

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



“Optimización de los parámetros de pH, temperatura y tiempo de reacción en el proceso de laqueado para la producción de colorante natural carmín, a partir de *Dactylopius coccus Costa* ‘Cochinilla’.”

Tesis Presentada por el Bachiller:

Vanessa Nicoli Gonzáles

Para optar por el título profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ing. Fredy Nicolás Molina Rodríguez

Arequipa – Perú

2014

PRESENTACIÓN

Señor Decano de la Facultad de ciencias farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas.

Señor Director del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica.

Señores miembros del Jurado de la Tesis.

De conformidad con las disposiciones de Reglamento de grados y títulos del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica, pongo en vuestra consideración el presente trabajo de investigación titulado:

Optimización de los parámetros de pH, temperatura y tiempo de reacción en el proceso de laqueado para la producción de colorante natural carmín, a partir de *Dactylopius coccus Costa* “Cochinilla”.

Trabajo de investigación que fue realizado aplicando los conocimientos adquiridos durante mi formación universitaria, el mismo que al ser aprobado me permitirá optar por el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo.

Arequipa, Agosto 2014

INDICE

SIMBOLOS	I
AGRADECIMIENTO	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	IV
CAPITULO I: INTRODUCCION	1
1. INTRODUCCION	1
2. IDENTIFICACION DEL PROBLEMA	2
3. FORMULACION DEL PROBLEMA	3
4. JUSTIFICACION	3
5. HIPOTESIS.....	4
6. ALCANCE.....	4
7. ANTECEDENTES.....	5
8. OBJETIVOS	7
8.1. Objetivo General.....	7
8.2. Objetivos Específicos.....	7
9. VARIABLES	8
9.1. Variables Independientes:.....	8
9.2. Variables Dependientes:	8
CAPITULO II: MARCO TEORICO:.....	9
1. PERCEPCION DE COLOR	9
1.1. Espacio Colorimétrico: CIE L* a* b*	9
2. MATERIA PRIMA: <i>Dactylopius coccus Costa</i> “ COCHINILLA”	11

2.1. Clasificación Taxonómica de la cochinilla.....	11
2.2. Biología a de la cochinilla.....	13
2.3. Producción de la Cochinilla.....	15
2.4. Historia de la Cochinilla.....	16
2.5. Importancia de los derivados de la Cochinilla.....	17
2.6. Producción y demanda mundial.....	18
3. DERIVADOS COMERCIALES DE LA COCHINILLA: COLORANTES NATURALES.....	19
3.1. Quinonas.....	19
3.2. Glicosidos Antraquinonicos.....	20
3.3. Acido Carmínico.....	21
3.4. Carmín o Carmín laca.....	22
3.5. Propiedades físicas y químicas.....	24
3.6. Aplicaciones.....	26
3.7. Estándares de calidad.....	28
3.8. Datos de seguridad.....	29
4. METODO DE PROCESO PARA LA OBTENCION DE CARMIN.....	31
4.1. UPSTREAM: Lineamiento.....	31
4.2. DOWNSTREAM: Lineamiento.....	32
5. DISEÑO ESTADISTICO.....	39
5.1. Metodología de Superficie de Respuesta (RSM).....	41
5.2. Diseños para ajustar modelos de primer orden.....	42
5.3. Diseños para ajustar modelos de segundo orden.....	43
CAPITULO III: MARCO EXPERIMENTAL.....	44

1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACION.....	44
2. MATERIALES	44
3. METODOS:	46
3.1. Metodología Estadística.....	46
3.2. Análisis estadístico.....	47
3.3. Metodología y diseño Experimental	49
3.4. Metodología de Análisis Físico químico	56
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	58
1. ANALISIS EXPERIMENTAL:.....	58
2. ANALISIS ESTADISTICO:.....	60
2.1. Análisis de Respuesta en L^*	62
2.2. Análisis de Respuesta en a^*	63
2.3. Análisis de respuesta en b^*	76
2.4. Optimización dual de a^* y b^*	86
3. ANALISIS DE COSTOS:.....	88
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	92
1. CONCLUSIONES	92
2. RECOMENDACIONES.....	93
REFERENCIAS.....	95
ANEXOS	101
ANEXO 1: Registro de los resultados colorimétricos.....	101
ANEXO 2: Metodologías de Análisis Físico Químico adicionales	122
ANEXO 3: Formulas estructurales propuestas para Carmín de Cochinilla.	123
ANEXO 4: Metodología Experimental: Imágenes	126

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Disposición cilíndrica del color según Munsell.	10
Figura 2.2: Representación del color de un sólido.....	11
Figura 2.3: Obtención de la materia prima.....	12
Figura 2.4: Etapas del ciclo de vida de la Cochinilla <i>Dactylopius coccus</i> Costa.	15
Figura 2.5: Derivados comerciales de la cochinilla.	18
Figura 2.6: Estructuras de quinonas.....	20
Figura 2.7: Molécula de Acido Carmínico.....	22
Figura 2.8: Molécula de carmín.....	23
Figura 2.9: Espectro visible de ácido carmínico.....	26
Figura 2.10: Soluciones de Acido carmínico a diferentes pH (7-5-4-3).....	27
Figura 2.11: Diagrama de Flujo del UPSTREAM.....	31
Figura 2.12: Diagrama de Flujo del DOWNSTREAM.....	33
Figura 2.13: Diagrama de operaciones.....	34
Figura 2.14: Estrategia Experimental. Métodos tradicionales.....	40
Figura 3.1: Diagrama de Flujo y puntos de control para el proceso actualmente utilizado.	50
Figura 3.2: Diagrama de Flujo y puntos de control para el proceso de laqueado a elaborar experimentalmente.....	51
Figura 3.3: SIPOC actual del proceso de laqueado.....	52
Figura 3.4: SIPOC del proceso de laqueado aplicando el diseño experimental.....	53
Figura 4.1: Espectro visible de solución de carmín.....	58
Figura 4.2: Carmines obtenidos bajo diferentes condiciones de laqueo.....	60
Figura 4.3: Gráfica de efectos para “L*”.....	62
Figura 4.4: Superficies de respuesta del parámetro “L*”.....	63
Figura 4.5: Diagrama de Pareto para los efectos de los factores sobre el parámetro de color “a*”.....	66
Figura 4.6: Gráfica de efectos para el parámetro “a*”.....	67

Figura 4.7: Superficies de respuesta y gráficas de contornos de “a*”	68
Figura 4.8: Diagrama de pareto para el modelo refinado de segundo orden de a*	72
Figura 4.9: Gráfica de efectos para el modelo refinado de segundo orden de la respuesta “a*”	73
Figura 4.10: Superficie de respuesta del modelo de segundo orden refinado de a*	74
Figura 4.11: Gráfica de contornos del modelo de segundo orden refinado de a*	75
Figura 4.12: Gráfica de efectos para el modelo refinado de primer orden de la respuesta “b*”	79
Figura 4.13: Superficie de respuesta del modelo de primer orden refinado de b*	80
Figura 4.14: Gráfica de efectos para el modelo refinado de segundo orden de “b*”. a) Efectos principales, b) Interacciones	83
Figura 4.15: Superficies de respuesta del modelo refinado de segundo orden de “b*”	84
Figura 4.16: Gráfica de contornos del modelo de segundo orden refinado de b*	85
Figura 4.17: Gráfica de contornos superpuestos de “a*” y “b*”	87
Figura 4.18: Flujo de Reproceso. Clasificación de carmín según calidad y gastos de reproceso	90

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Especies Pertenecientes al género <i>Dactylopius</i>	13
Tabla 2.2: Tabla de resumen y comparación de propiedades de colorante Acido Carmínico y Carmín.	24
Tabla 2.3: Especificaciones técnicas dadas por el FDA y la UE para la comercialización de carmín y sus derivados:	29
Tabla 3.1: Dominio Experimental: Niveles, variables codificadas y reales para el diseño factorial 2^3	46
Tabla 3.2: Matriz de Experimentos del diseño factorial 2^3 y Plan de Experimentación..	47
Tabla 3.3: Matriz para el diseño central compuesto (DCC) Factorial 2^3 : Adición de puntos centrales y puntos axiales.	48
Tabla 4.1: Plan de experimentación y Respuestas medidas	59
Tabla 4.2: Medidas de dispersión para % de Ácido carmínico de Carmín	60
Tabla 4.3: Matriz del diseño factorial 2^3 para la producción de carmín de cochinilla.....	61
Tabla 4.4: Análisis de varianza para la respuesta “a*”	64
Tabla 4.5: Análisis de varianza para el modelo refinado de primer orden de la respuesta “a*”	65
Tabla 4.6: Matriz del diseño central compuesto para la producción de carmín de cochinilla	69
Tabla 4.7: Análisis de varianza para el modelo de segundo orden de la respuesta “a*” .	70
Tabla 4.8: Análisis de varianza para el modelo de segundo orden refinado de la respuesta “a*”	71
Tabla 4.9: Optimización de respuesta para a*	76
Tabla 4.10: Análisis de varianza para la respuesta “b*”	77
Tabla 4.11: Análisis de varianza para el modelo refinado de primer orden de la respuesta b*	78
Tabla 4.12: Análisis de varianza para el modelo de segundo orden de la respuesta “b*”	81

Tabla 4.13: Análisis de varianza para el modelo refinado de segundo orden de la respuesta “b*”	82
Tabla 4.14: Optimización de respuesta para “b*”	86
Tabla 4.15: Optimización de respuesta para “a* y b*”	87
Tabla 4.16: Calculo de Rendimiento y Costo Unitario. Capacidad de Planta: 30 TN/mes de materia prima a procesar. Datos actualizados a Agosto 2014.....	88
Tabla 4.17: Resumen de Costos de producción. Capacidad: 30 TN. Datos Actualizados a Agosto 2014.	89
Tabla 4.18: Cálculo de Costo de Reproceso. Según capacidad de maquinaria (500 Kg) y por 1 Kg.	91



SIMBOLOS

AC	Ácido Carmínico
ADI	Acceptable daily intake
DCC	Diseño Central Compuesto
EEC	European Economic Comunity
FDA	Food and Drug Administration
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta



AGRADECIMIENTO

A Dios, por guiarme a lo largo de mi vida y alumbrar mi camino, dándome fortaleza de seguir adelante en aquellos momentos de debilidad.

A mis padres Rodolfo y Ana Rosa, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mi hermano André, por cuidarme y apoyarme siempre, por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo he necesitado.

A toda mi familia; a mi abuela, tíos y primos, y porque tengo la suerte de tener una familia que va más allá de la sangre.

A Gustavo, por todo su apoyo y motivación, por incentivar me siempre a alcanzar todas mis metas.

A mi asesor, Ing. Fredy Molina por su valioso tiempo y amistad, por orientarme y siempre estar dispuesto a darme su apoyo. Muchas gracias por todos los consejos y conocimientos transmitidos.

A la Ing. Cynthia Córdova, a quien le deseo sobre todo buena salud.

A los miembros del Jurado; Dr. Jaime Cárdenas, Ing Cifrido Zaravia e Ing Jaime Barreda por su amabilidad y valiosas contribuciones.

Al Ing. Abel Cuadros por haberme brindado la oportunidad de desarrollar el presente proyecto; ofreciéndome todo el apoyo y facilidades otorgadas en la empresa.

A todos mis amigos, por ser parte significativa de mi vida, gracias por su apoyo y comprensión.

A todos aquellos que de una manera u otra fueron parte de este proceso.

¡Muchas gracias!

RESUMEN

El carmín es un colorante natural formado a partir de la unión de una molécula de ácido carmínico con un metal (Al^{+3} y/o Ca^{+2}), proceso que es conocido en la práctica como “Laqueado”. En la presente investigación se buscó optimizar los parámetros: pH, temperatura y tiempo de reacción del proceso de laqueado, que permitieran mejorar la calidad colorimétrica en la producción del colorante Carmín.

La importancia de la presente investigación se basa en que el valor comercial del colorante carmín se asocia con la calidad de color, el cual es medido mediante las respuestas cromáticas: L^* (luminosidad), a^* (posición entre verde y rojo) y b^* (posición entre azul y amarillo).

La optimización del proceso de laqueado se realizó mediante la metodología de superficie de respuesta, para ello se elaboró un diseño factorial completo 2^3 , con el cual se estableció un total de 18 experimentos necesarios para determinar los parámetros óptimos de pH, temperatura y tiempo de reacción. Para los procesos de laqueado experimentales, se utilizó extracto de cochinilla obtenido a partir de la producción industrial del carmín, cuya concentración fue 0.73% de ácido carmínico.

Los resultados obtenidos permitieron identificar que la respuesta L^* tiende a mayores valores a menor tiempo y menor pH; en el caso de a^* se obtienen valores máximos a mayor tiempo y mayor temperatura; finalmente b^* alcanza los valores más altos a menores tiempos y mayor temperatura; sin embargo la optimización dual realizada respecto a las respuestas a^* y b^* determinó las mejores condiciones de trabajo a un tiempo de 61.7 min, temperatura $94^{\circ}C$ y pH 5.0.

Palabras Clave: Acido Carmínico, Carmín, Laqueado, Color, diseño factorial, metodología de superficie de respuesta.

ABSTRACT

Carmines are natural colorants formed from the binding of one molecule of carminic acid with a metal (Al^{+3} and/or Ca^{+2}), a process which is known in practice as "Lacquering". The present study aims to optimize the parameters: pH, temperature and reaction time of the lacquering process that would improve the colorimetric quality of the Carmine production.

The importance of this study is based on that the commercial value of carmine colorant is associated with its color quality, which is measured by the color responses: L^* (lightness), a^* (position between green and red) and b^* (position between blue and yellow).

The optimization of the lacquering process was performed using the Response Surface Methodology, for this a complete factorial design 2^3 was developed, in which it was established that a total of 18 experiments were required to determine the optimum process parameters. For the experimental lacquering processes, it was used cochineal extract obtained from the industrial production of Carmine, which concentration was 0.73% of carminic acid content.

The results obtained allowed to identify that the L^* response tends to higher values at lower time and lower pH; in the case of a^* , maximum values were achieved at higher time and higher temperature; finally b^* reaches the highest values at lower times and higher temperatures; however, the dual optimization for the responses a^* and b^* determined the best working conditions at a time of 61.7 min, temperature 94 ° C and pH 5.0.

Keywords: Carminic Acid, Carmine, Lacquering, Color, factorial design, response surface methodology.

CAPITULO I: INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

El color es un atributo muy importante que desempeña un papel fundamental a nivel mundial en la presentación de los productos; según Henry (1996) el color es la primera sensación que se percibe de un alimento y predetermina nuestras expectativas tanto de sabor como de calidad.

Por este motivo, las empresas alimenticias dan gran importancia a la conservación del perfil de sus productos; y recurren a la adición de colorantes con el objetivo de preservar un aspecto uniforme en los alimentos, asegurando así la aceptación del consumidor final; así mismo son también utilizados por la industria farmacéutica y cosmética. De esta manera, los colorantes, son aditivos que se añaden a los alimentos o productos por varias razones, las cuales se resumen en: 1) Restaurar el color perdido durante el procesamiento, 2) Realzar el color ya presente, 3) Asegurar uniformidad, minimizando variaciones de lote a lote, 4) Dar color a aquellos alimentos o productos que no lo tienen. (Henry, 1996; Madhava Naidu et al; 2012) Además pueden servir para dar propiedades de este al alimento o producto.

Actualmente, existe un interés creciente de los consumidores por productos naturales. Los colorantes sintéticos se perciben cada vez más como indeseables o dañinos, incluso la Unión Europea y los Estados Unidos dan cada vez mayores restricciones al uso de colorantes sintéticos como aditivos alimenticios; estas restricciones han generado un aumento en el consumo de colorantes naturales en la industria alimentaria (Noonan; 1972, Downham et al; 2000, y Madhava Naidu et al; 2012). Sin embargo, los proveedores de colorantes naturales se enfrentan a una constante necesidad y motivación por mejorar las propiedades técnicas y físicas de sus productos.

El colorante natural más popular utilizado para otorgar colores en el rango de rojo a violeta es el carmín; quelato formado de la unión de la molécula de ácido carmínico con aluminio o calcio en un proceso denominado “Laqueado”. El ácido carmínico es un pigmento natural no tóxico extraído a partir de *Dactylopius coccus Costa* (Cochinilla), siendo el cuerpo de la hembra a partir del cual se obtiene. Las principales aplicaciones del rojo natural del carmín son en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética; ya que convenientemente procesado proporciona una variada gama de colores: violeta, naranja, rojo y negro.

No obstante, la recuperación y purificación del ácido carmínico a partir de cochinilla es considerada un proceso complicado y dificultoso, debido a que actualmente la tecnología industrial sufre de bajos e irreproducibles rendimientos, lo que genera distintas características en el producto final, y se percibe como productos de baja calidad.

Por otro lado, el valor comercial del colorante carmín se asocia con la calidad de color; sin embargo la percepción del color es un concepto completamente individual y de interpretación subjetiva, debido a que puede verse afectado por una variedad de factores; siendo importante mantener las condiciones constantes a la hora de evaluar un color (Hendry; 1996). Por este motivo y con el objetivo de poder medir el color, se establecieron escalas colorimétricas que permiten obtener una respuesta numérica en base a estándares internacionales; de esta manera en la presente investigación, la calidad de color es medido mediante el modelo cromático CIEL*a*b*, cuyas respuestas cromáticas son: L*(luminosidad), a*(posición entre verde y rojo) y b* (posición entre azul y amarillo).

2. IDENTIFICACION DEL PROBLEMA

Durante el proceso de producción de Carmín de cochinilla, se observan fluctuaciones en los resultados colorimétricos del producto final, creando eventualmente la necesidad de invertir tiempo y dinero en procesos de regulación y homogenización de los lotes obtenidos durante la producción, con el objetivo de cumplir con los parámetros de calidad

establecidos y evitar diferencias significativas entre lotes, ya que estas variaciones podrían incurrir en una variación de color en los productos finales de las industrias consumidoras.

3. FORMULACION DEL PROBLEMA

Actualmente el proceso de producción del colorante Carmín a partir de Cochinilla, es considerado un proceso complejo debido a que la tecnología de producción no logra controlar el bajo rendimiento e irreproducibilidad del proceso; adicionalmente la materia prima utilizada no siempre presenta las mismas características, generando variaciones cuantitativas durante la producción, lo que para las empresas consumidoras se traduce en productos de baja calidad.

Estas variaciones naturales y la falta de mayores controles de calidad durante el proceso productivo del carmín de cochinilla, originan demoras en la producción; pérdida de tiempo y dinero requeridos para regular y homogenizar las características finales del colorante; y en diferentes valorizaciones comerciales según la calidad de color obtenida.

4. JUSTIFICACION

El uso de colorantes naturales ha desempeñado un papel fundamental a nivel mundial y se ha incrementado en los últimos años, interviniendo de forma directa en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética.

En el ámbito alimenticio, se ha observado un creciente interés de los consumidores por la seguridad y calidad de los alimentos que ingieren, revelando una clara tendencia de la industria alimentaria hacia los colorantes naturales. Actualmente el colorante natural más popular utilizado para otorgar colores en el rango de rojo a violeta es el carmín obtenido a partir de un insecto *Dactylopius coccus Costa*, conocido como Cochinilla.

El Perú y específicamente, la ciudad de Arequipa es el primer productor y exportador mundial de cochinilla y sus productos derivados, tiene alrededor de 2,000 productores ubicados principalmente en el distrito de La Joya, en donde se cultivan 3,000 hectáreas de tunales para la crianza de la cochinilla; por lo cual se observa la importancia socio económica que involucra la explotación de este recurso natural denominado “Cochinilla”, como materia prima para la elaboración de colorantes naturales como el carmín y ácido carmínico.

Estos colorantes son exportados a los principales mercados del mundo como: Europa, Estados Unidos, Asia, Brasil y México entre otros; debido a esto, observamos la importancia de optimizar el proceso de producción de los derivados de la cochinilla, implementando parámetros de control que nos permitan reducir las variaciones cuantitativas y cualitativas, manteniendo un factor de reproducibilidad en la producción y cumplir con los parámetros de calidad establecidos.

5. HIPOTESIS

Dado que las etapas de producción de Carmín pueden ser optimizadas, es posible reducir las variaciones cualitativas y cuantitativas de producción, mejorando así la reproducibilidad del proceso.

6. ALCANCE

El control de las etapas del proceso y de los resultados obtenidos durante cada producción, nos permitirán optimizar el proceso y reducir las variaciones cualitativas en el producto final, logrando así diseñar un proceso de alta reproducibilidad y mejor calidad estándar. La optimización ayudará además a reducir los tiempos y costos que se emplean actualmente en la producción, para homogenizar los diferentes lotes de producción y cumplir los parámetros cualitativos esperados por cada cliente.

Además de la recopilación de datos propios y de la literatura para realizar un análisis de criterios para el aumento de la viabilidad económica de la producción de carmín.

7. ANTECEDENTES

Méndez, J; González, M; Lobo, G; Carnero, A. (2004). “*Color quality of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa). Geographical origin characterization using multivariate statistical analysis*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 (5). P 1331-1337. Mar.

El valor comercial de una muestra de cochinilla (*Dactylopius coccus Costa*) se asocia con la calidad de color, cuanto mayor sea este contenido, más valiosa es la muestra para el mercado. En un esfuerzo por encontrar una manera de medir la calidad de color de una cochinilla, el presente estudio evalúa diferentes parámetros de medición de color, tales como atributos cromáticos (L^* y a^*), porcentaje de ácido carmínico, determinación tintórea, y el perfil cromatográfico de pigmentos. La combinación de la información de la determinación espectrofotométrica de ácido carmínico con el del perfil pigmento adquirida por cromatografía líquida (LC) y la composición de los grupos de pigmentos rojos y amarillos , también adquiridos por LC , permite una mayor precisión en juzgar la calidad de la muestra final. Como resultado de este estudio, fue posible conseguir la separación de las muestras de cochinilla según el origen geográfico utilizando dos técnicas estadísticas: análisis de conglomerados y análisis de componentes principales.

González, M; Méndez, J; Carnero, A; Lobo, G; Afonso, A. (2002). “*Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Cost) using response surface methodology*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50 (24). P 6968-6974 Nov

Uso de un método simple desarrollado para la extracción y la determinación de pigmentos de color en cochinillas (*Dactylopius coccus Costa*). El diseño factorial de dos niveles permitió optimizar los parámetros de extracción con disolventes: temperatura, tiempo, concentración de metanol en la mezcla de agente de extracción, y el número de extracciones. Los resultados sugieren que el número de extracciones es estadísticamente el factor más significativo. La separación y determinación de los pigmentos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución con detección UV-visible.

Anuar, N; Mohd Adnan A, F; Saat, N; Aziz, N; Mat Taha, R. (2013). “*Optimization of extraction parameters by using response surface methodology, purification, and identification of anthocyanin pigments in Melastoma malabathricum Fruit*”. The Scientific World Journal, vol. 2013, Article ID 810547, 10 pages, 2013. doi:10.1155/2013/810547

Las antocianinas tienen diversos beneficios en la industria alimentaria, como colorantes naturales en cosméticos, productos de recubrimiento y como potenciales foto sensibilizadores naturales en la célula solar. Por lo tanto, el propósito principal de este estudio fue obtener información sobre el rendimiento máximo de antocianina que puede ser recuperado a partir de la fruta *Melastoma malabathricum*. Se han identificado que factores tales como la temperatura de extracción, el tiempo de extracción, y la relación sólido líquido, afectan significativamente en la eficiencia de extracción de antocianinas. Mediante el uso de diseño de Box-Behnken de tres niveles de tres factores se determinaron las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas.

Sandoval F. “*Characterisation de la production et optimisation du Processus d’extraction des colorants de la plante de Añil (Indigofera Suffruticosamill)*” (2005). Trabajo para la obtención de título de Doctor en Institut National Polytechnique De Toulouse

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar la producción de colorantes en plantas de añil (*Indigofera suffruticosa* Mill) durante el ciclo de cultivo y conocer las condiciones más apropiadas para su extracción. Para este fin, se establecieron cultivos en campo de esta planta, se evaluaron cada una de las etapas de desarrollo de la planta y se determinó en que etapa se presenta producción de Colorante Azul en Polvo (CAP) y cual es la etapa más apropiada para realizar la cosecha de los cultivo. Así mismo se determinaron los colorantes presentes y las mejores condiciones para la extracción de colorantes de añil. En otra etapa se realizó la extracción con ultrasonido para lograr la reducción del tiempo de extracción. En todos los casos se encontró el efecto del tiempo de extracción y del pH sobre la extracción de CAP, índigo e indirrubina.

Las investigaciones mencionadas demuestran que es posible optimizar la producción de colorantes naturales y conocer las condiciones más adecuadas de proceso, utilizando técnicas de diseño estadístico.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo General

Optimizar los parámetros de pH, temperatura y tiempo de reacción en el proceso de laqueado para la producción de colorante natural carmín, a partir de *Dactylopius coccus* Costa (Cochinilla).

8.2. Objetivos Específicos

- Elaborar un diseño experimental para determinar los parámetros óptimos de pH, temperatura y tiempo de reacción del proceso de laqueado.

- Evaluar la influencia de los parámetros pH, temperatura y tiempo de reacción, en el parámetro de color: L^*
- Evaluar la influencia de los parámetros pH, temperatura y tiempo de reacción, en el parámetro de color: a^*
- Evaluar la influencia de los parámetros pH, temperatura y tiempo de reacción, en el parámetro de color: b^*
- Evaluar la influencia de los parámetros pH, temperatura y tiempo de reacción, en los parámetros de color: a^* y b^* simultáneamente.
- Realizar un análisis de costos para la producción de carmín.

9. VARIABLES

9.1. Variables Independientes:

- pH
- Temperatura de proceso ($^{\circ}\text{C}$)
- Tiempo de reacción (min)

9.2. Variables Dependientes:

- Parámetro de color (L^*)
- Parámetro de color (a^*)
- Parámetro de color (b^*)
- Costos

CAPITULO II: MARCO TEORICO:

1. PERCEPCION DE COLOR

Existen diversas definiciones disponibles para “Color”, la más útil en este contexto es: Parte del espectro electromagnético visible para el ojo humano y que se extiende entre los 380 y 730 nm (Hendry; 1996).

La percepción del color es un concepto completamente individual y de interpretación subjetiva, incluso si se habla del mismo objeto, el ojo humano puede dar diferentes referencias y respuestas sobre qué color es, adicionalmente existen una variedad de factores que afectan la percepción del color como la luz, sensibilidad óptica, tamaño, fondos, ángulo óptico; siendo importante mantener las condiciones constantes a la hora de evaluar un color (Hendry; 1996).

A pesar de que el ojo humano no sea capaz de cuantificar los colores de manera específica, esto es una tarea fácil utilizando un colorímetro, y escalas que nos permitan obtener una expresión numérica en base a los estándares internacionales, facilitando la comunicación y entendimiento para saber a qué color se hace referencia; adicionalmente los colorímetros mantienen las condiciones de medición constantes, al utilizar siempre la misma fuente de luz y método de iluminación, lo que resulta en una medida precisa y específica de manera simple.

1.1. Espacio Colorimétrico: CIE L* a* b*

CIE L*a*b* (CIELAB) es un modelo cromático que describe todos los colores que puede percibir el ojo humano y es hoy en día uno de los métodos más conocidos para medir el color de un objeto a través de un colorímetro. Fue desarrollado específicamente con este propósito por la Commission Internationale d'Eclairage (Comisión Internacional de Iluminación) en 1976, razón por la cual se abrevia CIE.

Los tres parámetros en el modelo son: L^* que representa la luminosidad de color (L^* , $L^*=0$ rendimientos negro y $L^*=100$ indica blanca); a^* que representa su posición entre magenta y verde (valores negativos indican verde mientras valores positivos indican magenta); y b^* que representa su posición entre amarillo y azul (valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo). Esta escala esta correlacionada con el sistema de color Munsell, el cual define el color en base a tres dimensiones: “Hue” (matiz), “Luminosidad” (brillo) y “Saturación” (intensidad o pureza). El elemento clave en el contexto de colorantes alimenticios es el Hue “percibido”. (Hendry, 1996).

El modelo de color $L^*a^*b^*$ ha sido creado para servir como modelo de referencia y sólo puede ser representado adecuadamente en un espacio tridimensional; por eso es crucial para darse cuenta que las representaciones visuales nunca son exactas. (Schanda, 2007).

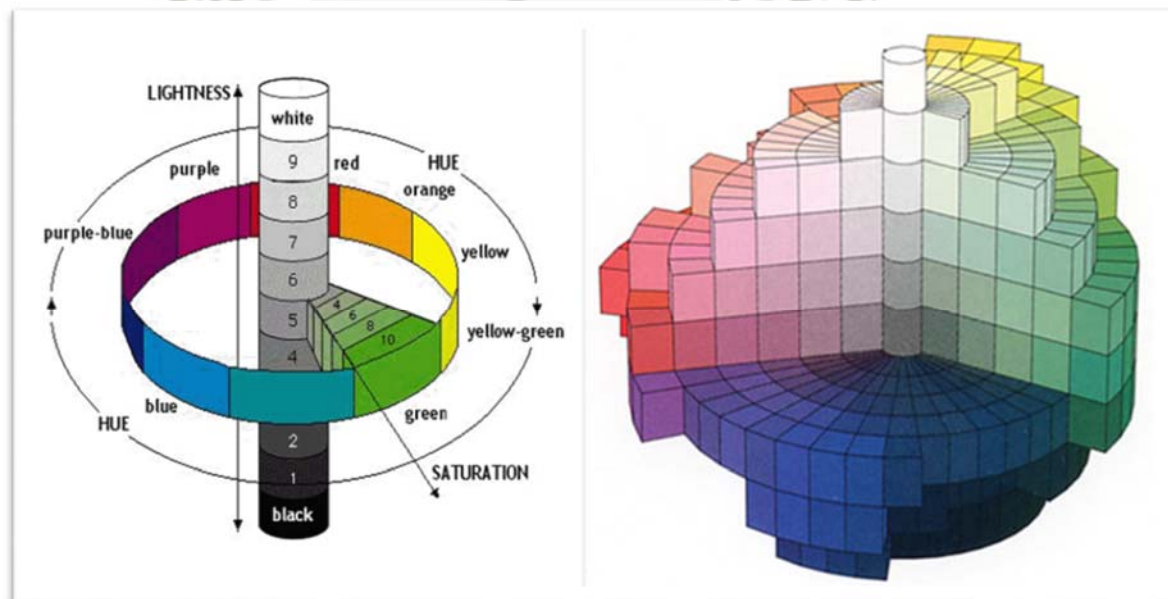


Figura 2.1: Disposición cilíndrica del color según Munsell. La línea horizontal representa la saturación, la línea vertical representa la luminosidad y la línea circular representa el Hue. Extraído de: Mc Bratney and Singh, 2006

Para hacer más fácil de entender las diferencias de color, en el L*a*b color space, estas pueden ser expresadas numéricamente mediante el valor ΔE^*ab ; valor que indica el tamaño de la diferencia del color, pero no en qué manera los colores son diferentes, este valor se rige por la siguiente ecuación:

$$\Delta E^*ab = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ec. 1. 1}$$

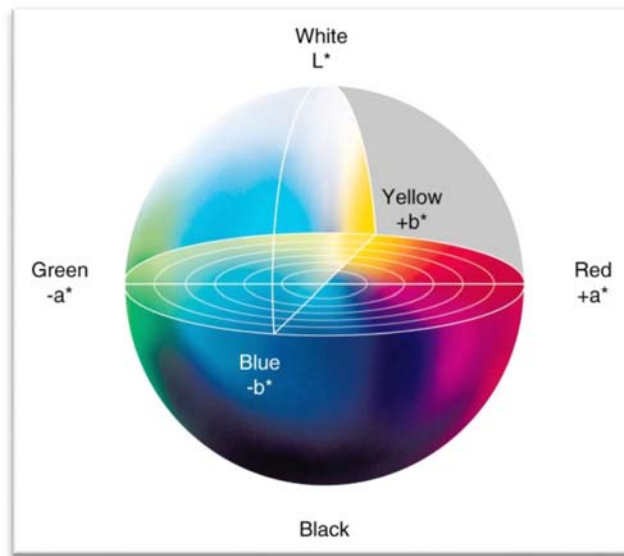


Figura 2.2: Representación del color de un sólido mediante el método de L* a* b* color space. Extraído de: CIELAB 1976

De esta manera, incluso cuando un color se ve igual para el ojo humano, mediante una medición colorimétrica se pueden resaltar las diferencias, lo que en el presente trabajo nos permite controlar y diferenciar las características colorimétricas del producto final.

2. MATERIA PRIMA: *Dactylopius coccus* Costa “COCHINILLA”

2.1. Clasificación Taxonómica de la cochinilla

- Phylum: Artopoda
- Clase: Insecta

- Orden: Hemiptera
- Super Familia: Coccoidea
- Familia: Dactylopidae
- Género: Dactilopius
- Especie: *Dactilopius coccus* (Costa)
- Nombre común: Cochinilla de Carmín.



