



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Posgrado en Ciencias (Química)

“Extracción y Caracterización de Ácido Carmínico a partir de Grana Cochinilla utilizando Solventes Eutécticos Profundos”

Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Química)

Presenta

I.Q. Katya Kimberly Guerrero Vázquez
Matrícula: 2231802469
Correo: kkgv1997@gmail.com

Directores de tesis:
Dr. Francisco Méndez Ruíz
Dra. Arlette Violeta Richaud Torres

Jurado:
Presidente: Dr. José Antonio Moreno Razo
Secretario: Dr. Sergio Antonio Gómez Torres
Vocal: Dra. Claudia Araceli Contreras Celedon

Iztapalapa, Ciudad de México a 20 de Junio de 2025

1. Agradecimientos

A mi familia, mi razón de ser, la luz que ilumina mis días y la fuerza que me impulsa a seguir. Ustedes son la razón por la que me mantengo de pie, luchando cada día por un futuro mejor. Mi vida es un reflejo de su amor y sacrificio, y por ello, mi gratitud es infinita.

A mis padres, los dos seres más maravillosos que la vida me pudo dar. Ellos son mis pilares, mis guías y mis protectores. A ti, papá Ramón, que con tu sabiduría y tu amor incondicional me enseñaste que el conocimiento es poder, que a través de él podemos transformar el mundo. Gracias por ser mi ejemplo de fortaleza, por mostrarme que, incluso en los momentos más difíciles, siempre hay una salida, siempre hay esperanza. Tu apoyo, tu fe en mí y tu confianza son las fuerzas que me impulsan a seguir adelante.

A ti, mamá Margarita, la razón de mi calma y mi paciencia. Tú, con tu amor inquebrantable y tu ternura infinita, me enseñaste a ser tolerante, a entender que todo tiene su tiempo y su espacio. Gracias por tu paciencia infinita, por tus abrazos que han sanado mis heridas, por tus palabras sabias que siempre me han hecho encontrar el camino, incluso cuando sentía que me perdía. Eres mi refugio, mi amor eterno, y tu presencia en mi vida es la razón por la que puedo enfrentar cualquier desafío con la certeza de que todo estará bien. El amor que me das es mi fuerza más grande.

A mis hermanas, mis compañeras de alma, que siempre han estado a mi lado, con sus diferencias que me enriquecen cada día. A Leslie, mi niña sentimental, cuya empatía me reconforta; a Megan, mi corazón valiente, que siempre ha sido el coraje en mis días más oscuros; y a Danna, mi pequeña temeraria, que me enseña a luchar con pasión y determinación. Cada una de ustedes ha sido un pilar en mi vida.

A ti, Michael Pascoe, el amor que llegó a mi vida para transformarla. No hay palabras suficientes para expresar lo que significas para mí. Gracias por ser mi refugio, por tu amor incondicional que me envuelve y me hace sentir que todo es posible. A tu lado he aprendido lo que es crecer en armonía, a ser responsable, a abrazar mis pasiones y a ver el mundo con los ojos del amor y la madurez. Cada uno de los nueve años que hemos compartido ha sido un regalo, una lección de vida. Juntos, hemos superado desafíos y celebrado logros, y contigo aprendí que el verdadero amor es ese que te acompaña, te fortalece y te inspira a ser mejor cada día. Te amo profundamente, y mi vida no tiene sentido sin ti a mi lado.

A mis asesores, Arlette y Francisco, quienes me brindaron su apoyo y sabiduría a lo largo de este viaje. Gracias por cuidar de mí, por mostrarme que debo ser más segura de mis conocimientos y por hacer de este proceso académico una experiencia enriquecedora. Su guía me ha permitido llegar hasta aquí.

Al Departamento de Química, por darme la oportunidad de ingresar al posgrado, y al CONACYT, por otorgarme la beca que hizo posible este sueño. Gracias por creer en mí y ofrecerme las herramientas necesarias para continuar en este camino de aprendizaje.

A mis padres que siempre me impulsan a esforzarme

“El esfuerzo no traiciona.” — JK (BTS)

Índice

1. Agradecimientos	I
2. Resumen	1
3. Introducción	1
3.1. Ácido carmínico	2
3.1.1. La D-glucosa en el ácido carmínico	4
3.2. Solventes Eutécticos Profundos (DES y NADES)	6
3.3. El Rol del Agua en los DES	7
4. Marco teórico	8
4.1. NADES en la Extracción de Ácido Carmínico	8
5. Hipótesis	11
6. Objetivos	11
6.1. Objetivo general	11
6.2. Objetivos específicos	11
7. Metodología	11
7.1. Eliminación de ceras	11
7.2. Preparación de NADES	11
7.3. Extracción sólido-líquido	12
7.3.1. Extracción MAE	12
7.3.2. Extracción NADES	12
7.3.3. pH en la extracción	12
7.3.4. Cromatografía de placa fina (TLC) y Cromatografía por columna (CC)	13
7.4. Evaluación de la eficiencia de la extracción	13
7.4.1. Identificación IR	13
7.4.2. Identificación RMN	13
7.4.3. Cuantificación HPLC	13
7.4.4. Cuantificación UV-vis	13
7.4.5. Análisis teórico	13
8. Resultados y análisis de resultados	16
8.1. Preparación de NADES	16
8.2. Seguimiento del pH en la extracción	16
8.3. Cuantificación UV-vis	16
8.4. Cromatografía de placa fina (TLC) y Cromatografía por columna (CC)	17
8.5. Reacción de acetilación	18
8.5.1. Caracterización (IR)	20
8.5.2. Caracterización (RMN)	20
8.5.3. Cuantificación HPLC	22
8.5.4. Extracción con NADES	23
8.6. Diagrama de Proceso y Balance de Materia	24
8.7. Estudio teórico de la desprotonación de grupos hidroxilo en el AC	28
8.7.1. Análisis de los Resultados en Función de ΔpK_a	28
9. Conclusiones	30
10. Perspectivas	32

11. Anexo	34
11.1. El ácido carminico y el Itrio	34
11.2. IR Ácido carmínico	34
11.3. Espectro UV	35
11.4. RMN Ácido carminico ^{13}C	36
11.5. Curva de calibración HPLC	37
11.6. Espectro HPLC para Extracción (MAE)	37
11.7. Espectros UV de los NADES	38

Índice de figuras

1.	Valoración con ácido carmínico en una solución de itrio (3) (6) Itrio y AC ver más en Anexo.	1
2.	Estructura ácido carmínico	3
3.	Estructura lineal de la D-glucosa	4
4.	Equilibrio cíclico	5
5.	Cochinilla Grana molida	5
6.	Estructuras químicas de los componentes de los NADES seleccionados	9
7.	Numeración de aniones en en AC	14
8.	Cromatografía de placa fina: Referencia de AC, R-Ac. Tartárico, R- <i>p</i> -TsOH, R-glicerol, SN-Ac. Tartárico, SN- <i>p</i> -TsOH, SN-glicerol.	18
9.	Cromatografía de placa fina: Mezcla de extracción acetilada, producto extraído, producto purificado .	19
10.	Interpretación del espectro infrarrojo de la muestra de ácido carmínico comercial marca ALDRICH acetilado, usado como referencia y muestra acetilada de extracción con NADES.	20
11.	Resonancia magnética de ¹³ C para la muestra acetilada	21
12.	[Pico característico que presenta el cromatógrafo de la Extracción por NADES a 473.9 nm.	23
13.	Espectro UV-vis de la Extracción realizada con NADES.	24
14.	Diagrama del proceso de extracción del AC acetilado, mediante NADES	27
15.	Ácido carminico aniones de prioridad	28
16.	Aniones del ácido salicílico [(17)]	30
17.	Metodología de extracción de AC con NADES	31
18.	Imagen ilustrativa AC y NADES (Cloruro de colina y ácido tartárico)	32
19.	Interpretación del espectro infrarrojo de la muestra de ácido carmínico comercial marca ALDRICH, usado como referencia.	34
20.	[Estandar comercial AC] / (ppm)	35
21.	Resonancia magnética de ¹³ C para la muestra de ácido carmínico comercial marca ALDRICH, usado como referencia.	36
22.	[Estándar comercial AC] / (ppm)	37
23.	[Pico característico que presenta el cromatógrafo de la muestra de extracción MAE	37
24.	Espectrograma cloruro de colina	38
25.	Espectrograma Ac. Tartarico	38

Índice de cuadros

1.	Composición de la grana cochinilla analizando luego de la extracción de AC	2
2.	Propiedades físicas de algunos NADES (11)	8
3.	Solubilidad de los componentes de NADES [Sigma Aldrich]	8
4.	Momentos dipolares de los componenetes de NADES [datos obtenidos de calculos propios en Gaussian 0.9]	9
5.	Los componentes, las proporciones de cada uno y las propiedades de los NADES resultantes de cada mezcla que se utilizarán para la extracción de ácido carmínico (AC).	12
6.	Constituyentes y valores de pH de cada NADES	16
7.	Rendimientos de extracción de cada NADES	17
8.	pH del NADES + soluto acetilado	18
9.	Rendimientos de extracciones MAE por cantidad de insecto	22
10.	Tabla comparativa de extracciones por cantidad de insecto	24
11.	Tabla de los valores en el balance por especie	25
12.	Resultados de energía libre de Gibbs, pKa y Δ pKa para los aniones en fase acuosa.	28
13.	Resultados de energía libre de Gibbs y acidez en fase gaseosa (GA) para los aniones en fase gaseosa.	29

2. Resumen

La extracción del ácido carmínico (AC) de *Dactylopius Coccus Costa* (grana cochinilla) ha despertado un gran interés en las industrias alimentaria y cosmética debido a su amplia aplicación como colorante natural. Sin embargo, los métodos de extracción convencionales que emplean disolventes orgánicos presentan desafíos tanto ambientales como económicos, incluyendo el uso no sostenible de la cochinilla, el consumo excesivo de disolventes y los altos costos asociados a la purificación. Además, restricciones regulatorias en varios países, derivadas de preocupaciones sobre seguridad alimentaria y salud, han motivado la búsqueda de alternativas de extracción más seguras y sostenibles.

