emissão de 600nm.

TABELA 4.17 Valores cromatográficos obtidos com detectores de arranjo de diodos e de fluorescência, para a construção da curva-padrão do ácido carmínico.

Concentração (mg/mL)	DAD	Fluorescência
	Área (mAbs./min.)	Altura (mm)
0,01392	1,7030	2,0
0,02320	2,3812	3,0
0,04640	6,9138	9,5
0,06960	8,5995	14,0
0,11600	15,8232	24,0
0,23200	33,1662	50,0

4.4.2 Aplicação das condições cromatográficas obtidas na análise de carmim.

Utilizando as condições cromatográficas propostas, foram analisados o carmim produzido pelas condições estabelecidas por este estudo e o carmim comercial. Os resultados estão apresentados no Tabela 4.18.

As Figuras 4.16 e 4.17 apresentam os cromatogramas planar e bidimensional e os espectros de absorção obtidos com detector de arranjo de diodos e o cromatograma obtido com o detector de fluorescência dos carmins estudados.

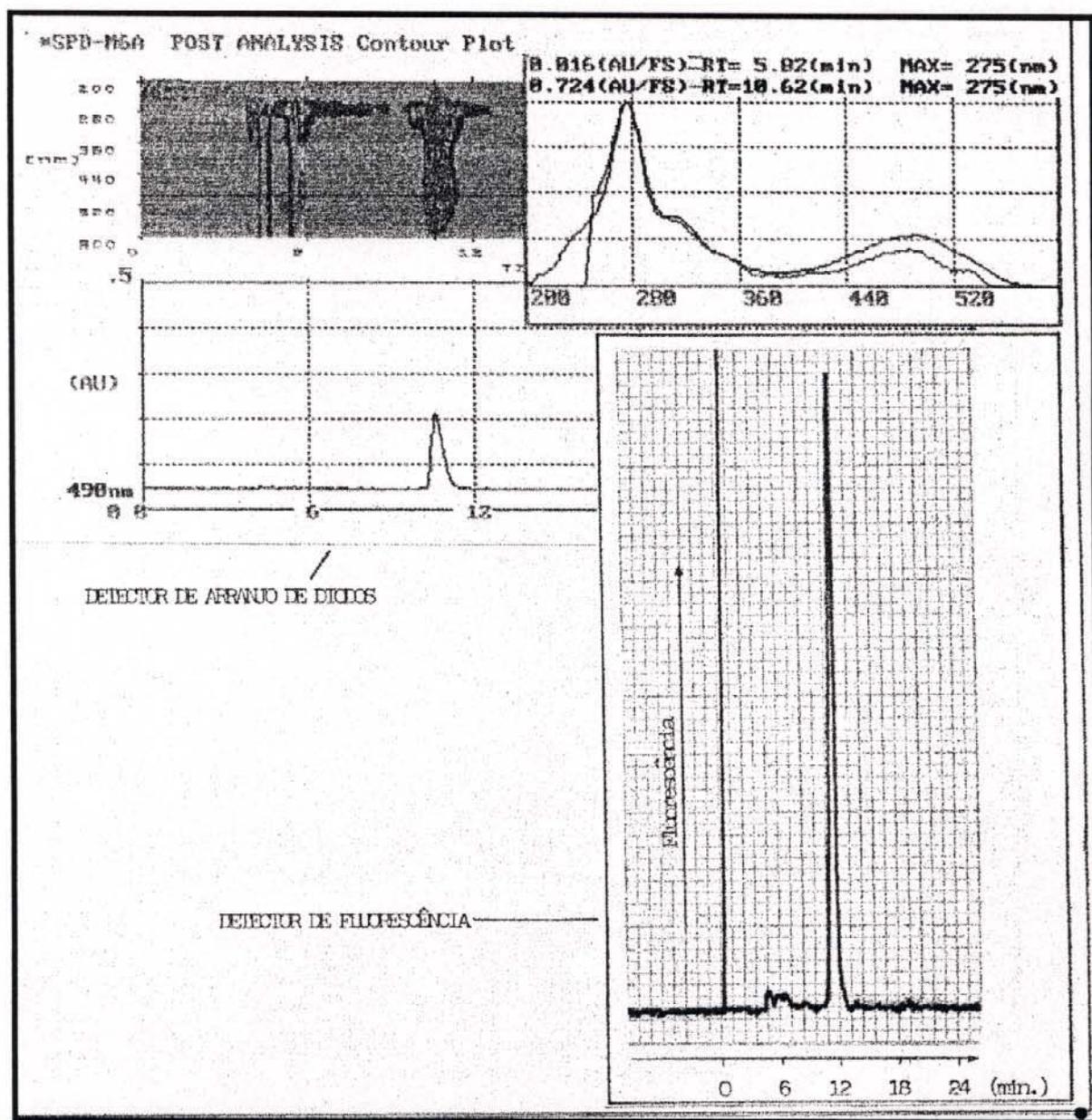


FIGURA 4.16 Cromatogramas e espectros obtidos com detectores de arranjo de diodos e de fluorescência, da amostra de carmin produzido nas condições estabelecidas neste estudo. As condições cromatográficas estão apresentadas no texto (Item 3.2).