Figura 2.3: Obtención de la materia prima: a) Paletas de Cactus Opuntia infestados con cochinilla b) Colonia de Cochinillas en Paleta; c) Cochinilla Seca y limpia (Hembras).

La cochinilla “*Dactylopius coccus Costa*” es un insecto que pertenece a la súper familia coccoidea, son insectos Hemipteros, lo que constituye un grupo homogéneo y especializado de pequeños insectos fitófagos, lo que quiere decir que están caracterizados por un alto grado de adaptación a la vida parasita.

El género *Dactylopius*, perteneciente a la familia Dactylopiidae, comprende nueve especies (Tabla 2.1); entre las cuales se encuentra la cochinilla comercial productora de carmín (*D. coccus Costa*), siendo la única especie cultivada para la obtención de pigmentos, por lo que se denomina grana fina o cultivada; el resto de especies constituyen

un grupo denominado grana silvestre o corriente. (Portillo, 1992). Según MacGregor (1975) el centro de dispersión de éste género podría ubicarse en la región mesoamericana.

Tabla 2.1: Especies Pertencientes al género *Dactylopius*.

1	<i>D. austrinus</i> de lotto
2	<i>D. ceylonicus</i> green.
3	<i>D. coccus</i> Costa.
4	<i>D. confertus</i>
5	<i>D. confusus</i> Crockerell
6	<i>D. opuntiae</i> Crockerell
7	<i>D. salmianus</i>
8	<i>D. tomentosus</i> Lamark.
9	<i>D. zimmermannii</i> zimmermann

Extraído de: MacGregor (1975)

D. coccus Costa se desarrolla naturalmente como parasito en algunas especies de plantas de la familia cactaceae conocidas como nopales, siendo encontradas exclusivamente con propósitos comerciales en la penca de las “tunas” *Opuntia Ficus indica* y *Nopalea coccinelliferma*. Aunque *D. coccus Costa* crece en otras especies, el cultivo de la cochinilla se realiza principalmente sobre *Opuntia Ficus Indica (L.) Mill*, pues es sobre esta especie que se logran los mejores rendimientos de pigmentos, especialmente de ácido carmínico (Portillo y Arreola, 1994.); estos cactus son encontrados en zonas semi-áridas de Perú, Bolivia, Chile, las islas canarias y México.

2.2. Biología a de la cochinilla

El ciclo biológico de *D. coccus Costa* tiene una duración entre 90 a 150 días, dependiendo de las condiciones de desarrollo; este ciclo comprende el estado de huevo, dos estados ninfales y el estado adulto. Según Marín y Cisneros (1977), macho y hembra son similares en los estados de huevo, ninfa I y ninfa II; y a partir de este estadio se presentan las

diferencias; de manera que en el estado adulto muestran dimorfismo sexual. Luego de eclosionado el huevo, las ninfas I se movilizan hasta ubicarse en un lugar de la planta donde puedan alimentarse; las cochinillas se nutren de la savia a través de un estilete bucal, cuando son separadas de su huésped original, no vuelven a adherirse jamás. Ya ubicadas, estas permanecen sésiles un tiempo; en este momento, aparece una cubierta cerosa de filamentos blanquecinos, hasta la muda que dará lugar a la etapa de ninfa II; luego la hembra muda por segunda vez hasta emerger como hembra adulta; al madurar los huevos empieza su postura, denominándose a este estado hembra oviplena (OV); en cambio, el macho construye un capullo en el cual pasa de pupa hasta adulto alado (Marín y Cisneros, 1977).

Dado que la cochinilla naturalmente se desarrolla en regiones áridas y semiáridas; dentro de los factores que más favorecen el desarrollo de ésta se pueden encontrar: la temperatura, que debe oscilar entre 20°C y 32°C; la iluminación debe estar entre 40 y 60% (Méndez et al., 1990). La humedad relativa entre 40 y 75%, con precipitaciones de 100 a 700 mm. anuales (Escobedo y Pérez, 1998). Su reproducción se realiza en la misma tuna donde crecen en la parte externa del cladodio formando colonias, pueden llegar a poner de 400 a 600 huevos.

Las hembras, organismos sésiles, son la fuente de ácido carmínico; miden 3-6mm de longitud, tienen forma de grano más o menos oval, arrugada, convexa y con algunas estrías, el color varía entre gris y negro, el peso de una hembra completamente desarrollada es alrededor de 45 mg, del cual pierde aproximadamente el 70% durante el secado; al poner huevos excretan una cera blanca algodonosa que cubre a estos y los hace fácilmente identificables, se piensa que esta cera tiene una función de placa protectora contra el sol, las lluvias u otros factores externos, así mismo, el mecanismo biosintético del ácido carmínico aun tiene varios aspectos sin conocer, pero se presume que el compuesto puede tener una función de defensa en contra de predadores naturales.

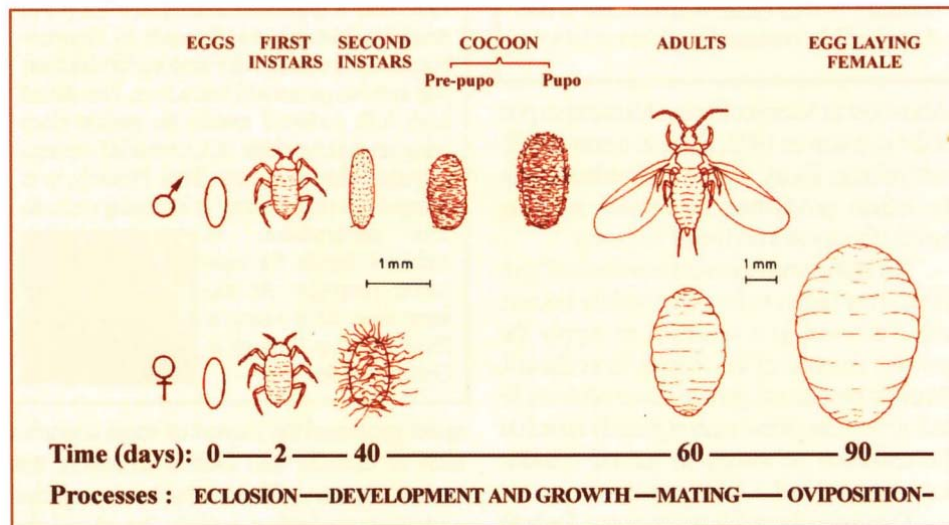


Figura 2.4: Etapas del ciclo de vida de la Cochinilla *Dactylopius coccus* Costa. Extraído de: Rodríguez y Niemeyer (2001)

La concentración del pigmento encontrado en los insectos es mayor cuando las hembras son sexualmente maduras, lo cual se da entre los 90-120 días de vida, justo antes de que la deposición de huevos inicie, momento en que deben contener aproximadamente 22% de su peso seco como pigmento, incluso durante ensayos de disección y análisis microscópicos de especímenes frescos (Francis, 1996; Schul, 2000). La cochinilla, además de ácido carmínico contiene ácido quermesico, ácido flavoquermesico y pigmentos no identificados.

2.3. Producción de la Cochinilla

Sáenz (2006) señala que la cosecha, se puede efectuar tres o cuatro veces al año, y se realiza manual y cuidadosamente, lo que significa un proceso de cepillado de las paletas, arrancando los cuerpos de las hembras de la tuna; el proceso primario incluye matar a los organismos y secar los cuerpos mediante métodos naturales (secado solar durante 4-5 horas por 6 días o a la sombra por 20-30 días) o artificiales (sistemas de aire caliente, 50-70 °C, 60% humedad relativa, durante 3-4 horas), hasta un contenido de humedad de 7 a 10%; este segundo método, permite un secado más uniforme, disminuye la contaminación,

e incrementa la calidad de la materia prima. Después del secado, la cochinilla se limpia, a modo de eliminar las impurezas como espinas, arena u otros elementos silíceos; esta operación se puede realizar en forma semi manual utilizando corriente de aire y cribas. A continuación se clasifica en rangos de calidad, para lo cual se utilizan tamices con distintas aberturas de malla; se considera una cochinilla de primera calidad, la que es retenida en mallas con orificios de 2 mm. La calidad de la cochinilla está referida principalmente a los contenidos de ácido carmínico, humedad y metales pesados. Respecto al contenido de ácido carmínico se considera bueno un valor superior a 22%; siempre se buscan cochinillas con un mayor contenido de ácido carmínico. (Flores; 1996 y Saenz; 2006). Aproximadamente 140000 insectos pesan 1 Kg y una plantación de 3 Ha (100 m²) rinden alrededor de 300 Kg.

2.4. Historia de la Cochinilla

Según MacGregor (1976) y Edmonds (1999) el insecto de la cochinilla es nativo de México, Centro América y Perú, habiéndose encontrado evidencias de su uso desde el siglo X; en las que se ha demostrado que sus vestimentas y túnicas eran teñidas con cochinilla desde los tiempos pre-colombinos.

Schul (2000), sostiene que los españoles hallaron a los Aztecas utilizando como pintura el extracto de un insecto que conocían como "Nocheztli" que significa "Sangre de la tuna"; inmediatamente los españoles reconocieron su valor comercial; y se vieron tan impresionados por el color rojo vivo de la cochinilla, que después de el oro y la plata se convirtió en el producto más importado de Centro América, pero el intento de su producción en Europa fue fallido. Debido a su valor comercial durante el siglo XIX, se introdujeron plantaciones en muchos lugares del mundo como en las islas canarias, Australia, Sudáfrica, Bostwama, Nepal, India y SriLanka; a pesar de esto, el mayor beneficio económico fuera de América, solo se observó en Las Islas canarias. Las exportaciones de estos insectos secos aumentaron de pocos kilogramos en 1831 a 3000

toneladas en 1875; hoy en día aun se pueden encontrar pequeñas cantidades de cochinilla de alta calidad en las islas canarias.

Debido a la aparición de colorantes sintéticos alrededor de 1950, el consumo y comercialización de la cochinilla se vio grandemente reducida; es en los recientes años que debido a un interés del consumidor final por productos naturales, por el conocimiento de efectos tóxicos y cancerígenos que se les otorga a los colorantes sintéticos, es que ha resurgido el interés por emplear colorantes naturales. (Edmonds, 1999)

2.5. Importancia de los derivados de la Cochinilla

Los derivados de la cochinilla han tomado gran importancia en los últimos años debido a un incremento en el consumo de colorantes orgánicos. Estudios realizados por Kornbrust y Bafknocht, (1985) demostraron que los colorantes artificiales, que se utilizaban para colorear alimentos, medicinas y cosméticos, poseen agentes cancerígenos que son perjudiciales para la salud humana siendo prohibido su uso en las tres industrias antes mencionadas. Adicionalmente, tienen gran importancia como aditivos alimenticios, debido a la estabilidad, claridad y al hue que presenta el colorante final. Los derivados comerciales más comunes son el ácido carmínico, y el carmín o carmín laca; a partir del cual se pueden obtener diferentes presentaciones comerciales como el carmín hidrosoluble (Carmín laca a cuya estructura se adiciono un álcali); carmín morado (Carmín laca en cuyo proceso se adiciona mayor cantidad de aluminio) y soluciones derivadas de carmín. La optimización realizada en la presente investigación es aplicada específicamente al proceso de producción de carmín o carmín laca.

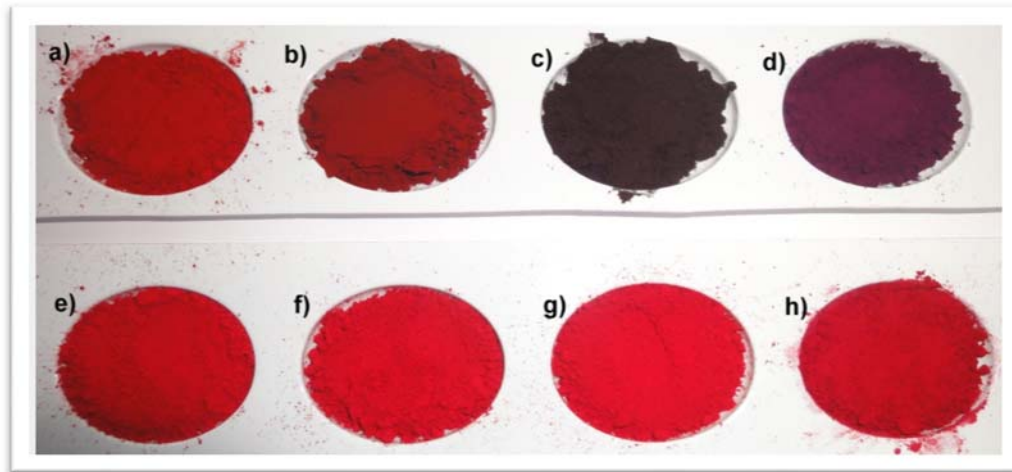


Figura 2.5: Derivados comerciales de la cochinilla: a y b) Acido Carmínico; c) Carmín Hidrosoluble; d) Carmín Morado, e-h) Carmín laca (Diferentes tonalidades).

A pesar de la importancia económica de la cochinilla y sus derivados, la información científica sobre este insecto es muy limitada (Marín y Cisneros; 1977)

2.6. Producción y demanda mundial.

La cochinilla es producida en pocos países a nivel mundial. Perú es el mayor productor con una participación del 73% del total de producción de cochinilla, unas 650 Ton/año, le sigue muy por debajo las Islas Canarias con una participación del 10%, es decir unas 89 Ton/año, también se encuentra Chile, Ecuador, Argentina, Bolivia y Sudáfrica, estos con una participación del 16% unas 142 Ton/año y por ultimo México con una participación de 1%, que equivale a unas 9Ton/año. (Mendez et al; 2004)

Las técnicas agronómicas avanzadas y el mejoramiento genético es actualmente empleado para la producción de cochinilla; las exportaciones tradicionales solían estar basadas en cochinilla como materia prima, pero hoy en día, se encuentran muchas industrias de procesamiento en desarrollo. Los mayores importadores de cochinilla continúan siendo Europa (Alemania, Italia, Francia, UK, España), USA, Japón y Argentina; en su mayoría

países desarrollados que se encargan de industrializar colorantes. Los mayores mercados consumidores de ácido carmínico son Japón, Francia, Inglaterra, USA y Argentina. (Saenz, 2006)

3. DERIVADOS COMERCIALES DE LA COCHINILLA: COLORANTES NATURALES

Existe una gran variedad de pigmentos que podemos encontrar en la naturaleza, por lo cual se han creado diversas maneras de clasificación de pigmentos biológicos. Según Hendry (1996), una clasificación basada en su afinidad estructural nos permite reducir casi todos los pigmentos conocidos a no más de seis grupos: Tetrapirroles, Tetra terpenoides, Quinonas, O-heterocíclico, N-heterocíclico, y Metaloproteínas, adicionalmente existen un grupo de pigmentos que no entran en esta simple clasificación.

En el presente trabajo, nos enfocamos en las quinonas, dentro de las cuales estudiaremos al ácido carmínico, que pertenece al subgrupo de las antraquinonas.

3.1. Quinonas

Son compuestos fenólicos que varían de un simple dihidroxifenol monomérico tal como la 1,4-benzoquinona, pasando a un compuesto trimérico como la 9,10-antraquinona; hasta un polímero más complejo como es la hipericina (Hendry; 1996 y Britton; 1983):

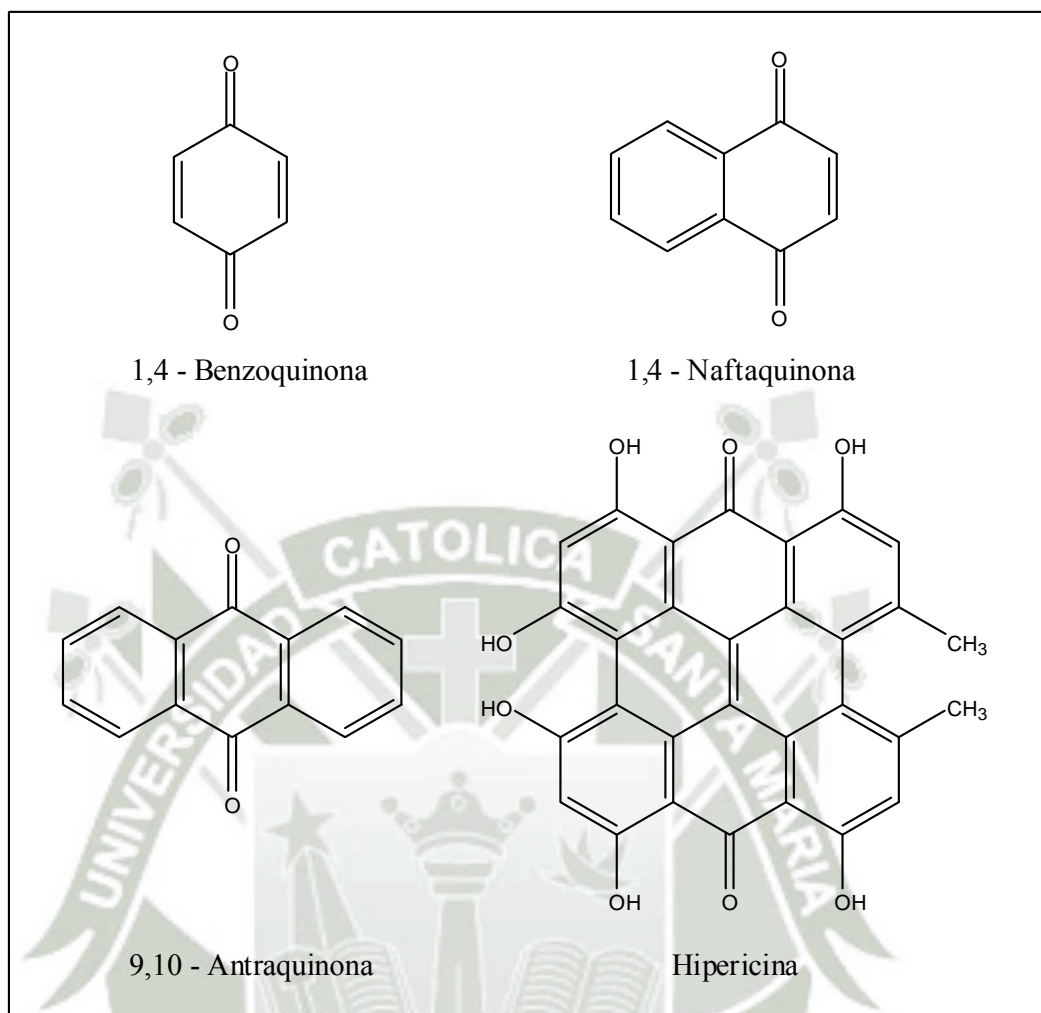


Figura 2.6: Estructuras de quinonas. a) 1,4-Benzoquinona; b) 1,4-Naftaquinona Extraído de: Hendry (1996)

3.2. Glicosidos Antraquinonicos

Las antraquinonas son compuestos aromáticos más o menos metilados, cuando hay sustituyentes en la posición C-2 ó C-3 en estado de oxidación del átomo de carbono puede variar y ser $-CH_3$; $-CH_2OH$; $-COOH$ o formar grupos más complejos.

Estas quinonas tricíclicas derivadas del antraceno, a menudo contienen uno o más grupos hidroxilo:

- Si poseen dos grupo OH en posiciones 1 y 2 tienen propiedades colorantes
- Si se encuentran en las posiciones 1 y 8 el efecto es laxante.

Gibaja (1998), señala que las antraquinonas naturales se encuentran libres y al estado de combinaciones glicosídicas. Pueden hallarse en la corteza y la raíz de diversos géneros y especies de las familias: *Rubiáceas*, *Rhamnáceas*, *Poligonáceas*, *Legumonosas*, *Escrofulariáceas*, *Liliáceas* y *Verbenáceas*; en los líquenes, hongos y en los insectos tintóreos de la familia Cócidos. Son de gran interés como colorantes para alimentos debido a su estabilidad y a su alto poder tintorial, constituyen el grupo más numeroso de las quinonas naturales, y son la base y fuente de una importante cantidad de colorantes.

3.3. Acido Carmínico

El ácido carmínico o ácido antraquinón-7-glucopiranosil-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-2-carboxílico, de fórmula $C_{22}H_{20}O_{13}$ cristaliza en prismas rojos, no tiene punto de fusión y se descompone a $120^{\circ}C$. (Gibaja; 1998).

Es considerado un compuesto antraquinona glicosido que contiene varios centros ácidos, el primer punto de disociación ocurre en el grupo carboxílico de la posición 2 ($pK_0=2.9$) el cual es el más ácido; el siguiente punto de equilibrio ácido-base ($pK_1=5.4$) involucra el grupo 6-hidroxil debido a que los grupo OH 5- y 8- ($pK_2=8.7$ y $pK_3=12.2$) son menos ácidos debido a su posición con respecto al grupo carbonílico, el cual reduce la movilidad del hidrogeno a través de la unión hidrogenada.

Gibaja (1998) sostiene que el grupo carboxílico $-COOH$ y los cuatro grupos $-OH$ fenolicos de las posiciones C-3 C-5 C-6 y C-8 desprotonables contribuyen a cambios de color y de pH, anaranjado a $pH=3.0$; rojo a $pH= 5.5$ y purpura a $pH = 7$. La curva de titulación del ácido carmínico con una solución 0.1M de hidróxido de sodio presenta tres inflexiones de 0.9 1.9 y 2.9 moles de hidróxido de sodio por mol de ácido carmínico.

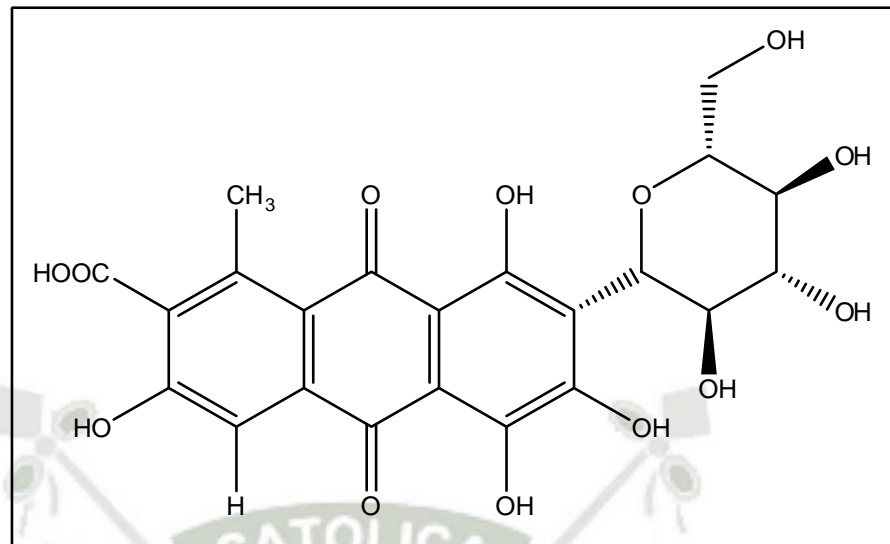


Figura 2.7: Molécula de Acido Carmínico (C₂₂H₂₀O₁₃. pM 492,38 g./mol) Según la nomenclatura IUPAC su designación química es ácido 7-β-D-glucopiranosil-9,10-dihidro-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxo-2-antracencarboxílico. Extraído de: Gibaja (1998)

3.4. Carmín o Carmín laca

La palabra “Carmín” (CAS Reg. NO 1390-65-4) ha sido utilizada como un término general para esta familia de antraquinonas, pero el significado más común denota una laca o quelato formado a partir del ácido carmínico con aluminio y/o calcio, o igualmente en algunos de ácido carmínico y magnesio (Francis; 1996) el cual es luego precipitado mediante la adición de un ácido durante la primera etapa de producción. El proceso de unión del ácido carmínico con un metal formando el carmín, es denominado en la producción industrial como “Laqueado”. El color final del producto depende de la proporción de aluminio y calcio, siendo violeta en formulaciones que no contienen calcio, y variando de rosado a escarlata según aumenta la proporción de calcio. (Francis; 1996)

El carmín usualmente contiene alrededor de 40-60% de ácido carmínico, y la intensidad en color es casi el doble que la del ácido carmínico siendo así un color más efectivo al costo. (Schul; 2000)

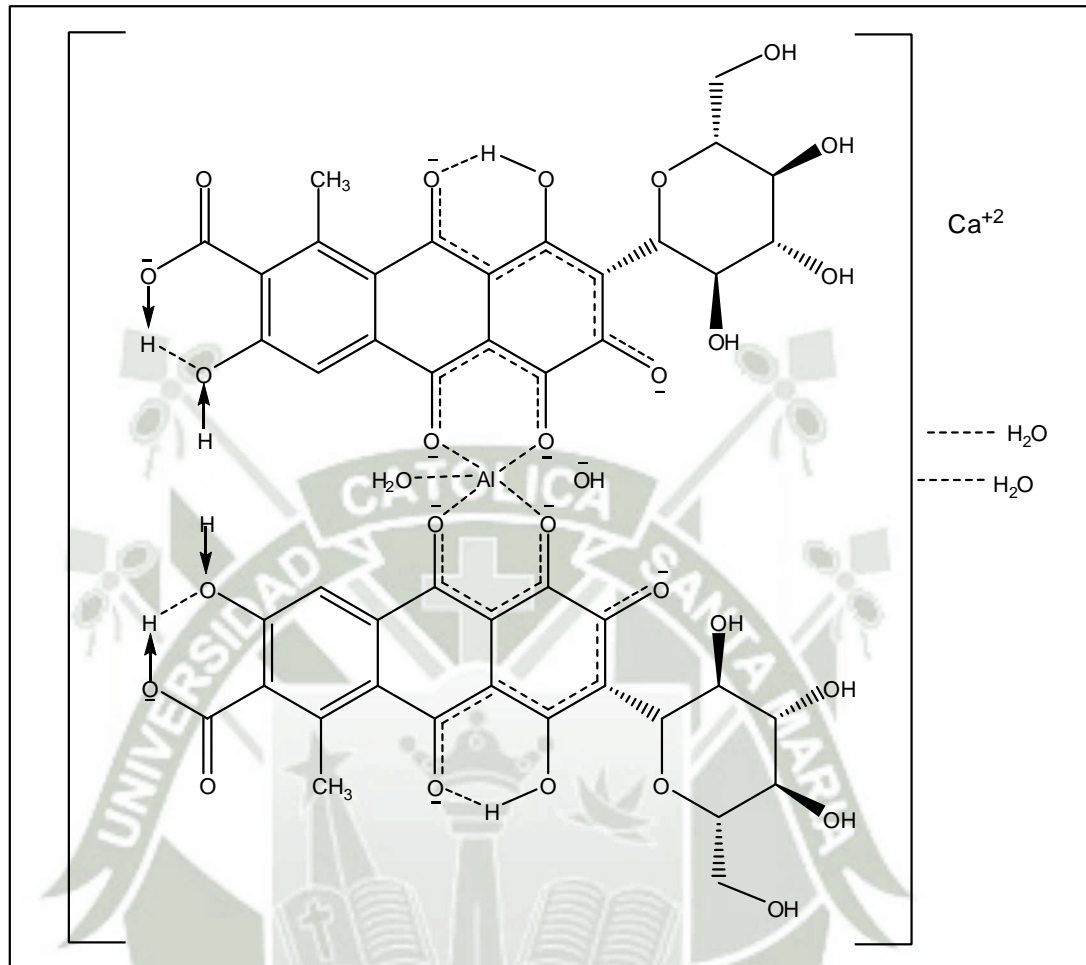


Figura 2.8: Molécula de carmín. Colorante Carmín obtenido a partir de *Dactylopius coccus Costa*. Extraído de: Gibaja (1998)

Schul (2000) explica que en el mercado del carmín no existen “colores estándar”. A lo largo de los años ha habido varios proveedores de este colorante, cada uno con un tono de color único. El consumidor estandarizará al utilizar un tono, e insistiendo en obtener exactamente el mismo hue y poder tintorial. Si un proveedor desea mantenerse en el mercado, debe ser capaz de producir todos los hue y poder tintorial producidos por todos los proveedores a nivel mundial.

El carmín natural es probablemente el único colorante en el mundo, que al ser preparado con los mismos ingredientes, se espera que sea más rojo, amarillo, azulado, con diferente poder tintorial y aun así mantener un contenido de ácido carmínico.

En la práctica esto es casi posible mediante ajustes muy cuidadosos durante la etapa de extracción y laqueado. De hecho el proceso de producción del carmín requiere controles constantes, en cada paso, a fin de mantener una consistencia (Schul, 2000)

3.5. Propiedades físicas y químicas

Las propiedades físicas y químicas del ácido carmínico y su derivado Carmín se muestran y comparan en la tabla 2.2

Tabla 2.2: Tabla de resumen y comparación de propiedades de colorante Ácido Carmínico y Carmín.

	ACIDO CARMINICO	CARMIN
Nombre Químico	7-β-D-glucopiranosil-3, 5, 6, 8-tetra hidroxil-1-metil-9, 10-dioxo antraceno-2 ácido carboxil.	Hidrato aluminio quelato del ácido carmínico (7-β-D-Glucopiranosil 1-3, 5, 6, 8-tetra hidroxil-1-metil-9, 10-dioxo antraceno-2 ácido carboxil).
Perfil	Polvo rojo oscuro brillante.	Polvo rojo brillante
Toxicidad	NO	
Punto de Fusión	NO tiene. Se descompone a 135°C o por tratamiento térmico a 80°C por una hora.	
Estabilidad	Es un producto muy estable ante la luz, tratamientos térmicos, oxidación y al dióxido de azufre, presentando mejor resistencia comparado con colorantes sintéticos, no se han detectado variaciones	

	en su contenido de ácido carmínico en productos almacenados durante 4 años.	
Solubilidad	Soluble en agua, alcohol, soluciones alcalinas y en ácido sulfúrico diluido; es insoluble en hidrocarburos, éter de petróleo, benceno, y en los aceites comestibles.	Es soluble en soluciones alcalinas, en los hidróxidos y carbonatos alcalinos dando soluciones violeta oscuras; insoluble en agua, y en ácidos. Dispersible en aceites y grasas.
pH	Precipita a pH menores a 3.5	
Color	El color en solución varía de naranja a púrpura dependiendo del pH.	El color varía de rojo a rojo azulado dependiendo del pH. La presencia de otros iones metálicos podría generar una ligera tendencia en el color hacia azulado.
Propiedades Complejantes	Forma complejos con diversos iones metálicos, ya que le permite cambiar su máximo de absorbancia del rango visible a mayores longitudes de onda, con un aparente aumento en la intensidad del color a simple vista, forma hue brillantes y estables; los colores más brillantes y la mayoría de las preparaciones comerciales se logran con aluminio.	
Concentración Comercial	90% de ácido carmínico FCCIII	Rango de 50-60% ácido carmínico FCCII

En La figura 2.9 se muestra la curva espectrofotométrica característica del ácido carmínico, en la que se observa un pico de absorción a 494 nm.

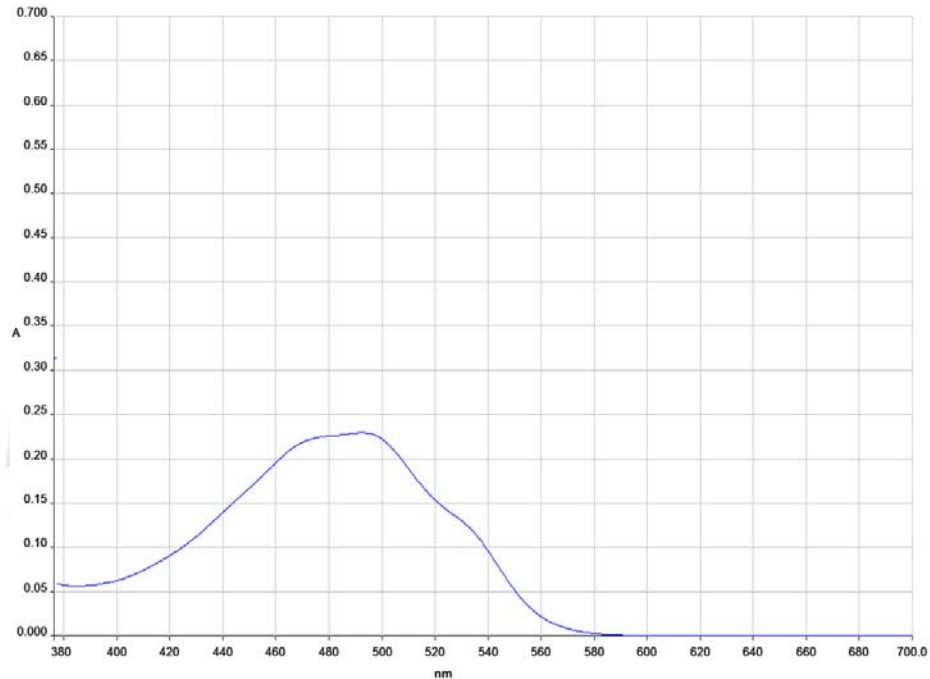


Figura 2.9: Espectro visible de ácido carmínico al 0.01% en solución buffer pH 7.0

3.6. Aplicaciones

El ácido carmínico, y sus derivados denominados carmines, tienen la consideración de colorantes naturales con el código de aditivo E-120. Es un colorante caro por lo que se utiliza fundamentalmente en productos de gama alta. Se comercializa en forma de polvo puro, atomizado y en soluciones. Este colorante compite directamente con el rojo de beterraga (betanina) y las antocianinas, siendo su principal desventaja la insolubilidad a pH bajos. Al día de hoy, muchas industrias permiten una reacción de ácido carmínico con amoníaco, para otorgarle mayor estabilidad a ácidos (Henry, 1996).