En este estudio, se evalúa el uso de solventes eutécticos profundos naturales (NADES) como un método innovador y respetuoso con el ambiente para la extracción del ácido carmínico. Se realizó una serie de microextracciones para determinar las condiciones óptimas, evaluando variables como temperatura, tiempo de extracción, composición del NADES, tiempo de preparación, pureza y rendimiento. Los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones fueron analizados mediante técnicas espectroscópicas (UV-Vis, IR y RMN), lo que permitió identificar la eficacia de las metodologías propuestas.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis teórico utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) para identificar los sitios preferenciales de desprotonación del ácido carmínico y evaluar su comportamiento en distintos medios químicos. Los cálculos se realizaron en fase gaseosa y en solución acuosa al nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p) utilizando el modelo de solvatación implícita SCRF=(Solvent=Water). Se estimaron los cambios relativos de acidez (ΔpK_a) en los grupos funcionales, lo que permitió cuantificar el del entorno químico sobre la estabilidad relativa de los diferentes sitios de desprotonación. Estos resultados proporcionan una base teórica para entender cómo las interacciones del ácido carmínico con disolventes específicos influyen en la eficiencia de extracción.

Los hallazgos resaltan el potencial de los NADES, compuestos por ácido tartárico, cloruro de colina y agua, como solventes eficientes y sostenibles para la extracción selectiva del ácido carmínico. La integración de la optimización experimental con el análisis teórico contribuye al desarrollo de técnicas de extracción más verdes, abordando las preocupaciones ambientales y y satisfaciendo la creciente demanda industrial de procesos más limpios, selectivos y eficientes.

3. Introducción

El ácido carmínico (AC) es un compuesto relevante en la industria de los colorantes, con un uso histórico que se remonta a las civilizaciones azteca y maya, quienes lo extraían de la grana cochinilla (*Dactylopius Coccus*). Durante la época virreinal, el AC se convirtió en un importante producto de exportación hacia España, junto con otros bienes valiosos como el oro (1). Las hembras adultas del insecto son las productoras de ácido carmínico, la cantidad de AC extraído depende de factores como la maduración del insecto, su dieta y la región de cultivo (2). Una propiedad notable del AC es su variación de color con el pH, presentando una gama que va desde anaranjado en pH 1-3, rojo en pH 5.5, rojo carmín en pH 7, hasta rosa en pH 14 (3). Esta variación se debe a sus equilibrios ácido-base. El AC es un compuesto polar que interactúa eficientemente mediante puentes de hidrógeno con disolventes polares como el agua. Su solubilidad y color están influenciados por el pH y temperatura (4). El color rojo del AC es consecuencia de la presencia de grupos cromóforos con un sistema de enlaces dobles conjugados que facilitan la absorción de luz visible. Además, sus grupos carboxilo pueden formar complejos con metales como el aluminio, lo que explica su uso en colorantes (5).



Figura 1: Valoración con ácido carmínico en una solución de itrio (3) (6) Itrio y AC ver más en Anexo.

La extracción sólido-líquido del AC se basa en la solubilidad, el equilibrio de fases y la cinética de extracción.

Además, el tamaño de partícula es crucial para optimizar el rendimiento de extracción (7). Históricamente, la extracción prehispánica utilizaba procedimientos simples como el secado y molido de las cochinillas, seguido de la inmersión en agua caliente. Aunque este método no permite la obtención de ácido carmínico puro, sigue siendo de interés para estudios históricos (8). Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas de extracción para mejorar el rendimiento y pureza del AC. Por ejemplo, la extracción asistida por microondas (MAE) ha mostrado ser eficiente al aumentar la penetración del solvente en la matriz celular, alcanzando un rendimiento superior 60 % (9). Sin embargo, los solventes reportados en la extracción de AC (Hexano, Cloroformo, Metanol, Etanol) suelen ser tóxicos y poco sostenibles en comparación con los solventes eutécticos profundos naturales (NADES). En este sentido, los líquidos iónicos (ILs) y los solventes eutécticos profundos (DES) han sido propuestos como alternativas ecológicas, aunque los ILs presentan desventajas como altos costos y falta de biocompatibilidad. Los DES ofrecen una alternativa sostenible, con propiedades fisicoquímicas similares a los ILs (9).

3.1. Ácido carmínico

El ácido carmínico, con fórmula química $C_{22}H_{20}O_{13}$, es un pigmento rojo carmesí clasificado como un colorante antraquinóico. Su estructura incluye un núcleo de 1,3,4,6-tetrahidroxi-9,10-antraquinona, un grupo metilo en la posición 8, un grupo carboxilo en la posición 7 y una cadena de glucitol unida mediante un enlace C-glucosídico. Su masa molecular es de 492.39 g/mol. Comercialmente, este compuesto es conocido como “carmín” cuando contiene al menos un 50 % de ácido carmínico en solución. En la tabla 1, se muestra la composición porcentual de los diferentes compuestos identificados durante la extracción del AC de la grana cochinilla (*Dactylopius Coccus* Costa)(1)

Tabla 1: Composición de la grana cochinilla analizando luego de la extracción de AC

Componente	Porcentaje total en el animal [%]
Ácido Carmínico	10-12
Grasas	2-12
Ceras	2-3
Humedad (agua)	10-12
Proteínas	32-45
Carbohidratos	10-12
Cenizas	3-5

El ácido carmínico presenta las siguientes características:

1. Es un compuesto polar, debido a la posición y número de los grupos funcionales polares presentes en su estructura los grupos ácidos carboxílicos (COOH) y los grupos hidroxilo (OH). Esta polaridad permite que el ácido carmínico interactúe eficazmente a través de enlaces de hidrógeno con compuestos polares, como el agua.
2. En solución acuosa, el ácido carmínico presenta una conductividad eléctrica baja, típicamente del orden de 1–10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, dependiendo de la concentración y el pH. Esta baja conductividad se debe a su escasa disociación iónica: aunque posee grupos carboxílicos (–COOH) capaces de ionizarse parcialmente en medio acuoso, el grado de disociación es limitado, especialmente en soluciones con pH inferior a 5. A modo de comparación, un electrolito fuerte como NaCl al 0.01 M puede tener conductividades del orden de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esta diferencia evidencia que el ácido carmínico no genera una cantidad significativa de iones libres en solución, lo cual puede influir en su comportamiento en procesos como separación por campos eléctricos o en aplicaciones electroquímicas.
3. La solubilidad del ácido carmínico puede variar con la temperatura y el pH. A pH ácido, el ácido carmínico se encuentra en su forma protonada (no ionizada), lo que puede influir en su solubilidad y color. (4)
4. Su color rojo se deriva de la presencia de grupos cromóforos en su estructura molecular, que incluyen un sistema de enlaces dobles conjugados, también conocido como enlace pi. Este enlace pi es una característica estructural crucial de los compuestos orgánicos, ya que facilita la absorción de luz visible. Cuando una molécula posee un sistema de enlaces dobles conjugados, como en el ácido carmínico, los electrones de los enlaces pi pueden moverse dentro del sistema en respuesta a la energía absorbida de los fotones de luz visible. A medida que los electrones del sistema pi absorben la luz visible, la molécula se excita a un estado electrónico más alto, lo cual afecta su apariencia de color. La longitud de onda de la luz absorbida determina el color observado de

la sustancia. El sistema de enlaces pi conjugados en el ácido carmínico es lo que le confiere su intenso color rojo.

5. Contiene grupos carboxilo en su estructura, los cuales presentan dos pares de electrones libres (Figura 2). Según la teoría ácido-base de Lewis, estos pares de electrones actúan como bases y pueden interactuar con metales como aluminio o calcio, u otros ácidos de Lewis formando interacciones de tipo electrostático o de coordinación.(5)

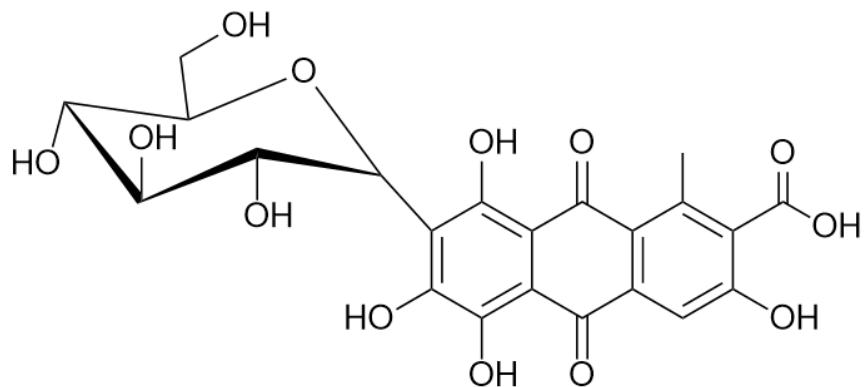


Figura 2: Estructura ácido carmínico

Este pigmento presenta alta solubilidad en una amplia variedad de medios, incluyendo soluciones acuosas, alcohólicas, ésteres, ácidos y entornos alcalinos, gracias a su estructura poli-hidroxilada. No obstante, es insoluble en disolventes no polares como el éter de petróleo, benceno y cloroformo. En soluciones acuosas, es susceptible a degradación fotoquímica por absorción de luz, aunque mantiene una notable estabilidad química gracias a un equilibrio entre varias formas isoméricas y su capacidad de participar en reacciones de óxido-reducción.