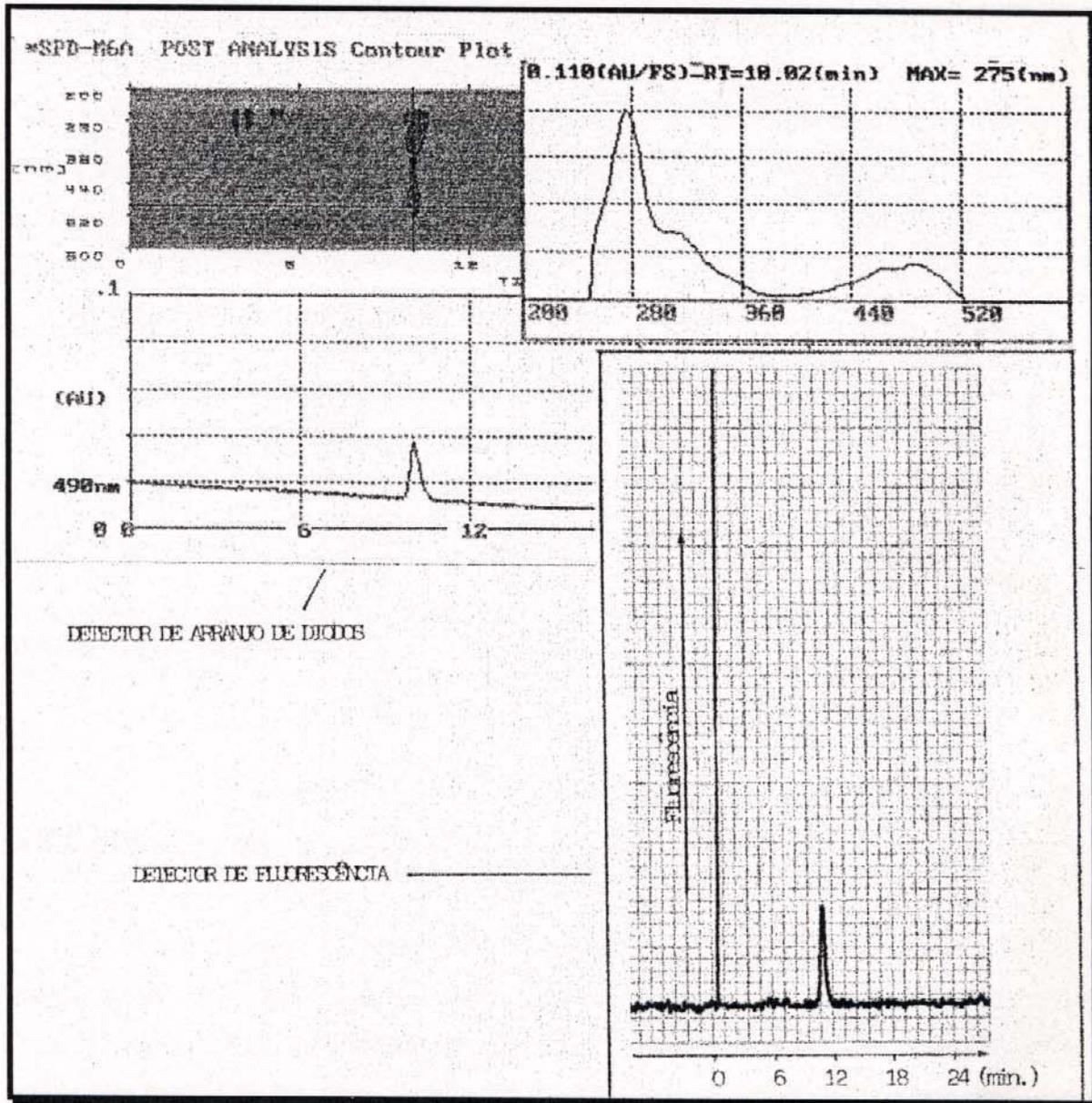


FIGURA 4.17 Cromatogramas e espectros obtidos com detectores de arranjo de diodos e de fluorescência, da amostra de carmim utilizada como referência neste estudo. As condições cromatográficas estão apresentadas no texto (Item 3.2).

Observa-se, no cromatograma do carmim produzido pelas condições do estudo (Figura 4.16) que, das substâncias detectadas, apenas a que apresenta um $t_R = 5,82$ min. tem um espectro de absorção similar ao do ácido carmínico ($t_R = 10,62$ min.) e sua concentração (considerando a absorção de ambas a 275nm) é aproximadamente 45 vezes inferior à do ácido carmínico presente.

TABELA 4.18 Concentrações de ácido carmínico, obtidas através de análises cromatográficas, das amostras de carmim estudadas.

Amostras	% de ácido carmínico	
	detector de arranjo de diodos	detector de fluorescência
referência comercial	45,03	46,31
Amostra produzida nas condições do estudo	46,50	47,66

4.4.3 Validação do método analítico para produtos coloridos com carmim.

Os resultados encontrados na avaliação dos processos de extração do corante de amostras com elevada concentração de proteína indicaram uma melhor performance do método B, que se apresentou como o mais rápido e mais eficiente na extração dos pigmentos. O Tabela 4.19 apresenta os resultados obtidos com as metodologias A e B na extração do ácido carmínico, em amostras de leite coloridas com quantidades conhecidas de carmim.

TABELA 4.19 Recuperação analítica de ácido carmínico em amostras de leite com a aplicação dos métodos A e B.

Concentração esperada (mg/100g)	Método A		Método B	
	Concentração encontrada (mg/100g)	% de recuperação	Concentração encontrada (mg/100g)	% de recuperação
4,41	1,68	38,10	4,20	95,24
4,41	1,52	34,47	4,35	98,64
4,41	1,48	33,56	4,25	96,37
Média	1,56	35,38	4,27	96,75
Erro-padrão	0,06	1,38	0,05	1,00

Deste modo optou-se pelo método B, ressaltando-se que o método A pode ser otimizado se adicionado de processos suplementares de extração, conforme apresentado por JALON *et alii* (1989). Esses processos tornam a metodologia muito longa e laboriosa e, por isso, desinteressante para o nosso objetivo.

A precisão das condições analíticas escolhidas foi avaliada pela injeção de uma mesma amostra várias vezes (precisão do sistema cromatográfico) e pela repetição analítica de uma mesma amostra, utilizando todos os procedimentos envolvidos, desde a amostragem até a quantificação do princípio ativo (precisão do processo analítico).

A precisão do sistema cromatográfico está apresentada no Tabela 4.20, onde foram injetadas cinco vezes a mesma amostra. O coeficiente de variação de 2,55% para valores calculados pelo sistema de integração do detector de arranjo de diodos e de 7,33%, calculado pelo processo de medida manual dos registros

do detector de fluorescência, demonstrou a maior eficiência dos processos automatizados para esses cálculos.

Os critérios de aceitação dos valores do coeficiente de variação tem sido bastante variados (QUATTROCCHI, *et alii*, 1992) e foram considerados satisfatórios quando inferiores a 5%, para concentrações superiores a 1mg/100g e de 10% para concentrações inferiores a este valor (HORWITZ, 1982).

TABELA 4.20 Precisão do sistema cromatográfico na análise do ácido carmínico, para os detectores de arranjo de diodos e de fluorescência. (Recuperação ao nível de 1,44mg/100g).

Detector	Resultado analítico (mg/100g)					Média	s	CV
	1	2	3	4	5			
DAD	1,42	1,41	1,48	1,42	1,38	1,42	0,04	2,55
Fluorescência	1,26	1,15	1,26	1,09	1,09	1,17	0,08	7,33

s = estimativa de desvio padrão

CV = coeficiente de variação.

A avaliação da precisão do processo analítico foi realizada pela análise em triplicata de amostras de leite e iogurte coloridos com carmim.