- Colorante alimenticio: Es ideal para alimentos con un pH mayor a 3.5 como en industrias lácteas para productos como el yogurt, helados y bebidas a base de leche y bebidas no carbonadas y alcohólicas, o productos relacionados; en la industria cárnica es pre dispersado en masas de chorizos, salchichas, jamones, surimi u otros; es además utilizado en postres de gelatina, dulces y confites, rellenos de caramelos, conservas, pastelería, repostería, mermeladas, etc.
- Industria cosmética y Farmacéutica: cosméticos, dentífricos, fármacos, etc.
- Colorante textil, indicador de pH y tinturas histológicas.
- Fluoración: El ácido carmínico en acetonitrilo tratado con difluoruro de xenón y ácido trifluoroacético como catalizador da los órganos fluorados II, III.
- Material fotográfico: La emulsión de halogenuro de plata y gelatina pigmentada con ácido carmínico da una película fotográfica con sensibilidad e imágenes buenas en comparación con el proceso tradicional.
- Oxidación selectiva: El ácido carmínico al ser tratado en forma sucesiva con hidróxido de sodio-peróxido de hidrógeno a 60°C, ácido clorhídrico y sulfato de dimetileno carboato de potasio da el ácido 5-metoxitoluen-2,3,6-tricarboxílico.
- Teñido de ácidos nucleicos: El carmín-litio se ha empleado para el teñido específico de ácidos nucleicos.



Figura 2.10: Soluciones de Acido carmínico a diferentes pH (7-5-4-3).

Extraído de: Food Ingredient Solution.

3.7. Estándares de calidad

La cochinilla y sus derivados están aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) y son actualmente aceptados para usos industriales, las especificaciones están dadas por el Food Chemical Codex; los procedimientos aprobados por la FDA se encuentran en el 21 CFR sección 73.100.

El mismo instituto en unión con el Comité de expertos FAO/OMS para aditivos alimenticios (JECFA) propone técnicas analíticas para evaluar el pigmento en muestras de cochinilla (FAO/OMS, 2000). El parlamento europeo junto con el consejo de la unión europea especifican los principales usos y limites para cada alimento (bebidas 100 mg/L y en sólidos 50-500 mg/Kg). En Japón el ácido carmínico más que el carmín es empleado por las industrias alimenticias.

Tanto la cochinilla como el carmín están ampliamente permitidos en Europa y Norte América. Dentro de la UE se debe utilizar una amplia variedad de aditivos procesados a niveles de dosificación específicos que van hasta un máximo de 50-500 ppm (pigmento puro) en sopas y salsas respectivamente.

Las especificaciones técnicas para su comercialización son establecidas por la FDA y por la EEC para los países pertenecientes a la Unión Europea, como se muestra en la tabla 2.3

Tabla 2.3: Especificaciones técnicas dadas por el FDA y EEC para la comercialización de carmín y sus derivados:

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA COMERCIALIZACIÓN		
	FDA (Food and Drug Administration)	EEC (European Economic Community)
Contenido de Humedad:	No debe exceder el 10%	
Contenidos de Metales y Otros:		
Arsénico	Max. 3 mg/kg.	Max. 3 mg/kg.
Plomo	Max. 10 mg/kg.	Max. 10 mg/kg.
Mercurio	Max. 1 mg/kg.	Max. 1 mg/kg.
Cadmio	Max. 1 mg/kg.	Max. 1 mg/kg.
Metales Pesados	Max. 40 mg/kg.	
Dióxido de Azufre (SO ₂)		Max 1000 mg/kg.
Residuos de Metanol y Etanol		No debe ser mayor a 50mg/kg por cada uno o en combinación.
Presencia de Salmonella:	La prueba debe dar negativo	
Presencia de Bacterias:	Max. 1000 ufc/g.	
Mohos y Levaduras:	Max. 100 ufc/g	
Coliformes Fecales:	1967 La prueba debe dar negativo	

3.8. Datos de seguridad

El extracto de cochinilla y el carmín no son genotóxicos; no se han observado efectos adversos ni evidencia de potencial carcinógeno en pruebas realizadas en ratas. (Brown; 1979, Loprieno et al; 1992, Mori et al; 1988). El estudio de Ford et al (1987) sostiene que la alimentación a largo plazo de carmín en ratas, y cochinilla en ratones fueron

similarmente inactivas; la administración oral repetida de carmín falló en identificar de manera concluyente un órgano diana específico. No hay señales convincentes de toxicidad en estudios de reproducción que involucran la administración oral repetida de carmín a ratas o de la cochinilla a los ratones. (Grant et al; 1987, Loprieno et al; 1992). Se observaron algunas malformaciones fetales (2 de 85 ratones) en ratones que recibían inyecciones subcutáneas de 150/mg/Kg en ratas con 8 días de embarazo y alguna indicación de un débil potencial teratogénico en ratones. (Grant et al; 1987)

En el hombre, únicamente en raras ocasiones se ha observado sensibilización de la piel; pero hay una serie de informes de reacciones alérgicas (dérmicos y/o respiratorias) después de su consumo (Chung et al; 2001). Tanto el carmín, como la cochinilla, y posiblemente ácido carmínico, han inducido asma ocupacional (Acero et al; 1998), así como otros efectos sobre la función respiratoria (Beaudouin et al; 1995). Las reacciones alérgicas se han demostrado a pesar de que los alérgenos no han sido completamente identificados. Sin embargo, las proteínas derivadas de insectos (posiblemente complejos con ácido carmínico) podrían ser las responsables de la alergia al carmín mediante IgE. Los criterios de inclusión de productos carmínicos como alimentos alergénicos no han sido completamente satisfechos (Chung et al; 2001). El parlamento europeo y el consejo de la unión europea recomiendan una restricción a nivel proteico en E120. La FDA indica que los colorantes derivados de carmín deben ser tratados para asegurar la ausencia de Salmonella.

JECFA asignó un ADI combinado de 0.5 mg/Kg/día para la cochinilla y el carmín. (Francis; 1996)

4. METODO DE PROCESO PARA LA OBTENCION DE CARMIN

4.1. UPSTREAM: Lineamiento

Materia Prima: Cochinilla seca de primera calidad (21-22% AC) obtenidas de agricultores de la Joya, Arequipa.

Tratamiento: Identificación (la cochinilla acopiada es identificada con un lote, indicando el peso neto, proveedor y fecha), limpieza, tamizado, clasificación y envasado.

Los pre tratamientos realizados como recolección, secado, tamizado y clasificación de la cochinilla, dependen de cada proveedor y son realizados en campo con el objetivo de mejorar la calidad de la materia prima.

Indicador de control: Contenido de Acido Carmínico.

Condiciones: Limpieza en un cilindro tamiz, por un tiempo de 45 minutos a una velocidad de giro de 40 rpm.

Descripción de las operaciones unitarias del UPSTREAM:

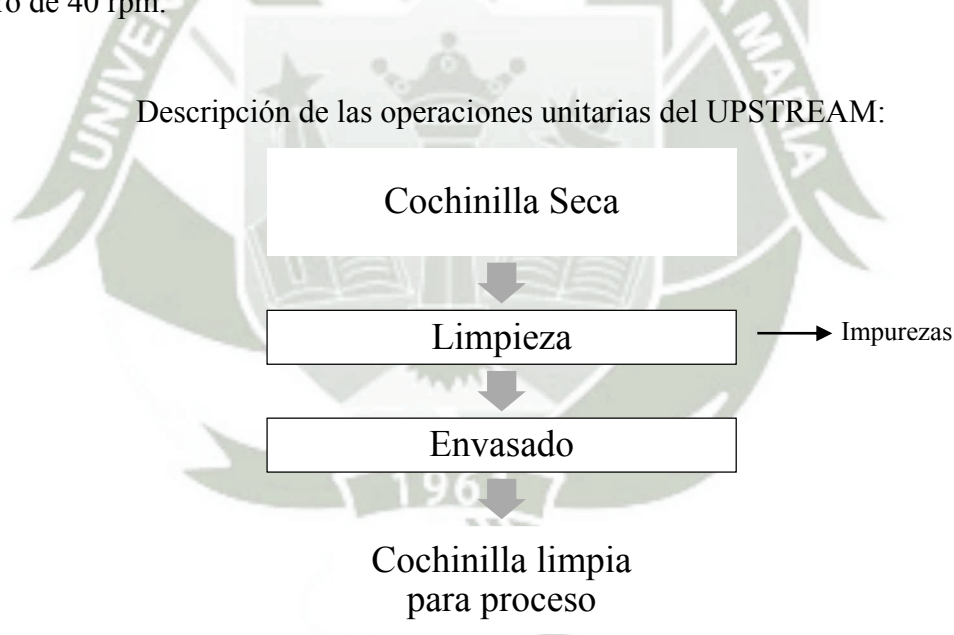


Figura 2.11: Diagrama de Flujo del UPSTREAM.

- LIMPIEZA.- La cochinilla recepcionada y previamente identificada, se procede a limpiar, saco por saco en un cilindro tamiz, por un espacio de 45 minutos, a una velocidad de giro de 40 rpm. Transcurrido el tiempo se descarga la cochinilla limpia,

y se toma una muestra de 50 g. aproximadamente; luego, se vuelve a cargar un nuevo saco y proceden de la misma manera, hasta culminar con todo el lote; finalmente se mezclan todas las muestras de cochinilla limpia, y se envían a laboratorio para determinar la concentración del ácido carmínico. Es importante pesar el producto de descarte para determinar el contenido de impurezas y reportar al área de compras para su respectivo descuento en el peso de compra.

- ENVASADO.- La cochinilla limpia se envasa en sacos de 25 Kg para su almacenamiento.

4.2. DOWNSTREAM: Lineamiento

Reactivos: Carbonato de Sodio, Acido acético, Tierra Filtrante, Hidróxido de Sodio, Sulfato de Aluminio, Cloruro de Calcio, Acido Cítrico, Acido Sulfúrico, Diluyente (Maltodextrina).

Recuperación: Extracción alcalina, (Las variables que se deberán evaluar durante este procedimiento son el pH, tiempo y temperatura de extracción, y la relación soluto/Solvente) seguido de una etapa de tamizado y filtración.

Concentración: “Laqueado” o proceso químico para formar el carmín, seguido de enfriamiento, precipitación y filtración.

Purificación: Esterilización y Secado.

Formulación: Molienda, Homogenización y estandarización.

Obtención de Carmín: Para la obtención de Carmín se conocen ocho procedimientos: Método alemán, de Carré, Francés, Inglés, Thorpe, de Forgiós, Robin y el método Americano (Gibaja, 1998). El proceso en el presente trabajo está basado es una combinación mejorada de los procedimientos anteriormente mencionados, controlando las condiciones optimas de extracción, encontrando el factor adecuado de reactivos que

garanticen un producto de buena calidad en lo que respecta a rendimiento de extracción y color.



Descripción de las operaciones unitarias del DOWNSTREAM:

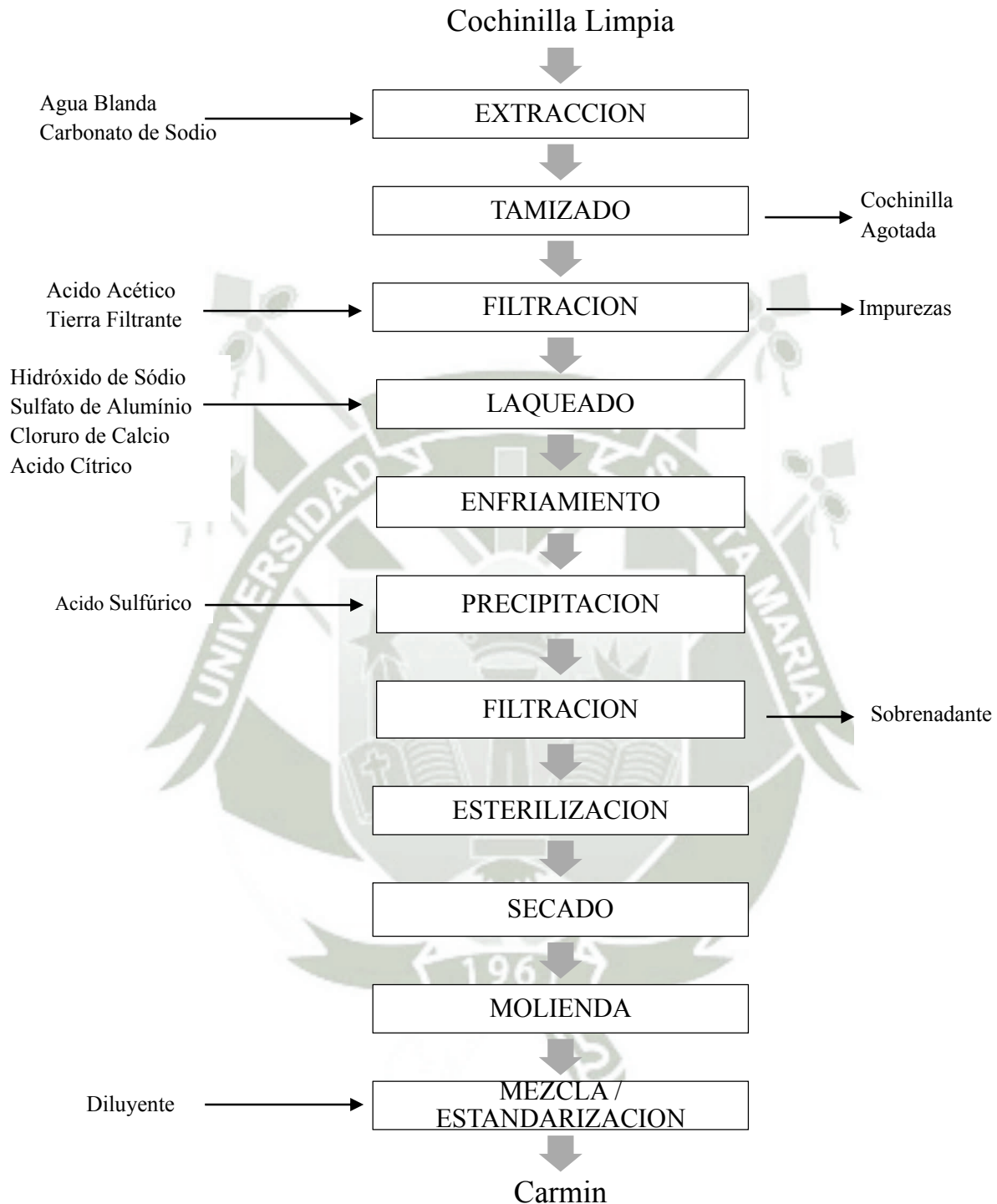


Figura 2.12: Diagrama de Flujo del DOWNSTREAM.

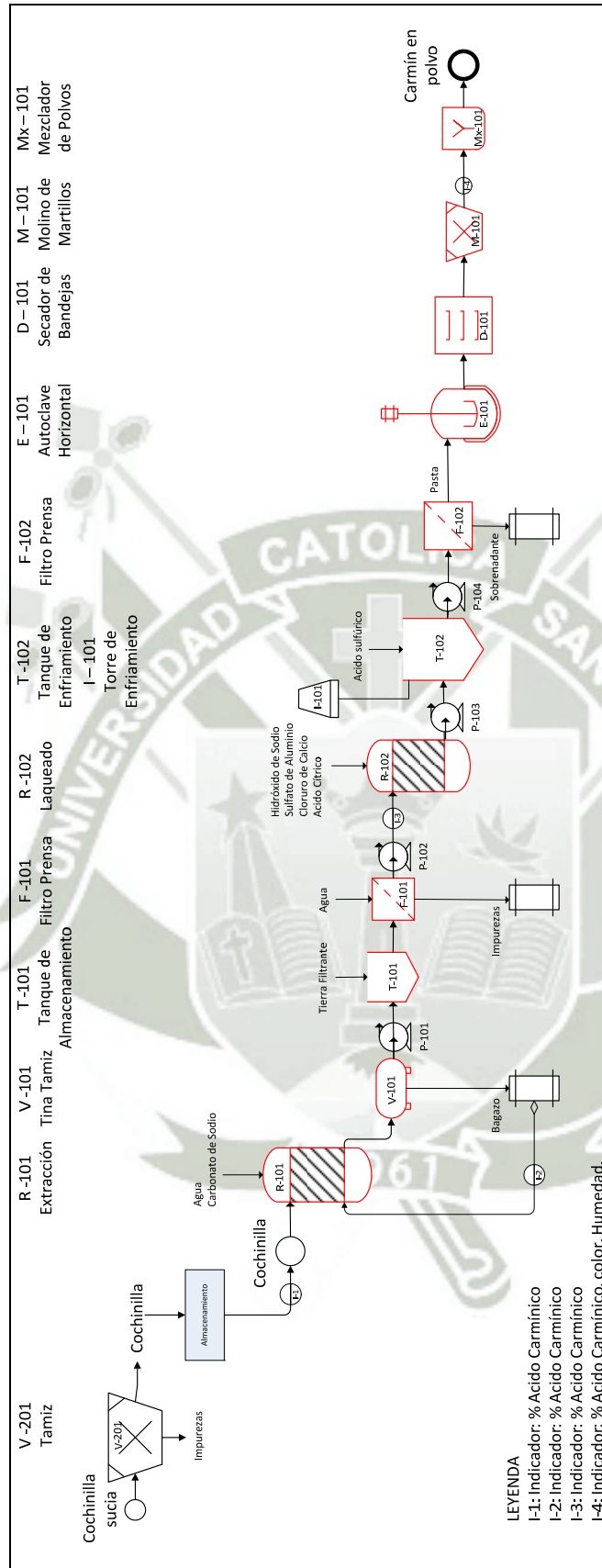


Figura 2.13: Diagrama de operaciones.

- EXTRACCION.- Se basa en una extracción alcalina que se realiza por lixiviación en contracorriente, en cuatro etapas, a temperatura de ebullición y con agitación constante; tiene la finalidad de extraer todo el colorante contenido en la cochinilla (ácido carmínico). Las variables que se deberán evaluar durante este procedimiento son el pH, tiempo de reacción, temperatura de extracción, y relación soluto/Solvente

EXTRACCION I.- Se carga el reactor de 4800 L de capacidad, con 150 kg de cochinilla de primera calidad y luego se adiciona agua blanda o el tercer y cuarto lavado del lote anterior, hasta completar la relación solvente soluto de 20:1; luego adicionar 6.0 kg de Carbonato de sodio liviano anhidro de 99% de pureza; inmediatamente se deja ingresar vapor a la chaqueta del reactor a una presión manométrica de 20 PSIA; y se calienta hasta llegar a temperatura de ebullición, se mantiene en ebullición por 15 minutos, con agitación constante a una velocidad de 120 rpm. Luego se deja en reposo por un espacio de 20 minutos, y finalmente se descarga el extracto por la válvula lateral, hacia la tina tamiz de malla N° 150 ASTM; el extracto tamizado se transfiere mediante una bomba centrifuga de 2HP hacia el tanque de almacenamiento de extractos, donde se debe medir la altura del líquido en el tanque para determinar el volumen; y se toma una muestra, la cual es enviada al laboratorio para determinar la concentración de ácido carmínico y el pH.

EXTRACCION II.- Se procede de la misma manera que la primera extracción pero utilizando 1.5 kg de Carbonato de sodio liviano anhidro y dejando rebullir por 15 minutos con agitación constante, de esta manera se mantiene la relación solvente soluto de 20:1; finalmente el extracto obtenido es enviado al tanque de almacenamiento de extractos

EXTRACCION III.- Se procede de la misma manera que la primera extracción, pero utilizando solo agua blanda, de esta manera se mantiene la relación solvente soluto de 20:1, se deja rebullir por 20 minutos con agitación. El extracto tamizado se envía al tanque de almacenamiento de extractos.

- TAMIZADO.- Finalizada la extracción, se descarga la cochinilla agotada (sin color) dejando escurrir sobre una tina tamiz para su respectivo desecho; previamente se debe pesar y tomar una muestra para determinar el contenido de ácido carmínico.

- FILTRACION.- En esta operación, el líquido o extracto almacenado en el tanque, se pasa a través de un separador de sólidos de descarga automática; este equipo tiene la función de retener todas las impurezas provenientes de la extracción como son: tierras, partículas insolubles, ceras, grasas, las cuales son evacuadas por una válvula inferior del tanque, mientras que por la válvula superior se obtiene un extracto carmínico exento de impurezas apto para su posterior tratamiento químico. Los extractos I y II se filtran por separado de la siguiente manera:

EXTRACTO I.- Al primer extracto almacenado en un tanque de 4000 L, se adicionan 6 kg de ácido acético glacial, el pH debe quedar entre 5 a 5.5; una vez regulado el pH, se agregan 8 kg de tierra filtrante y se agita; luego se procede a filtrar previa preparación de una pre capa utilizando 7 kg de tierra filtrante en un filtro prensa de polipropileno de 800*800 mm con 14 placas; para la filtración utilizar una bomba centrífuga de 2 HP (Ebara). El extracto filtrado es enviado al tanque de laqueado.

EXTRACTO II.- Al segundo extracto almacenado en un tanque de 4000 L, se adiciona 1 kg de ácido acético glacial, el pH debe quedar entre 5 a 5.5, una vez regulado el pH adicionar 5 kg de tierra filtrante y se agita; luego se procede a filtrar en el mismo filtro prensa de polipropileno de 800*800 mm con 14 placas, donde se hizo la primera filtración; para la filtración utilizar una bomba centrífuga de 2 HP (Ebara).

Finalmente se lava la torta en el filtro con agua blanda caliente a 80°C; para recuperar el ácido carmínico que queda retenido. Culminada esta operación se procede a bajar la torta y a lavar la prensa. El extracto filtrado es enviado al tanque de laqueado hasta una altura de 10 cm, si faltara extracto se completa con el agua del lavado del filtro.

Se toma una muestra representativa del extracto, y se lleva al laboratorio para determinar la concentración del ácido carmínico.

- LAQUEADO.- El extracto clarificado se somete a una reacción química para formar el Carmín, (complejo aluminico-calcico del ácido carmínico). Es importante haber analizado previamente el porcentaje de ácido carmínico en el extracto obtenido, ya que en base a este dato se calculará la cantidad de reactivos que se deben adicionar, para lo cual se procede de la siguiente manera:

- Cantidad de hidróxido de sodio (99%) = Kg de A.C * 0.20
- Cantidad de sulfato de aluminio (tipo A) = Kg de A.C.* 0.54
- Cantidad de cloruro de calcio (75-80%) = Kg de A.C.* 0.28
- Cantidad de ácido cítrico (98%) = Kg de A.C.* 0.24

Antes de iniciar la adición de los reactivos, el agitador del reactor debe de estar encendido a una velocidad de 120 rpm. Se deben pesar todos los reactivos para proceder a su adición de la siguiente manera, diluyendo previamente en agua blanda, con el objetivo de facilitar su adición al tanque de manera segura:

- Primero se adiciona lentamente el Hidróxido de sodio y se deja agitando por espacio de 10 minutos
- Segundo, adicionar el Sulfato de Aluminio y dejar agitando por espacio de 10 minutos
- Tercero, adicionar el Cloruro de Calcio y dejar agitando por espacio de 10 minutos.
- Finalmente adicionar el Acido Cítrico y dejar agitando por espacio de 10 minutos.

Una vez adicionados todos los reactivos, se debe ingresar vapor para calentar el líquido hasta 90°C; en este punto se controla la reacción en agitación constante y por un tiempo de 30 minutos; finalizada la reacción, se regular el pH a 5.0-5.20, adicionando hidróxido de sodio lentamente

- ENFRIAMIENTO.- Finalizada la reacción, proceder a enfriar la solución hasta 28°C, utilizando un intercambiador de placas.
- PRECIPITACION.- A la solución fría se adiciona ácido sulfúrico diluido al 10% hasta obtener un pH de 2.8-3.0, lo que genera la precipitación del carmín. Luego dejar en reposo por 30 minutos.
- FILTRACION.- La solución precipitada se pasa por otro separador de sólidos, un filtro prensa de polipropileno, donde el sólido que se obtiene es el carmín precipitado en forma de pasta. Se desecha el líquido sobrenadante solo cuando este tenga una concentración menor a 0.024% de ácido carmínico. Culminada la filtración, dejar ingresar aire comprimido para evacuar el agua que queda en la cámara de filtración de tal forma que la pasta de carmín, este con un contenido no menor de 20% en ácido carmínico. Finalmente se abre el filtro y cuidadosamente se descarga la pasta con la ayuda de una espátula hacia una tina. Esta pasta sirve para obtener carmín laca en polvo o carmín hidrosoluble.
- ESTERILIZACION.- Con la finalidad de eliminar la carga microbiana del producto, la pasta es cargada en bandejas de acero inoxidable, las cuales ingresan a un autoclave horizontal de acero inoxidable, donde se someten a una esterilización a 121°C por 30 minutos. Es muy importante que las etapas posteriores a esta, se lleven de manera aséptica para evitar la contaminación microbiológica.
- SECADO.- Las bandejas con pasta de carmín esterilizado, son enviadas a un secador de bandejas para el secado a una temperatura de 60°C, hasta que la humedad final sea menor de 10%. Finalmente descargar el carmín seco en bolsas de polietileno previo enfriamiento. Se debe identificar el producto con su respectivo lote, peso neto, y fecha.

- MOLIENDA.- El carmín seco es molido en un molino de martillos de acero inoxidable de alta velocidad, hasta obtener partículas pasantes por malla N° 200 ASTM.
- MEZCLADO- ESTANDARIZACION.- El carmín molido se procede a mezclar y estandarizar a una concentración promedio de 52% o de acuerdo a requerimiento del cliente, utilizando como diluyente maltodextrina de papa o maíz.

5. DISEÑO ESTADISTICO

La finalidad principal de muchas empresas es desarrollar nuevos procesos y productos, o la mejora continúa de estos; minimizando costos y tiempo. La calidad global de los productos está representada por muchas características de interés y estas a la vez, están en función de un conjunto de factores de control. Para obtener el valor de respuesta de esas características se recurre a una estrategia experimental. (Domínguez; 2006)

Haaland (1989) señala que existen dos métodos tradicionales que son comúnmente utilizados en procedimientos experimentales: “Once at a time” o Una variable a la vez; y “Matrix”; ambos pueden ser utilizados para la resolución de problemas, pero ninguno de ellos es económico ni eficiente. El método de una variable a la vez, es bastante ineficiente debido a que requiere demasiados ensayos para llegar a una respuesta, adicionalmente no evalúa la interacción entre variables al no explorar todo el espacio de experimentación. El segundo método de búsqueda de un resultado a través de una Matriz, a pesar de tener la ventaja de explorar todo el espacio experimental, requiere de un gran e innecesario número de mediciones. Los inconvenientes de los métodos tradicionales provienen de variar un factor cada vez, y la necesidad de realizar un gran número de experimentos para obtener la información necesaria. La solución, por lo tanto debe consistir en variar más de un factor simultáneamente, obteniendo información sobre sus interacciones; y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir con la máxima eficiencia. (Ferré)

Un planeamiento factorial permite explorar todo el espacio experimental, considerando el estudio de diferentes variables y un menor número de ensayos. (Haaland; 1989). Planificar nos permite minimizar el coste de la experimentación como la influencia del error experimental; garantizando la máxima fiabilidad de las conclusiones. (Ferré)

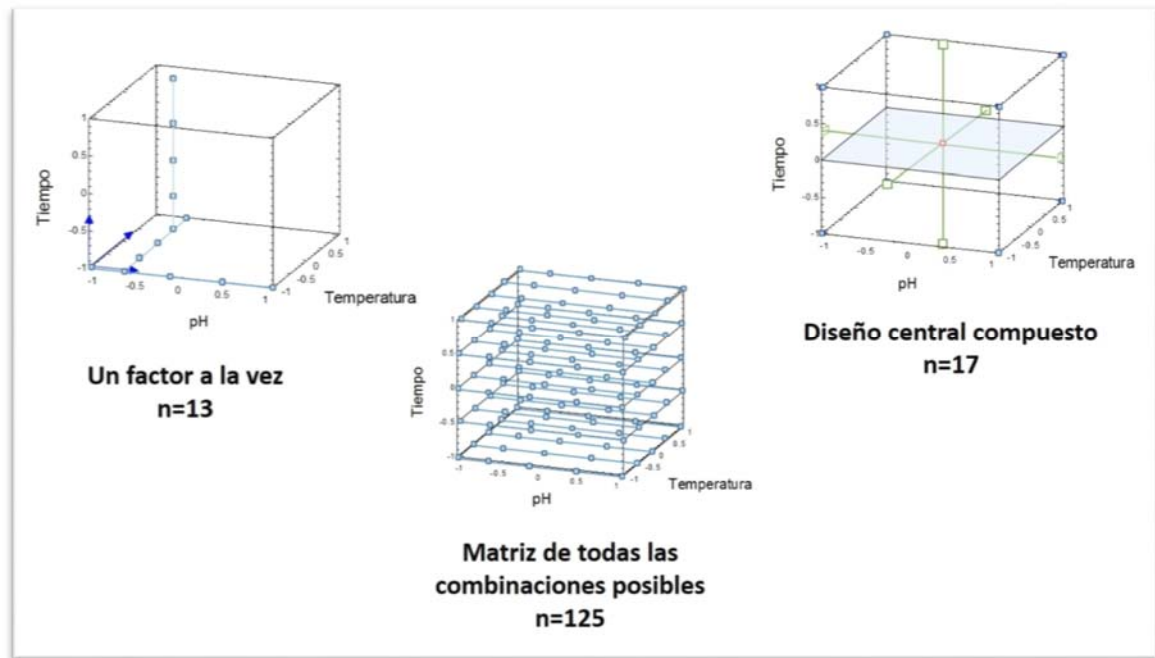


Figura 2.14: Estrategia Experimental. Métodos tradicionales (“Once at a time” y “Matrix”) versus planeamiento factorial (RSM). Extraído de: Manrique (2013)

Las ventajas son reducir el número de ensayos, mejorar la calidad de información obtenida, reduciendo el trabajo, tiempo y costo final, analizar los factores simultáneamente pudiéndose verificar y cuantificar los efectos sinérgicos y antagónicos entre ellos, optimizar más de una respuesta al mismo tiempo, calcular y validar el error experimental.

La necesidad de estudiar conjuntamente varios factores obedece principalmente a encontrar un modelo que describa el comportamiento general del fenómeno en estudio y a optimizar la respuesta o variable independiente, es decir, encontrar la combinación de

niveles de los factores que optimizan esa respuesta, donde el número de planeamientos experimentales factoriales necesarios depende principalmente del número de variables independientes a ser estudiadas y del objetivo (Box, 1978)

5.1. Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)

La metodología de respuesta de superficies es una estrategia de experimentación secuencial utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El objetivo es optimizar una o más variables, lo cual se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema, y lo que a su vez permite mejorar significativamente su resultado en cuanto a costos, tiempos, eficiencia, productividad, cumplimiento de especificaciones y en fin, mejorar su calidad. (Ferré).

La función que determina la relación entre los factores y la variable respuesta es, en general, desconocida, por lo que el primer objetivo de la RSM consiste en establecer experimentalmente una aproximación de la función, para lo cual se proponen modelos polinomiales en los factores y se selecciona un conjunto de tratamientos sobre los que realizar las observaciones experimentales. Los polinomios usados más frecuentemente en funciones de aproximación son los de primer (modelo lineal) y segundo orden (modelo cuadrático). (Fernández, C y Piñeiro, M. 2001). Los diseños de segundo orden permiten estudiar los efectos de interacción y efectos cuadráticos, aparte de los efectos lineales. Se utilizan ante la necesidad de explorar una superficie más compleja o bien cuando se tiene identificada la región de respuesta óptima y se quiere caracterizar esa superficie de respuesta. La selección de estos diseños depende de las características del problema, y deben cumplir ciertos parámetros como capacidad para realizar las estimaciones eficientes de los coeficientes modelo y medir tanto el error experimental como la posible presencia de falta de ajuste. (Sisqueiros, 2004)

El objetivo principal de esta etapa es confirmar la influencia significativa de los factores sobre la característica de calidad a optimizar, determinar la significancia de las

interacciones entre dichos factores, estimar el modelo de regresión que describa el comportamiento del efecto de dichos factores y determinar en qué dirección se encuentran las condiciones más probables para optimizar la característica de calidad.