3.1.1. La D-glucosa en el ácido carmínico

El ácido carmínico posee una unidad de D-glucosa enlazada mediante un enlace O-glucosídico al núcleo de antraquinona, el cual es responsable de su intensa coloración. La presencia de la glucosa incrementa la solubilidad en medios acuosos gracias a sus múltiples grupos hidroxilo, facilitando la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones con solventes polares.

Dado que la interacción entre la D-glucosa y los disolventes juega un papel crucial en la eficiencia de extracción, se estudia a continuación su estructura:

a) Estructura lineal de la D-glucosa.

La D-glucosa es un monosacárido con un grupo aldehído en el carbono 1 (C1), que es lo que la convierte en un aldosa. Su fórmula es $C_6H_{12}O_6$ y su estructura lineal incluye un grupo aldehído ($-CHO$) en el extremo de la cadena y varios grupos hidroxilo ($-OH$) en los otros carbonos.

La estructura lineal de la glucosa se muestra a continuación:

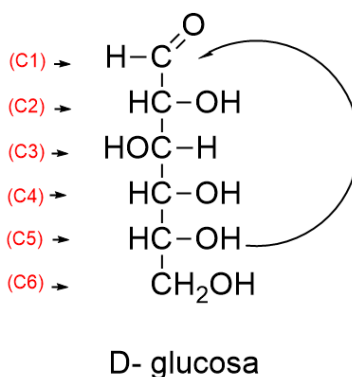


Figura 3: Estructura lineal de la D-glucosa

b) Reacción de adición nucleofílica para formar el hemiacetal (grupo hidroxilo ($-OH$) que reacciona con un grupo carbonilo ($-C=O$), proveniente de un aldehído).

Cuando la D-glucosa está en solución acuosa, su grupo aldehído (en C1) puede reaccionar con un grupo hidroxilo ($-OH$) en el carbono 5 (C5), que está ubicado en el extremo de la cadena. Esta es una reacción de adición nucleofílica.

- Nucleófilo y Electrófilo Nucleófilo: El oxígeno del grupo hidroxilo en C5 es nucleofílico, porque tiene un par de electrones no compartidos, lo que le permite atacar (reaccionar) un átomo de carbono electrofílico. Electrófilo: El carbono en el grupo aldehído (C1) es electrofílico porque el doble enlace con oxígeno ($C=O$) hace que el carbono esté parcialmente cargado positivamente, lo que lo hace susceptible a un ataque nucleofílico.
- Mecanismo de adición nucleofílica Ataque nucleofílico: El oxígeno del grupo hidroxilo en el C5 ataca al carbono del grupo aldehído (C1), lo que rompe el doble enlace $C=O$.

Formación del hemiacetal: Como resultado del ataque nucleofílico, el C1 ahora tiene un enlace simple con un nuevo oxígeno (el oxígeno proveniente del C5) y un grupo hidroxilo (OH) en el C1. Esto forma un hemiacetal.

La reacción puede representarse de la siguiente manera:

c) Equilibrio cíclico: Alfa y beta anómeros.

Una vez que se forma el hemiacetal, el nuevo carbono (C1) donde se unió el oxígeno se llama carbono anomérico. Este carbono puede existir en dos configuraciones espaciales distintas, lo que da lugar a dos formas anoméricas: alfa α y beta β .

En la forma alfa α , el grupo $-OH$ en el carbono anomérico está opuesto al grupo CH_2OH (en C6). En la forma beta β , el grupo $-OH$ en el carbono anomérico está en la misma dirección que el grupo CH_2OH . El equilibrio entre estas dos formas anoméricas es lo que ocurre en solución acuosa, y ambas formas están presentes en equilibrio.

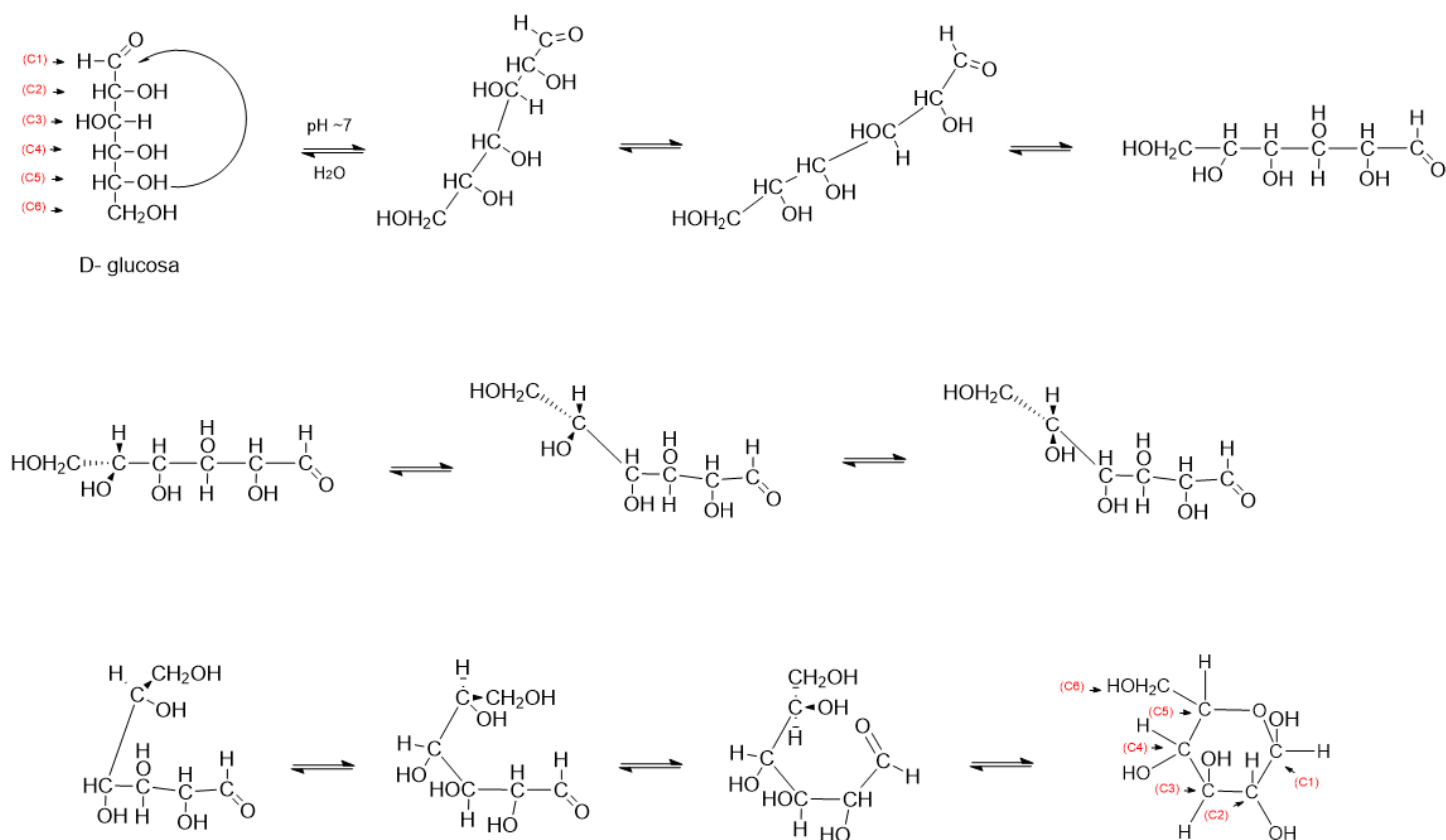


Figura 4: Equilibrio cíclico

El ácido carmínico es un colorante natural que se extrae de la cochinilla *Dactylopius coccus*, aunque también existen métodos biotecnológicos recientes para producirlo sin depender de fuentes naturales. En la industria alimentaria, se emplea para dar tonos rojos a bebidas, jugos, helados, yogures, embutidos y otros productos. Aunque carece de sabor y aroma, su color ayuda a mejorar el atractivo visual de los alimentos y bebidas, lo cual influye en la percepción del sabor. Este efecto psicológico hace que los consumidores asocien el color de un alimento con un sabor específico, creando así una experiencia sensorial más completa.



Figura 5: Cochinilla Grana molida

Además de su uso en la industria alimentaria, el ácido carmínico también se aplica en textiles, cosméticos, medicamentos y otros productos, con la aprobación de la FDA para su uso como colorante (6). Su estabilidad en un amplio rango de pH (3.5 a 8) y su resistencia al calor y la luz aumentan su valor para diversas aplicaciones. Debido a estas propiedades, el interés científico en este colorante ha ido en aumento, especialmente en sus potenciales beneficios biológicos ya que el ácido carmínico no solo posee actividad antioxidante, sino que

también ayuda a reducir la inflamación y el estrés oxidativo en el hígado, mostrándose prometedor como tratamiento para enfermedades hepáticas, como la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) (6). Además, se ha explorado su conjugación con la hormona GnRH, lo que abre posibilidades para el desarrollo de compuestos con actividad fotoactiva (6).

El ácido carmínico, conocido comercialmente como E120, cambia de color en solución según el pH, ya que sus fracciones fenólicas presentan una naturaleza ácida. A pH bajo, el ácido carmínico muestra un tono naranja, mientras que en condiciones ligeramente ácidas o neutras se torna rojo, y en medios alcalinos puede adquirir un tono violeta (3). En los métodos de extracción de ácido carmínico, el pH es un factor fundamental, ya que influye de manera significativa en la eficiencia y especificidad del proceso, regula el estado de carga del ácido carmínico y los equilibrios de ionización de sus componentes, generando un conjunto de interacciones electrostáticas y fenómenos de solvatación que resultan cruciales para el mecanismo de extracción.