Os resultados, apresentados no Tabela 4.21, indicam que, mesmo para baixas concentrações do pigmento, o coeficiente de variação obtidos pelo uso do detector de arranjo de diodos é aceitável (7,11%) e diminui bastante quando se trabalha com concentrações superiores a 1,0mg/100g.

Os resultados obtidos com o detector de fluorescência, para amostras de iogurte, estão mascarados pela dimensão do pico cromatográfico apresentado

(altura = 2,0mm) que dificulta a avaliação de pequenas diferenças existentes entre eles, pelo uso de medidas manuais (Figura 4.18).

TABELA 4.21 Precisão do processo analítico para análise de ácido carmínico, utilizando o método B, descrito em material e métodos (Item 3.2).

Amostras	Resultados analíticos (mg/100g)											
	Detector de arranjo de diodos						Detector de fluorescência					
	1	2	3	\bar{x}	s	CV	1	2	3	\bar{x}	s	CV
Iogurte	0,60	0,66	0,69	0,65	0,05	7,11	0,58	0,58	0,58	0,58	0	0
Leite	4,20	4,35	4,25	4,27	0,08	1,79	3,81	3,92	3,68	3,80	0,12	3,16

\bar{x} = média aritmética.

s = estimativa de desvio padrão.

CV = coeficiente de variação.

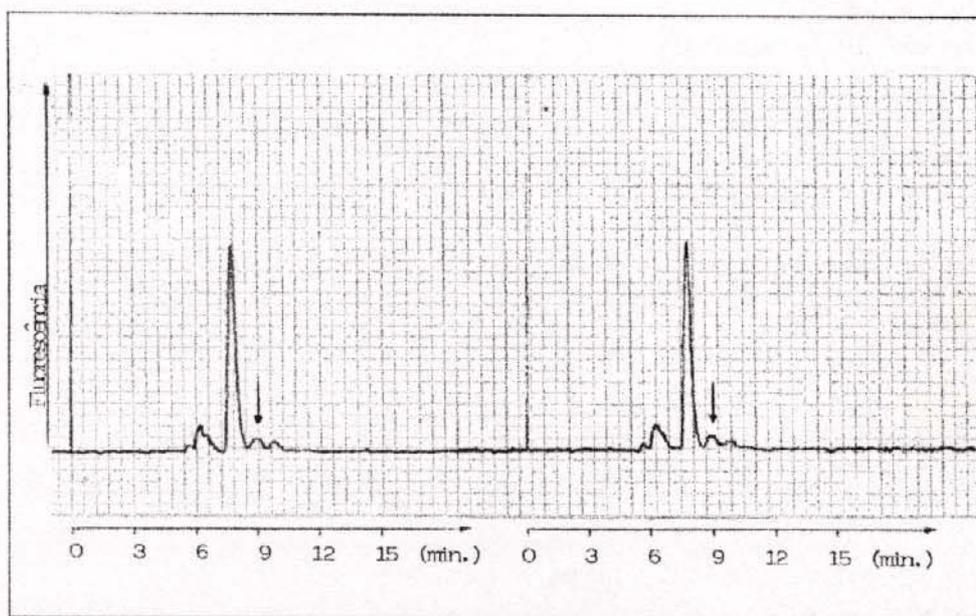


FIGURA 4.18 Cromatogramas de amostras de iogurte, obtidos com detector de fluorescência, após extração com o método B (item 3.2).

A exatidão do método foi determinada pela recuperação analítica do pigmento em amostras de leite e de água. Os resultados desta recuperação em amostras de leite, apresentados no Tabela 4.22, indicam valores médios de 96,75%, enquanto para amostra com baixo teores de proteína (amostra de água) a recuperação obtida foi de 99,77%, com a utilização do detector de arranjo de diodos.

Estas mesmas recuperações apresentaram, para o detector de fluorescência, valores médios de 86,24% para amostra de leite e de 84,95% para amostra de água.

TABELA 4.22 Recuperação analítica (%) do método B, aplicado em amostras de leite e água, coloridas com carmim, utilizando detectores de arranjo de diodos e de fluorescência.

Amostras	DAD					Detector de fluorescência				
	1	2	3	\bar{x}	EP	1	2	3	\bar{x}	EP
Leite	95,24	98,64	96,37	96,75	$\pm 1,0$	86,39	88,89	83,45	86,24	$\pm 1,57$
Água	98,61	97,92	102,78	99,77	$\pm 2,63$	87,50	79,86	87,50	84,95	$\pm 4,41$

EP = erro padrão

Como sensibilidade do método procurou-se avaliar o limite de detecção e o limite de quantificação. O limite de detecção foi estabelecido como um sinal igual ou superior a três vezes o ruído do registro cromatográfico. Isto implica em uma concentração de aproximadamente $1\mu\text{g/mL}$ para o detector de arranjo de diodos e de $1,5\mu\text{g/mL}$ para o detector de fluorescência.

Para se obter o limite de quantificação foram avaliadas, em triplicatas, amostras com concentrações crescentes de ácido carmínico. O Tabela 4.23 apresenta o resultado destas avaliações.

TABELA 4.23 Resultados analíticos para ácido carmínico, com a utilização de detectores de arranjo de diodos e de fluorescência.

Concentração injetada (µg/mL)	Detector de arranjo de diodos						Detector de fluorescência					
	Área (mAbs/min.)		\bar{x}	s	CV		Altura (mm)			\bar{x}	s	CV
2,88	4,03	3,54	2,25	3,27	0,92	28,10	nd	nd	nd	-	-	-
7,20	8,88	8,56	8,72	8,72	0,16	1,83	4,5	4,5	5	4,67	0,29	6,21
14,40	16,61	16,44	16,56	16,53	0,09	0,54	8	9	9	8,67	0,58	6,69
28,80	31,78	32,62	31,42	31,94	0,62	1,94	14	15	15	14,67	0,58	3,95

nd = não detectado (menor que 3 vezes o ruído do registro cromatográfico).

\bar{x} = média aritmética.

s = estimativa do desvio-padrão.

CV = coeficiente de variação

Os valores do coeficiente de variação para o detector de arranjo de diodos e a baixa relação sinal/ruído para o detector de fluorescência indicam um limite de quantificação superior a 3,0 µg/mL para ambos os detectores.

A linearidade do método cromatográfico foi avaliada pelo coeficiente de correlação para as equações das retas, que representam as "curvas-padrão" de ácido carmínico para os detectores de arranjo de diodos e de fluorescência. Os coeficientes obtidos para concentrações entre 0 e 200 µg/mL foram superiores a 0,99 indicando uma boa linearidade nesta faixa de trabalho, que representa a grande maioria das concentrações encontradas em alimentos.