5.2. Diseños para ajustar modelos de primer orden.

5.2.1. Diseño factorial 2^k .

En un diseño de primer orden se desea llegar a la ortogonalidad ya que permite minimizar la varianza de los coeficientes de regresión. Un diseño ortogonal es aquel en el que los términos del modelo ajustado son incorrelados, y por tanto también las estimaciones de los parámetros. En los diseños ortogonales de primer orden se incluyen: Diseños factoriales 2^k ; fracciones de diseños factoriales 2^k ; Diseño Simplex y diseño Plackett-Burman. (Montgomery D., 1991, Fernández, C; Piñeiro, M. 2001). En el presente trabajo utilizaremos el diseño factorial 2^k .

El diseño Experimental 2^k , indica la estimación de k factores, sobre la variable de respuesta buscada. Para cada factor se consideran dos niveles, que pueden codificarse en los valores $+1$ (para el más alto) y -1 (para el más bajo); considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los k factores, se probarán entonces 2^k tratamientos.

Este diseño presenta el inconveniente de que, salvo que se repitan algunas observaciones, no permiten la estimación del error experimental. Una técnica habitual para incluir repeticiones consiste en aumentar el diseño con algunas observaciones en el centro, pues esto no influye sobre las estimaciones de los parámetros y no altera la ortogonalidad del diseño.

5.3. Diseños para ajustar modelos de segundo orden.

5.3.1. Diseño central compuesto.

Un diseño experimental para ajustar un modelo de segundo orden debe tener al menos tres niveles de cada factor (-1, 0, +1). En este diseño se desea que sea rotable; se dice que un diseño es rotable cuando la varianza de la respuesta predicha en algún punto es función solo de la distancia del punto al centro y no una función de la dirección. Dentro de los diseños rotables de segundo orden se incluyen: Diseño central compuesto, Diseño Equirradial y Diseño e Box Behnken (Montgomery D., 1991). En el presente trabajo utilizaremos un diseño central compuesto.

El diseño central compuesto puede “crecer” a partir de un diseño 2^k de primer orden, agregando puntos axiales y quizá algunos puntos centrales; donde los factores son codificados de tal manera que el centro sea $(0,0,\dots,0)$, aumentado por 2^k puntos axiales $(\pm\alpha, 0, 0,\dots, 0)$, $(0, \pm\alpha, 0,\dots, 0)$, $(0, 0, \pm\alpha,\dots, 0)$, $(0, 0, 0,\dots,\pm\alpha)$, y n^0 puntos centrales $(0,0,\dots,0)$. (Montgomery D., 1991).

CAPITULO III: MARCO EXPERIMENTAL

1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACION

La obtención de colorante carmín bajo diferentes condiciones de laqueo y sus respectivos análisis, se realizaron en los laboratorios de Investigación y Desarrollo, de la Empresa Aromas & Colorantes de los Andes S.A.C; en la ciudad de Arequipa.

2. MATERIALES

Material Biológico

Se utilizó 100 Kg de liquido de extracto de cochinilla con una concentración del 0.73% de acido carmínico; obtenido a partir de la planta de procesos N°1 de la empresa Aromas & Colorantes de los Andes S.A.C, lote de producción N° 14156002.

Reactivos:

- Hidróxido de Sodio con 99% de Pureza
- Sulfato de Aluminio tipo A
- Cloruro de Calcio con 75-80% de pureza
- Acido Cítrico con 98 % de pureza
- Acido Sulfúrico diluido al 10%
- Acido Clorhídrico 2N
- Agua destilada o des ionizada
- Talco Americano

Material de Vidrio:

- Termómetros de Mercurio

- Celda de 1 cm
- Fiola 1000 ml
- Matraz Kitassato de 1000 ml
- Matraz erlenmeyer de 250 ml
- Pocillos de vidrio de 250 g. para licuadora
- Bagueta
- Vasos Beaker de 200 ml

Equipos:

- pH metro
- Balanza Analítica de 0.0001 g.
- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25
- Calentador eléctrico con agitador magnético
- Bomba de vacío
- Fotocolorímetro Minolta CR-400
- Reactor de 10 Litros de capacidad (SS)
- Secador de Bandejas Rotativo

Otros:

- Tela de Filtración
- Baldes de 20 Litros de Capacidad
- Mortero de Porcelana
- Malla 200 ASTM
- Cucharas (SS)
- Termómetros digitales
- Embudo Buchner para vacío
- Papel de filtración lenta # 925
- Licuadora

- Pizeta de Agua Destilada

Software:

- Statgraphics Centurion XV version 15.2 (Statpoint Inc., Warrenton, Virginia EEUU)
- Microsoft Office Excel Professional Plus 2010 (Microsoft Corporation, Redmon, Washington, EEUU)
- OnColor QC for Colorimeters version V.5.4.04XYS (CyberChrome Inc., Stone Ridge, New York, EEUU)
- ChemOffice Ultra 2006 version 10.0 (Cambridge Scientific Computing Inc., EEUU)

3. METODOS:

3.1. Metodología Estadística

La optimización del proceso de laqueado se realizó mediante la metodología de superficie de respuesta, para ello se elaboró un diseño factorial completo 2^3 . Las variables, niveles y matriz factorial se muestran a continuación (Tabla 3.1 y 3.2)

Tabla 3.1: Dominio Experimental: Niveles, variables codificadas y reales para el diseño factorial 2^3

Factores		DOMINIO EXPERIMENTAL			
		V. Codificadas		V. Reales	
		(-)	(+)	(-)	(+)
X1	Tiempo de Reacción (min)	-1	1	30	70
X2	Temperatura (°C)	-1	1	75	90
X3	pH	-1	1	4.5	5.5

Tabla 3.2: Matriz de Experimentos del diseño factorial 2^3 y Plan de Experimentación

# Exp	MATRIZ DE EXPERIMENTOS Variables Codificadas			PLAN DE EXPERIMENTACIÓN Variables Reales		
	X1	X2	X3	t(min)	T(°C)	pH
1	-1	-1	-1	30	75	4.5
2	1	-1	-1	70	75	4.5
3	-1	1	-1	30	90	4.5
4	1	1	-1	70	90	4.5
5	-1	-1	1	30	75	5.5
6	1	-1	1	70	75	5.5
7	-1	1	1	30	90	5.5
8	1	1	1	70	90	5.5

3.2. Análisis estadístico

Los datos fueron procesados estadísticamente mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) ajustando los diseños según el modelo de regresión (primer orden o segundo orden) que describía mejor la respuesta de interés. En el caso del modelo de segundo orden se amplió el diseño factorial completo 2^3 a un Diseño Central Compuesto (DCC), con la adición de 4 puntos centrales y 6 puntos axiales con el cuidado de mantener las restricciones que el mismo proceso brinda para cada factor, como se muestra en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Matriz para el diseño central compuesto (DCC) Factorial 2^3 :
Adición de puntos centrales y puntos axiales.

# Exp	VARIABLES CODIFICADAS			VARIABLES REALES		
	X_1	X_2	X_3	t (min)	T (°C)	pH
1	-1	-1	-1	30	75	4.5
2	1	-1	-1	70	75	4.5
3	-1	1	-1	30	90	4.5
4	1	1	-1	70	90	4.5
5	-1	-1	1	30	75	5.5
6	1	-1	1	70	75	5.5
7	-1	1	1	30	90	5.5
8	1	1	1	70	90	5.5
9	0	0	0	50	80	5
10	0	0	0	50	80	5
11	0	0	0	50	80	5
12	0	0	0	50	80	5
13	-1.68	0	0	16.4	80	5
14	1.68	0	0	83.6	80	5
15	0	-1.68	0	50	69.067	5
16	0	1.68	0	50	94.267	5
17	0	0	-1.68	50	80	4.16
18	0	0	1.68	50	80	5.84

El análisis realizado permitió establecer un total de 18 experimentos necesarios para determinar los parámetros óptimos de pH, temperatura y tiempo de reacción del proceso de laqueado; los cuales se dividieron en dos grupos denominados bloques, considerando el día de ejecución.

3.3. Metodología y diseño Experimental

Para la ejecución de los 18 laqueados experimentales, se obtuvieron 100 Kg de extracto de cochinilla de la producción industrial de Carmín de la planta N°1 de procesos, de los cuales se destinaron 5 Kg por cada laqueado, y se guardaron 10 Kg en caso de error y necesidad de repetir algún experimento. La determinación del contenido de ácido carmínico en el extracto de cochinilla identificó una concentración de 0.73%; este valor corresponde al porcentaje de ácido carmínico extraído a partir de *Dactylopius coccus Costa* “Cochinilla” y debe ser considerado para calcular la cantidad de reactivos a adicionar durante el laqueado. Los factores de adición para los reactivos fueron determinados de manera empírica y establecidos como constantes por la empresa productora.

El flujo de proceso y puntos de control considerados en la producción de colorante carmín a nivel industrial, se muestran a continuación (Figura 3.1), y se comparan con el flujo de proceso y puntos de control considerados a nivel experimental (Figura 3.2). Así mismo se comparan el proceso de laqueado seguido actualmente a nivel industrial, y el proceso de laqueado aplicando el diseño experimental (Figuras 3.3 y 3.4)

Diagrama de Operaciones	Parámetros de Control	Analisis
<p>Cochinilla Seca</p> <p>↓</p> <p>Limpieza → Impurezas</p>	1.- Peso	1.- % AC
<p>↓</p> <p>Envasado</p> <p>↓</p> <p>Cochinilla Limpia</p>	1.- Peso	1.- % AC
<p>Agua Blanda Carbonato de Sodio →</p> <p>Extracción</p>	1.- Volumen 2.- pH 3.- Temperatura 4.- Tiempo	1.- % AC
<p>↓</p> <p>Tamizado → Cochinilla Agotada</p>	1.- Peso	1.- % AC
<p>Tierra Filtrante →</p> <p>Filtración → Impurezas</p>	1.- pH	1.- % AC
<p>Hidróxido de Sodio Sulfato de aluminio Cloruro de Calcio Acido Cítrico →</p> <p>Laqueado</p>	1.- pH 2.- Temperatura 3.- Tiempo	
<p>↓</p> <p>Enfriamiento</p>	1.- Temperatura	
<p>Acido Sulfúrico →</p> <p>Precipitación</p>	1.- pH	
<p>↓</p> <p>Filtración → Sobrenadante</p>	1.- Peso	
<p>↓</p> <p>Esterilización</p>		
<p>↓</p> <p>Secado</p>	1.- Peso 2.- Temperatura	
<p>↓</p> <p>Molienda</p>	1.- Peso	1.- % AC 2.- Color
<p>Diluyente →</p> <p>Mezcla</p> <p>↓</p> <p>Carmín</p>	1.- Peso	

Figura 3.1: Diagrama de Flujo y puntos de control para el proceso actualmente utilizado.

Diagrama de Operaciones	Parametros de Control	Análisis
<p style="text-align: center;">Extracto de Cochinilla</p> <p>Hidróxido de Sodio Sulfato de aluminio Cloruro de Calcio Acido Cítrico</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Laqueado</p>	<p>1.- pH</p> <p>1.- pH 2.- Temperatura 3.- Tiempo</p>	<p>1.- % AC</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Enfriamiento</p>	<p>1.- Temperatura</p>	
<p style="text-align: center;">↓</p> <p>Acido Sulfúrico</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Precipitación</p>	<p>1.- pH</p>	
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Filtración</p> <p style="text-align: right;">→ Sobrenadante</p>	<p>1.- Peso</p>	
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Secado</p>	<p>1.- Peso 2.- Temperatura</p>	
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Molienda</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Carmin</p>	<p>1.- Peso</p>	<p>1.- % AC 2.- Color 3.- Humedad</p>

Figura 3.2: Diagrama de Flujo y puntos de control para el proceso de laqueado a elaborar experimentalmente.

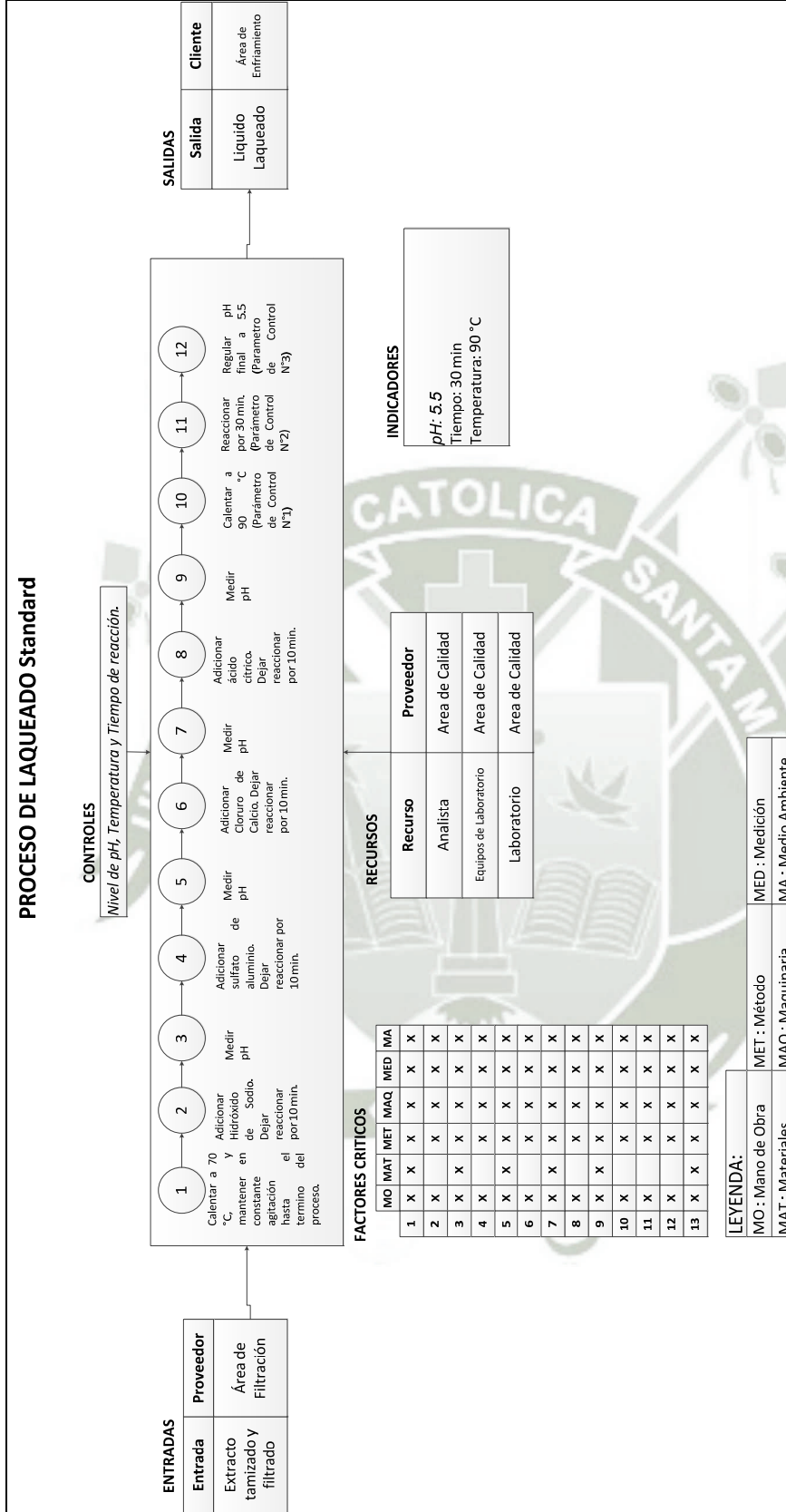


Figura 3.3: SIPOC actual del proceso de laqueado.

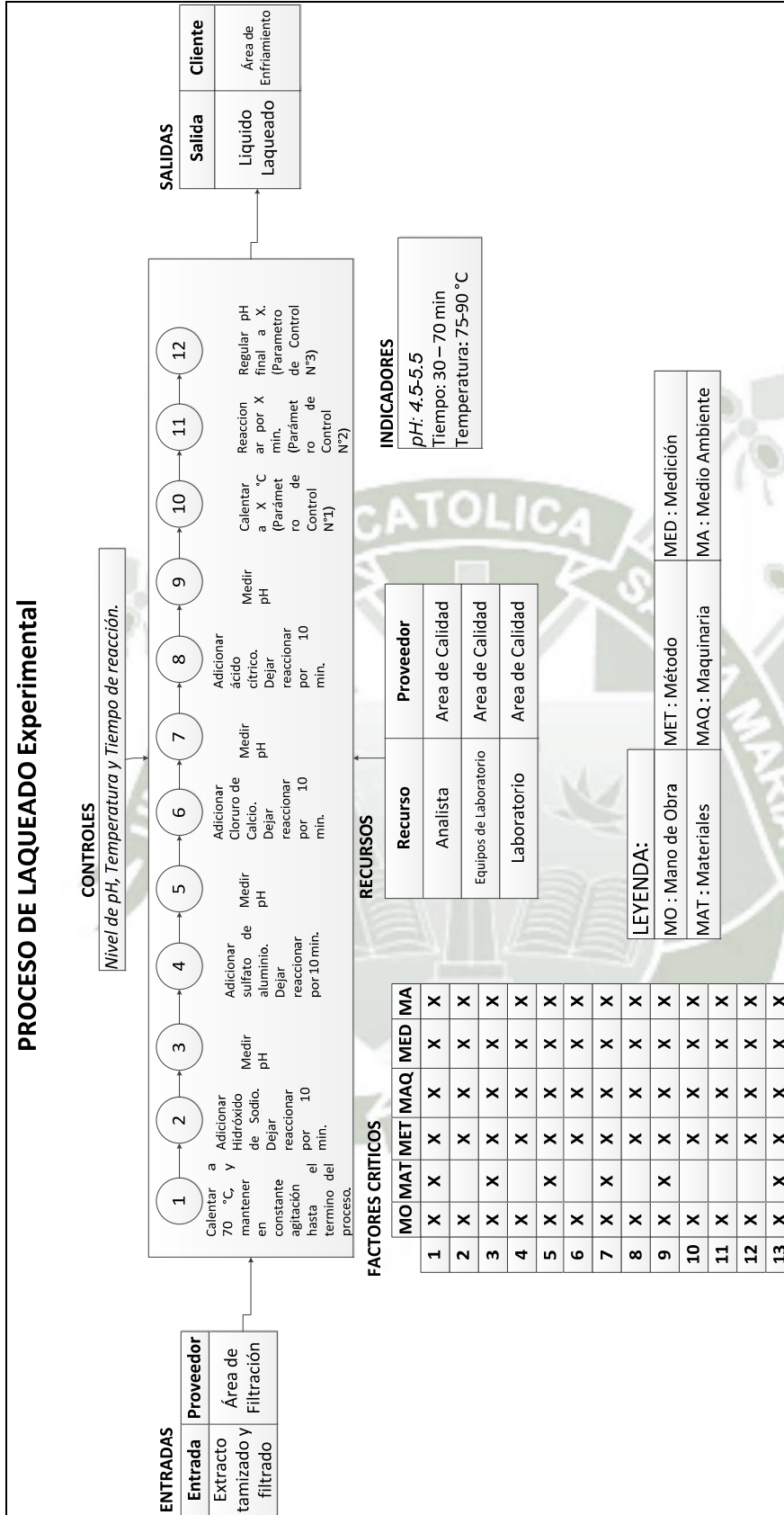


Figura 3.4: SIPOC del proceso de laqueado aplicando el diseño experimental.

Una vez adicionados todos los reactivos, se reguló la temperatura de reacción de acuerdo al diseño experimental establecido; así mismo el tiempo y pH final de reacción siguen el diseño experimental.

3.3.2. ENFRIAMIENTO

Finalizada la reacción, se transfiere el líquido laqueado a un balde plástico de 20 litros, el cual se enfrió hasta 28°C, sumergiéndolo en una tina con agua fría y bloques de hielo.

3.3.3. PRECIPITACION

A la solución fría se adicionó ácido sulfúrico diluido al 10%, hasta obtener un pH de 2.8 lo que generó la precipitación del carmín. Luego fue dejado en reposo por 30 minutos.

3.3.4. FILTRACION

La solución precipitada fue filtrada por gravedad utilizando una tela de filtración, esta operación demoró aproximadamente 4 horas y permitió obtener una pasta de carmín, la cual fue recolectada cuidadosamente utilizando una cuchara; como medida de control se registró el peso de las pastas obtenidas. Los líquidos residuales fueron recolectados y devueltos a la planta producción industrial.

3.3.5. SECADO

Las muestras de pasta de carmín se cargaron en bandejas de acero inoxidable y se enviaron a un secador de bandejas rotativo, para el secado uniforme a una temperatura de 60°C, hasta que la humedad final sea menor de 10%. Finalmente se recolectó el carmín seco en bolsas de polietileno previo enfriamiento y se registró el peso total.

3.3.6. MOLIENDA.

Las muestras de carmín seco fueron molidas en morteros de porcelana, y tamizadas en una malla N° 200 ASTM para asegurar el mismo tamaño de partícula.

Una vez obtenidas todas las muestras de carmín en polvo, se llevaron a laboratorio para analizar el porcentaje de Acido carmínico y Color.

3.4. Metodología de Análisis Físico químico

3.4.1. Análisis de Acido Carmínico en Carmín (Método FCCII)

- Se calculó la cantidad de muestra a pesar de acuerdo al contenido de acido carmínico estimado, utilizando la siguiente fórmula:

$$W = \frac{Abs * 100}{13.9 * \%AC} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde:

W = Peso (g.)

Abs = Absorbancia (0.7)

%AC = Porcentaje de Acido Carmínico teórico

- Se debe pesar con precisión en una balanza analítica.
- La muestra pesada, se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y añadir 30 ml de HCl 2N y aproximadamente 100 ml de agua destilada.
- Se calentó la solución con agitación constante, y se dejó hervir por 10 minutos.
- Posteriormente se enfrió hasta 20°C
- La solución fría, se transfirió a una fiola de 1000 ml y se completó el volumen con agua destilada, homogenizando mediante agitación.
- Se procedió a filtrar la solución resultante al vacío utilizando como medio de filtración el papel de filtración Lenta
- La solución filtrada, se colocó en una celda del espectrofotómetro. Utilizando como blanco agua destilada o desionizada.
- La absorbancia fue leída a 494 nm de longitud de onda. Es importante que el rango de absorbancia para FCCII sea de 0.68 a 0.72.

Cálculos:

$$\% AC = \frac{Abs * 100}{13.9 * W} \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde:

W = Peso (g.)

Abs = Absorbancia

%AC = Porcentaje de Acido Carmínico

3.4.2. Análisis de color en carmín en polvo

- Se pesó 25 g. de talco americano en los pocillos de vidrio para licuadora.
- Se calculó la cantidad a pesar según la siguiente ecuación basada en la concentración de ácido carmínico (FCCII)

$$W = \frac{13}{\%AC} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde:

W = Peso Carmín (g.)

%AC = Porcentaje de Acido Carmínico

- La muestra pesada se transfiere a los pocillos de vidrio para licuadora que contienen el talco americano.
- Se homogenizó la mezcla utilizando la licuadora a alta velocidad por 10 segundos, y en tres tiempos, deteniéndose para homogenizar manualmente.
- Se transfirió la mezcla homogénea a la luna óptica del fotolorímetro
- Finalmente se leyeron los resultados de color utilizando el fotolorímetro Minolta CR-400, previamente calibrado.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. ANALISIS EXPERIMENTAL:

Debido a fluctuaciones en los resultados colorimétricos del proceso de producción de Carmín de cochinilla, es que surgió la necesidad de optimizar los parámetros de la etapa de laqueado, con el objetivo de reducir las variaciones mencionadas y permitir así diseñar un proceso de alta reproducibilidad y asegurar la obtención de un producto final de mejor calidad.

En una etapa inicial, se elaboró un diseño experimental para determinar los parámetros óptimos de pH, temperatura y tiempo de reacción en el proceso de laqueado. El plan de experimentación que se siguió y los resultados obtenidos a partir del análisis de ácido carmínico y del análisis de color en carmín, se muestran en la Tabla 4.1. Se utilizó la misma solución preparada durante el análisis de ácido carmínico para obtener la curva espectrofotométrica de las muestras.

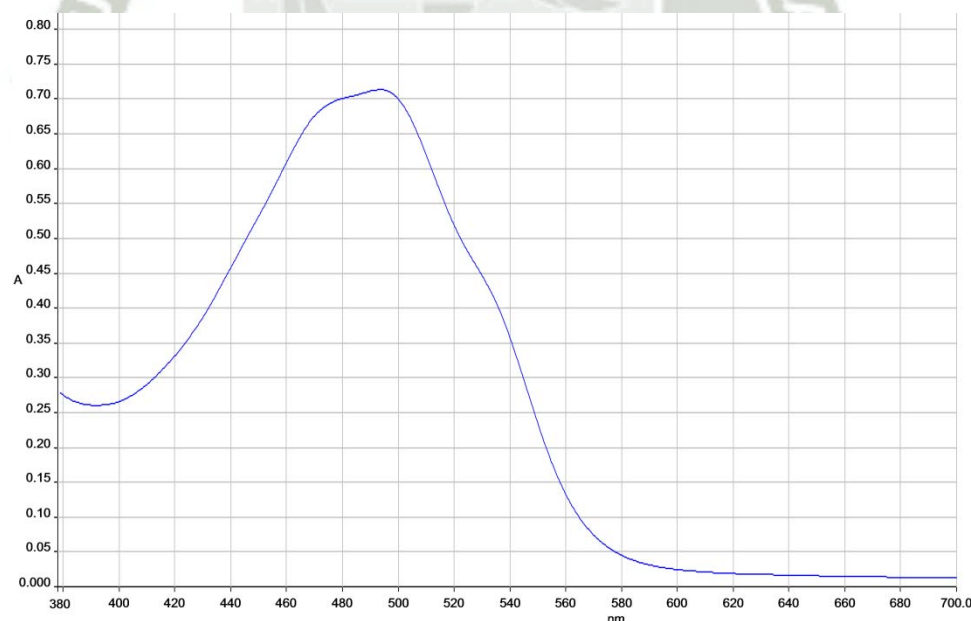


Figura 4.1: Espectro visible de solución de carmín en pH 7. La absorbancia a 494 nm es 0.7

Tabla 4.1: Plan de experimentación y Respuestas medidas

# Exp	PLAN DE EXPERIMENTACIÓN			RESPUESTAS					
	t(min)	T(°C)	pH	%AC	L*	a*	b*	H	Humedad
1	30	75	4.50	56.46	76.92	12.19	-1.07	354.99	6.46
2	70	75	4.50	56.39	74.52	14.53	-0.80	356.83	5.48
3	30	90	4.50	56.65	77.14	10.22	-0.52	357.11	7.78
4	70	90	4.50	55.40	74.99	15.06	-0.86	356.54	7.40
5	30	75	5.50	56.93	75.76	13.30	-0.98	355.79	7.54
6	70	75	5.50	55.84	74.81	14.14	-0.87	356.47	5.59
7	30	90	5.50	57.90	76.12	10.15	-0.35	358.62	6.63
8	70	90	5.50	55.32	74.28	14.90	-0.62	357.61	6.04
9	50	80	5.00	57.71	76.00	13.64	-0.95	356.01	6.91
10	50	80	5.00	56.23	74.36	14.27	-0.61	357.69	7.80
11	50	80	5.00	56.48	74.47	14.52	-0.51	357.97	6.24
12	50	80	5.00	57.90	74.55	13.38	-0.54	357.69	3.40
13	16.40	80	5.00	57.93	74.69	12.50	-0.77	356.46	6.13
14	83.60	80	5.00	57.47	73.77	14.39	-0.94	356.26	5.15
15	50	69.07	5.00	57.27	73.77	14.07	-0.85	356.53	6.15
16	50	94.27	5.00	54.86	72.80	15.15	-0.59	357.74	4.20
17	50	80	4.16	57.91	74.32	13.39	-1.21	354.83	3.83
18	50	80	5.84	56.01	77.00	9.85	-0.87	354.96	8.37

* Bloque 1: Azul // Bloque 2: Amarillo.

Los tratamientos de la matriz, se dividieron en grupos denominados “bloques”, teniendo en cuenta el día de ejecución, y fueron realizados de manera aleatoria.

Las diferentes tonalidades de carmín obtenidas bajo diferentes condiciones de laqueado son comparadas en la Figura 4.2.

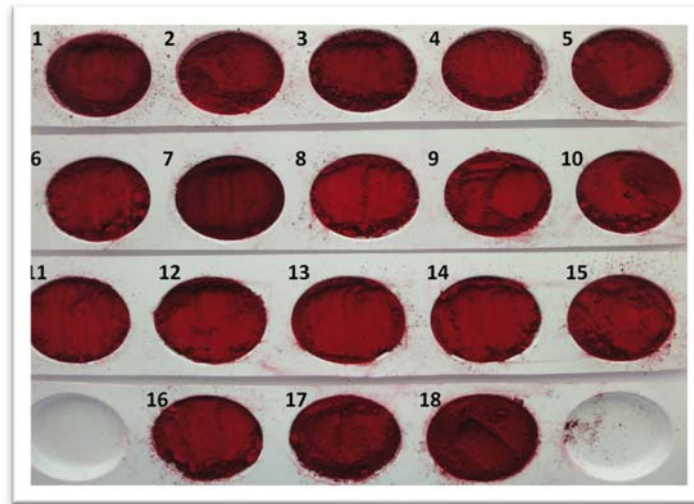


Figura 4.2: Carmines obtenidos bajo diferentes condiciones de laqueo.

2. ANALISIS ESTADISTICO:

A partir de los resultados obtenidos en el análisis experimental, y mediante el Software Statgraphics se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Primero se determinó el contenido de ácido carmínico promedio y el límite de confianza, en las muestras de colorante carmín obtenidas bajo diferentes condiciones de laqueado; como se muestra en la Tabla 4.2 el porcentaje de ácido carmínico fue de 56.70 +/- 0.489458, oscilando entre un mínimo de 54.86% y un máximo de 57.93%, presentando una distribución normal.

Tabla 4.2: Medidas de dispersión para % de Ácido carmínico de Carmín

Recuento	18
Promedio	56.7033 +/- 0.489458
Desviación Estándar	0.9842
Mínimo	54.86
Máximo	57.93

Prosiguiendo con el análisis y con la finalidad de poder optimizar los parámetros de tiempo (A), temperatura (B) y pH (C) se realizó un diseño factorial 2^3 el cual permitió evaluar el comportamiento del producto según el método “L*a*b* color space” también conocido como CIELAB, siendo L*, a*, b* y hue (H), las respuestas reportadas en la Tabla 4.3

Tabla 4.3: Matriz del diseño factorial 2^3 para la producción de carmín de cochinilla

Tratamientos	FACTORES			RESPUESTAS			
	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	pH	L*	a*	b*	H
1	30	75	4.5	76.92	12.19	-1.07	354.99
2	70	75	4.5	74.52	14.53	-0.8	356.83
3	30	90	4.5	77.14	10.22	-0.52	357.11
4	70	90	4.5	74.99	15.06	-0.86	356.54
5	30	75	5.5	75.76	13.3	-0.98	355.79
6	70	75	5.5	74.81	14.14	-0.87	356.47
7	30	90	5.5	76.12	10.15	-0.35	358.62
8	70	90	5.5	74.28	14.9	-0.62	357.61
9	50	80	5	76.00	13.64	-0.95	356.01
10	50	80	5	74.36	14.27	-0.61	357.69
11	50	80	5	74.47	14.52	-0.51	357.97
12	50	80	5	74.55	13.38	-0.54	357.69

2.1. Análisis de Respuesta en L*

Debido a que el parámetro L* no es un parámetro de calidad en la producción de carmín, no se buscó optimizar esta respuesta, aun así se evaluó su comportamiento bajo la influencia de los parámetros tiempo, temperatura y pH.

Se observó que “L*” osciló entre un valor de 74.28 y 77.14, en la gráfica de efectos principales mostrados en la Figura 4.3 (a) se observa que “L*” sufre una mayor variación cuando el factor tiempo pasa de 30 a 70 minutos y el factor pH pasa de 4.5 a 5.5 respectivamente, no viéndose fuertemente afectado por el factor de temperatura el cual sólo permite una variación de 75.04 a 75.43. Así mismo, en la Figura 4.3 (b) se grafica la no interacción entre los factores Tiempo (A), Temperatura (B) y pH (C).