3.2. Solventes Eutécticos Profundos (DES y NADES)

Los Solventes Eutécticos Profundos (DES, por sus siglas en inglés: *Deep Eutectic Solvents*) conforman una categoría relativamente reciente de solventes verdes, desarrollada a partir de la combinación de dos o más compuestos (generalmente sólidos a temperatura ambiente) que, al mezclarse en proporciones adecuadas, forman un líquido a temperatura ambiente. Estos solventes han ganado atención en la última década debido a su bajo costo, biodegradabilidad, baja toxicidad y la posibilidad de diseñar sus propiedades físico-químicas. Una de estas propiedades es su viscosidad típicamente elevada, que puede variar entre 100 y 10,000 mPa · s a temperatura ambiente, dependiendo de la composición del DES. Esta viscosidad es significativamente mayor que la del agua (1 mPa · s) o del etanol (1.2 mPa · s), lo que puede afectar procesos de difusión, transporte de masa o manipulación en aplicaciones prácticas, además los DES tienen una capacidad específica para interactuar mediante enlaces de hidrógeno, estas interacciones promueven la solubilidad de compuestos polares, tanto orgánicos como inorgánicos, que contienen átomos electronegativos o aceptores de puentes de hidrógeno. Haciendo así que los DES se comporten como líquidos con características ajustables a sistemas como extracción de colorantes de origen vegetal.(10).

Los DES se clasifican en diferentes tipos según los componentes que los forman.

- Tipo I: Formados por una sal cuaternaria, comúnmente cloruro de colina, y una sal metálica anhidra, como ZnCl_2 . Estos sistemas presentan propiedades catalíticas o electroquímicas, pero generalmente no se consideran de origen natural.
- Tipo II: Similares al tipo I, pero en este caso la sal metálica está hidratada, por ejemplo $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Este tipo de DES se ha aplicado en procesos redox, aunque su toxicidad y origen no natural limitan su uso en aplicaciones verdes.
- Tipo IV: Integrados por un compuesto orgánico (HBA) y una sal metálica hidratada, sin la presencia de sales cuaternarias. Un ejemplo es la mezcla de urea con $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Aunque menos comunes, estos sistemas han demostrado utilidad en catálisis y síntesis química.
- Tipo V: Formados por dos compuestos orgánicos (uno actúa como HBA y otro como HBD), sin sales metálicas ni sales cuaternarias. Ejemplos incluyen mezclas de ácido láctico con glucosa o glicerol. Al igual que los tipo III, estos DES también se consideran NADES por su origen completamente natural.
- DES tipo III se forman por la interacción entre una sal de amonio cuaternaria, como el cloruro de colina (ChCl), y un compuesto dador de hidrógeno (HBD), como ácidos carboxílicos o alcoholes. Las interacciones de enlace de hidrógeno son clave para reducir el punto de fusión de la mezcla.(11).

En los DES tipo III, las interacciones intermoleculares entre el HBD y el aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) facilitan la deslocalización de la carga del anión en la sal de amonio, lo que reduce la fuerza del enlace iónico y disminuye la energía de la red cristalina. Sin embargo, el éxito de estos procesos depende de varios factores, como la polaridad, viscosidad y capacidad de formación de enlaces de hidrógeno, lo que es particularmente relevante en el diseño de NADES (Natural Deep Eutectic Solvents), un subgrupo de DES basados en componentes naturales(12)(13).

3.3. El Rol del Agua en los DES

El agua juega un papel fundamental en el comportamiento y desempeño de los DES, especialmente en aplicaciones como la extracción de compuestos bioactivos. Las propiedades fisicoquímicas del sistema, como la viscosidad, la conductividad eléctrica y la capacidad extractiva, están fuertemente influenciadas por el contenido de agua.

A concentraciones bajas de agua (fracción molar $<30\%$ o fracción en peso $<5\%$), esta se incorpora a la red del DES sin alterar significativamente sus propiedades. En este rango, el agua no compite de forma notable por los enlaces de hidrógeno entre el donador (HBD) y el aceptor de enlaces (HBA), permitiendo que la estructura y funcionalidad del sistema se mantenga prácticamente intacta (12).

Sin embargo, cuando la fracción molar de agua supera el 50% , se observa una disrupción importante de la red de enlaces de hidrógeno característica del DES. El agua actúa como competidor por los sitios de enlace, debilitando las interacciones HBD–HBA y desorganizando la estructura supramolecular, es decir, la red tridimensional mantenida por interacciones no covalentes. Este fenómeno afecta negativamente propiedades clave como la solubilidad, la viscosidad y la selectividad, disminuyendo así la eficacia del sistema en procesos como la extracción o la catálisis. En estas condiciones, el DES puede comportarse más como una solución acuosa diluida que como un medio eutéctico funcional (12).

En esencia, el exceso de agua puede transformar un DES en una solución acuosa diluida, lo que compromete su capacidad para interactuar de manera eficiente con los compuestos de interés, como el ácido carmínico(12).

4. Marco teórico

4.1. NADES en la Extracción de Ácido Carmínico

El uso de NADES, especialmente aquellos que incluyen cloruro de colina como HBA y un ácido carboxílico o un alcohol como HBD, ha demostrado ser eficaz en la extracción de compuestos fenólicos (9), como el ácido carmínico.

En los experimentos de extracción con NADES basados en cloruro de colina y ácido tartárico, se ha observado que un contenido adecuado de agua mantiene la integridad del sistema (13) (11) y mejoraría la selectividad hacia el ácido carmínico. Esto resalta la importancia del diseño racional de los NADES, donde no solo se debe considerar la naturaleza de los componentes, sino también como se mencionó anteriormente la cantidad de agua, ya que este factor influye directamente en las propiedades físicas del sistema y, por ende, en su capacidad para actuar como solvente de extracción.

En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos y algunas características físicas relevantes de seis NADES empleados en diversos procesos químicos por el grupo de investigación de Diego A. Alonso. (11). En dicha tabla, se puede observar el recurrente uso del cloruro de colina como un constituyente importante de esos NADES pues debido a su estructura iónica, el cloruro de colina puede interactuar con otras moléculas polares a través de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno favoreciendo su solubilidad en agua y otros disolventes polares.(11)

Tabla 2: Propiedades físicas de algunos NADES (11)

NADES	Proporción	p.f (°C)	Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (cP)	Conductividad (mS/cm)	Biodegradabilidad (%)28 días
ChCl- Urea	1:2	12	1.25	750	0.199	97.1
ChCl-Glicerol	1:2	-40	1.18	376	1.05	95.9
ChCl-Ácido malónico	1:2	10	1.25	1124	0.36	76.3
ChCl-Ácido tartárico	1:2	47	1.27	66441	0.014	84.6
ChCl-TsOH	1:1	27	1.21	183	0.04	80.4

Dado que los NADES también son polares y que, según el principio de que "lo polar disuelve lo polar", se puede prever que la afinidad del ácido carmínico por los NADES será mayor en función de la polaridad de estos solventes. Otra característica importante es la solubilidad en agua de los NADES ya que esto determinará la facilidad de formar una mezcla homogénea al preparar el NADES (Tabla 3)

Tabla 3: Solubilidad de los componentes de NADES [Sigma Aldrich]

Especie	Solubilidad
<i>p</i> -TsOH	670 g/L a 20°C
Ácido Tartárico	1.390 g/L a 20 °C
Urea	624 g/L a 20 °C
Glicerol	1.000 g/L a 25 °C
Cloruro de colina	140 g/L a 20°C
Ácido oxálico	220 mg/ L a 25°C
Ácido malónico	766 g/L a 20 °C

Además la presencia de grupos funcionales polares en los componentes de los NADES, como se muestra en la Tabla 2, respalda la hipótesis de que estos solventes son adecuados para la extracción de ácido carmínico (AC). Grupos polares, como los hidroxilos (OH) y carbonilos (C=O) (Figura 6), facilitan interacciones intermoleculares relevantes.

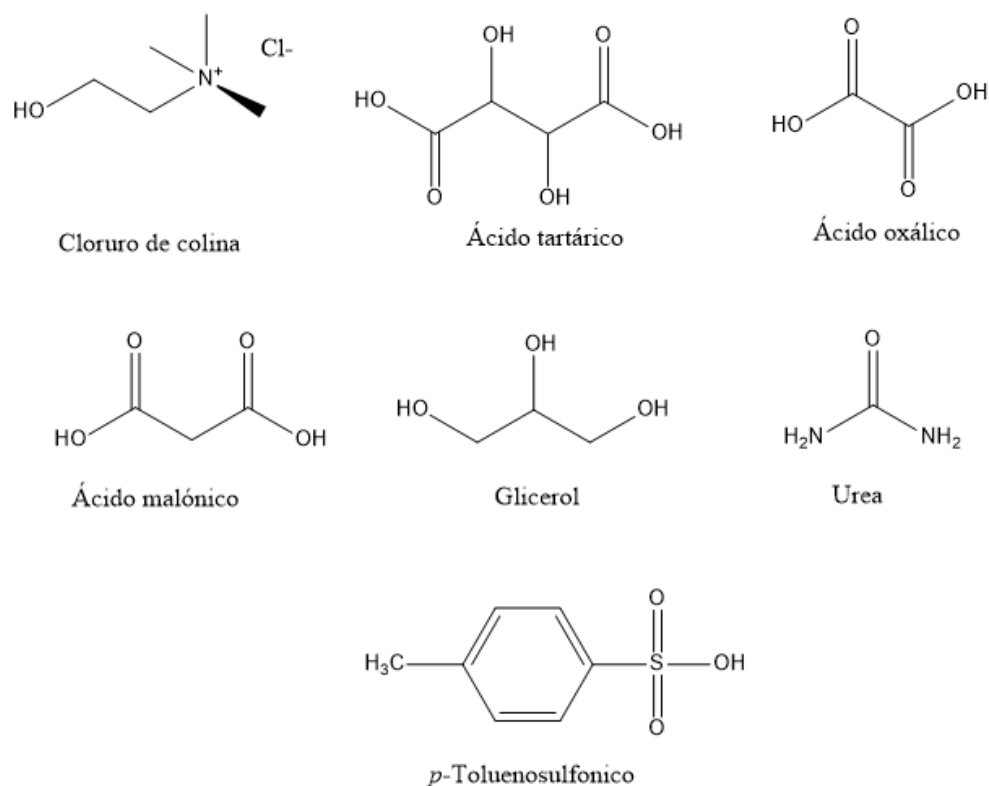


Figura 6: Estructuras químicas de los componentes de los NADES seleccionados

Otra propiedad importante son los valores de momento dipolar de los componentes de los NADES, presentados en la Tabla 4, los cuales constituyen un indicador clave para evaluar las interacciones moleculares responsables de la solubilización del AC. Un mayor momento dipolar en los NADES se traduce en una distribución más significativa de carga eléctrica dentro de sus moléculas, lo que favorece la formación de interacciones específicas como enlaces de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo y posibles interacciones iónicas si el medio contiene grupos funcionales cargados.