As análises de variância para as equações encontradas foram:

- Detector de arranjo de diodos ($\lambda = 490\text{nm}$)

$$y = -0,48 + 143,56 x$$

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Nível de probabilidade
Regressão	1	806,5795	806,5795	1927,715	0
Erro	5	2,09206	0,418412		
Total	6	806,67156			

Coefficiente de determinação (r^2) = 0,9974

-Detector de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 470\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 600\text{nm}$)

$$y = -1,01 + 218,70 x$$

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Nível de probabilidade
Regressão	1	1871,8254	1871,8254	3696,701	0
Erro	5	2,5317510	0,50635		
Total	6	1874,3571			

Coefficiente de determinação (r^2) = 0,9986

Para avaliar a seletividade do método foi preparada uma mistura contendo os principais corantes utilizados na indústria de alimentos que, junto com o corante carmim, foram injetados no cromatógrafo, nas condições estabelecidas neste trabalho. A Figura 4.19 apresenta os cromatogramas obtidos

pela injeção desta mistura, onde o ácido carmínico elui com $t_R = 9,09$ minutos. A pureza do pico correspondente ao ácido carmínico, obtida pela razão espectral determinada em três faixas diferentes do pico (Figura 4.20), apresentou valores superiores a 0,999, indicando a ausência de picos sobrepostos de substâncias coeluidas.

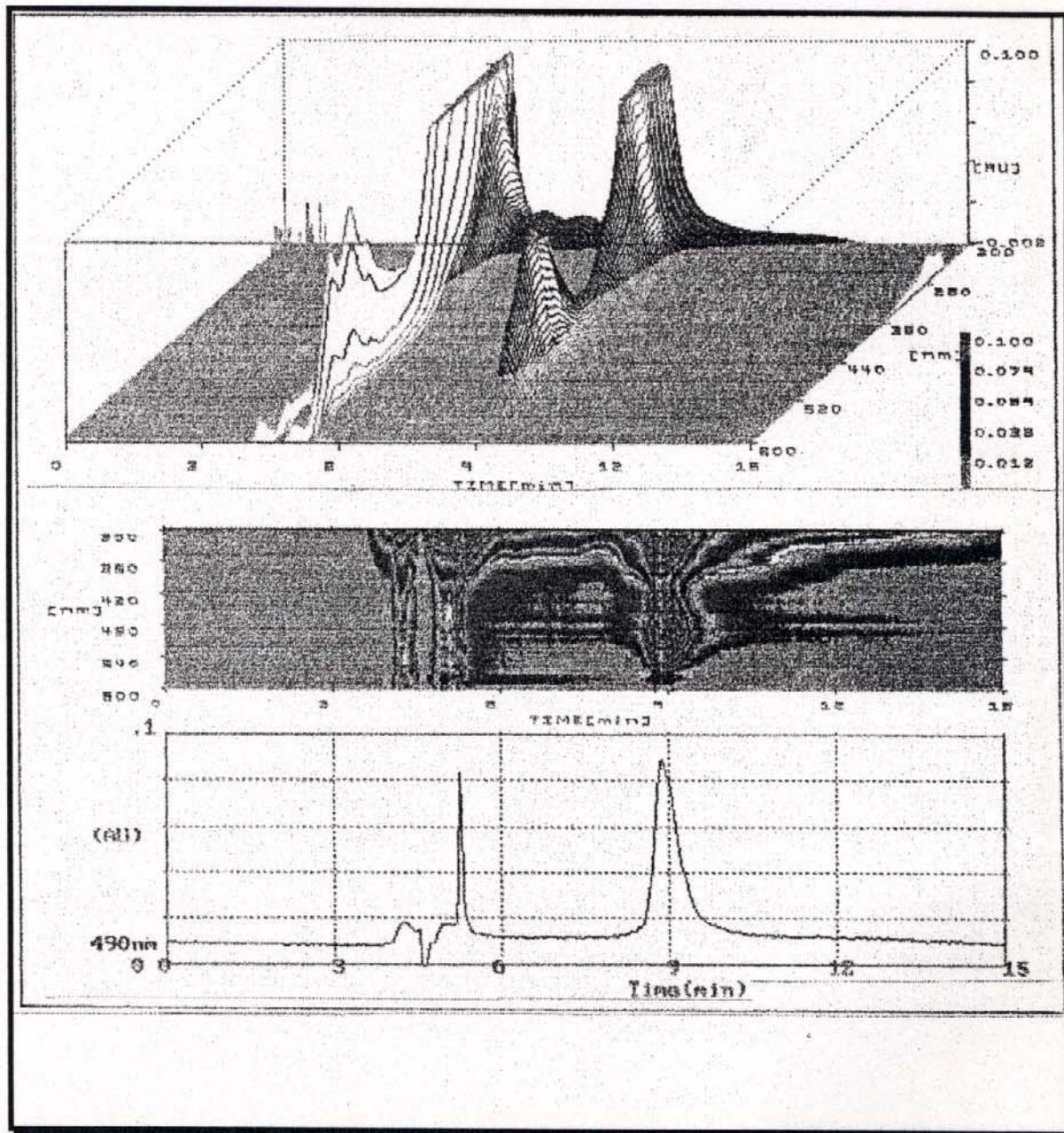


FIGURA 4.19 Cromatogramas tridimensionais, planar e bidimensional de uma mistura de corantes artificiais, com carmim, utilizados para avaliar a seletividade do processo cromatográfico descrito no item 3.2.