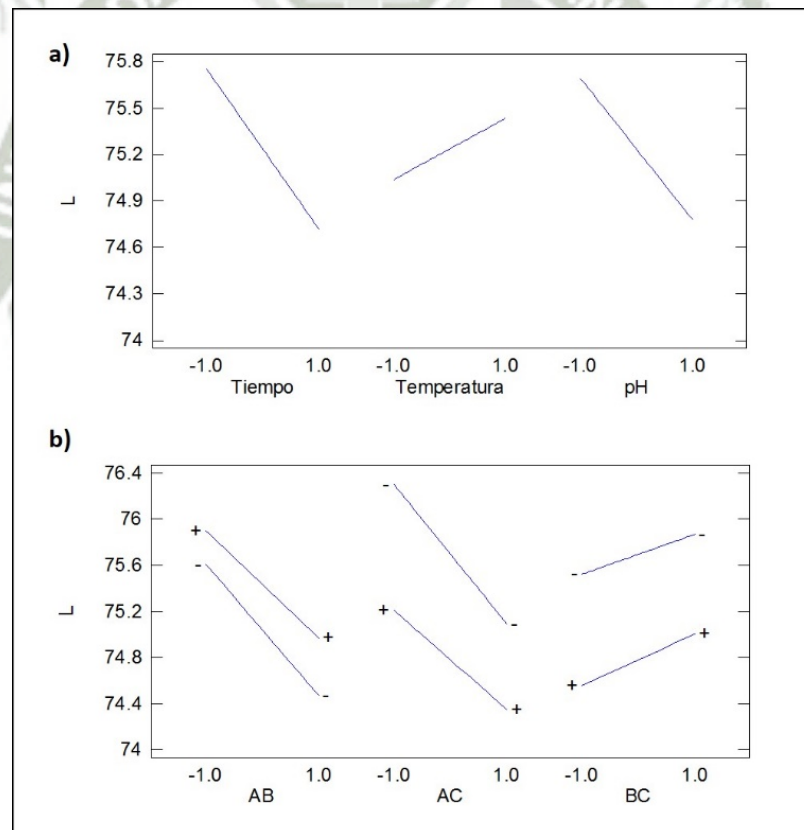


Figura 4.3: Gráfica de efectos para “L*”. a) Efectos principales, b) Interacciones.

El comportamiento del parámetro “L*”, se confirmó con las superficies de respuesta construidas y mostradas en la Figura 4.4, en las cuales se observó un máximo valor de “L*” cuando los tiempos de reacción eran menores, en este caso 30 minutos; así mismo en la figura 4.4 (b) se muestra una inclinación hacia abajo del plano cuando el pH pasa de 4.5 a 5.5 disminuyendo el valor de “L*”, sin embargo dicho parámetro de color se mantiene en su valor más bajo cuando se varia la temperatura. Figura 4.4 (c).

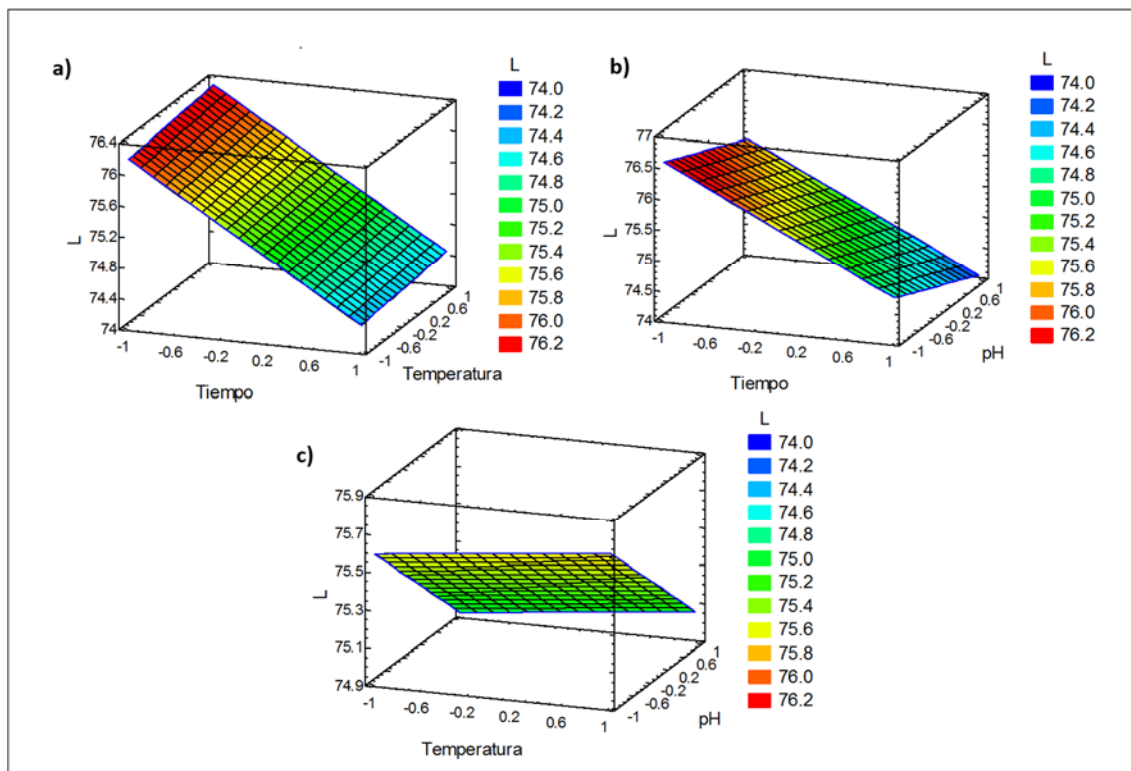


Figura 4.4: Superficies de respuesta del parámetro “L*”. Superficies de respuesta frente a los factores a) Tiempo y Temperatura, b) Tiempo y pH y c) Temperatura y pH.

2.2. Análisis de Respuesta en a*

Continuando con el análisis y con la finalidad de estandarizar el producto final, se optimizó en “a*”, puesto que es considerado un parámetro de calidad del carmín de

cochinilla. Para ello se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mostrado en la Tabla 4.4, el cual permitió identificar al factor Tiempo (A), Temperatura (B), la interacción Tiempo-temperatura (AB) y los bloques como efectos que fueron significativos en el comportamiento de “a*”, así mismo se registró un valor de R² de 94.7353 y un R² ajustado de 88.4177. Sin embargo la prueba de falta de ajuste realizada, indicó que fue necesario refinar el modelo matemático construido y mostrado en la ecuación 4.1 debido a la presencia de falta de ajuste.

$$a = 13.4554 + 1.15964 *Tiempo - 0.624286 *Temperatura + 0.206786 *pH + 0.655714 *Tiempo *Temperatura - 0.0532143 *Tiempo *pH - 0.264286 *Temperatura *pH \quad \text{Ec. 4.1}$$

Tabla 4.4: Análisis de varianza para la respuesta “a*”

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo+bloque	5.47689	1	5.47689	168.39	0.0059
B:Temperatura+bloq	2.81613	1	2.81613	86.58	0.0114
C:pH+bloque	0.308978	1	0.308978	9.50	0.0911
AB+bloque	3.10682	1	3.10682	95.52	0.0103
AC+bloque	0.0204618	1	0.0204618	0.63	0.5108
BC+bloque	0.5047	1	0.5047	15.52	0.0588
Bloques	1.58149	9	0.175721	48.62	0.0200
Falta de ajuste	1.56845	2	0.784227	24.11	0.0398
Error puro	0.06505	2	0.032525		
Total (corr.)	31.0276	11			

R²=94.7353, R² ajustado = 88.4177.

Eliminando los términos no significativos y buscando el máximo valor de R² ajustada (90.2272) se consiguió la ecuación 4.2 en la cual se excluyó el término AC. El análisis de

varianza del modelo refinado se muestra en la Tabla 4.5 en el cual se identifica nuevamente al factor Tiempo (A), Temperatura (B), la interacción Tiempo-temperatura (AB) y los bloques como efectos significativos en el comportamiento de “a*” (Figura 4.5), a diferencia del modelo inicial, el nuevo modelo refinado (Ecuación 4.2) muestra una no significancia para la prueba de falta de ajuste indicando la buena adecuación del modelo.

$$a = 13.4588 + 1.14419 *Tiempo - 0.629435 *Temperatura + 0.211935 *pH + 0.650565 *Tiempo *Temperatura - 0.269435 *Temperatura *pH \quad \text{Ec. 4.2}$$

Tabla 4.5: Análisis de varianza para el modelo refinado de primer orden de la respuesta “a*”

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo+bloque	5.59787	1	5.59787	172.11	0.0058
B:Temperatura+bloq	2.88985	1	2.88985	88.85	0.0111
C:pH+bloque	0.327627	1	0.327627	10.07	0.0866
AB+bloque	3.08712	1	3.08712	94.92	0.0104
BC+bloque	0.52952	1	0.52952	16.28	0.0563
Bloques	1.87704	1	1.87704	57.71	0.0169
Falta de ajuste	1.58892	3	0.529638	16.28	0.0584
Error puro	0.06505	2	0.032525		
Total (corr.)	31.0276	11			

$R^2 = 94.6694$, R^2 ajustado = 90.2272.

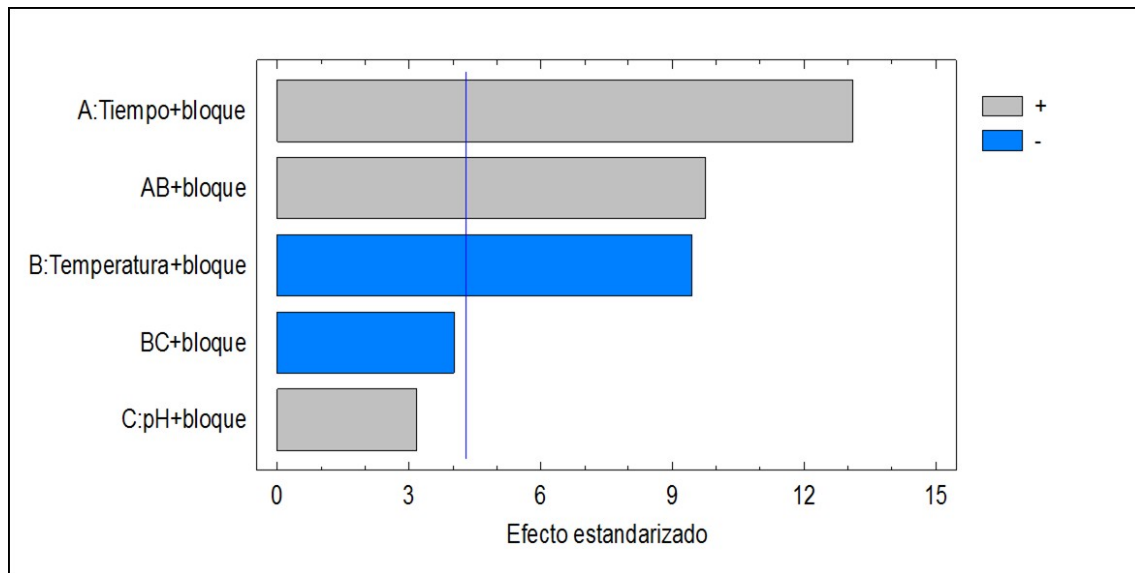


Figura 4.5: Diagrama de Pareto para los efectos de los factores sobre el parámetro de color “a*”.

Con la gráfica de efectos mostrada en la Figura 4.6 se pudo identificar y confirmar que el factor Tiempo(A) genera un efecto positivo, es decir al pasar de 30 minutos a 70 minutos el valor de “a*” pasa de 12.30 a 14.58 respectivamente, de igual manera pero de forma no significativa, el factor pH (C) presenta un efecto positivo sobre el indicador de color. El factor Temperatura (B), por el contrario, como efecto aislado, cuando pasa de 75°C a 90°C genera una disminución de “a*” de 14.07 a 12.83 siendo significativo en el análisis junto con la interacción Tiempo-Temperatura (AB), la cual cuando el factor temperatura (B) está en su valor bajo y Tiempo (A) pasa de 30 a 70 minutos se observa un cambio de 13.5 a 14.57, a diferencia de si el factor Temperatura (B) se fija en 90°C y el factor Tiempo (A) pasa de su nivel bajo al alto la respuesta varía de 11.02 a 14.60, un incremento en aproximadamente 3 unidades.

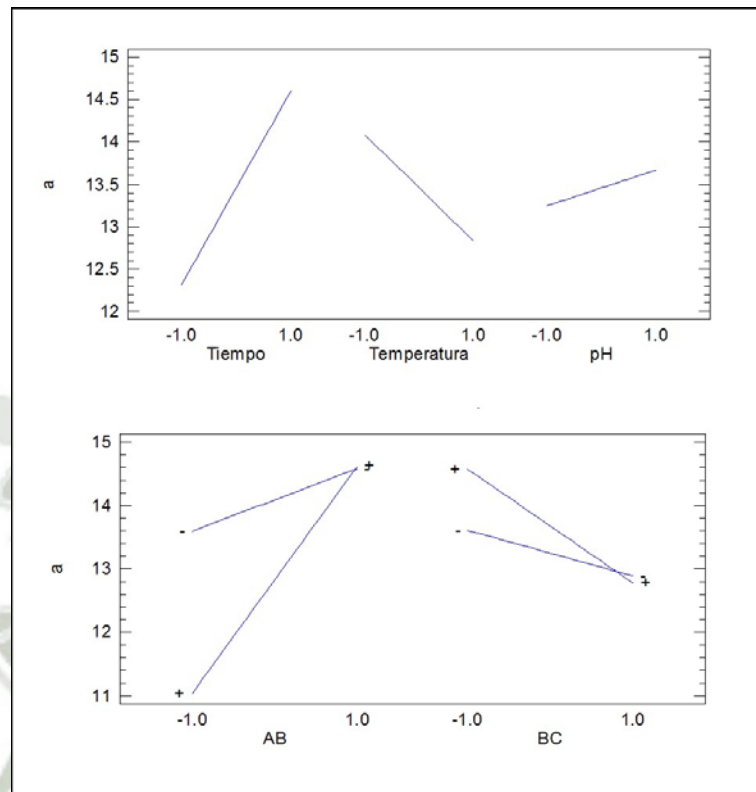


Figura 4.6: Gráfica de efectos para el parámetro “ a^* ”. a) Efectos principales, b) Interacciones.

Las superficies de respuesta construidas (Figura 4.7) muestran claramente los efectos mencionados, se puede observar en a) la inflexión característica debido a la interacción AB correspondiente a los factores Tiempo y Temperatura, con su respectiva gráfica de contornos; el factor Tiempo y pH por su parte generan una respuesta lineal esperándose que por fuera de ésta región a mayores tiempos se encuentre una mayor respuesta de “ a^* ”. Por el contrario la combinación de factores temperatura y pH, muestran valores alrededor de 14 a menores temperaturas y mayor pH.

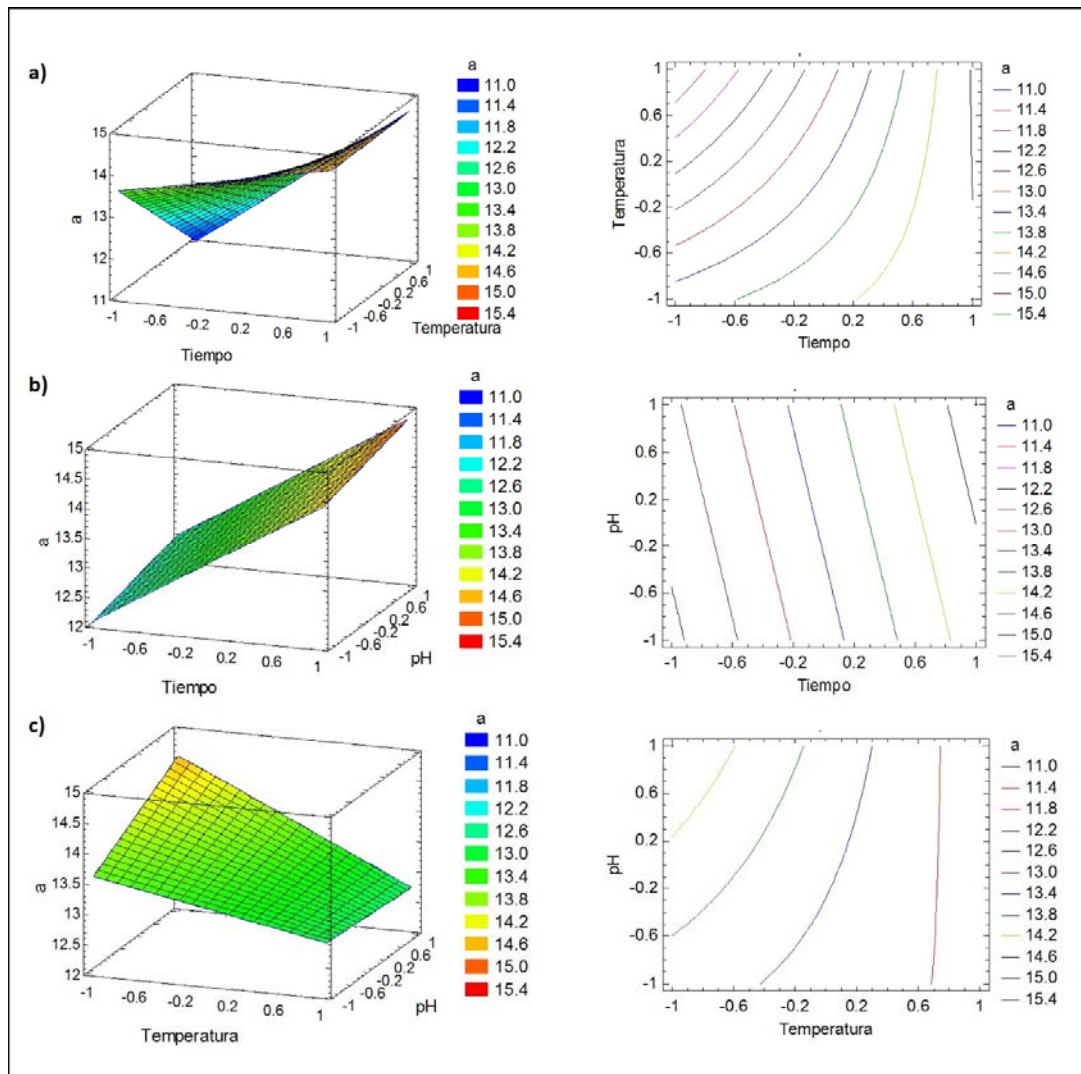


Figura 4.7: Superficies de respuesta y gráficas de contornos de “a*”. Superficies de respuesta frente a los factores a) Tiempo y Temperatura, b) Tiempo y pH y c) Temperatura y pH.

Todo ello pareciera indicar que a mayores tiempos y temperaturas, o a menor temperatura y mayor tiempo se podría alcanzar un valor aun mayor de “a*” de lo que se observó hasta el momento con la matriz mostrada en la Tabla 4.1; por ello y con el objetivo de optimizar la respuesta se incrementó puntos axiales para poder construir un modelo de segundo orden, es importante aclarar que no se realizó el camino de máximo ascenso ni viceversa puesto que el proceso de manufactura en sí mismo ofrece limitantes en los valores que

podrían tomar los factores, siendo 94°C el limitante superior para temperatura, el tiempo que se buscaría sea el menor posible y un pH no mayor a 5.5, por ello es que el modelo sólo fue incrementado con puntos axiales que permiten explorar por fuera de la región pero sin exceder los límites antes expuestos resultando una matriz incrementada (Tabla 4.6) para la construcción de un diseño central compuesto (DCC)

Tabla 4.6: Matriz del diseño central compuesto para la producción de carmín de cochinilla

Tratamientos	FACTORES			RESPUESTAS			
	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	pH	L*	a*	b*	H
1	30	75	4.5	76.92	12.19	-1.07	354.99
2	70	75	4.5	74.52	14.53	-0.8	356.83
3	30	90	4.5	77.14	10.22	-0.52	357.11
4	70	90	4.5	74.99	15.06	-0.86	356.54
5	30	75	5.5	75.76	13.3	-0.98	355.79
6	70	75	5.5	74.81	14.14	-0.87	356.47
7	30	90	5.5	76.12	10.15	-0.35	358.62
8	70	90	5.5	74.28	14.9	-0.62	357.61
9	50	80	5	76.00	13.64	-0.95	356.01
10	50	80	5	74.36	14.27	-0.61	357.69
11	50	80	5	74.47	14.52	-0.51	357.97
12	50	80	5	74.55	13.38	-0.54	357.69
13	16.4	80	5	74.69	12.50	-0.77	356.46
14	83.6	80	5	73.77	14.39	-0.94	356.26
15	50	69.067	5	73.77	14.07	-0.85	356.53
16	50	94.267	5	72.8	15.15	-0.59	357.74
17	50	80	4.16	74.32	13.39	-1.21	354.83
18	50	80	5.84	77.00	9.85	-0.87	354.96

El análisis de varianza (ANOVA) realizado para el modelo de segundo orden se muestra en la Tabla 4.7, con ella se pudo identificar que los efectos de Tiempo (A), pH (C), la interacción Tiempo-Temperatura (AB), efecto cuadrático de temperatura (BB) y el efecto cuadrático de pH (CC) fueron significativos sobre la respuesta observada de “a*”. El modelo ajustado mostró un R^2 de 77.8524 % y un R^2 ajustada de 52.9363 %, con una falta de ajuste significativa. El error estándar fue 0.180347 y el estadístico Durbin-Watson mostró un $p > 0.05$ indicando la no correlación serial de los residuos del modelo.

Tabla 4.7: Análisis de varianza para el modelo de segundo orden de la respuesta “a*”

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo+bloque	11.8947	1	11.8947	365.71	0.0027
B:Temperatura+bloq	0.229013	1	0.229013	7.04	0.1175
C:pH+bloque	2.03301	1	2.03301	62.51	0.0156
AA+bloque	0.593316	1	0.593316	18.24	0.0507
AB+bloque	5.17814	1	5.17814	159.20	0.0062
AC+bloque	0.384989	1	0.384989	11.84	0.0751
BB+bloque	0.628453	1	0.628453	19.32	0.0481
BC+bloque	0.0633542	1	0.0633542	1.95	0.2976
CC+bloque	9.22396	1	9.22396	283.60	0.0035
Bloques	0.0978379	1	0.0978379	3.01	0.2250
Falta de ajuste	10.7472	5	2.14944	66.09	0.0150
Error puro	0.06505	2	0.032525		
Total (corr.)	48.819	17			

$R^2 = 77.8524 \%$, R^2 (ajustada por g.l.) = 52.9363 %.

La ecuación 4.3 para el modelo de segundo orden se muestra a continuación

$$a = 13.9617 + 1.24301 *Tiempo - 0.131817 *Temperatura - 0.389134 *pH - 0.21972 *Tiempo^2 + 0.828372 *Tiempo *Temperatura - 0.225872 *Tiempo *pH + 0.231488 *Temperatura^2 - 0.0916276 *Temperatura *pH - 0.866333 *pH^2$$

Ec. 4.3

Para poder mejorar el valor de R^2 ajustada se refinó el modelo de segundo orden, eliminando los efectos no significativos, obteniendo un nuevo Análisis de varianza mostrado en la Tabla 4.8. En dicha tabla se muestra los efectos Tiempo (A), Temperatura (B), pH (C), la interacción Tiempo-Temperatura (AB) y el efecto cuadrático de pH (CC) y el efecto de los bloques que permanecieron en el modelo luego de su refinado con lo cual se obtuvo un R^2 de 73.9934 % y un R^2 ajustada de 63.1573 %, con una falta de ajuste no significativa, es decir con un modelo adecuado que describe los datos obtenidos. El error estándar del estimado fue de 0.53175 y el estadístico Durbin-Watson mostró un $p > 0.05$ indicando la no correlación serial de los residuos del modelo.

Tabla 4.8: Análisis de varianza para el modelo de segundo orden refinado de la respuesta “a”

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	18.6334	1	18.6334	65.90	0.0039
B:Temperatura	0.297743	1	0.297743	1.05	0.3803
C:pH	2.18259	1	2.18259	7.72	0.0691
AB	5.13601	1	5.13601	18.16	0.0237
CC	9.87309	1	9.87309	34.92	0.0097
Falta de ajuste	11.8479	9	1.31643	4.66	0.1163
Error puro	0.848275	3	0.282758		
Total (corr.)	48.819	17			

$R^2 = 73.9934 \%$, R^2 (ajustada por g.l.) = 63.1573 %.

La ecuación refinada para el modelo de segundo orden se muestra en la ecuación 4.4

$$a = 13.96 + 1.16859 *Tiempo - 0.147719 *Temperatura - 0.399947 *pH + 0.80125 *Tiempo *Temperatura - 0.852394 *pH^2 \quad \text{Ec. 4.4}$$

En el diagrama de pareto de la Figura 4.8, se muestra al efecto Tiempo (A), efecto cuadrático de pH (CC) y la interacción Tiempo-Temperatura (AB), como los efectos que permanecieron en el modelo refinado y que son estadísticamente significativos para el comportamiento de “a*”,

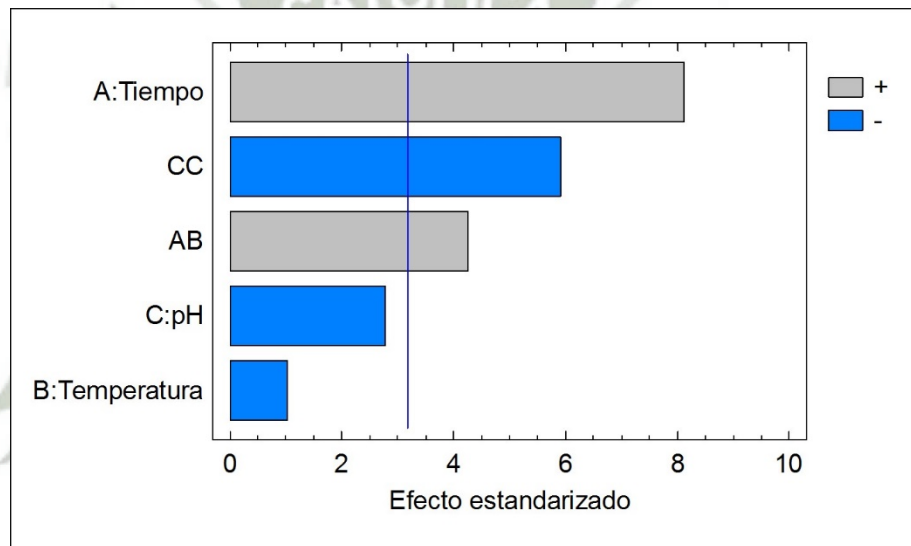


Figura 4.8: Diagrama de pareto para el modelo refinado de segundo orden de a*.

En la Figura 4.9 de efectos principales e interacciones del modelo de segundo orden refinado se puede observar que a diferencia del modelo de primer orden analizado para la respuesta de “a*”, el factor pH (C) presenta un efecto cuadrático sobre dicha respuesta, así mismo se observa la fuerte interacción entre el Tiempo y la Temperatura (AB), en la cual cuando la Temperatura permanece en su valor bajo y el tiempo pasa de 30 minutos a 70 minutos se obtiene un valor de “a*” que pasa de 13.73 a 14.47, sin embargo cuando la temperatura permanece en 90°C y el tiempo varía de 30 minutos a 70 minutos se obtiene

un valor de “a*” que va desde 11.85 hasta un 15.76, siendo este un incremento en aproximadamente 4 unidades.

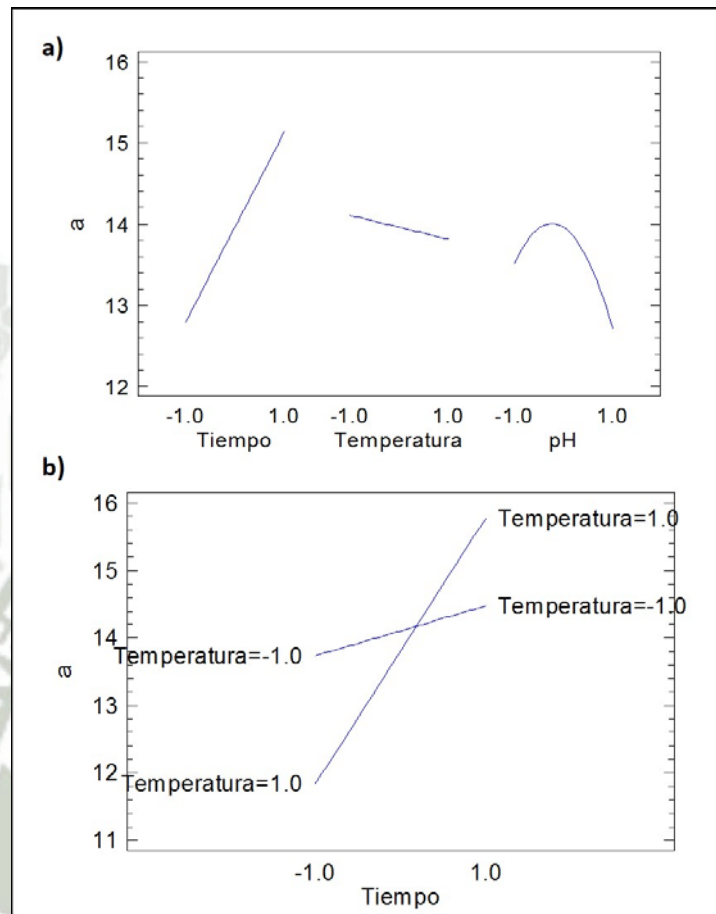


Figura 4.9: Gráfica de efectos para el modelo refinado de segundo orden de la respuesta “a*”. a) Efectos principales, b) Interacciones.

Con las superficies de respuesta construidas mostradas en la Figura 4.10 y las graficas de contornos de la Figura 4.11 correspondientes al modelo refinado de segundo orden para la respuesta “a*”, se confirmó que la interacción Tiempo-Temperatura (AB) genera una variación en “a*”, obteniéndose a mayor tiempo y temperatura, 83 minutos y 94°C respectivamente, una respuesta de “a*” de aproximadamente 16 unidades a más.

Así mismo se logró identificar la curvatura que genera el factor pH(C) en nuestra respuesta identificando un mayor valor de “a*” a pHs entre el rango de -0.6 y 0.6 en variable codificada, equivalente a 4.7 y 5.3 en variable real.

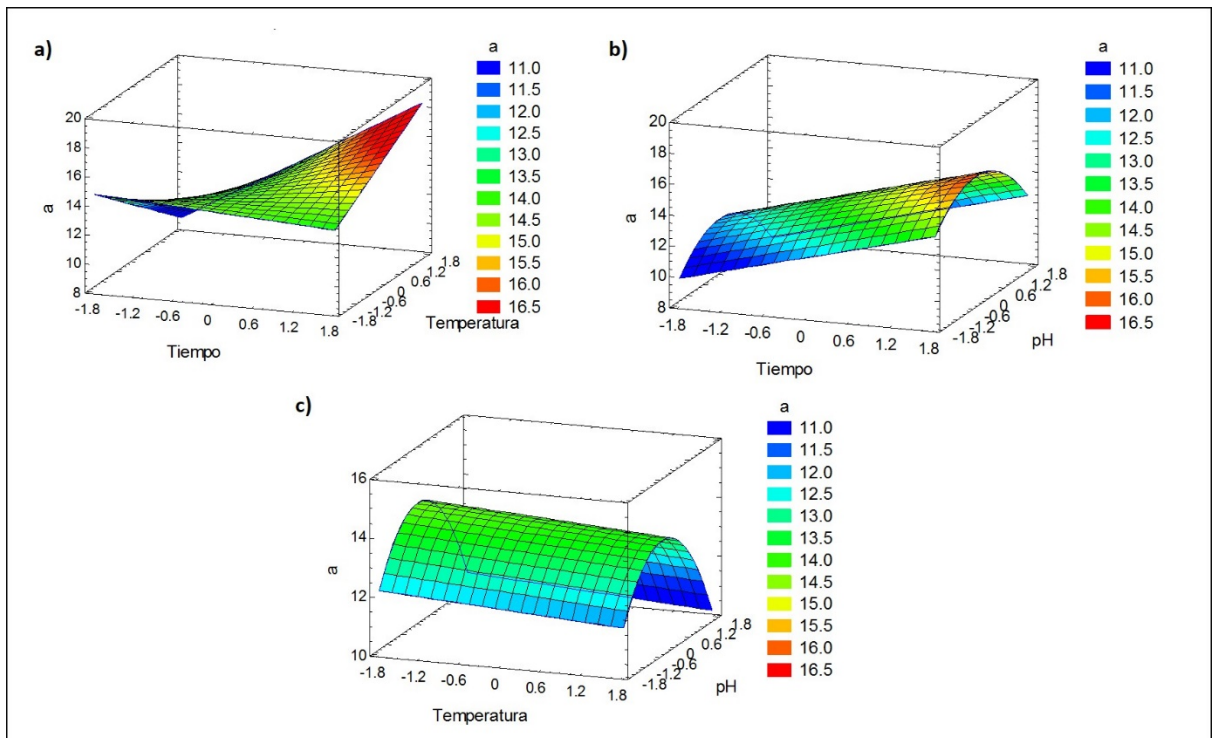


Figura 4.10: Superficie de respuesta del modelo de segundo orden refinado de a^* . Superficies de respuesta frente a los factores a) Tiempo y Temperatura, b) Tiempo y pH y c) Temperatura y pH.