Tabla 4: Momentos dipolares de los componenetes de NADES [datos obtenidos de calculos propios en Gaussian 0.9]

Especie	Momento dipolar [Debye]
<i>p</i> -TsOH	4-6
Ácido Tartárico	5-8
Agua	1.85
Urea	5
Glicerol	2-4
Cloruro de colina	10-12
Ácido oxálico	1-2
Ácido malónico	2-3

El ácido carmínico, que presenta múltiples grupos hidroxilo y carboxilo, puede interactuar con los NADES a través de estos mecanismos, especialmente con componentes capaces de aceptar o donar protones. La polaridad de los NADES también puede influir en la organización estructural del AC en el solvente, estabilizando conformaciones específicas que faciliten su solubilización. En conjunto, estas características químicas sugieren que un NADES con mayor momento dipolar tiene una mayor capacidad para formar interacciones energéticamente favorables con el AC, lo que no solo incrementa su solubilidad, sino también la eficiencia del proceso de extracción.

A partir de los estudios previos sobre la extracción de ácido carmínico, surge la necesidad de desarrollar un método que se caracterice por su alta selectividad, permitiendo un proceso de purificación que garantice la obtención exclusiva de AC. En este contexto, los NADES representan una alternativa prometedora, ya que pueden diseñarse con propiedades específicas para mejorar tanto la solubilidad como la selectividad del ácido carmínico. Esto no solo permitiría una extracción más eficiente, sino que también ofrecería un enfoque más respetuoso con el medio ambiente. (11)

Por lo anterior, y con base en los antecedentes presentados, se propone el uso de NADES y su diseño en la extracción de ácido carmínico como un enfoque innovador para abordar esta problemática.(14)(9)(15)

5. Hipótesis

Si el NADES seleccionado lleva a cabo interacciones preferentemente con el ácido carmínico (AC) presente en el polvo de cochinilla grana, entonces se podrá extraer el pigmento AC de manera selectiva.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

- Extraer selectivamente el ácido carmínico a partir de grana cochinilla *Dactylopius Coccus Costa* utilizando solventes eutécticos naturales profundos (NADES).

6.2. Objetivos específicos

- a) Identificar un conjunto de NADES que permitan una extracción eficiente y selectiva del ácido carmínico a partir de grana cochinilla.
- b) Evaluar la eficiencia de las extracciones con los NADES seleccionados en comparación con la metodología de extracción con etanol/agua asistida con microondas (MAE).
- c) Proponer un protocolo optimizado para la extracción de ácido carmínico utilizando NADES, incluyendo un análisis detallado de las condiciones de extracción y los parámetros más relevantes.
- d) Determinar las energías electrónicas de los sitios desprotonables del ácido carmínico (grupo carboxílico y grupo fenólico) en fase gaseosa y solución acuosa.
- e) Evaluar el impacto del modelo de solvatación implícito SCRF=(Solvent=Water) sobre las energías de desprotonación de cada grupo funcional y calcular los cambios relativos en la acidez (pKa) entre los diferentes sitios funcionales del ácido carmínico en ambas fases.

7. Metodología

A continuación se realiza una descripción de la metodología propuesta para el estudio de extracción de ácido carmínico (AC) con solventes eutécticos naturales profundos (NADES). Asimismo, se explica la preparación de una metodología comparativa y un estudio de rendimiento.

7.1. Eliminación de ceras

Para reducir las impurezas en la extracción del ácido carmínico, se realizó el siguiente procedimiento: primero, se molieron aproximadamente 300 mg de cochinilla grana hasta obtener un polvo fino. Luego, este polvo se sometió a un reflujo en hexano durante 24 horas a 60 °C. Tras finalizar el reflujo, el hexano se eliminó mediante una pipeta Pasteur, acompañado de calentamiento para asegurar su completa evaporación. Finalmente, se recuperó el polvo de cochinilla libre de ceras, listo para las pruebas de extracción con NADES.

7.2. Preparación de NADES

Para la experimentación, los NADES elegidos y sintetizados para realizar las extracciones de AC son los descritos en la Tabla 5 (Elección de estos NADES según disposición en el laboratorio y propiedades marcadas en sección 3 "NADES en la extracción de AC"). El NADES se preparó en un vial de reacción agregando un 40 % en peso de agua respecto al peso total de los componentes. La mezcla se agitó de manera constante y se calentó a una temperatura entre 70 y 80°C durante 5 min para llegar a una mezcla totalmente homogénea.

Realizada esta etapa, se procedió a la extracción del AC con las siguientes metodologías propuestas:

Tabla 5: Los componentes, las proporciones de cada uno y las propiedades de los NADES resultantes de cada mezcla que se utilizarán para la extracción de ácido carmínico (AC).

Componentes NADES	Proporción	Grupos funcionales
Cloruro de colina / <i>p</i> -TsOH	(1:1), 250 mg: 340 mg	${}^{-}\text{Cl}, {}^{+}\text{N}(\text{CH}_3), (-\text{SO}_3\text{H})$
Cloruro de colina / Glicerol	(1:2), 250 mg: 330 mg	${}^{-}\text{Cl}, {}^{+}\text{N}(\text{CH}_3), (-\text{OH})$
Cloruro de colina / Ácido tartárico	(1:2), 250 mg: 537 mg	${}^{-}\text{Cl}, {}^{+}\text{N}(\text{CH}_3), (-\text{OH})$
Cloruro de colina / Urea	(1:2), 250 mg: 215 mg	${}^{-}\text{Cl}, {}^{+}\text{N}(\text{CH}_3), (-\text{CONH}_2)$
Cloruro de colina / Ácido oxálico	(1:1), 250 mg: 225 mg	${}^{-}\text{Cl}, {}^{+}\text{N}(\text{CH}_3), (-\text{COOH})$
Cloruro de colina / Ácido malónico	(1:1), 250 mg: 186 mg	${}^{-}\text{Cl}, {}^{+}\text{N}(\text{CH}_3), (-\text{COOH})$

7.3. Extracción sólido-líquido

El método de extracción asistida por microondas (MAE), previamente desarrollado y evaluado por el grupo de investigación (7), se presenta como una metodología adecuada para utilizar como referencia en el estudio comparativo de los rendimientos de ácido carmínico obtenidos mediante extracción con NADES.

7.3.1. Extracción MAE

Para la extracción asistida por microondas (MAE), se siguieron los siguientes pasos. Se colocaron 100 mg de polvo de cochinilla libre de ceras en tubos XP1500 para someterlos a calentamiento en el equipo de microondas (Microondas Discover Proteomics, CEM Automated Synthesis System). Previamente, se añadieron 4 ml de agua destilada o desionizada ajustada a pH 2 con HCl [Sigma-Aldrich, ACS Reagent, 37 %]. Luego, se realizó el calentamiento a 50 °C durante 10 minutos, con una potencia de 200 W. Finalizado el tiempo, la disolución resultante fue centrifugada mientras aún estaba caliente, y la fase líquida fue separada de la sólida con una pipeta Pasteur. Se ajustó el pH de la extracción para su posterior análisis en HPLC (*WatersW600IV – W600SC*).

Se realizaron tres extracciones utilizando la misma grana de cochinilla como materia prima, hasta el agotamiento visible del pigmento.

7.3.2. Extracción NADES

En la extracción de ácido carmínico (AC) con NADES, se siguió la metodología descrita a continuación: en un vial de reacción se colocaron los componentes del NADES de acuerdo con las proporciones indicadas en la Tabla 5. Estos componentes fueron mezclados con agua desionizada en una proporción equivalente al 40 % del peso total. A continuación, se agregaron 300 mg de grana cochinilla a la mezcla. La mezcla de extracción se sometió a agitación constante durante 12 horas a una temperatura entre 70 y 80°C.

En esta metodología, se probaron distintas mezclas eutécticas con el objetivo de identificar la más adecuada para la extracción del ácido carmínico. Se consideraron los siguientes aspectos:

- Los procesos de extracción y purificación del disolvente.
- La naturaleza de los componentes de la mezcla eutéctica (toxicidad, disponibilidad, selectividad).

Además, se optimizaron los parámetros termodinámicos de la extracción sólido-líquido, teniendo en cuenta los siguientes factores:

- La temperatura (70-80°C), evitando pérdidas de agua a temperaturas más altas.
- El tiempo de extracción (12 horas).