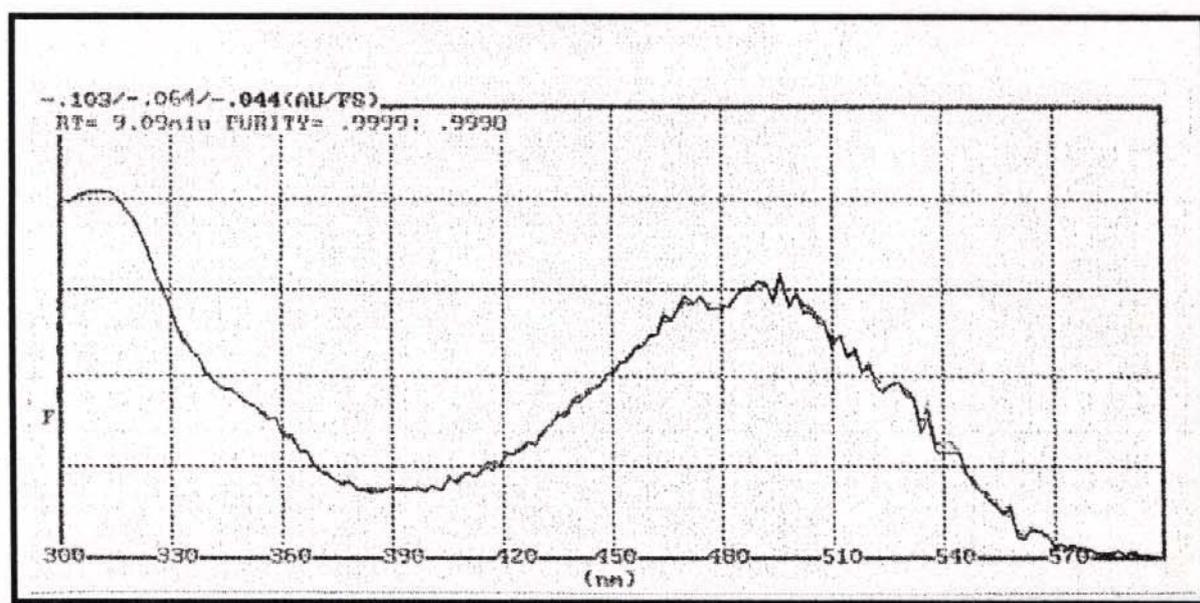


FIGURA 4.20 Sobreposição de espectros obtidos em diferentes pontos do pico cromatográfico do ácido carmínico, em uma amostra com a presença de vários corantes artificiais, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 3.2.

5 CONCLUSÃO

Os resultados alcançados durante o estudo do corante carmim de cochonilha permitiu-nos observar que:

- O rendimento conseguido pelas condições propostas (72%) foi superior aos encontrados na literatura para condições semelhantes;
- O processo desenvolvido apresentou rapidez e simplicidade, podendo ser extrapolado para condições industriais;
- O corante produzido em condições onde procurou-se maximizar o rendimento, apresenta uma coloração com tonalidade mais azul que o pigmento comercial;
- A metodologia proposta para análise do ácido carmínico em alimentos mostrou, além de simplicidade, boa exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade e linearidade, nas condições estudadas;
- Este trabalho indicou também que é possível obter corantes carmim com tonalidade diferentes, apenas modificando alguns fatores no processo de produção, merecendo, por isso, estudos posteriores que padronizem essas alterações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCABES, V. B. Estudio de Factibilidad de Instalación de una Planta de Industrialización de Cochinilla para la Obtención del Carmin. Tese para obtenção do título de engenheiro químico. Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga. Ayacucho, Peru, 1970, 105p.
- ANAND, N. The Market for Annatto and other Natural Colouring Materials, with Special Reference to the United Kingdon. **Rep. Trop. Devel. Resear. Inst.** London, 1983, 32p.
- ANDRES, C. Natural Color Systems. **Food Process.**, USA, 48 : 46 - 50, 1987.
- ANDREY, D. Detection of Colouring of Orange Juice With Beetroot Juice and With Carminic Acid. **Mitteilungen Gebiete Lebensmitteluntersuchung Hygiene**, 70 : 237-245, 1979.
- ANDRZEJEWSKA, E. Detection of the Natural Organic Dye Cochineal in Meat Products. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, 32: 315-318, 1981.
- ANGELUCCI, E. Corantes Naturais Versos Corantes Artificiais. Vantagens e Desvantagens. In: CARVALHO, P. R. N. Corantes Naturais para Alimentos. ITAL, Campinas, SP. 1989, 89p.
- ANGELUCCI, E. Corantes para Alimentos In: CARVALHO, P. R. N. & YABIKU, H. Y. II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos. I Simpósio Internacional de Urucum. ITAL, Campinas, SP. , 1991, 320p.
- ANGELUCCI, E. & MANTOVANI, D. M. B. Minerais em Alimentos. ITAL, Campinas, ITAL. 1986, 131p.

ANON. Colour Additives. Cochineal Extracts; Carmine. Federal Register. 33 (243): 18577, 1968.

BARALE, R.; LOPRIENO, N.; FUMERO, S.; MERIGGI, J.; MONDINO, A. & SILVESTRI, S. Evaluation of Potential Mutagenic Activity of Carminic Acid. **Chem. Toxicol. Food.** 11: 349 - 357, 1978.

BIERREN, F. Color and Humam Appetite. **Food Technol.**, 17 : 45, 1963.

BOX, G. E. P. & BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables **Technometrics.** 2 : 455 - 475, 1960.

BRUNS, R. E.; BARROS NETO, B. & SCARMINIO, I. S. Otimização e Planejamento de Experimentos. Uma Introdução à Quimiometria. UNICAMP. Campinas, SP. 1994.

CASSANO, C.M.C. Proyecto para una Planta Industrial para La Obtencion del Carmin de Cochinilla. Universidad Nacional Mayor de San-Marcos. Lima Peru, 1962, 103p.

COULSON, J. Food, Flavourings, Ingredients, Packaging and Processing **Philippine J. Veter. Anim. Sci.** 3 : 14 - 17, 1981.

DIEMAIR, W. Laboratoriumsbuch für Lebensmittelchemiker. 8 Auflage Verlag Von Theodor Steinkopff, Dresden. , 1963.

EGGINGER, R. Identification of Natural Water-soluble Food Colorants by TLC. **Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung**, 97: 7574 - 7579, 1987.

- EGGINGER, R. Qualitative Identification of Natural Organic Colorants by TLC. **Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung**, 113: 308 - 315, 1991.
- FAO. Current Food Additives Legislation - France. Current Food Additives Legislation. Rome. 130: 7, 1969.
- FAO/WHO. Specification for the Identity and Purity of Some Antioxidants, Food Colours, Thickeners and Certain Other Food Additives. Rome. n° 57, 1977. 157p.
- FAO/WHO. Specification for Identity and Purity of Carrier Solvents, Emulsifiers and Stabilizers, Enzyme Preparations, Flavoring Agents, Foods Colours, Sweetening Agents and Other Food Additives. n° 19, Geneva. : 58 - 61, 1981.
- FERREIRA, A. B. H. Dicionário Eletrônico Aurélio. Ed. Nova Fronteira. Rio de Janeiro, 1995.
- FERREIRA, V. L. P.; HOUGH, G. & YOTSUYANAGI, K. Cor de Doce de Leite Pastoso. **Colet. ITAL**, 19 : 134 - 143, 1989.
- FORD, G. P.; GOPAL, T.; GRANT, D.; GAUNT, I. F.; EVANS, J. G. & BUTLER, W. H. Chronic Toxicity/carcinogenicity Study of Carmine of Cochineal in the Rat. **Food Chem. Toxicol.**, 25 : 897 - 902, 1987.
- GRANT, D. & GAUNT, I. F. Three Generation Reproduction Study on Carmine of Cochineal in Rat. **Food Chem. Toxicol.**, 25 : 903, 1987.