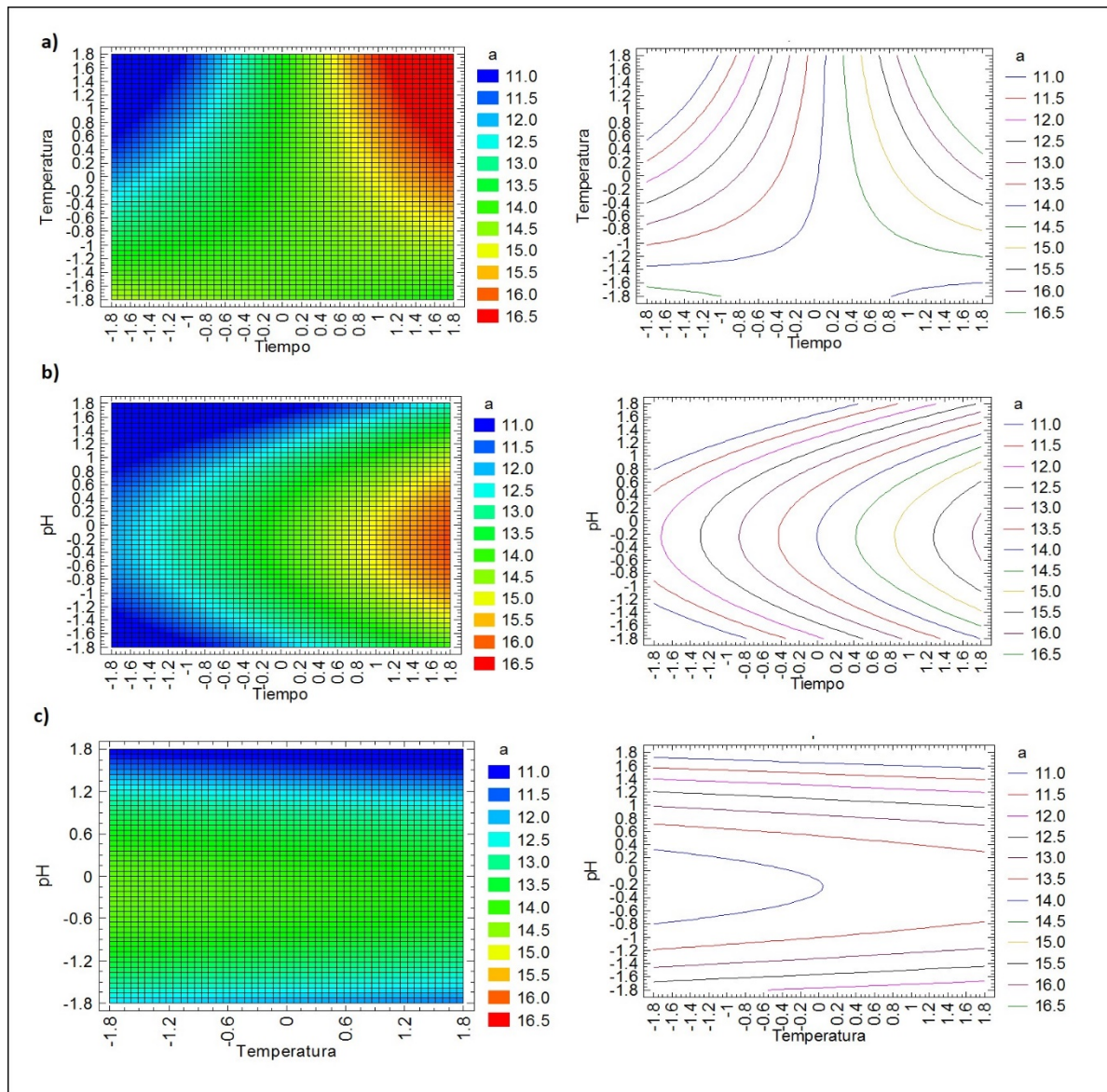


Figura 4.11: Gráfica de contornos del modelo de segundo orden refinado de a^* . Factores a) Tiempo y Temperatura, b) Tiempo y pH y c) Temperatura y pH.

Para la optimización de respuesta realizada se seleccionó los límites de la región sobre la cual se buscó optimizar el valor de " a^* ", tal y como se detalla en la Tabla 4.9; obteniendo un valor óptimo de " a^* " de 17.9805 a 83.6 minutos, 94°C y 4.8 de pH.

Tabla 4.9: Optimización de respuesta para a*.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo	
			V. Codificada	V. Real
Tiempo	1.2	1.68	1.6799	83.59
Temperatura	0.4	1.68	1.6800	94
pH	-0.6	0.6	-0.2344	4.8

2.3. Análisis de respuesta en b*

Siguiendo el mismo proceso de análisis se buscó optimizar el valor de “b*”, para ello se construyó un modelo inicial de primer orden en base a los resultados mostrados en la Tabla 4.1, identificándose un valor de R^2 de 81.1637 y un R^2 ajustado de 58.5601 con un error de 0.211009 (Tabla 4.10). La prueba de falta de ajuste indicó una buena adecuación del modelo, construyéndose la ecuación inicial 4.5 que describe los datos.

Tabla 4.10: Análisis de varianza para la respuesta “b*”

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo+bloque	0.0482455	1	0.0482455	1.08	0.4072
B:Temperatura+bloq	0.150989	1	0.150989	3.39	0.2069
C:pH+bloque	0.0467627	1	0.0467627	1.05	0.4132
AB+bloque	0.16355	1	0.16355	3.67	0.1953
AC+bloque	0.00172402	1	0.00172402	0.04	0.8622
BC+bloque	0.00351434	1	0.00351434	0.08	0.8052
Bloques	0.0532149	1	0.0532149	1.20	0.3884
Falta de ajuste	0.0177268	2	0.00886339	0.20	0.8340
Error puro	0.08905	2	0.044525		
Total (corr.)	0.566867	11			

$R^2 = 81.1637 \%$, R^2 (ajustada por g.l.) = 58.5601% .

$$b = -0.705536 - 0.108839 *Tiempo + 0.144554 *Temperatura + 0.0804464 *pH - 0.150446 *Tiempo *Temperatura + 0.0154464 *Tiempo *pH + 0.0220536 *Temperatura *pH$$

Ec. 4.5

El modelo inicialmente construido fue refinado eliminando términos no significativos obteniendo la ecuación 4.6 y el nuevo análisis de varianza mostrado en la Tabla 4.11, el cual señala a los factores Temperatura (B) y a la interacción Tiempo-Temperatura (AB) como significativos. Así mismo se logró mejorar el valor de R^2 y de R^2 ajustado a 80.14% y 68.80% , con un error de 0.1369 , la prueba de Durbin-Watson con un $p > 0.05$ indicó la no correlación de los residuos del modelo.

$$b = -0.705147 - 0.110588 *Tiempo + 0.143971 *Temperatura + 0.0810294 *pH - 0.151029 *Tiempo *Temperatura \quad \text{Ec. 4.6}$$

Tabla 4.11: Análisis de varianza para el modelo refinado de primer orden de la respuesta b*

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo+bloque	0.0545327	1	0.0545327	2.91	0.1391
B:Temperatura+bloq	0.152375	1	0.152375	8.12	0.0292
C:pH+bloque	0.0482672	1	0.0482672	2.57	0.1598
AB+bloque	0.167683	1	0.167683	8.94	0.0243
Bloques	0.0674711	1	0.0674711	3.60	0.1067
Falta de ajuste	0.0177268	4	0.0058739	0.13	0.9564
Error total	0.112546	2	0.0187576		
Total (corr.)	0.566867	11			

$R^2 = 80.146 \%$, R^2 (ajustada por g.l.) = y 68.8009% .

La Figura 4.12 muestra el comportamiento de la respuesta frente a los factores, identificándose que el factor Tiempo al pasar de 30 a 70 minutos produce un descenso en la respuesta “b*” haciéndolo variar entre -0.6 y -0.8 aproximadamente, sin embargo y de manera opuesta los factores Temperatura y pH al pasar de sus niveles bajos a altos generan que el indicador “b*” se incremente y tome valores mayores, tal es el caso de la temperatura que genera un cambio entre -0.85 y -0.55 aproximadamente.

En el caso de la fuerte interacción mostrada Tiempo-Temperatura se puede observar que cuando la temperatura se mantiene en 90°C y el tiempo pasa de 30 a 70 minutos se genera un fuerte descenso del valor de “b*” el cual pasa de -0.29 a -0.82 aproximadamente , a diferencia de mantener la temperatura en 70°C y hacer variar el tiempo nuestra respuesta crece ligeramente pasando de -0.88 a -0.80 aproximadamente, evidenciando por tanto un mejor valor de “b*” a mayor temperatura y menor tiempo.

Las superficies de respuestas construidas y mostradas en la Figura 4.13, sugieren que si se continúa incrementando la temperatura y, disminuye el tiempo podríamos obtener un valor de “b*” cercano a 0, por ello, y con el fin de optimizar la respuesta fue que se incrementaron puntos en la matriz construida para desarrollar un diseño central compuesto mostrado en la Tabla 4.6.

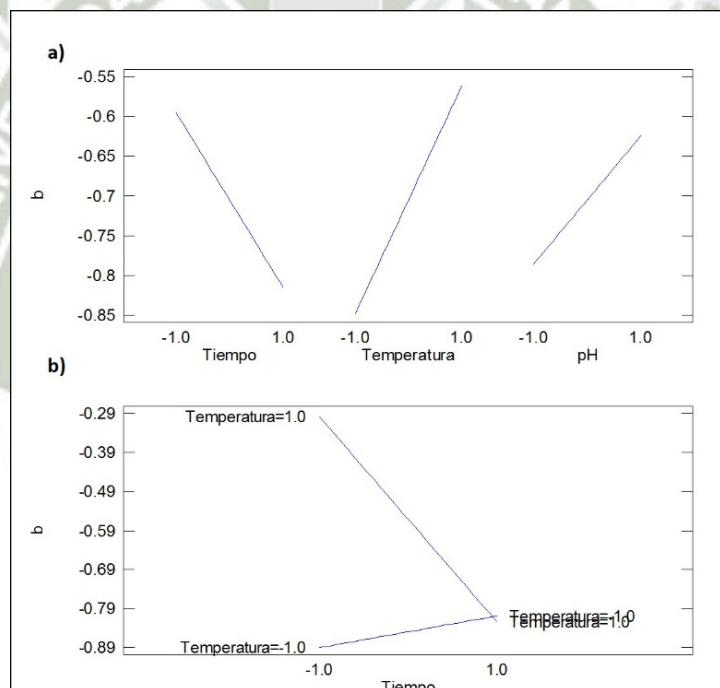


Figura 4.12: Gráfica de efectos para el modelo refinado de primer orden de la respuesta “b*”. a) Efectos principales, b) Interacciones.

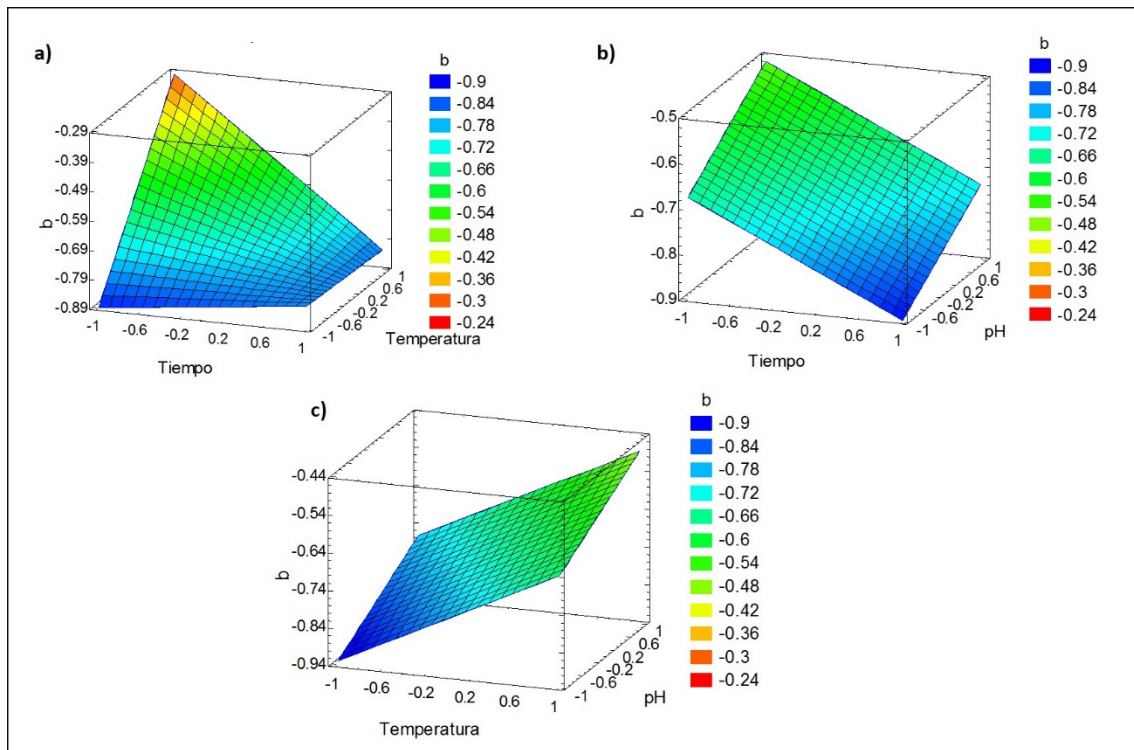


Figura 4.13: Superficie de respuesta del modelo de primer orden refinado de b^* . Superficies de respuesta frente a los factores a) Tiempo y Temperatura, b) Tiempo y pH y c) Temperatura y pH.

El análisis de varianza realizado (Tabla 4.12) para el modelo de segundo orden mostró al factor temperatura como significativo sobre la respuesta de “ b^* ”, con ello se construyó la ecuación 4.7 la cual presentó un valor de R^2 de 76.9273 y un R^2 ajustado de 50.9705 con un error de 0.168771, así mismo según la prueba de Durbin-Watson con un p de 0.5811 ($p > 0.05$) los residuos no presentaban correlación alguna.

$$\begin{aligned}
 b = & -0.660317 - 0.0712451 *Tiempo + 0.125268 *Temperatura \\
 & + 0.0685145 *pH - 0.0377865 *Tiempo^2 - 0.135944 *Tiempo \\
 & *Temperatura + 0.000943531 *Tiempo *pH - 0.00723591 \\
 & *Temperatura^2 + 0.0365565 *Temperatura *pH - 0.103334 *pH^2 \quad \text{Ec. 4.7}
 \end{aligned}$$

Tabla 4.12: Análisis de varianza para el modelo de segundo orden de la respuesta “b*”

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo+bloque	0.0390761	1	0.0390761	1.37	0.2798
B:Temperatura+bloq	0.20682	1	0.20682	7.26	0.0309
C:pH+bloque	0.0630242	1	0.0630242	2.21	0.1805
AA+bloque	0.0175477	1	0.0175477	0.62	0.4582
AB+bloque	0.139457	1	0.139457	4.90	0.0625
AC+bloque	0.00000671792	1	0.00000671792	0.00	0.9882
BB+bloque	0.000614046	1	0.000614046	0.02	0.8874
BC+bloque	0.0100844	1	0.0100844	0.35	0.5706
CC+bloque	0.131229	1	0.131229	4.61	0.0690
Bloques	0.0197747	1	0.0197747	0.69	0.4322
Falta de ajuste	0.110335	2	0.0220671	0.50	0.7722
Error total	0.199385	7	0.0284836		
Total (corr.)	0.864161	17			

$R^2 = 76.9273 \%$, R^2 (ajustada por g.l.) = 50.9705 %.

Refinando el modelo de segundo orden se consiguió un incremento del valor de R^2 ajustada a 62.90%, con un error de 0.143436 mediante la eliminación de términos no significativos, obteniendo con ello una nueva ecuación 4.8

$$b = -0.701797 -0.0802505 *Tiempo +0.123343 *Temperatura +0.0672061 *pH -0.139225 *Tiempo *Temperatura -0.0936371 *pH^2 \quad \text{Ec. 4.8}$$

El análisis de varianza (Tabla 4.13) realizado señaló como significativos a los factores Temperatura (B), la interacción Tiempo-Temperatura (AB) y al efecto cuadrático de pH (CC).

Tabla 4.13: Análisis de varianza para el modelo refinado de segundo orden de la respuesta “b*”

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo+bloque	0.0542438	1	0.0542438	2.64	0.1327
B:Temperatura+bloq	0.201872	1	0.201872	9.81	0.0095
C:pH+bloque	0.0608326	1	0.0608326	2.96	0.1135
AB+bloque	0.147928	1	0.147928	7.19	0.0214
CC+bloque	0.11585	1	0.11585	5.63	0.0370
Bloques	0.0396833	1	0.0396833	1.93	0.1924
Falta de ajuste	0.137261	9	0.0152513	0.34	0.8946
Error total	0.226311	11	0.0205738		
Total (corr.)	0.864161	17			

$R^2 = 73.8114 \%$, R^2 (ajustada por g.l.) = 62.8995% .

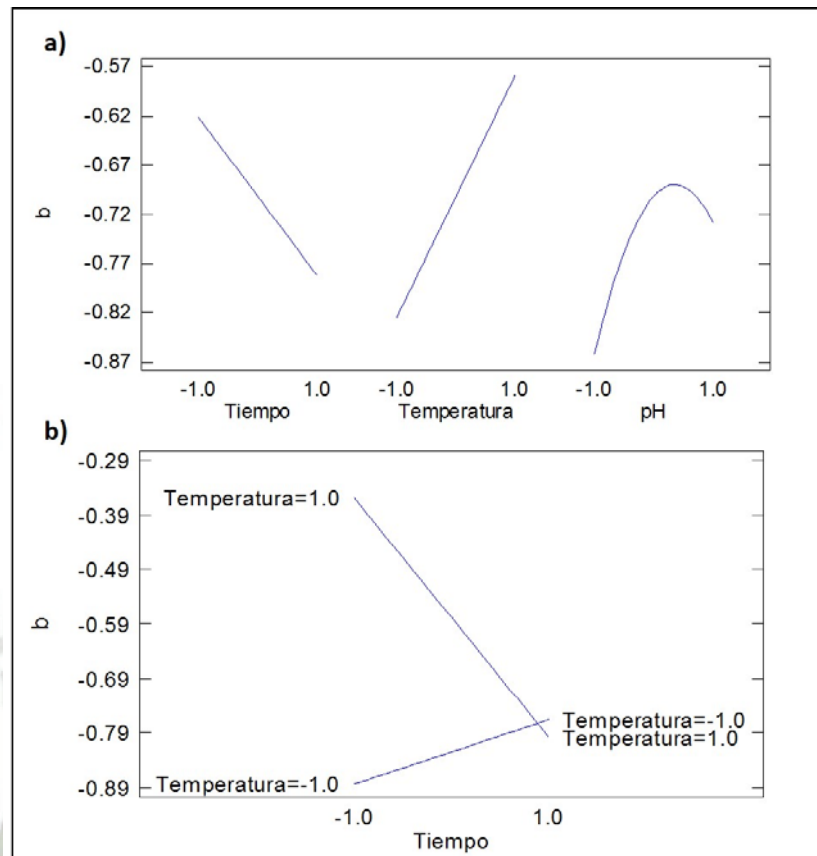


Figura 4.14: Gráfica de efectos para el modelo refinado de segundo orden de “b*”. a) Efectos principales, b) Interacciones.

Al observar los efectos que sufre el indicador “b*” frente a los factores estudiados, se puede comprobar cómo el factor pH afecta de manera no lineal a la respuesta generando una curvatura interna a pH de 5. Así mismo el comportamiento de nuestra respuesta “b” frente a los factores Tiempo, Temperatura y la interacción Tiempo-Temperatura (AB) se mantiene tal cual y se observó en el modelo de primer orden construido, observándose que mientras se incrementa el tiempo de 30 a 70 minutos el valor de “b*” disminuye, caso contrario, si se pasa de 75°C a 90°C el valor del indicador de color se incrementa.

Este comportamiento señalado en la Figura 4.14, fue comprobado y graficado mediante las superficies de respuesta construidas y mostradas en la Figura 4.15, mostrando la clara curvatura en el comportamiento de “b*” cuando se ve influenciado por el factor pH. Así

mismo, se confirmó que a menor tiempo y mayor temperatura se obtiene valores alto de “b*”.

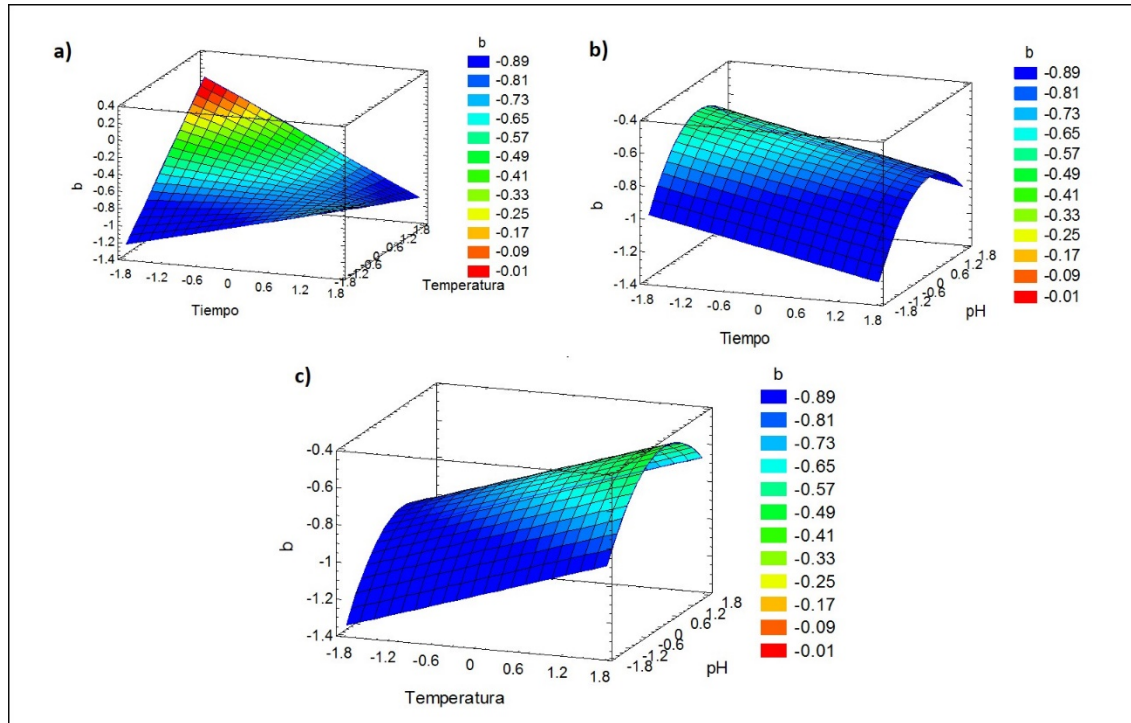


Figura 4.15: Superficies de respuesta del modelo refinado de segundo orden de “b*”. Superficies de respuesta frente a los factores a) Tiempo y Temperatura, b) Tiempo y pH y c) Temperatura y pH.

Por su parte las gráficas de contornos construidas y mostradas en la Figura 4.16, facilitaron la localización de la región de interés para realizar la optimización, registrada en la Tabla 4.14.

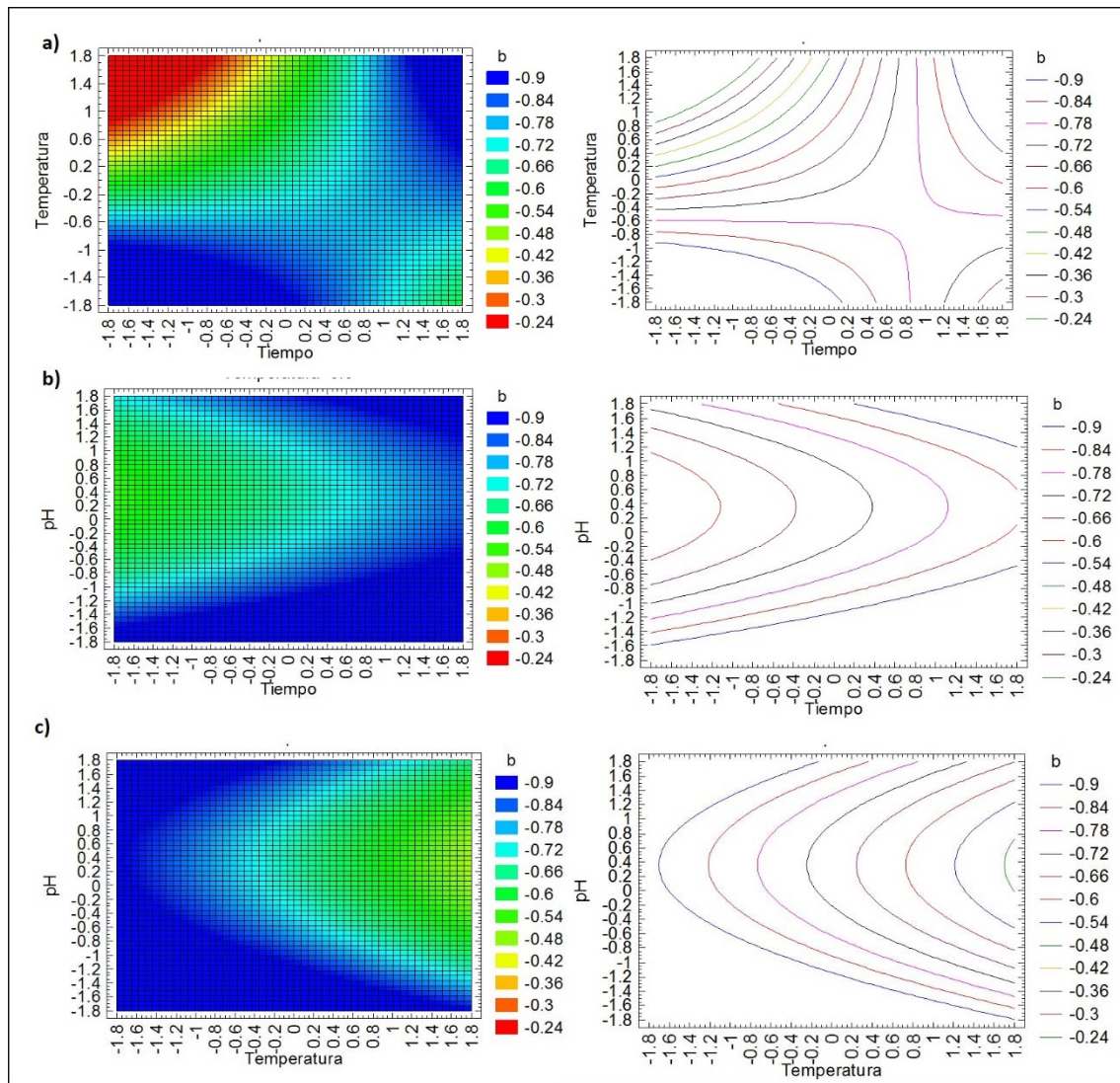


Figura 4.16: Gráfica de contornos del modelo de segundo orden refinado de b^* . Factores a) Tiempo y Temperatura, b) Tiempo y pH y c) Temperatura y pH.

La optimización efectuada entre los límites seleccionados, brindaron un valor máximo de “b*” correspondiente a 0.045118 si se trabajase a un tiempo de 16.4, 94°C y pH 5.18.

Tabla 4.14: Optimización de respuesta para “b*”.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo	
			V. Codificada	V. Real
Tiempo	-1.68	0.2	-1.68	16.4
Temperatura	-0.2	1.68	1.67963	94
pH	-1.68	1.68	0.360943	5.18

2.4. Optimización dual de a* y b*

En las optimizaciones simples realizadas para “a*” y “b*”, se observó que dichos indicadores mostraban valores óptimos a tiempos muy opuestos, tal es el caso que “a*” presentó un óptimo de 17.9805 a 83.59 minutos y “b*” un óptimo de 0.045118 a 16.4 minutos, siendo necesario por ello la optimización dual de dichas respuestas con la finalidad de encontrar la combinación de factores que satisfaga la optimización simultánea de “a* y b*”.

Mediante la función deseabilidad y con un impacto de 3 a 1 de “a*” sobre “b*”, se logró obtener un valor de “a*” de 15.1973 y “b*” de -0.679923 a 62 minutos, 94°C y pH 5 (Tabla 4.15). La grafica de contornos superpuestos de la Figura 4.17 permite identificar la región en la cual se encontró el óptimo simultáneo.

Tabla 4.15: Optimización de respuesta para “a*” y b*”.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo	
			V. Codificada	V. Real
Tiempo	-1.68	1.68	0.593253	61.8651
Temperatura	-1.68	1.68	1.68	94
pH	-1.68	1.68	0.0156148	5.00

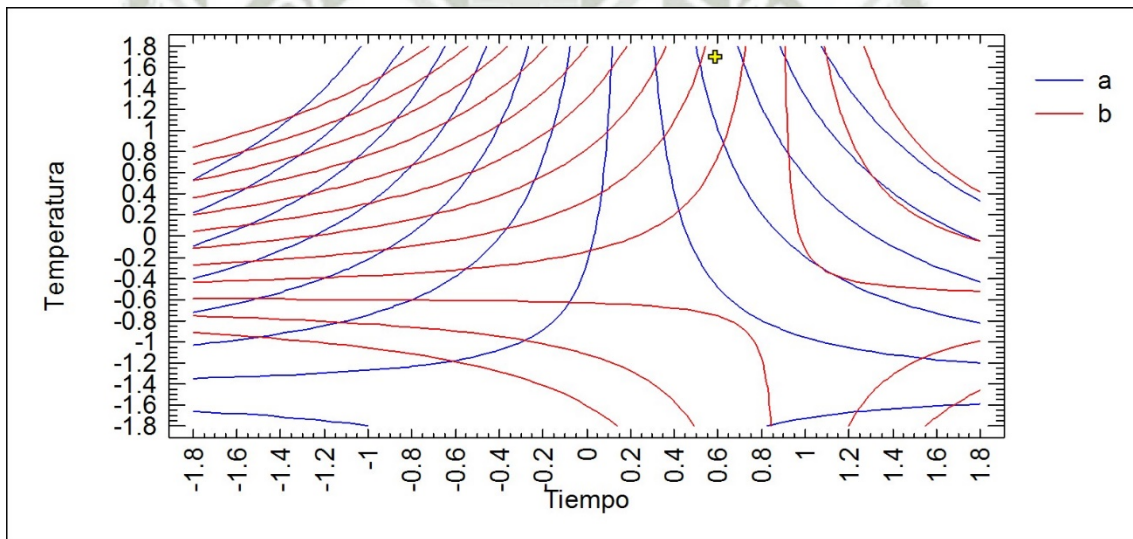


Figura 4.17: Gráfica de contornos superpuestos de “a*” y “b*”.

De esta manera, el análisis realizado permitió optimizar los parámetros de color “a*” y “b*” de manera independiente y de manera dual.

3. ANALISIS DE COSTOS:

Finalmente se realizó un análisis de costos que permitiera calcular el impacto económico al optimizar los parámetros en el laqueado y reducir las variaciones cualitativas y cuantitativas de producción; para lo cual fue necesario conocer primero los costos de producción y rendimiento, datos que fueron obtenidos a partir del área de finanzas y contabilidad de la empresa productora (Tabla 4.16 y 4.17) , y los cuales están calculados en base a una capacidad de producción de 30 toneladas de materia prima mensuales.

Tabla 4.16: Calculo de Rendimiento y Costo Unitario. Capacidad de Planta: 30 TN/mes de materia prima a procesar. Datos actualizados a Agosto 2014

	Unid	Cantidad	% A. Carm	A. Carm Kg
Materia Prima	Kg	30000.00	20.00	6000.00
Producto Terminado	Kg	9807.69	52.00	5100.00
Rendimiento	%			85.00
Ratio Coch /Carm		3.06		
Tiempo	Días	30		
Costo Unitario de Producción	\$/Kg	87.98		
Costo Unitario de Producción	\$/%A.C	1.69		

Extraído de: Aromas & Colorantes de los Andes. SAC

Tabla 4.17: Resumen de Costos de producción. Capacidad: 30 TN. Datos Actualizados a Agosto 2014.