7.3.3. pH en la extracción

En cada uno de los pasos de la extracción, se midió el pH debido a la influencia del ambiente químico en el que se encuentra el ácido carmínico. Esto es crítico para garantizar la integridad de la muestra y el éxito del proceso de extracción.

7.3.4. Cromatografía de placa fina (TLC) y Cromatografía por columna (CC)

Para determinar las condiciones de separación entre el NADES y el AC extraído, se realizó una cromatografía de placa fina con fase estacionaria de sílica y fase móvil de acetato de etilo-metanol (9:1).

7.4. Evaluación de la eficiencia de la extracción

A continuación, se presentan los procedimientos seguidos para evaluar la eficiencia de la extracción de cada uno de los métodos propuestos.

7.4.1. Identificación IR

Para la identificación IR se utilizó un aparato de infrarrojo de marca Bruker modelo Tensor 27, Brunker Platinum ATR con el software Opus. Se obtuvo e interpretó el espectro infrarrojo del ácido carmínico comercial (Sigma ALDRICH) para emplear esta caracterización en la identificación de los posteriores extractos corroborando así la extracción del compuesto ácido carmínico.

7.4.2. Identificación RMN

Se obtuvo e interpretó el espectro RMN para ^{13}C del ácido carmínico comercial (ALDRICH) para emplear esta caracterización en la identificación de los posteriores extractos corroborando así la extracción del compuesto ácido carmínico. (Anexo)

7.4.3. Cuantificación HPLC

La cuantificación de AC obtenido en cada extracción se llevó a cabo en un sistema cromatográfico de líquidos modular *WatersW600IV – W600SC* para cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) , equipado con una columna YMG-Pack Pro C18 de fase inversa ($5\mu\text{ m}$, $25\text{ cm} \times 4,6\text{ mm}$ de diámetro interno). El volumen de inyección a la columna es de $20\mu\text{L}$ de disolución, caudal de la fase móvil: $0,8\text{ mL/min}$, longitud de onda de 495 nm , el tiempo de corrida= 20 minutos.

7.4.4. Cuantificación UV-vis

Una vez realizada la identificación del tiempo de retención del AC en el HPLC bajo las condiciones descritas, se procedió a realizar una curva de calibración para AC (Anexo) mediante UV-vis en un espectrómetro Jasco V-730 con la longitud de onda de 495 nm fija para AC con el propósito de identificar la concentración de cada muestra obtenida con el procedimiento NADES.

7.4.5. Análisis teórico

Se realizó un análisis teórico utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) para identificar los sitios preferenciales de desprotonación del ácido carmínico y evaluar cómo estos se ven afectados por el medio químico. El análisis se llevó a cabo en fase gaseosa y en solución acuosa mediante el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p) y el modelo de solvatación implícito SCRF=(Solvent=Water), con el fin de estimar los cambios relativos en la acidez (Δpka) entre los diferentes grupos funcionales de la molécula. Este enfoque permitió cuantificar el efecto del solvente (Agua) en la estabilidad de los distintos sitios susceptibles de desprotonación, proporcionando una base teórica para entender cómo la interacción del ácido carmínico con medios específicos afecta su reactividad. Los resultados son de particular interés para la optimización de su extracción utilizando solventes eutécticos profundos naturales (NADES), compuestos por mezclas de ácido tartárico, cloruro de colina y agua. (16)

La evaluación del Δpka en diferentes entornos químicos permite interpretar la influencia de la polaridad y la solubilidad del medio sobre la eficiencia del proceso de extracción. Estos hallazgos son clave para mejorar los métodos de recuperación selectiva de ácido carmínico y para avanzar en el desarrollo de técnicas sostenibles basadas en NADES.

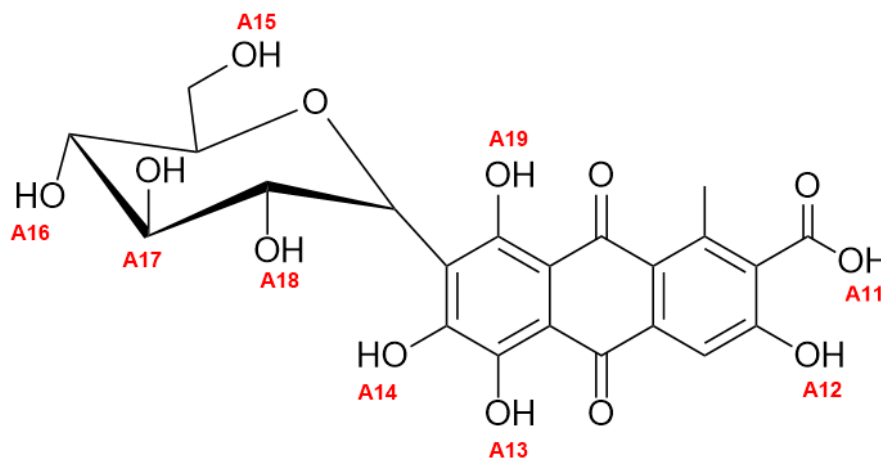


Figura 7: Numeración de aniones en en AC

Cálculo del pK_a para el ácido carmínico

El pK_a describe el equilibrio de ionización del ácido carmínico en solución acuosa:



El pK_a está relacionado con la energía libre de Gibbs estándar de las especies en equilibrio. Para determinar el pK_a del ácido carmínico (ACH) en solución acuosa, se sigue la metodología propuesta por H. Bernhard Schlegel (16), basada en la relación entre las energías libres estándar de las especies protonadas y desprotonadas en equilibrio: (16)

$$pK_a = \frac{\Delta G^*}{2,303RT} = \frac{G_{\text{aq},\text{AC}^-}^* + G_{\text{aq},\text{H}^+}^* - G_{\text{aq},\text{ACH}}^*}{2,303RT}$$

En esta ecuación:

- $G_{\text{aq},\text{ACH}}^*$ es la energía libre estándar del ácido carmínico en su forma neutra (ACH) en solución acuosa.
- $G_{\text{aq},\text{AC}^-}^*$ es la energía libre estándar del anión del ácido carmínico (AC^-) en solución acuosa.
- $G_{\text{aq},\text{H}^+}^*$ es la energía libre estándar del protón (H^+) en solución acuosa.

El cálculo de la energía libre del protón en solución acuosa, según la metodología seguida, implica los siguientes pasos:

- a) **Energía libre estándar del protón en fase gaseosa** ($G_{\text{g},\text{H}^+}^\circ$), que se obtiene utilizando la expresión:

$$G_{\text{g},\text{H}^+}^\circ = H_{\text{g},\text{H}^+}^\circ - TS_{\text{g},\text{H}^+}^\circ$$

Con valores de $H_{\text{g},\text{H}^+}^\circ = 1,48 \text{ kcal/mol}$ y $S_{\text{g},\text{H}^+}^\circ = 26,05 \text{ cal/mol} \cdot \text{K}$, resultando en una $G_{\text{g},\text{H}^+}^\circ$ de $-6,2868075 \text{ kcal/mol}$ (16).

- b) **Energía de solvatación del protón** ($\Delta G_{\text{aq},\text{H}^+}^*$), que se ha reportado como $-265,9 \text{ kcal/mol}$ en la literatura (17)
- c) **Corrección para el cambio en el estado estándar**, considerando la transición de 1 atm a 1 mol/L en solución acuosa:

$$\Delta G_{1\text{atm} \rightarrow 1\text{M}} = RT \ln(24,4) = 1,89 \text{ kcal/mol}$$

Con estos valores, se puede calcular la energía libre del protón en solución acuosa, $G_{\text{aq},\text{H}^+}^*$, y finalmente obtener el pK_a para el equilibrio de ionización del ácido carmínico. (16)

Cálculo de la acidez en fase gaseosa (GA)

La acidez de los diferentes sitios de desprotonación en el ácido carmínico en fase gaseosa (denotada como **GA**) fue calculada a partir de las energías libres de Gibbs de los aniones en la fase gaseosa. Este valor es una medida del cambio de energía libre asociado con la desprotonación en la fase gaseosa, y proporciona una idea de la facilidad de desprotonación cuando el sistema no está influenciado por las interacciones solvatantes que ocurren en la fase acuosa.

Para obtener los valores de **GA**, se utilizó la fórmula que correlaciona las energías libres de Gibbs de las especies neutras y los aniones, similar a la metodología propuesta por H. Bernhard Schlegel (2017) para evaluar la acidez en fase gaseosa. La ecuación general es la siguiente: (16)

$$GA = \Delta G_{\text{gas}} = G_{\text{anion}} + G_{\text{g,H}^+}^{\circ} - G_{\text{neutral}}$$

Donde:

- G_{anion} es la energía libre de Gibbs de los aniones en fase gaseosa.
- G_{neutral} es la energía libre de Gibbs del ácido carmínico neutro en fase gaseosa.
- $G_{\text{g,H}^+}^{\circ}$ de -6.2868075 kcal/mol Energía libre estándar del protón en fase gaseosa.

Interacciones entre el NADES y el ácido carmínico

El ácido carmínico, con su esqueleto de antraquinona y múltiples grupos funcionales (un carboxilo, hidroxilos y un metilo), presenta sitios de interacción altamente polares y regiones que favorecen la formación de enlaces intermoleculares con el NADES. Las interacciones esperadas incluyen:

a. Puentes de hidrógeno Los grupos hidroxilo (OH-OH) del ácido tartárico pueden formar puentes de hidrógeno con:

- El grupo carboxílico (COOH-COOH) desprotonado del ácido carmínico (carboxilato, COO^-).
- Los grupos hidroxilo del anillo de antraquinona del ácido carmínico.
- Los grupos OH de la colina pueden formar enlaces de hidrógeno con los mismos sitios (6) (16).