- GRANT, D.; GAUNT, I. F. & CARPANINI, F. M. B. Teratogenicity and Embriotoxicity Study of Carmine of Cochineal in Rat. **Food and Chem. Toxicol.**, 25 : 913 - 917, 1987.
- GROTHUS, P. Natural Colors and their Use in Confections. **Manufact. Confection.**, 61 : 29 - 32, 1981.
- GUTTERIDGE, J. M. C. & QUINLAN, G. J. Carminic Acid Protoned Oxygen Radial Damage to Lipid and Carbohydrate. **Food Addit. Contam.**, 3 (4): 289 - 293, 1986.
- HIRATA, K.; OGIWARA, T.; AMAKAWA, E. & OHONISHI, K. Analytical Methods for Natural Dyes in Foods. II. Detection of Natural Dyes in Kamaboko Prepared as Imitation Crab. **J. Food Hyg. Soc. Jpn.**, 24 : 1 - 6, 1983.
- HORWITZ, W. (ed.) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D. C., 12th ed. 1975, 1094p.
- HORWITZ, W. (ed.) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D. C., 1980, 1018p.
- HORWITZ, W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. **Anal. Chem.**, 54 : 67 - 76, 1982.
- ILANY, J. Confectionery and Chocolate Information Notes. **Gordian**. 75: 240, 1975.
- IMO INDUSTRIES INC. ICP 2000 Spectrometer User's Guide. Bedford, MA, 1990.

- INCOTEC. Instituto Colombiano de Normas Técnicas. Colombian-Standard. INCOTEC. Bogotá, 1978, 4p.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Vol. 1. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3ª ed. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1985.
- JALÓN, M.; PEÑA, M.J. & RIVAS, J.C. Liquid Chromatographic Determination of Carminic Acid in Yogurt. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 72 : 231-234, 1989.
- KEARSLEY, M. W. & KATSABOXAKIS, K. Z. Stability and Use of Natural Colours in Foods. Red Beet Powder, Copper Chlorophyll Powder and Cochineal. **J. Food Technol.**, 15 : 501 - 514, 1980.
- KENMOCHI, K. & KATAYAMA, O. A Simple Method for Identification of Cochineal Pigment and Lac Dye in Coexistence with Synthetic Food Dyes. **Rep. Nat. Food Res. Inst. Japan**, 32: 128-132, 1977.
- LARA, W. H. Monografias de Corantes Naturais para Fins Alimentícios. Padrões de Identidade e Qualidade. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1984, 47p.
- LEES, R. Use of Natural Food Colours in Confectionery. **Confect. Product**. 41: 391 - 392, 1975.
- LLOYD, A. G. Extraction and Chemistry of Cochineal. **Food Chem.**, 5: 91-107, 1980.
- LOPRIENO, G.; BONCRISTIANI, G. & LOPRIENO, N. Genotoxicity Studies *in vitro* and *in vivo* on Carminic Acid (Natural Red 4). **Food Chem. Toxicol.** 30 : 759-764, 1992.

- MADSEN, H. L.; STAPELFELDT, H.; BERTELSEN, G. & SKIBSTED, L. H. Cochineal as a Colorant in Processed Pork Meat. Colour Matching and Oxidative Stability. **Food Chem.**, 46 : 265 - 271, 1993.
- MARSHALL, P. N. & HOROBIN, R. W. A Simple Assay Procedure for Carmine and Carminic Acid Samples. **Stain Technol.**, 49: 19-28, 1974.
- MARUSZEWSKA, M. & GERTING, H. Food Colorants. **Zywieni Czlowieka**, 5: 287 - 294, 1978
- MASLOWSKA, J. A New Chromatographic Method for the Separation of Food Dye Mixtures on Thin MgO Layers. **Chromatographia**, 20: 99-101, 1985.
- MASLOWSKA, J. & GRONOWSKA, E. Separation of Mixtures of Metal Complexes with Substantial Food Dyes by Paper Electrophoresis. **Dtsch. Lebensm. Rundsch.**, 80: 207 - 210, 1984.
- MC NEAL, J. E. Qualitative Test for Added Coloring Matter in Meat Products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 59: 570-577, 1976.
- MELOAN, S. N.; VALENTINE, L. S. & PUCHTLER, H. On the Structure of Carmine Acid and Carmine. **Histochemistry**. 27: 87, 1971.
- MESLE, L. Additives in Meat Industries. **Ind. Aliment. Agric.** 89: 631 - 639, 1972.
- MONTESINOS, E.E.; CALCIN, F. & RUIZ, Y. S. Cochinilha del Carmin. M. B. RIVEROS (ed.), Lima. 1989, 95p.
- MORI, H.; IWATA, H.; TANAKA, T.; MORISHITA, Y.; MORI, Y.; KOJIMA, T. & OKUMURA, A. Carcinogenicity study of cochineal in B6C3F1 mice. **Food Chem. Toxicol.**, 29 (9): 585-588, 1991.

- MOTTIER, R. Cochenille, Acid Carminique et Carmin. **Rev. Conserv. Alimentat. Mod.**, 27: 83-86, 1974.
- NAZÁRIO, G. Avaliação Toxicológica de Corantes Naturais. In: CARVALHO, P. R. N. Corantes Naturais para Alimentos. ITAL, Campinas, SP. , 1989, p. 2 - 6
- OHLEN, A. & BERTELSEN, G. Alternative Colourants in Salami. Evaluation of Light-induced Quality Changes. **Proc. Int. Cong. Meat Sci. Technol.**, 35: 840 -845, 1989.
- OVEREEM, J.C. & VAN DER KERK, G. J. M. Revised Structures for Cochenilic Acid and for the Insect Pigments, Carminic and Kermesic Acid. **Rec. Trav. Chim.** 83: 1023, 1964.
- OVIEDO S.G. & GIBAJA, L. D. A. Preparacion del Carmin. I. Evaluacion de Cuatro Procesos para Preparar Carmin. **Bol. Soc. Quim. Peru.** 43: 133-138, 1977.
- PETIT, J.; DURAND, P.; FRASEY, A. M.; BARGNOUX, H.; SAUDAN, M. & BERGER, J. A. Additive and Ingredient Blends for Meat Products. Analytical Aspects and Problems With Their Use. **Viandes Prod. Carnes.**, 7: 211 - 215, 1986.
- PRADO, D. M. Obtención de Carmin a partir de Extracto de Cochinilla. Universidad Nacional Agrária La Molina, Tese para obtenção de título de Engenheiro de Alimentos, Lima, Peru, 1985, 76p.
- PUTTEMANS, M. L.; De VOOGT, M.; DRYON, L. & MASSART, D. Extraction of Organic Acid by Ion-Pair Formation With Tri-*n*-Octylamine. Part 7. Comparison of Methods for Extraction of Synthetic Dyes from Yogurt. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 68: 143 - 145, 1985.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S.A. & LABA, R.F. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Merck, Buenos Aires, 1992, 407p.