Costos de Producción	\$	% Participación	\$/Kg Carmín
Materia Prima	690000.00	79.96	70.35
Insumos Directos	24394.20	2.83	2.49
Mano de obra directa	15094.42	1.75	1.54
Insumos Indirectos	39848.66	4.62	4.06
Mano de obra indirecta	15104.54	1.75	1.54
Gastos Generales	37224.09	4.31	3.80
Gastos de Administración	29254.55	3.39	2.98
Gastos de Ventas	7970.49	0.92	0.81
Gastos Financieros	3996.68	0.46	0.41
TOTAL	862887.63	100.00	87.98

Extraído de: Aromas & Colorantes de los Andes. SAC

La figura 4.18 explica el valor comercial y costos que incurren según la calidad de color obtenida. Los lotes de Carmín obtenidos, normalmente presentan variaciones en los resultados cuantitativos y colorímetros, estas diferencias generan distintas calidades de color y por ende una diferente valorización comercial; adicionalmente las variaciones cualitativas, crean la eventual necesidad de invertir tiempo y dinero en procesos de regulación y homogenización de los lotes, a fin de mantener la reproducibilidad y calidad estándar del producto final.

Para mejorar la calidad de color del carmín, existen dos opciones de reproceso: Mezclado o Remolienda. Como su nombre lo indica, la remolienda implica volver a moler el colorante obtenido, tiene como objetivo reducir el área superficial de la partícula colorante aumentando su poder de color; este proceso tiene como desventajas el tiempo requerido, y que el color solo puede aumentar hasta cierto límite. El reproceso de mezclado es un proceso más corto, pero que implica sacrificar un carmín de alta calidad para mejorar uno de baja calidad.

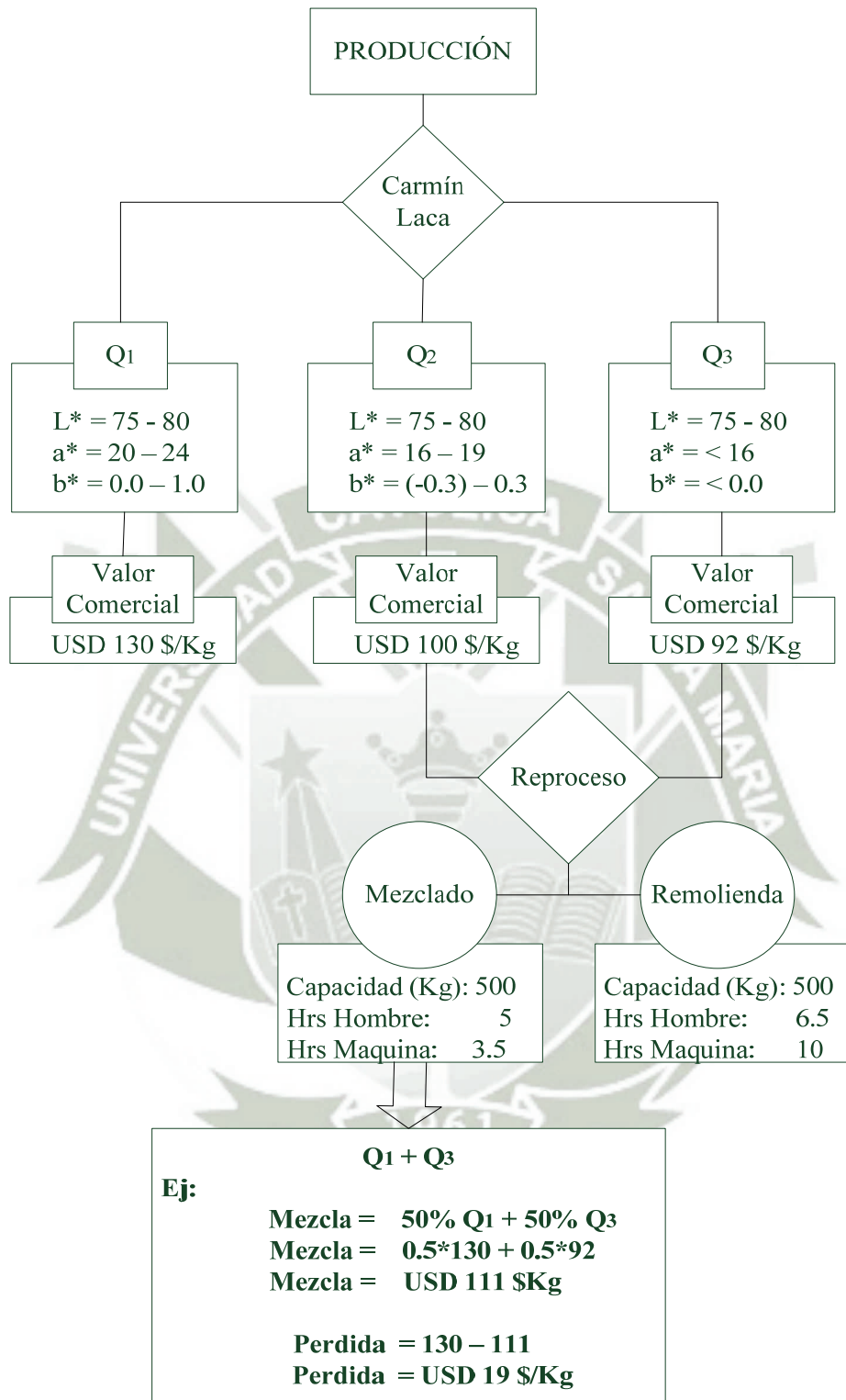


Figura 4.18: Flujo de Reproceso. Clasificación de carmín según calidad y gastos de reproceso.

El análisis de costos de reproceso (Tabla 4.18) permitió identificar el impacto económico de las etapas de reproceso que actualmente se llevan a cabo, demostrando que la optimización ayudaría a reducir tiempo y dinero que se emplean en la producción para homogenizar los diferentes lotes de producción, además de reducir pérdidas ocasionadas por la devaluación de lotes de carmín de alta calidad al ser mezclados con otros de calidad inferior.

Tabla 4.18: Cálculo de Costo de Reproceso. Según capacidad de maquinaria (500 Kg) y por 1 Kg.

Costo de Reproceso	Unid	Cantidad	
		Mezclado	Remolienda
Capacidad	Kg	500.00	
Mano de Obra			
- Costo	\$/op/hr	1.36	1.36
- Tiempo	hr	5.00	6.50
Subtotal	\$/op	6.82	8.86
Maquinaria			
- Costo	\$/mq/hr	3.59	3.59
- Tiempo	hr	3.50	10.00
Subtotal	\$/mq	12.56	35.88
Devaluación (aprox)		19	
Subtotal		9500	
TOTAL		9519.38	44.75

Costos Unitario	Unid	Mezclado	Remolienda
Mano de Obra	\$/Kg	0.014	0.018
Maquinaria	\$/Kg	0.025	0.072
Devaluación (aprox)	\$/Kg	19.00	0.00
TOTAL	\$/Kg	19.039	0.089

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. CONCLUSIONES

PRIMERA

El diseño factorial 2^3 permitió construir un plan de experimentación en base a 8 experimentos, a partir de lo cual se agregaron 4 puntos centrales y 6 puntos axiales, dando un total de 18 experimentos necesarios para determinar los parámetros óptimos de tiempo, temperatura y pH en el proceso de laqueado.

SEGUNDA

Para la respuesta L^* no se identificó ninguna interacción entre los parámetros mencionados, en cambio se observó que individualmente L^* se ve mayormente afectada por los parámetros tiempo y pH, no viéndose fuertemente afectada por la temperatura. De esta manera se determinó que la respuesta L^* puede ser controlada mediante los parámetros tiempo y pH, identificándose valores más altos de L^* a menor tiempo y menor pH.

TERCERA

La optimización realizada para la respuesta a^* permitió identificar una interacción entre los parámetros tiempo y temperatura, en la cual se determinó valores más altos de a^* a mayor tiempo y temperatura; así mismo se identificó un efecto cuadrático en el pH. Considerando las limitaciones en los valores para cada factor establecidas por el propio proceso, la optimización respectiva identificó la obtención de un máximo valor en a^* en las condiciones de 83.6 min, 94°C y pH 4.8

CUARTA

La optimización realizada para la respuesta b^* identificó que de igual manera existe una interacción en los parámetros tiempo y temperatura, y un efecto cuadrático en el pH, pero

que contrario al comportamiento de a^* , la obtención de valores máximo de b^* se obtienen a menor tiempo y mayor temperatura.

De esta manera se identificó que las condiciones óptimas entre los límites seleccionados, brindan un máximo valor b^* a un tiempo de 16.4 min, temperatura de 94°C y pH 5.18

QUINTA

Se identificó que el parámetro tiempo tiene valores opuestos para lograr la optimización de a^* y b^* siendo óptimo para a^* un mayor tiempo, y óptimo para b^* un menor tiempo.

Así mismo se identificó que tanto a^* como b^* , alcanzan condiciones óptimas a mayores temperaturas, y que el pH presenta un efecto cuadrático en ambas respuestas.

Para la optimización dual realizada, se eligió un impacto de 3 a 1 en relación de a^* sobre b^* que permitió identificar como punto óptimo simultáneo las condiciones de 61.7 min; 94°C y pH 5

SEXTA

El análisis de costos de reproceso permitió calcular un costo de USD 0.089 \$/Kg durante el proceso de Remolienda, y un costo de USD 0.039 \$/Kg durante el proceso de Mezclado. En el reproceso de mezclado se considera adicionalmente la devaluación generada al mezclar lotes de carmín de alta calidad con otros de calidad inferior, lo cual puede incrementar el costo de mezclado aproximadamente a USD 19.019 \$/Kg.

2. RECOMENDACIONES

Debido a que se desconoce la interacción específica de la molécula de ácido carmínico con los reactivos que son adicionados en el proceso de laqueado para la formación del colorante laca carmín, es necesario continuar la optimización del proceso de laqueado y determinar la influencia de los reactivos de reacción; de esta manera y con el objetivo de profundizar en la optimización del proceso de laqueado, se recomienda realizar un diseño experimental que permita encontrar los factores óptimos de adición de los reactivos: Hidróxido de Sodio, Sulfato de Aluminio, Cloruro de Calcio y Ácido Cítrico.

Para continuar con la optimización del proceso global de producción de carmín, se recomienda utilizar la metodología de respuesta de superficie utilizada en el presente trabajo, aplicada a la etapa de extracción a fin de optimizar los parámetros de extracción e incrementar el rendimiento y contenido de ácido carmínico.



REFERENCIAS

- Acero S., Tabar A. I., Alvarez M. J., Garcia B. E., Olaguibel J. M., Moneo I. (1998) *Occupational asthma and food allergy due to carmine*. *Allergy*. Sep;53(9):897-901.
- Anuar, N., Mohd Adnan A. F., Saat N., Aziz N., Mat Taha R., (2013). “*Optimization of extraction parameters by using response surface methodology, purification, and identification of anthocyanin pigments in Melastoma malabathricum Fruit*” *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 810547, 10 pages, 2013. doi:10.1155/2013/810547
- Baryanyovits, F. L. C., (1978) *Cochineal Carmine: an Ancient Dye with a Modern Role*. *Endeavour (New Series)*. 2 (2): p. 85-92
- Beaudouin E., Kanny G., Lambert H., Fremont S., Moneret-Vautrin D. A.(1995) *Food anaphylaxis following ingestion of carmine*. *Ann Allergy Asthma Immunol*. May; 74(5):427-30.
- Box, g. H. (1978). *Statistics for experimenters: an introduction to designs, data analysis and model building*. New York: Willey
- Britton, G. (1983) *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge University Press, Cambridge. p 74-101
- Brown , J.P. and Brown R.J. (1979) *Mutation Research* **66** 223.
- Chung K., Baker J. R. Jr, Baldwin J. L., Chou A. (2001) *Identification of carmine allergens among three carmine allergy patients*. *Allergy*. Jan; 56(1):73-7.
- CIELAB 1976. (2007) *Commission internationale de l'éclairage*. Colorimetry - Part 4: CIE 1976 L*a*b* COLOUR SPACE.
- CIELAB 1976. (2012) *Commission internationale de l'éclairage*. Measuring Color using Hunter L, a, b versus CIE 1976 L*a*b*. Hunterlab

- Commission Internationale de l'Éclairage (CIE). (1978) *Recommendations on uniform color spaces, color difference and psychometric color terms*. Suppl. Núm. 2 to Publ. CIE No. 15 (E-1.3.1), 1971, (TC-1.3) 1978. CIE Central Bureau. Paris, France.
- Dominguez Dominguez, J. (2006) *Optimización simultanea para la mejora conitua y reducción de costos en procesos*. Ingeniería y Ciencia, Vol 2. Numero 4, pp. 145-162.
- Donkin, R. A. (1977), *Spanish Red: An Ethnogeographical Study of Cochineal and the Opuntia Cactus*. Transactions of the American Philosophical Society. New Series, Vol. 67, No. 5 pp. 1-84
- Downham, A. and P. Collins, (2000) *Colouring our food in the last and next millennium*. International Journal of Food Science and Technology. 35 (1): p 5-22
- Edmonds, J., (1999) *The History and practice of Eighteenth century dyeing, in Historic dyes series*.
- Escobedo, R. S., Pérez, J. J. (1998) *Biología y comportamiento de la grana cochinilla del nopal (Dactylopius coccus Costa) y su viabilidad de cultivo en la costa de Hermosillo, Sonora y regiones cercanas para la extracción y aplicación del colorante natural rojo de carmín en alimentos*. Tesis Lic. Químico. México, Universidad de Sonora. 123 p.
- FAO/OMS (2000). <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0534s/a0534s01.pdf>
- Fernández, C; Piñeiro, M. (2001). *Superficies de Respuesta. Métodos y Diseños*
- Flores, V. (1996) *Cosecha y postcosecha de cochinilla en la sierra del Perú*. In anales: I Seminario Internacionla de la Cochinilla. Ayacucho Peru.
- Food Ingredients Solution. <http://www.foodcolor.com/carminic-acid-color-cochineal-extract-color/>
- Ford G. P., Gopal T., Grant D., Gaunt I. F., Evans J. G., Butler W. H. (1987) *Chronic toxicity/carcinogenicity study of carmine of cochineal in the rat*. Food Chem Toxicol. Dec; 25(12):897-902.

- Fox, H.M. and Verves, G. (1960) *The Nature of Animal Colours*. Sidgwick & Jackson, London
- Francis, F. J. (1996). Chapter 9. *Less common natural colorants. Natural food colorants*. Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. Springer Science & Business Media. Second edition.
- Gibaja, S. (1998) *Pigmentos Naturales, Quinonicos*. UNMSM. Cap III. P 71
- González, M., Méndez. J., Carnero, A., Lobo M. G., Afonso, A. (2002) “*Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals(Dactylopius coccus Costa) using response surface methodology.*” J. Agric Food Chem 50: 24. 6968-6974 Nov
- Grant D., Gaunt I. F., Carpanini F. M. (1987) *Teratogenicity and embryotoxicity study of carmine of cochineal in the rat*. Food Chem Toxicol. Dec; 25(12):913-7
- Grant D., Gaunt I.F. (1987) *Three-generation reproduction study on carmine of cochineal in the rat*. Food Chem Toxicol. Dec; 25(12):903-12.
- Haaland, p. (1989). *Experimental Design in Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, INC
- Hendry, G. A. F. (1996) Chapter 1, *Natural Pigments in Biology. Natural food colorants*. Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. Springer Science & Business Media. Second edition.
- Henry, B. S. (1996) Chapter 2, *Natural Food Colors. Natural food colorants*, Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. Springer Science & Business Media. Second edition.
- Islam K., Alex B., McBratney and Singh B. (2006) *Estimation of soil colour from visible reflectance spectra. Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources, The University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia*.
- JECFA, FAO/OMS. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/es/>

- Joan Ferré, F. Xavier Rius. *Introducción al diseño estadístico de experimentos*, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.
- Kornbrust D., Barfknecht T. (1985) *Environ Mutagen. Testing of 24 food, drug, cosmetic, and fabric dyes in the in vitro and the in vivo/in vitro rat hepatocyte primary culture/DNA repair assays*; 7(1):101-20.
- Lloyd, A. G. (1980) *Extraction and chemistry of Cochineal. Food Chemistry*, , 5(1):p.91-107
- Loprieno G, Boncristiani G, Loprieno N. (1992) *Genotoxicity studies in vitro and in vivo on carminic acid (natural red 4)*. Food Chem Toxicol. Sep;30(9):759-64.
- Mac Gregor, R. (1976) *La grana o cochinilla del nopal usada como colorante desde el México antiguo hasta nuestros días*. Suculentas y cactáceas mexicanas, Sociedad Mexicana de Cactología, 21(4), México.
- Madhava Naidu, M., Sowbhagya, H. B. (2012) *Technological Advances in Food Colours*. Chemical Industry Digest. P 79-88
- Manrique, P. (2013) *Optimización de la producción de carbón activado a partir de cascarilla de arroz*. Tesis de Titulación en Ingeniería Biotecnológica. UCSM.
- Marin, R., Cisneros, F. (1977) *Biología y morfología de la cochinilla del carmín Dactylopius coccus Costa (Homoptera: Dactylopiidae)*. Rev. Per. Ent. 20(1):115-120.
- Meiselman, H. L., Macfire, H. J. H., (1996). *Food Choice Acceptance and consumption*. 1996
- Méndez, G; Aquino, P; Moreno, A. (1990). *Producción de grana-cochinilla fina (Homóptera: Dactylopiidae: Dactylopius coccus Costa) bajo diferentes condiciones de sombreo en el Altiplano Potosino-Zacatecano*. I n Resúmenes de la IV Reunión

- nacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal (4, 1990, MX); Congreso Internacional (2, 1990, MX). Zacatecas, México; p. 46.
- Mendez, J., et al. (2004) *Color quality of pigments in cochineal (Dactylopius coccus Costa). Geographical origin characterization using multivariate statistical analysis.* J. Agric Food Chem. 52(5). P. 1331-7.
- Montgomery, D. (1991). *Diseño y Analisis de experimentos.* Grupo Editorial Iberoamerica.
- Mori H, Iwata H, Tanaka T, Morishita Y, Mori Y, Kojima T, Okumura A. (1991) *Carcinogenicity study of cochineal in B6C3F1 mice. Food Chem Toxicol.* Sep; 29(9):585-8.
- Noonan, J. (1972) *Color additives in food. In: Handbook of Food Additives, 2nd ed., Furia, T. E. (Ed.). CRC Press, Cleveland, OH, pp. 587–615.*
- Portillo M. L. (1992). *Producción comparada de grana cochinilla obtenida de dos especies de Opuntia en nopaloteca.* Nakari 3(3): 50-55. México.
- Portillo M. L. y H. J. Arreola N. (1994) *Los nopales hospederos de la cochinilla fina o cultivada Dactylopius coccus Costa.* Cact. y Suc. Mex. 39(4): 90-95. México.
- Rodriguez L. C., Mendez M. A., Niemeyer H. M. (2001) *Direction of Dispersion of cochineal (Dactylopius coccus Costa) within the americas.* Antiquity.75. p 73-77
- Rodriguez L., C. & Niemeyer H., M. (2001) *Cochineal production: a reviving pre-Columbian industry.* Athena Review, vol. 2, no. 4, pp. 77.
- Saenz, C. (2006) *Utilización agroindustrial del nopal.* Fao. Cap 7. Pp 99-112
- Sandoval F. (2005) “*Caracterisation de la production et optimisation du Processus d’extraction des colorants de la plante de Añil (Indigofera Suffruticosamill)*”. Trabajo para la obtención de título de Doctor en Institut National Polytechnique De Toulouse
- Schanda, J. (2007) *Colorimetry: Understanding the CIE system.* Janos Schanda. Wiley

Schul, J. (2000) *Carmine, Natural Food Colorants: Science and Technology*. IFT Basic Symposium. Gabriel J. Lauro, Jack Francis.

Sisqueiros, A. (2004) *Aplicacion de La metodologia de superficies de respuesta para El mejoramiento de La calidad Del aceite de soya*. Tesis, Universidad de Sonora, Division de ciencias exactas y naturales departamento de matematicas, Ermosillo, Sonora.



ANEXOS

ANEXO 1: Registro de los resultados colorimétricos obtenidos en producción (2014)

A continuación se muestran los registros y fluctuaciones en los resultados cuantitativos y colorimétricos del producto final, observados durante el proceso de producción de carmín de cochinilla en el periodo del año 2014 (Enero – Julio).

FECHA ANALISIS		CODIGO PE	PRODUCTO	LOTE	DESCRIPC DE LA MUESTRA	COLOR				F3-SGI-PR-08			
						%AC	TALC	LECH	DEXT	BUFFE	L*	a*	b*
HOJA DE ANÁLISIS DE PRODUCTOS INTERMEDIOS – CARMÍN													
ENERO													
03/01/14	PE99051	CARMINE LCI	13364007	MMP	63.46	X					76.79	12.48	0.33
03/01/14	PE99051	CARMINE LCI	13360002	MAP	63.20	X					75.10	15.03	0.25
04/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14001002	MMP	62.12	X					74.05	17.31	0.51
04/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14002002	MMP	63.88	X					73.99	16.47	0.24
06/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14002002	MRP	63.88	X					74.70	17.58	0.54
04/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14002008	MMP	63.20	X					74.51	15.88	0.47
06/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14002008	MRP	63.20	X					74.14	16.32	0.73

13/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14011006	MMP	64.44	X				75.34	15.82	0.53
14/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14011010	MMP	64.00	X				74.24	16.37	0.79
18/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14012002	MMP	61.41	X				74.52	16.73	0.62
18/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14013002	MMP	62.27	X				74.32	16.20	0.64
16/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14013006	MMP	61.58	X				74.57	16.07	0.71
16/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14013004	MMP	61.12	X				74.30	16.25	0.93
16/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14014002	MMP	63.23	X				76.32	14.01	0.55
17/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14014004	MMP	62.25	X				73.44	17.59	0.78
17/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14014012	MMP	61.90	X				73.66	17.56	0.83
17/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14014014	MMP	60.71	X				73.62	17.34	0.95
17/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14015002	MMP	61.81	X				74.04	16.52	0.72
17/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14015011	MMP	62.59	X				75.11	16.12	0.38
18/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14016002	MMP	65.06	X				74.89	15.58	0.86
21/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14018014	MMP	61.60	X				73.39	16.90	0.64
27/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14018014	MAP	61.62	X				75.65	13.16	0.37
30/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14018014	MARP	61.61	X				73.56	14.92	0.40
22/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14018015	MMP	63.35	X				74.55	14.75	0.74
23/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14017014	MMP	61.63	X				77.82	10.89	0.60
23/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14024006	MMP	59.36	X				73.95	17.73	0.67
27/01/14	PE99051	CARMINE LCI	13365001	MMP	62.58	X				75.11	14.86	0.22
30/01/14	PE99051	CARMINE LCI	13365001	MRP	62.58	X				72.82	16.92	0.60
29/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14025003	MMP	61.94	X				73.43	16.92	0.33
29/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14025006	MMP	61.57	X				74.98	15.32	0.14
28/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14026002	MMP	58.89	X				75.18	15.03	0.04
29/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14027004	MMP	60.54	X				73.63	16.09	0.26
28/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14028004	MMP	62.51	X				75.87	15.11	0.75
31/01/14	PE99051	CARMINE LCI	13334001	MMP	62.84	X				74.03	16.63	0.39

31/01/14	PE99051	CARMINE LCI	14031001	MMP	62.31	X			74.54	16.67	0.28
FEBRERO											
02/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14027002	MMP	62.57	X			76.08	12.69	0.71
03/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14027002	MRP	61.65	X			74.10	15.07	0.35
02/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14018014	MRP	62.46	X			74.06	14.15	
02/02/14	PE99051	CARMINE LCI	13347011	MRP	64.08	X			74.28	15.34	0.53
03/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14029007	MMP	63.73	X			76.37	12.42	0.51
03/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14029007	MRP	60.78	X			75.39	13.54	0.36
03/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14029010	MMP	62.30	X			75.30	13.91	0.77
03/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14029010	MRP	62.30	X			73.92	15.72	0.73
04/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14029010	MRRP	62.30	X			72.84	17.98	0.76
03/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14030005	MMP	63.40	X			74.50	15.24	0.80
04/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14030005	MRRP	63.40	X			73.50	16.44	0.75
04/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14027003	MRP	60.72	X			74.22	15.33	0.36
10/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14039003	MMP	63.03	X			76.54	12.24	0.52
11/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14039005	MMP	62.33	X			74.52	14.85	0.29
11/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14039007	MMP	62.86	X			73.29	15.43	0.44
11/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14040002	MMP	62.41	X			73.57	17.30	0.44
12/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14041006	MMP	63.30	X			74.81	15.83	0.51
12/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14041002	MMP	63.60	X			74.31	16.50	0.52
13/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14042010	MMP	62.12	X			73.58	17.03	0.71
13/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14042008	MMP	63.06	X			73.83	16.05	0.78
13/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14043002	MMP	61.85	X			74.05	16.05	0.42
13/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14043004	MMP	62.29	X			74.71	15.57	0.36
14/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14044004	MMP	62.29	X			73.17	17.16	0.54
14/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14043011	MMP	60.88	X			74.13	16.30	0.59
14/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14044002	MMP	64.27	X			74.76	14.56	0.45

14/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14044006	MMP	62.13	X					74.43	15.01	0.33
15/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14044010	MMP	61.65	X					73.66	17.01	0.28
15/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14044008	MMP	60.31	X					73.85	16.14	0.48
15/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14045002	MMP	64.15	X					74.10	15.47	0.20
16/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14045004	MMP	65.21	X					74.22	15.08	0.34
16/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14045006	MMP	63.64	X					74.37	16.25	0.42
17/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14045010	MMP	65.64	X					74.76	15.45	0.32
17/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14046002	MMP	63.27	X					74.64	15.80	0.51
17/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14046004	MMP	64.09	X					75.72	13.57	0.46
18/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14046006	MMP	62.43	X					74.31	15.98	0.10
19/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14048004	MMP	62.41	X					73.15	16.19	0.43
20/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14049004	MMP	61.14	X					73.10	16.59	0.17
20/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14049002	MMP	60.47	X					74.44	15.55	0.34
20/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14049008	MMP	61.73	X					73.28	17.50	0.17
20/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14050002	MMP	60.45	X					73.63	16.62	0.14
21/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14050004	MMP	62.12	X					73.06	17.10	0.23
22/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14051010	MMP	60.41	X					74.35	15.17	0.15
27/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14052008	MRP	60.60	X					71.37	17.82	0.88
24/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14051014	MMP	61.77	X					72.52	16.98	0.67
24/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14052004	MMP	61.97	X					72.75	15.85	0.87
24/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14052002	MMP	61.40	X					72.48	16.43	0.73
24/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14053002	MMP	63.26	X					72.98	15.87	0.82
24/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14052010	MMP	62.37	X					73.89	17.02	-0.93
24/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14053006	MMP	63.46	X					73.68	18.07	-0.95
24/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14053008	MMP	62.41	X					74.93	15.67	-1.26
25/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14053012	MMP	63.69	X					74.05	17.69	-1.19
26/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14048006	MRP	62.07	X					73.13	18.61	-1.19

26/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14053010	MMP	60.03	X				72.51	16.06	0.73
26/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14055002	MMP	61.85	X				72.74	15.32	0.88
27/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14053006	MMP	61.81	X				71.72	17.56	0.85
28/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14058008	MMP	62.14	X				73.53	15.01	0.49
28/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14058009	MMP	64.44	X				73.77	13.10	1.15
28/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14058010	MMP	62.29	X				73.41	15.97	0.90
28/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14058013	MMP	62.65	X				73.37	16.29	0.76
MARZO												
01/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14059015	MMP	60.32	X				74.20	14.03	0.64
01/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14059007	MMP	63.08	X				72.78	15.82	0.87
07/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14058008	MMP	59.14	X				73.20	15.52	0.81
03/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14058014	MMP	61.66	X				72.55	16.21	0.68
03/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14059009	MMP	63.26	X				73.03	15.96	0.86
04/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14060002	MMP	63.55	X				73.08	15.61	0.64
04/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14059001	MMP	60.45	X				72.44	16.27	0.48
04/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14059001	ArcoI	62.55	X				73.11	15.42	0.45
04/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14059005	MMP	62.75	X				72.91	15.62	0.68
05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14060004	MMP	61.91	X				74.22	13.87	0.65
05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14060004	MRP	61.91	X				74.16	14.70	0.58
05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14060010	MMMP	61.21	X				73.22	15.22	0.73
22/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14051012	MMP	61.31	X				74.01	15.41	0.15
19/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14048006	MMP	62.07	X				73.23	16.11	0.38
24/02/14	PE99051	CARMINE LCI	14052008	MMP	60.60	X				72.56	16.96	0.77
05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14061006	MMP	60.48	X				73.80	14.01	1.11
05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14061004	MMP	62.16	X				72.56	16.02	0.85
05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14061002	MMP	61.87	X				73.13	15.99	0.87
05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14062002	MMP	62.18	X				74.17	13.76	0.41

05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14062002	MRP	62.18	X					74.62	13.29	0.45
05/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14062006	MMP	62.70	X					73.65	14.10	0.82
08/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14060010	MMP	62.59	X					72.77	16.61	0.45
09/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14063003	MMP	61.79	X					72.92	15.87	0.90
08/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14063005	MMP	64.09	X					73.00	15.14	0.67
08/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14063012	MMP	63.54	X					73.42	14.23	0.59
08/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14063012	MRP	63.54	X					73.49	14.49	0.99
08/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14064002	MMP	62.83	X					72.92	15.23	0.70
09/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14064008	MMP	62.33	X					72.89	15.96	0.83
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14065008	MMP	62.84	X					74.33	13.65	0.91
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14062009	MMP	63.09	X					73.86	15.06	0.82
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14065002	MMP	63.07	X					74.35	13.80	0.98
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14065006	MMP	64.51	X					74.20	14.53	0.92
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14064012	MMP	64.71	X					74.14	13.93	0.92
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14063005	MRP	64.09	X					72.38	16.06	0.97
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14064008	MMP	62.33	X					72.87	16.31	0.71
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14064012	MMP	64.71	X					73.48	14.45	0.91
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14065006	MRP	64.51	X					72.88	15.51	0.90
10/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14065011	MMP	63.69	X					73.81	13.43	1.06
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14065011	MRP	63.69	X					73.75	13.96	0.82
26/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066002	MMP	62.77	X					71.66	13.97	1.10
27/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066002	MRP	62.77	X					72.89	14.93	0.66
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066002	MRRP	62.77	X					73.23	14.81	0.89
14/03/00	PE99051	CARMINE LCI	14066006	MMP	61.73	X					74.86	13.48	0.69
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066006	MRP	61.73	X					74.12	13.48	0.33
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066006	MRRP	61.73	X					73.97	14.01	0.60
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066008	MMP	63.11	X					75.06	13.25	0.98

25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066008	MRP	63.11	X					74.48	13.02	0.38
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066008	MRRP	63.11	X					74.24	13.24	0.75
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14066011	MMP	63.55	X					73.42	16.04	0.76
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14067004	MMP	61.91	X					73.55	15.81	0.77
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14067004	MRP	61.91	X					72.80	15.11	0.28
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14067006	MMP	62.91	X					73.83	14.03	0.72
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14067006	MRP	62.91	X					73.91	14.04	0.57
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14067006	MRRP	62.91	X					73.61	14.10	0.75
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14067009	MMP	62.65	X					75.39	11.55	0.82
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14067009	MRP	62.65	X					74.71	12.53	0.39
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14068003	MMP	61.76	X					74.71	13.30	0.78
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14068003	MRP	61.76	X					74.03	13.83	0.88
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14068006	MMP	61.04	X					74.27	13.07	0.82
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14068006	MRP	61.04	X					73.92	13.85	0.38
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14068008	MRP	62.55	X					72.79	15.63	0.33
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14068009	MMP	61.41	X					74.44	13.83	0.61
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14068009	MRP	61.41	X					73.79	14.54	0.23
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069002	MMP	64.43	X					73.14	14.19	1.00
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069002	MRP	64.43	X					73.69	14.50	0.54
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069006	MMP	62.52	X					73.03	16.14	0.78
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069006	MRP	62.52	X					72.16	16.61	0.76
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069006	MRRP	62.52	X					72.24	16.98	1.11
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069008	MMP	62.55	X					73.20	15.15	0.71
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069008	MRP	62.55	X					72.79	15.63	0.33
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069008	MRRP	62.55	X					72.47	16.49	0.79
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069008	MRRRP	62.55	X					72.84	15.77	0.71
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14070002	MMP	63.21	X					73.73	14.70	0.68