Estas interacciones son dominantes en la estabilización del complejo ácido carmínico-NADES debido a la elevada densidad de grupos hidroxilo presentes tanto en el NADES como en el ácido carmínico.

b. Interacciones ión-dipolo El anión cloruro (Cl^-) del NADES puede interactuar electrostáticamente con:

- El grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$) del ácido carmínico desprotonado, estabilizando la carga negativa por su capacidad de solvatar aniones.
- Los grupos hidroxilo polares del ácido carmínico, generando interacciones débiles debido al momento dipolar local.

c. Interacciones dipolo-dipolo Las regiones polares del NADES (especialmente los grupos hidroxilo del ácido tartárico y colina) pueden interactuar con:

- Los grupos polares (OH-OH y $-\text{COOH-COOH}$) del ácido carmínico.
- El momento dipolar de la estructura de antraquinona también puede contribuir a interacciones dipolo-dipolo con el NADES, aunque en menor medida que los puentes de hidrógeno.

d. Interacciones de van der Waals (dispersión de London) Las regiones no polares del ácido carmínico (como el grupo metilo en el anillo de antraquinona) pueden establecer interacciones de dispersión con las cadenas hidrocarbonadas de la colina. Aunque estas interacciones son débiles comparadas con los enlaces de hidrógeno, pueden contribuir a la estabilización del sistema en un entorno altamente polar como el NADES.

8. Resultados y análisis de resultados

8.1. Preparación de NADES

Durante la preparación de los diferentes NADES, se observó que el sistema compuesto por cloruro de colina, ácido oxálico y agua no logró formar una mezcla homogénea. Esta falta de uniformidad podría afectar la extracción del ácido carmínico, ya que el pH y las propiedades químicas del medio no serían consistentes en toda la solución.

8.2. Seguimiento del pH en la extracción

Durante el procedimiento de extracción se llevaron a cabo mediciones de pH en cada uno de los NADES (Tabla 6) ya que el pH inicial de los NADES es un factor clave en las interacciones químicas durante la extracción del ácido carmínico (9).

Tabla 6: Constituyentes y valores de pH de cada NADES

NADES	pH	NADES	pH
ChCl + <i>p</i> -TsOH + agua	0.46 ±0.04	(ChCl + <i>p</i> -TsOH + agua) + soluto	1.80 ±0.48
ChCl + Glicerol + agua	2.82 ±0.27	(ChCl + Glicerol + agua) + soluto	4.36 ±0.35
ChCl + Urea + agua	4.09 ±0.22	(ChCl + Urea + agua) + soluto	5.58 ±0.30
ChCl + Ac tartárico + agua	0.41 ±0.18	(ChCl + Ac tartárico) + agua) + soluto	1.72 ±0.20
ChCl + Ac malónico + agua	0.87 ±0.08	(ChCl + Ac malónico + agua) + soluto	2.75 ±0.07
ChCl + Ac Oxálico + agua	1.12 ±0.02	(ChCl + Ac Oxálico + agua) + soluto	1.27 ±0.20

Realizada la preparación, se midió el pH de cada NADES con el polvo de cochinilla libre de ceras (Tabla 6).

Los resultados de las mediciones de pH muestran un incremento en la alcalinidad cuando el polvo de cochinilla, que contiene ácido carmínico (AC), se incorpora a los NADES (Tabla 6). Aunque los valores de pH permanecen dentro del rango ácido (entre 1.27 y 6), esta tendencia más básica en comparación con los NADES puros puede atribuirse a la interacción entre el ácido carmínico y los solventes eutécticos profundos.

El ácido carmínico posee varios valores de pKa, lo que le permite actuar como un ácido débil, ionizándose parcialmente en función del pH del entorno. Al incorporarse en el NADES, es posible que algunos grupos funcionales del AC se desprotonen, provocando una ligera neutralización del medio y, por tanto, un aumento en el pH. Esta reacción podría deberse a la estabilización de los aniones formados por el ácido carmínico, que interactúan con los componentes del NADES, lo que disminuye la acidez global de la mezcla.

8.3. Cuantificación UV-vis

La espectroscopía UV-Vis se empleó para la determinación cuantitativa del ácido carmínico (AC) en las soluciones obtenidas tras el proceso de extracción. Esta técnica se basa en la absorción de radiación electromagnética en la región ultravioleta-visible por parte de los electrones de ciertos grupos cromóforos presentes en la molécula. En este caso, el ácido carmínico presenta un cromóforo conjugado capaz de absorber intensamente en una longitud de onda específica, lo cual permite su monitoreo espectroscópico.

La cuantificación se fundamenta en la ley de Beer-Lambert, la cual establece que la absorbancia (A) es proporcional a la concentración de la especie absorbente en solución (c), a la longitud del trayecto óptico (l) y al coeficiente de absorción molar (ϵ), de acuerdo con la expresión:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Donde:

A es la absorbancia (adimensional), ϵ es el coeficiente de absorción molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), c es la concentración del analito ($mol \cdot L^{-1}$), l es la longitud del paso óptico de la celda (cm).

Esta relación permitió obtener la concentración de ácido carmínico a partir de la medición de absorbancia, utilizando una curva de calibración construida con soluciones estándar. La aplicación de esta metodología hizo posible comparar cuantitativamente la eficiencia de extracción de los diferentes sistemas NADES evaluados.

Tras la preparación de los NADES y la ejecución de las extracciones, se procedió a la cuantificación del ácido carmínico (AC) (Tabla 7) con el fin de identificar el NADES con la mayor capacidad de extracción, mayor explicación de la curva en Anexo.

Tabla 7: Rendimientos de extracción de cada NADES

NADES	Concentración [mg/L]
ChCl + Ac. tartárico	1.96
ChCl + Glicerol	1.14
ChCl + Ac. Oxálico	1.60
ChCl + Ac. Malónico	0.60
ChCl + <i>p</i> -TsOH	0.90
ChCl + Urea	0.73

Los resultados muestran una variabilidad significativa entre los NADES utilizados. El NADES formado por ChCl y ácido tartárico se destaca como el más eficaz para la extracción de ácido carmínico, seguido por el sistema de ChCl y ácido oxálico, mientras que los demás NADES presentaron una menor capacidad extractiva. Dado los rendimientos de extracción obtenidos, se llevó a cabo una cromatografía en placa fina (TLC) con el objetivo de determinar la fase móvil adecuada para la purificación de cada muestra de extracción mediante cromatografía por columna (CC).

8.4. Cromatografía de placa fina (TLC) y Cromatografía por columna (CC)

La cromatografía de placa fina se utilizó como herramienta de análisis cualitativo para detectar la presencia del ácido carmínico en los extractos y evaluar su movilidad relativa (Rf) en diferentes disolventes. Esta técnica permitió un primer reconocimiento del comportamiento cromatográfico del compuesto. Por otro lado, la cromatografía por columna facilitó la separación de los componentes presentes en los extractos mediante un proceso de elución, lo que permitió un aislamiento preliminar del ácido carmínico para su posterior caracterización espectroscópica.

Dado que en la extracción se obtiene un sobrenadante (SN) y restos sólidos en el fondo (R), se aplicaron diferentes puntos en la placa cuyo orden se ilustra en la Figura 8:

En la placa se analiza que para el primer punto que es la referencia de AC Aldrich, el AC se adhiere a la silica mediante una interacción π -d entre el AC y el orbital d vacío de la silica (18). Por lo que la elección de la fase móvil no es la adecuada para este punto. En los puntos correspondientes a sobrenadantes de NADES compuesto por glicerol, NADES compuesto por *p*-TsOH se nota un recorrido de algún subproducto de la extracción y un punto retenido al igual que la referencia, lo que implicaría la separación del AC de todo lo demás que se obtiene de la mezcla de extracción.

Para el análisis del sobrenadante del NADES compuesto por ácido tartárico, se observó un desplazamiento notable en la muestra. Esto sugiere que los componentes presentes en el sobrenadante (NADES, ácido carmínico y otros subproductos) están altamente solvatados mediante la formación de puentes de hidrógeno, lo que genera esferas de solvatación densas. Estas esferas modifican la polaridad global del sistema, haciendo que la muestra sea menos polar y, en consecuencia, más afín a la fase móvil propuesta.

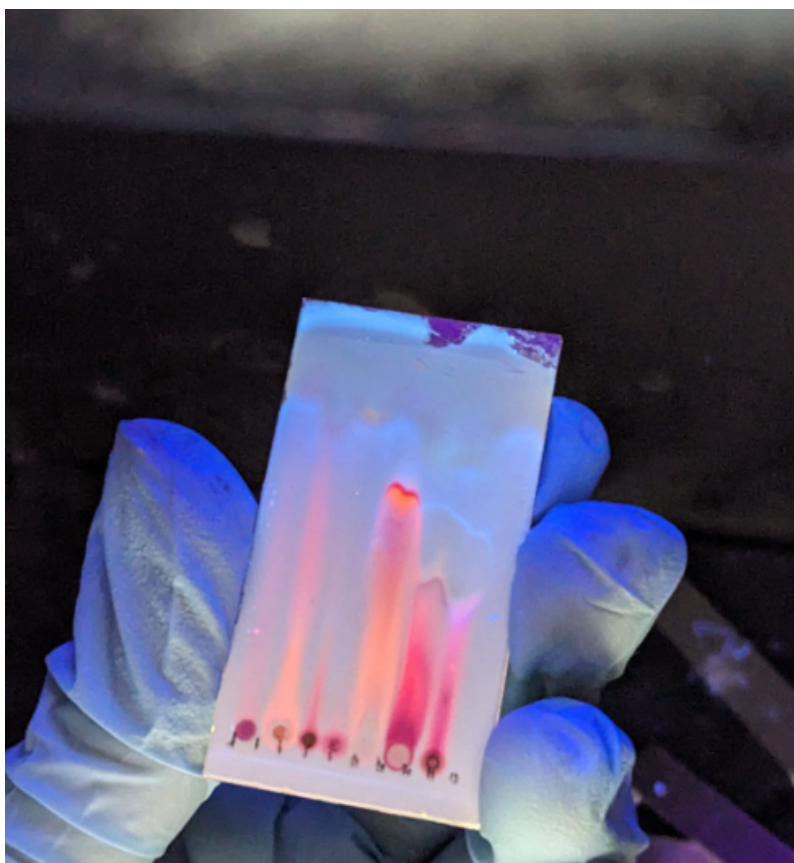


Figura 8: Cromatografía de placa fina: Referencia de AC, R-Ac. Tartárico, R- *p*-TsOH, R-glicerol, SN-Ac. Tartárico, SN-*p*-TsOH, SN-glicerol.