RANDICH, J. A. Ensayo Tecnológico para la Obtención de Extracto de Cochinilla em Polvo. Tese para obtenção de título de Engenheiro de Alimentos, Universidad Nacional Agraria de La Molina. Lima Peru, 1975, 163p.

RAYNER, P. B. Food and Drink Colors from Natural Sources. **Food Mark. Technol.**, 7: 9 - 10, 1993.

RIOS, E. F. Utilización del Método Carré Modificado para la Obtención del Carmin. Tese para obtenção de título de Engenheiro de Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Peru, 1989, 92p.

SATO, G. S.; CHABARIBERY, D.; MAIA, M. L.; CARVALHO, F. C.; NEGRI NETO, A. & MARQUES, S. A. Tendência de Mercado para Corantes na Indústria para Alimentos. **Agricult. São Paulo**. São Paulo, SP. 1: 1-50, 1992.

SCHWING-WEILL, M. J. Etude Spectrophotométrique de l'acid Carminique en Solution. Application à son Dosage. **Analisis**, 14: 290 - 295, 1986.

SHIMANO, Y. The Right Method of Utilizing Natural Colouring Matters. **Food Process.**, 8: 43 - 46, 1973.

STAPELFELDT, H.; JUN, H. & SKIBSTED, L. H. Fluorescence Properties of Carminic Acid in Relation to Aggregation, Complex Formation and Oxygen Activation in Aqueous Food Models. **Food Chem.**, 48: 1 - 11, 1993.

SUNADA, T. & KATO, N. Effect of Radiation on Food Colours. II. Effect of Radiation on Natural Food Colours. **Food Irrad.**, 4: 137 - 142, 1969.

- TADAMASA, H. Recent Trends in the Use of Colorants in Confectionery, Particularly Annatto Colorants. **New Food Ind.**, 23: 6 - 10, 1981.
- VARGAS, P.; PAULEN, B. & LIVCHITZ, P. La Industria del Carmin y su Exportación. ESAN. Lima, Peru, 1974, 70p.
- VON ELBE, J. H. Status of Colors in Dairy Products. **Dairy Ice Cream Field.**, 160 (3): 60 - 62, 1977.
- VON ELBE, J. H. Natural Colors Where are we? **Manufac. Confect.**, 66: 43 - 46, 1986.
- WALKER, W. Alcoholic Beverage Containing Cream. **U.K. Patent GB2084185A**, 1982.
- WELLNITZ, M. & BENTLER, W. Detection of Cochineal in Raw Dry Sausages. **Fleischwirtschaft**, 66: 1001-1003, 1986.
- YAMADA, S.; NODA, N.; MIKAMI, E. & HAYAKAWA, J. Analysis of Natural Coloring Matter in Food. IV. Methylation of Cochineal Color With Diazomethane for the Analysis of Food Products. **J. Agric. Food. Chem.**, 41: 1071-1075, 1993.
- YAMAMOTO, K.; MORISHITA, S. & MORIYAMA, S. A Simple Method for Confirmation of Amaranth, Cochineal Pigment and Laccaic Acid by Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis. **J. Food Hyg. Soc. Jpn.**, 14: 229-233, 1973.
- YURNA, B. I.; LAIDVEE, M. A. & MAAR, I. P. Liviko Bitter Aperitif Composition. **USSR Patent SU927852**, 1982.

APÊNDICE¹

CARMINS

SINONÍMIA

Vermelho de cochonilha; Carmim de cochonilha

DEFINIÇÃO

Carmim é a laca de alumínio ou de cálcio-alumínio obtida de um extrato aquoso de cochonilha.

Cochonilha consiste dos corpos dessecados de fêmeas de insetos *Dactylopius coccus, Costa (Coccus cacti, L.)*. A matéria corante deriva do ácido carmínico (ácido 7-β-D-glucopiranosil-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxo-antraceno-2-carboxílico).

Nos produtos comerciais o princípio corante está presente sob a forma dos cátions amônio, cálcio, sódio ou potássio, isolados ou associados, podendo haver excesso destes cátions.

Os produtos comerciais poderão conter ainda matéria protéica oriunda de inseto e carminato livre ou pequeno excesso de cátion alumínio.

DESCRIÇÃO

Pó friável, vermelho ou vermelho escuro. Solução - vermelho violácea.

CLASSE

Antraquinona

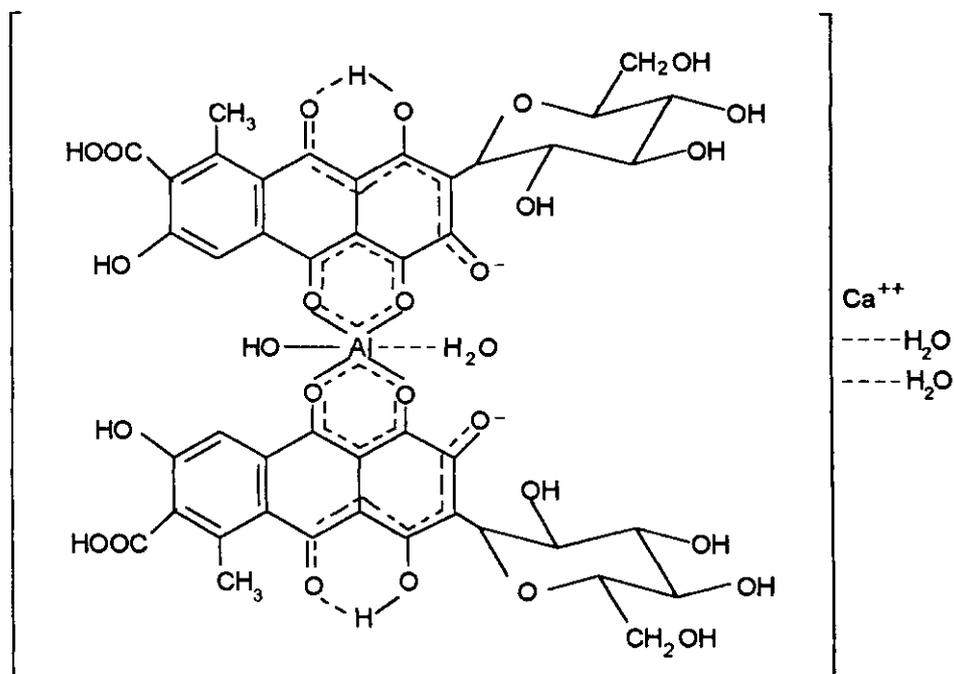
NÚMEROS INDEXADOS

C.I. (1975) N° 7547; Vermelho natural 4; Schultz (1931) N° 1391; EEC N° E120.