25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14070002	MRP	63.21	X					72.73	15.11	0.28
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14070002	MRRP	63.21	X					73.10	15.30	0.82
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14070011	MMP	62.73	X					74.62	13.53	0.81
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14070011	MRP	62.73	X					74.64	13.13	0.87
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14070014	MMP	61.59	X					75.10	12.94	0.76
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14070014	MRP	61.59	X					74.60	13.29	0.83
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14071002	MMP	61.84	X					73.78	13.79	0.82
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14071002	MRP	61.84	X					73.41	14.52	0.99
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14071005	MMP	60.81	X					76.16	10.78	0.39
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14071005	MRP	60.81	X					75.90	11.26	0.19
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14071009	MMP	61.23	X					75.35	12.15	0.73
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14071009	MRP	61.23	X					73.63	13.76	0.38
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14071012	MMP	61.53	X					73.94	14.00	0.95
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14071012	MRP	61.53	X					72.97	14.68	0.81
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14077003	MMP	63.09	X					76.30	11.48	0.39
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14077003	MRRP	63.09	X					75.47	12.52	0.34
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14077005	MMP	62.92	X					73.75	14.67	0.63
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14078003	MMP	62.83	X					73.56	14.57	0.52
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14078005	MMP	62.46	X					74.24	13.68	0.42
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14078009	MMP	63.60	X					73.51	15.61	0.19
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14078012	MMP	64.16	X					74.14	13.82	0.27
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14079002	MMP	64.16	X					74.51	13.03	0.25
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14079022	MMP	64.40	X					74.85	13.20	0.54
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14079022	MRP	64.40	X					74.36	13.67	0.44
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14080010	MMP	64.01	X					74.72	13.17	0.52
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14080010	MRP	64.01	X					74.01	13.92	0.40
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14080012	MMP	62.22	X					74.04	14.18	0.79

25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14080012	MRP	62.22	X					73.22	14.98	0.60
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14080005	MMP	63.76	X					74.04	13.51	0.50
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14079004	MMP	63.28	X					74.02	13.78	0.48
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14080003	MMP	64.17	X					73.23	14.76	0.66
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14080003	MRP	64.17	X					73.05	14.95	0.44
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14081004	MMP	63.98	X					73.38	14.88	0.53
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14081004	MRP	63.98	X					73.03	15.41	0.47
24/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14079020	MMP	63.67	X					73.66	14.91	0.55
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14081013	MMP	63.70	X					74.81	14.04	0.64
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14081006	MMP	63.44	X					74.89	13.60	0.60
25/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14081011	MMP	63.85	X					74.39	14.72	0.61
26/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14082004	MMP	66.25	X					75.31	13.08	0.33
26/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14082006	MMP	62.00	X					75.16	12.44	0.30
26/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14082002	MMP	64.27	X					73.03	15.86	0.50
26/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14083002	MMP	64.23	X					73.82	13.94	0.42
26/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14083002	MRP	64.23	X					74.56	13.56	0.71
26/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14083004	MMP	65.40	X					74.05	13.61	0.34
26/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14083004	MRP	65.40	X					73.83	14.28	0.29
27/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14069002	MMP	62.25	X					73.89	14.37	0.65
27/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14083006	MMP	65.12	X					74.27	14.67	0.45
27/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14084016	MMP	64.95	X					73.77	14.60	0.54
27/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14084002	MMP	62.08	X					73.77	14.55	0.71
28/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14084018	MMP	65.43	X					74.67	13.18	0.28
28/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14084020	MMP	64.58	X					75.29	13.06	0.35
28/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14085002	MMP	62.83	X					75.39	13.48	0.39
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14085013	MMP	62.68	X					75.42	13.34	0.37
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14085008	MMP	63.98	X					73.44	15.02	0.50

31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14085008	MRP	63.98	X					73.38	14.98	0.77
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14085010	MMP	64.36	X					73.60	14.83	0.55
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14086002	MMP	63.29	X					74.98	13.56	0.27
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14086009	MMP	63.18	X					74.61	13.48	0.39
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14085012	MMP	62.12	X					73.75	14.32	0.12
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14085012	MRP	62.12	X					73.15	15.52	0.20
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14086011	MMP	62.49	X					74.41	13.48	0.26
31/03/14	PE99051	CARMINE LCI	14086013	MMP	62.75	X					74.11	15.16	0.04
ABRIL													
04/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14086013	MRP	62.75	X					73.17	15.90	0.51
01/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14087002	MMP	62.45	X					73.21	15.59	0.43
02/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14090003	MMP	61.34	X					75.29	13.98	0.36
04/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14090003	MRRP	61.34	X					72.44	16.77	0.45
03/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14091004	MMP	63.36	X					74.94	14.06	0.19
03/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14091006	MMP	62.52	X					75.00	13.68	0.15
09/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14091006	MMP	60.36	X					73.08	16.21	0.30
05/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14092004	MMP	63.15	X					74.02	15.30	0.18
04/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14094007	MMP	62.64	X					72.84	15.52	0.41
05/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14091017	MMP	62.74	X					73.94	14.88	0.24
05/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14092002	MMP	62.55	X					74.06	14.51	0.20
11/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14092002	MRP	62.55	X					73.70	16.67	0.48
05/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14091015	MMP	61.79	X					76.09	14.80	0.50
11/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14091015	MRP	61.79	X					73.66	16.84	0.75
06/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14093002	MMP	61.03	X					74.02	14.94	0.28
09/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14093002	MMP	62.43	X					73.51	15.63	0.38
11/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14093002	MRP	61.03	X					75.00	15.55	0.82
08/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14093004	MMP	59.49	X					74.02	15.31	0.38

22/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14091002	MRRP	62.24	X				72.76	17.20	0.82
23/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14100004	MMP	62.32	X				72.86	16.99	-0.33
23/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14112003	MMP	63.26	X				73.59	15.54	T
23/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14112005	MMP	61.85	X				74.02	14.51	-0.12
23/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14113002	MMP	62.24	X				73.70	14.83	0.45
23/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14113006	MMP	61.97	X				73.25	14.99	-0.51
24/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14113006	MARP	61.59	X				73.39	15.20	0.21
24/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14113008	MMP	62.24	X				73.00	15.20	-0.32
25/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14115006	MMP	63.35	X				74.79	13.26	0.02
25/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14114018	MMP	63.58	X				74.25	13.98	0.05
25/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14115004	MMP	63.11	X				74.34	15.61	0.21
25/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14115006	MMP	63.35	X				74.79	13.26	0.02
25/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14116002	MMP	60.74	X				74.64	12.66	-0.44
26/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14116006	MMP	63.49	X				74.11	14.74	-0.33
26/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14115008	MMP	63.74	X				74.97	14.01	-0.33
26/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14111013	MMP	59.61	X				75.33	14.62	-0.38
26/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14111008	MMP	62.30	X				72.31	15.70	-0.34
27/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14112016	MMP	62.12	X				71.35	16.93	-0.51
27/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14113004	MMP	63.21	X				73.56	15.95	-0.47
27/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14117003	MMP	62.14	X				72.96	16.64	-0.33
27/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14116008	MMP	62.94	X				74.18	15.25	-0.58
28/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14117005	MMP	62.87	X				73.71	14.99	-0.32
27/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14119006	MMP	63.90	X				75.70	12.10	0.38
28/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14120004	MMP	63.81	X				75.09	13.86	0.21
28/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14119004	MMP	63.93	X				74.95	14.41	0.16
28/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14118008	MMP	64.94	X				74.74	14.20	0.11
29/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14119002	MMP	64.03	X				75.23	14.30	0.05

09/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14119002	MRP	64.03	X					72.67	16.55	0.28
30/04/14	PE99051	CARMINE LCI	14118004	MMP	64.47	X					75.35	14.33	0.05
MAYO													
02/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14119004	MMP	62.58	X					75.73	13.60	0.10
02/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14116004	MMP	62.45	X					76.72	10.50	0.18
02/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14118002	MMP	65.25	X					75.58	13.75	-0.02
03/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14118006	MMP	63.86	X					76.06	11.83	0.04
05/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14119008	MMP	64.44	X					74.97	14.36	0.11
09/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14119008	MRP	64.44	X					73.51	15.70	0.15
09/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14121001	MARP	59.56	X					74.19	14.28	0.47
10/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14128018	MMP	65.43	X					74.46	13.57	0.37
12/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14129016	MMP	62.53	X					75.63	13.45	-0.08
12/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14129007	MMP	64.09	X					75.31	14.14	0.18
15/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14129007	MRP	64.09	X					74.05	15.67	0.32
12/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14129009	MMP	63.45	X					75.72	14.42	-0.08
15/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14129009	MRP	63.45	X					73.21	16.69	-0.14
12/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14129018	MMP	62.37	X					75.58	13.71	0.29
15/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14129018	MRP	62.37	X					74.21	15.08	0.35
12/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14130004	MMP	62.71	X					75.08	14.05	0.30
15/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14130004	MRP	62.71	X					73.10	15.95	0.24
13/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14130006	MMP	61.96	X					72.83	16.86	0.45
14/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14131002	MMP	63.60	X					736.36	15.39	0.51
15/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14132002	MMP	62.31	X					73.98	14.66	0.10
15/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14132007	MMP	63.75	X					73.23	15.57	-0.16
15/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14133003	MMP	63.18	X					74.60	13.76	0.15
15/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14132011	MMP	63.43	X					74.35	13.43	0.05

16/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14133020	MMP	62.93	X				72.14	17.85	0.15
16/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14133007	MMP	63.25	X				74.12	15.49	-0.21
16/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14133022	MMP	63.85	X				73.69	15.07	0.10
16/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14134004	MMP	62.09	X				74.19	15.16	-0.18
17/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14134002	MMP	63.61	X				76.68	11.17	-0.17
17/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14135003	MMP	61.31	X				73.45	15.07	-0.17
17/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14134018	MMP	62.22	X				74.11	13.72	-0.26
19/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14136006	MMP	63.35	X				75.44	12.26	0.31
19/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14136013	MMP	64.35	X				74.95	14.77	-0.01
19/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14135007	MMP	63.96	X				74.66	13.01	0.36
19/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14137004	MMP	63.64	X				74.64	13.68	0.11
19/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14137016	MMP	62.48	X				75.14	14.21	0.11
19/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14137014	MMP	63.13	X				75.37	11.85	0.23
20/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14138005	MMP	61.80	X				74.16	14.78	0.33
21/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14139002	MMP	61.02	X				73.32	14.57	-0.02
21/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14132011	MMP	58.71	X				73.51	15.28	0.18
21/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14138003	MMP	57.67	X				74.38	15.06	-0.11
22/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14139014	MMP	64.75	X				74.39	13.25	-0.03
22/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14139012	MMP	63.46	X				73.67	14.63	-0.17
22/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14140002	MMP	64.01	X				74.63	12.65	-0.04
22/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14139016	MMP	63.40	X				74.08	15.27	-0.24
23/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14141003	MMP	63.85	X				74.10	13.52	-0.25
24/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14140019	MMP	63.37	X				73.89	15.03	-0.19
23/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14140022	MMP	64.48	X				73.30	13.42	-0.33
23/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14140025	MMP	63.41	X				75.88	13.73	-0.95
23/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14141011	MMP	63.91	X				76.20	13.22	-0.87
23/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14141013	MMP	62.77	X				73.50	16.51	-0.88

JUNIO													
04/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14141013	MRP	62.77	X					74.38	15.36	-0.39
04/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14141013	MRRP	62.77	X					73.17	17.40	-0.17
26/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14143028	MMP	62.46	X					74.43	13.40	-0.12
27/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14145004	MMP	62.15	X					75.10	14.13	-0.05
27/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14144009	MMP	63.12	X					76.04	13.42	-0.09
27/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14144005	MMP	59.12	X					74.66	13.97	0.22
27/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14145008	MMP	60.13	X					74.72	13.91	-0.39
27/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14145012	MMP	62.88	X					74.02	14.61	0.08
28/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14146018	MMP	62.63	X					73.48	14.48	0.13
28/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14146003	MMP	63.75	X					73.46	15.35	-0.48
29/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14147004	MMP	63.38	X					73.23	15.12	-0.35
29/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14146022	MMP	63.67	X					72.85	14.64	-0.16
29/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14147014	MMP	62.62	X					71.86	16.18	-0.47
04/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14147014	MRP	62.62	X					74.22	14.32	0.26
29/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14147018	MMP	61.82	X					72.46	15.45	-0.33
29/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14148002	MMP	63.07	X					72.29	16.31	-0.45
04/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14148002	MRP	63.07	X					73.84	15.03	0.22
05/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14148003	MRP	64.07	X					72.67	16.18	0.24
30/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14148006	MMP	63.65	X					73.00	15.95	-0.67
30/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14147020	MMP	63.74	X					74.57	14.68	-0.95
31/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14148022	MMP	63.05	X					72.71	15.96	-0.76
31/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14148024	MMP	64.00	X					72.64	15.02	-0.35
31/05/14	PE99051	CARMINE LCI	14149005	MMP	64.61	X					72.81	14.79	-0.46
02/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14149016	MMP	66.27	X					72.39	16.37	-0.60
02/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14150002	MMP	63.32	X					72.80	15.49	-0.39
02/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14150007	MMP	64.19	X					72.22	16.28	-0.66

02/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14149018	MMP	63.37	X					72.47	16.25	-0.52
03/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14150015	MMP	62.20	X					73.40	14.86	-0.50
03/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14150005	MMP	65.19	X					73.91	15.26	-0.91
03/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14149003	MMP	63.46	X					75.43	14.34	-1.16
03/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14147016	MMP	61.67	X					75.49	13.41	-1.14
03/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14140830	MMP	63.64	X					76.01	13.70	-1.20
03/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14149021	MMP	63.60	X					75.83	13.51	-1.21
03/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14153006	MMP	62.96	X					72.47	15.30	-0.62
04/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14153021	MMP	65.24	X					74.19	14.80	0.40
04/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14153008	MMP	64.50	X					74.13	14.97	0.36
04/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14153019	MMP	66.66	X					74.31	15.00	0.09
04/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14154007	MMP	63.36	X					74.18	15.05	-0.27
05/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14154003	MMP	65.38	X					75.27	12.58	0.46
05/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14154017	MMP	64.69	X					75.15	14.58	0.10
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14155010	MMP	63.65	X					74.80	12.81	0.37
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14154021	MMP	64.52	X					74.93	14.42	-0.18
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14155003	MMP	62.61	X					73.79	14.55	0.27
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14155018	MMP	62.06	X					72.25	13.07	0.01
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156003	MMP	60.05	X					75.15	13.20	0.16
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14155014	MMP	62.13	X					76.01	13.37	-0.37
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14154005	MMP	62.42	X					74.66	13.61	-0.19
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156007	MMP	60.63	X					74.66	13.47	-0.08
07/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156011	MMP	59.62	X					73.27	15.97	-0.18
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14155016	MMP	63.64	X					74.03	13.19	-0.24
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14155012	MMP	64.10	X					74.53	13.19	-0.24
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14155005	MMP	63.80	X					73.73	14.27	-0.15
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14157002	MMP	64.29	X					73.10	14.97	-0.44

09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156015	MMP	62.74	X				73.34	15.72	-0.38
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156013	MMP	64.83	X				73.56	14.37	-0.55
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156005	MMP	64.46	X				72.63	15.67	-0.58
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156009	MMP	62.73	X				73.34	14.35	-0.53
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14157004	MMP	62.12	X				74.03	15.35	-0.28
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14153023	MMP	63.57	X				72.75	15.85	-0.27
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14157006	MMP	62.75	X				72.37	16.51	-1.16
09/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14157010	MMP	63.82	X				72.05	16.30	-0.96
10/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14157016	MMP	64.13	X				75.47	13.31	0.37
10/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14154009	MMP	63.81	X				74.04	14.34	0.26
10/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14154019	MMP	63.82	X				72.27	13.64	0.23
10/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156015	MMP	61.82	X				74.33	15.02	0.08
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14156015	MRP	61.82	X				73.58	15.98	0.18
10/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14158003	MMP	63.63	X				76.60	12.98	0.03
10/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14158011	MMP	62.95	X				74.84	14.39	0.23
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14158011	MRP	62.95	X				73.96	15.32	0.43
11/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14157008	MMP	62.51	X				72.79	16.22	-0.14
11/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14157014	MMP	62.09	X				73.63	15.64	-0.28
11/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14158005	MMP	61.96	X				74.07	14.70	0.05
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14158005	MRP	61.96	X				74.30	14.97	0.58
11/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14158007	MMP	63.00	X				73.84	14.83	-0.27
11/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14158009	MMP	63.12	X				74.49	14.42	-0.32
11/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14157018	MMP	62.92	X				73.20	14.99	-0.37
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14160002	MMP	62.42	X				74.93	14.69	0.07
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14161002	MMP	62.01	X				74.43	14.81	0.15
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14160004	MMP	61.63	X				74.16	14.96	0.22
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14160017	MMP	63.26	X				75.68	14.27	-0.20

13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14161006	MMP	61.25	X						74.44	14.47	0.20
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14160013	MMP	62.89	X						73.59	15.22	0.23
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14160015	MMP	61.96	X						74.65	14.37	0.10
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14146012	MMP	62.35	X						75.19	14.05	0.09
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14162002	MMP	61.11	X						73.49	15.63	0.02
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14161010	MMP	62.35	X						74.83	14.19	-0.10
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14161012	MMP	62.21	X						74.38	13.78	0.07
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14161014	MMP	64.05	X						74.93	14.34	-0.25
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14161014	MRP	64.05	X						74.04	16.26	0.07
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14161008	MMP	62.04	X						75.20	14.18	0.13
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14162008	MMP	61.89	X						75.29	14.02	0.18
13/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14162004	MMP	62.66	X						74.30	14.61	0.08
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14162006	MMP	63.64	X						75.63	13.99	0.12
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14162006	MRP	63.64	X						73.72	16.02	0.10
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14162010	MMP	64.91	X						76.13	13.13	-0.26
17/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14162012	MMP	63.77	X						75.35	13.10	0.20
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14162014	MMP	63.28	X						75.61	13.79	-0.24
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163003	MMP	64.66	X						76.19	11.48	0.00
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163005	MMP	63.46	X						74.87	16.66	0.13
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163005	MRP	63.46	X						75.34	15.22	0.38
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163007	MMP	61.82	X						75.21	13.92	-0.20
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163016	MMP	63.66	X						75.95	13.44	-0.06
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163018	MMP	64.98	X						75.71	13.10	-0.09
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163020	MMP	62.72	X						75.14	13.20	0.05
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163009	MMP	63.49	X						74.31	14.15	-0.06
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14164007	MMP	63.65	X						75.96	13.29	0.13
16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14164007	MRP	63.65	X						74.66	15.65	0.24

16/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14164003	MMP	63.27	X					75.24	14.82	0.02
17/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14164014	MMP	64.12	X					75.93	14.07	-0.06
17/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14163012	MMP	64.77	X					74.75	13.33	-0.15
18/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14165016	MMP	62.96	X					75.40	14.37	0.10
18/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14165005	MMP	62.98	X					74.54	14.56	0.14
21/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14165005	MRP	62.98	X					47.78	15.91	0.35
18/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14165019	MMP	61.98	X					75.31	13.18	0.18
18/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14164018	MMP	64.17	X					75.11	13.54	0.30
18/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14165009	MMP	63.18	X					75.49	13.28	0.09
18/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14167003	MMP	63.50	X					74.64	14.59	0.05
21/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14167003	MRP	63.50	X					74.79	15.98	0.41
18/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14167007	MMP	61.87	X					74.98	13.92	0.24
19/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14167021	MMP	64.02	X					74.63	14.57	0.17
21/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14167021	MRP	64.02	X					75.53	15.39	0.39
19/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14167015	MMP	63.04	X					75.23	14.36	0.18
19/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14168003	MMP	64.14	X					75.29	14.24	-0.13
20/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14168017	MMP	63.42	X					75.33	13.98	0.19
20/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14168007	MMP	63.64	X					76.11	11.89	0.24
20/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14168019	MMP	62.55	X					74.83	14.84	0.16
21/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14168019	MRP	62.55	X					72.57	16.32	0.19
20/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14169004	MMP	62.42	X					75.40	12.84	0.29
21/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14169006	MMP	63.79	X					74.77	13.12	0.19
21/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14169010	MMP	62.77	X					74.68	13.84	0.29
21/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14169015	MMP	64.14	X					74.91	13.96	0.15
22/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14170003	MMP	62.00	X					75.34	14.53	0.18
23/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14170008	MMP	62.85	X					73.98	14.73	0.11
23/06/14	PE99051	CARMINE LCI	14171006	MMP	63.73	X					74.29	14.86	0.04

ANEXO 2: Metodologías de Análisis Físico Químico adicionales

Análisis de Acido Carmínico en Extracto a laquear

- Pesar en una balanza analítica la cantidad calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$W = \frac{Abs * 100}{13.9 * \% AC \text{ teórico}}$$

Donde:

W = Peso (g.)

Abs = Absorbancia (0.7)

%AC = Porcentaje de Acido Carmínico teórico

- Transferir a muestra a una fiola de 1000 ml, y añadir 30 ml de HCL 2N y llevar a volumen con agua desionizada o destilada.
- Homogenizar mediante agitación
- Proceder a filtrar la solución resultante al vacío utilizando como medio de filtración el papel de filtración Lenta
- Colocar la solución filtrada en ceda del espectrofotómetro. Utilizar como blanco agua destilada o desionizada.
- Leer la absorbancia a 494 nm de longitud de onda
- Es importante que el rango de absorbancia para FCCII sea de 0.68 a 0.72.

Cálculos:

$$\% AC = \frac{Abs * 100}{13.9 * W}$$

Donde:

W = Peso (g.)

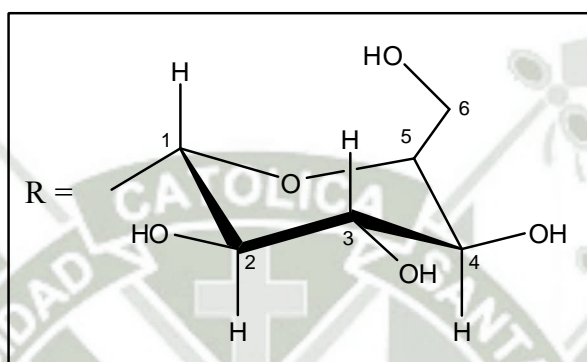
Abs = Absorbancia

%AC = Porcentaje de Acido Carmínico

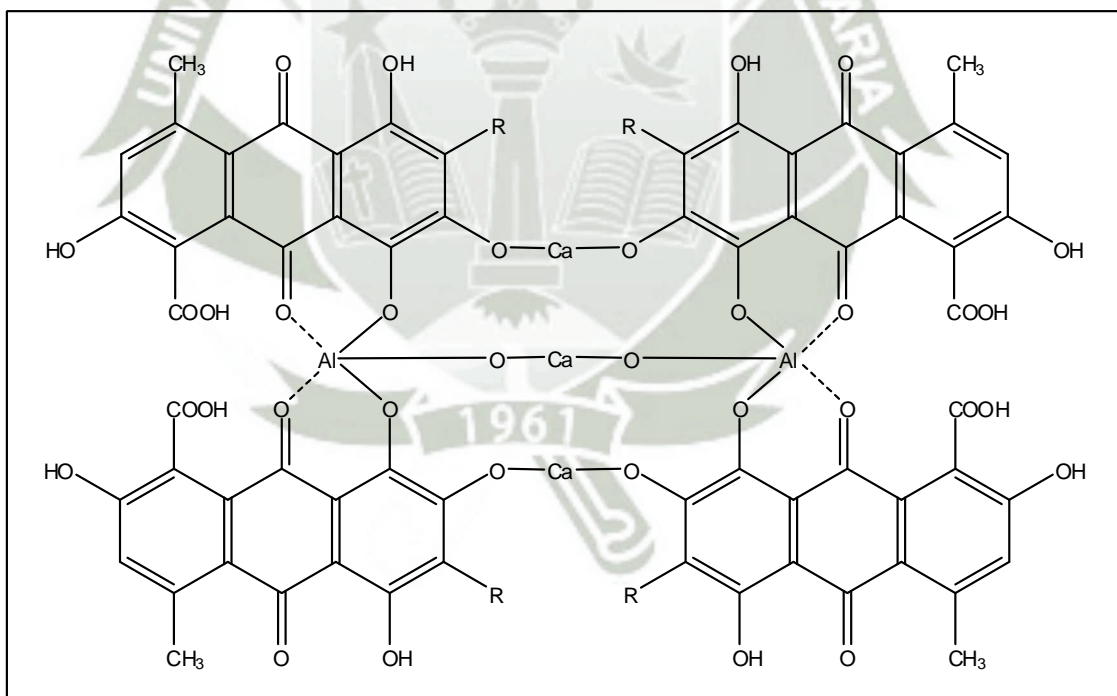
ANEXO 3: Formulas estructurales propuestas para Carmín de Cochinilla. (Gibaja, 1998)

El carmín de cochinilla, es una laca aluminosa-cálcica del ácido carmínico. No se conoce su formula estructural, pero se han postulado las siguientes formulas:

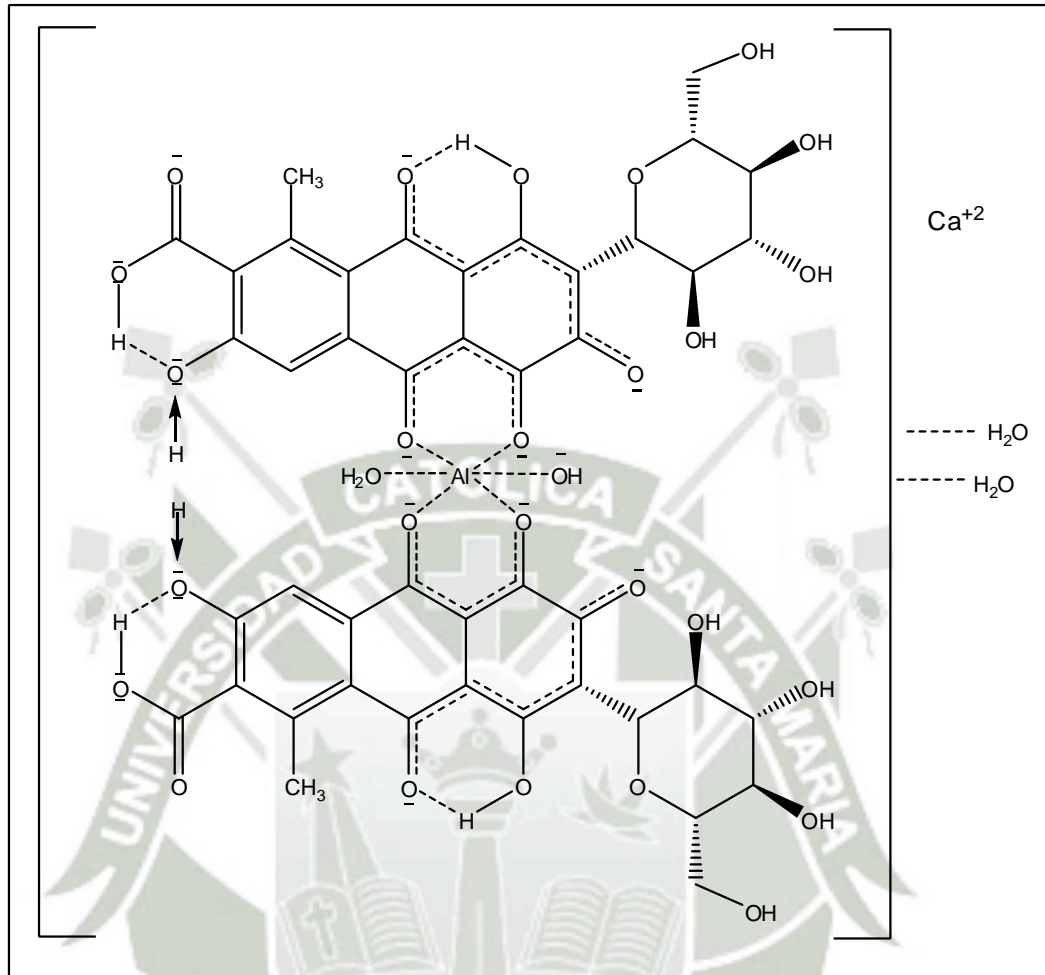
Donde $R = C_6H_{11}O_5$



- Formula sugerida por Harms:



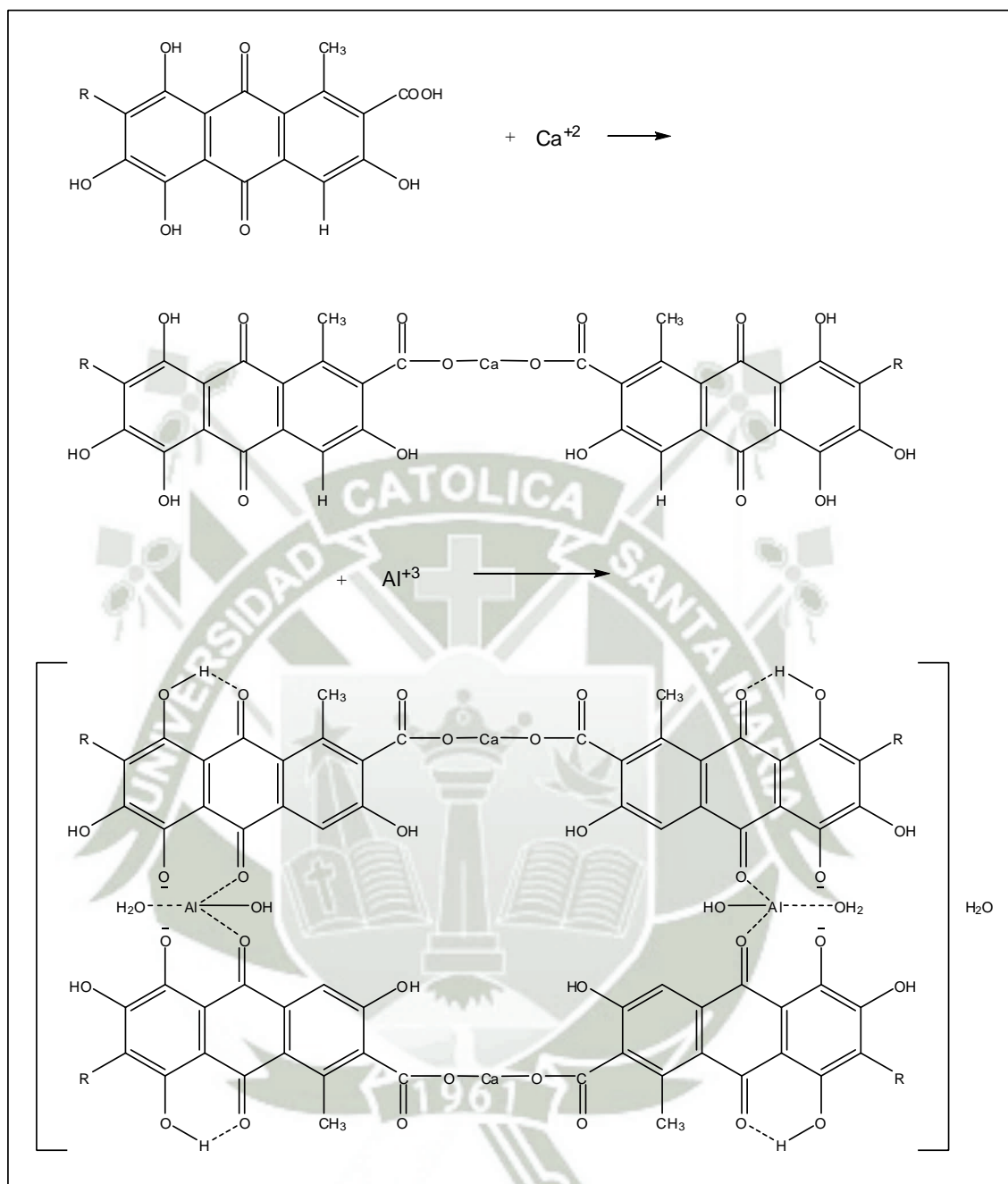
- Formula sugerida por Meloam y col.:



Meloam y col. adoptan la fórmula indicada para el complejo del ácido carmínico-aluminio-calcio, por “analogía” con la fórmula de Kiel-Heerjes establecida para el complejo de 2 alizarina-aluminio-calcio.

- Formula sugerida por Forgios.:

En el método de Forgios el extracto acuoso de la cochinilla es tratado con Ca^{+2} para dar carminato de calcio-proteína; y este complejo se trata con sulfato de aluminio. El aluminio se adiciona a los oxígenos de $5C-O$ y $10>C=O$ del carminato de calcio y se forma el carmín. Para el carmín hemos adoptado la fórmula estructural Forgios representada a continuación:



Cuando el Carmín de cochinilla se trata con aluminio, su color rojo intenso vira al violeta. Este desplazamiento esta producido por la adición del Al^{3+} a los oxígenos de los grupos 8C-OH y 9C=O y a los OH del C4 y C6 del resto del azúcar.

ANEXO 4: Metodología Experimental: Imágenes

- LAQUEADO:



- ENFRIAMIENTO:



- PRECIPITACION:



- SECADO:



- MOLIENDA:



- EPECTROFOTOMETRO:



- PERKIN ELMER
- LAMBDA 25
- UV/Vis range

- COLORIMETRO:



- KONICA MINOLTA
- CR-400 Petri - Dish