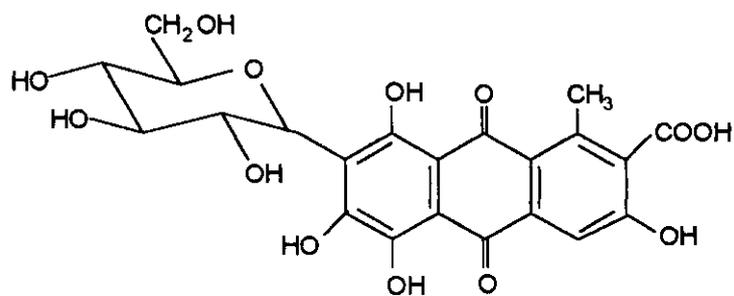
FÓRMULA QUÍMICA

Ácido carmínico - C₂₂H₂₀O₁₃

¹ LARA, W. H. (coord.) Monografias de Corantes Naturais para Fins Alimentícios. Padrões de Identidade e Qualidade. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1984, 47p.

FÓRMULA ESTRUTURAL

Quelato alumínico do ácido carmínico (provável)



Ácido carmínico

PESO MOLECULAR

Ácido carmínico - 492,40

PUREZA

O carmim deve apresentar, no mínimo, 42% de ácido carmínico.

USO FUNCIONAL

Corante para alimentos

CARACTERÍSTICAS

Provas de identificação:

A) Solubilidade

Carmim amoniacal - facilmente solúvel em água em pH 3,0 a 8,5

Carmim cálcico - pouco solúvel em água em pH 3,0. Facilmente solúvel em pH 8,5.

B) Torne a solução da amostra levemente alcalina pela adição de uma gota de solução de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio a 10%. Forma-se coloração violeta.

C) A adição de pequena quantidade de cristais de ditionato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) às soluções de amostra, em meio ácido, neutro ou alcalino, não descora a solução.

D) Leve à secura uma pequena quantidade da amostra em cápsula de porcelana. Esfrie totalmente e trate o resíduo seco com uma ou duas gotas de solução de ácido sulfúrico a 10% v/v. Não se observa alteração de cor.

E) Transfira uma dispersão aquosa da amostra para um funil de separação, cuja capacidade seja de tres vezes o volume da dispersão. Adicionar 1/3 do volume (correspondente ao da dispersão) de solução de ácido clorídrico 10% v/v e agite. Adicione álcool amílico de maneira a dobrar o volume do conteúdo do funil de separação e agite. Deixe separar as fases e despreze a fase aquosa (inferior). Lave a fase amílica com água duas ou quatro vezes, para eliminar resíduos de ácido clorídrico. Dilua a fase amílica com igual volume de éter de petróleo e agite. Adicione uma pequena quantidade de água (cerca de 1/6 do volume total). Adicione gota a gota solução de acetato de uranilo 5% p/v, agitando bem após cada adição. Forma-se uma coloração verde esmeralda característica na fase inferior.

Perda por dessecação: máximo 20%

Cinzas: máximo 12%

Proteínas (não amoniacal) - N x 6,25: máximo 25%

DETERMINAÇÃO

Adicione cerca de 30mg em base seca da amostra precisamente pesada em 30mL de ácido clorídrico 2M, ferva até a dissolução e esfrie. Transfira quantitativamente a um frasco volumétrico de 1000mL, dilua com água até a marca e misture. Determine a absorvância da solução em 494nm, usando como branco, solução contendo 3mL de ácido clorídrico 2M por 100mL. Se a absorvância medida não estiver entre 0,20 a 0,80, então o peso da amostra deve ser ajustado adequadamente. Calcule a porcentagem do ácido carmínico da amostra pela fórmula:

$$\% \text{ de ácido carmínico} = \frac{A \cdot 1500}{0,262 \cdot P}$$

Sendo A a absorvância medida e P o peso da amostra em mg. (0,262 é a absorvância de uma solução de ácido carmínico contendo 15mg por litro).

IMPUREZAS

Arsênio: máximo 3mg/kg

Chumbo: máximo 10mg/kg

Metais pesados c/ Pb: máximo 20mg/kg

Insolúveis em amônia diluída: máximo 1%

Procedimento:

Dissolva cerca de 0,25g da amostra precisamente pesada e previamente dessecada, em 2,5mL de solução de amônia diluída (160mL de amônia concentrada, diluída até 500mL) e dilua a 100mL em água; a solução é transparente. Filtre por cadinho de vidro de porosidade média. Lave o filtro com uma solução contendo 0,1% de NH₃ e seque até peso constante a 105°C.

ADULTERANTES:

Cromatografia em papel:

Prepare uma solução contendo 2g de citrato trissódico 100mL NH₄OH à 5%. Para uma melhor resolução, mergulhe o papel na solução. Seque-o em estufa a 105°C. Aplique a solução a 2cm da base do papel. Corra no solvente.

A cochonilha dá uma única mancha violácea em R_F ~ 0,8.

MICROORGANISMO

Ausência de Salmonelas em 25g da amostra, determinadas por métodos adequados.

APRESENTAÇÃO

Os produtos comerciais poderão ser apresentados em pó, ou em forma de solução aquosa ou hidroalcoólica.

ROTULAGEM

As formas comerciais dos carmins devem trazer no rótulo a forma catiônica de apresentação e o teor total de ácido carmínico, expresso em percentagem.

Nota: Deverão ser efetuadas determinações microbiológicas para a pesquisa de microrganismos patogênicos, sempre que se tornar necessária a obtenção de dados sobre o estado higiênico-sanitário da cochonilha.