8.5. Reacción de acetilación

Según los observado, se realizó una reacción de acetilación con el fin de modificar las interacciones puentes de hidrógeno entre el NADES y el AC. Al añadir anhídrido acético (Ac_2O) a la extracción, se acetilan los grupos hidroxilo del AC, formando grupos éster lo cuales son seguiran teniendo una interacción puente de hidrógeno con el NADES, pero con una interacción menos intensa que los hidroxilos. La reacción de acetilación se debe realizar bajo las siguientes condiciones: Se prepara una disolución que contenga 300 mg de polvo de cochinilla tratada, NADES en la proporción ya mencionada en la Tabla 5 y 5 ml de anhídrido acético. De igual manera se hizo otra muestra donde se preparó 21 mg de referencia de AC y 5 ml de anhídrido acético, con el fin de comparar los pH del medio. Se puede observar lo siguiente:

Tabla 8: pH del NADES + soluto acetilado

Acetilación	pH
Ácido Carmínico	-0.420 ± 0.014
(ChCl + Ac tartarico + Ac_2O) + agua) + soluto	-0.386 ± 0.004

La mezcla de extracción acetilada presenta un pH de -0.386 ± 0.004 , lo que indica un medio ligeramente más ácido que el estándar de ácido carmínico acetilado. Esta diferencia se puede atribuir ala presencia del NADES genera un ambiente más ácido.

Posteriormente se realizó una extracción liquido-liquido con agua y acetato de etilo con el fin de extraer este producto acetilado con la fase acuosa. Para después purificar el AC acetilado mediante (CC). Se realizó una otra cromatografía de placa fina (Figura 9) con una fase móvil de acetato de etilo-metanol (9:1) y se observó lo siguiente:

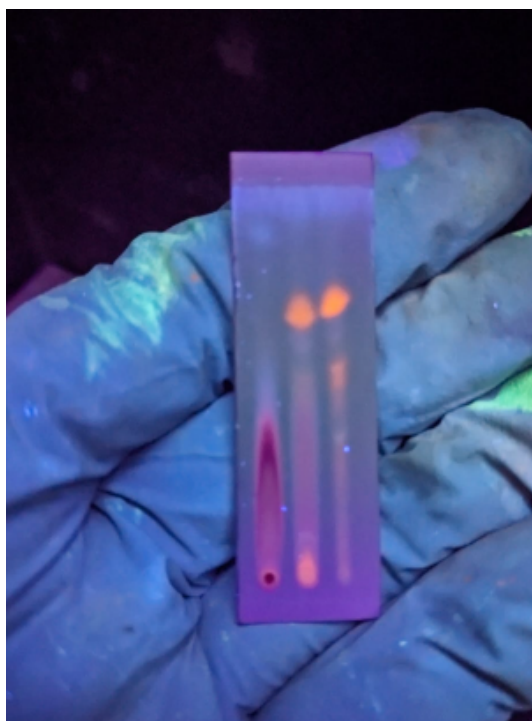


Figura 9: Cromatografía de placa fina: Mezcla de extracción acetilada, producto extraído, producto purificado

Como se puede notar en la Figura 9, el producto purificado refleja un R_f más definido, lo cual indica una separación adecuada. Dicho esto se procede a caracterizar este producto.

8.5.1. Caracterización (IR)

La caracterización estructural se apoyó en espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), con el objetivo de identificar cambios en los grupos funcionales del ácido carmínico tras su interacción con los NADES y después de la acetilación. La aparición o desplazamiento de bandas características (por ejemplo, estiramientos C=O y desaparición de O–H) permitió confirmar la modificación química y evaluar la naturaleza de las interacciones moleculares presentes.

Se puede observar que en el espectro IR, se muestran los grupos principales del ácido carmínico, pero además se nota la presencia de ésteres en el rango del infrarrojo (Figura 10).

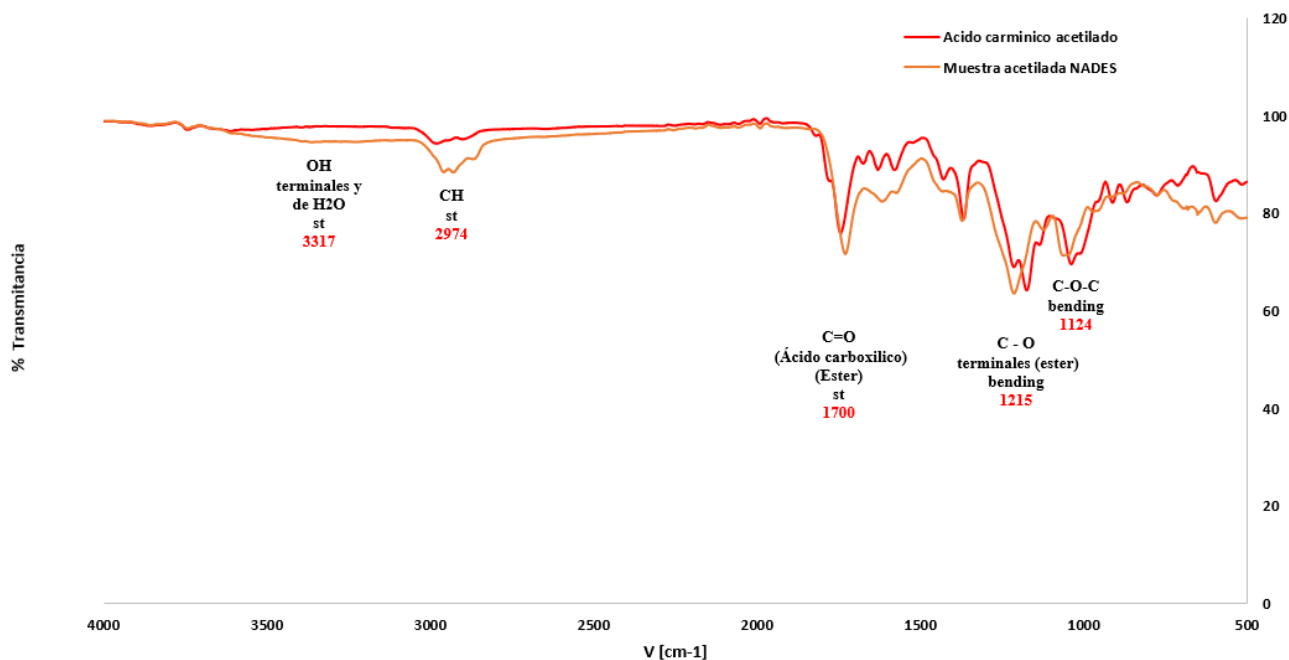


Figura 10: Interpretación del espectro infrarrojo de la muestra de ácido carmínico comercial marca ALDRICH acetilado, usado como referencia y muestra acetilada de extracción con NADES.

El aumento de la intensidad de la banda OH (3317 cm^{-1}) en el producto de extracción purificado muestra la presencia de agua, lo cual indica que apesar de la extracción y purificación no se logró retirar completamente el agua del medio. La aparición de la nueva banda en (1215 cm^{-1}) es un fuerte indicio de la formación de ésteres, confirmando la acetilación de los grupos hidroxilo. Las bandas de los carbonilos (1700 cm^{-1}) aparece debido a los nuevos carbonilos introducidos por la acetilación. También se tienen las bandas en (2974 cm^{-1} , 1124 cm^{-1} , 2974 cm^{-1}) características del AC (Anexo).

8.5.2. Caracterización (RMN)

Se utilizaron espectros de RMN, particularmente de carbono-13, como herramienta para la elucidación estructural del ácido carmínico y su derivado acetilado. Esta técnica permitió confirmar la presencia de grupos funcionales específicos y verificar la conversión de los hidroxilos en ésteres, al observar los desplazamientos químicos característicos y las señales asociadas a los nuevos entornos electrónicos.

Para visualizar si los grupos importantes del ácido carmínico se encuentran presentes en el espectro, se realiza el siguiente análisis (Figura 11):

Antraceno: $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_8, C_9, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}$: Desplazamientos de 113.5 ppm a 124 ppm.

Quinonas: C_{10}, C_7 : Desplazamientos 187.8 ppm y 190 ppm.

Azúcar: C₂₇, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₃₀: Desplazamientos 62 ppm a 69.5 ppm.

Se puede concluir que los principales componentes del ácido carmínico se tiene, pero ahora debemos enfocarnos en si los productos de la acetilación están presentes:

Metilos de acetilación (Azúcar): C₅₇, C₄₂, C₅₄, C₆₁:Desplazamiento 20.9 ppm.

Metilos de acetilación (Antraquinona): C₄₈, C₃₅, C₄₆, C₃₈, C₅₁:Desplazamiento 20.8 ppm.

Metilos de Esteres productos de acetilación: C₄₇, C₅₀, C₄₄, C₃₇, C₃₄:Desplazamiento 167 ppm a 176.6 ppm.

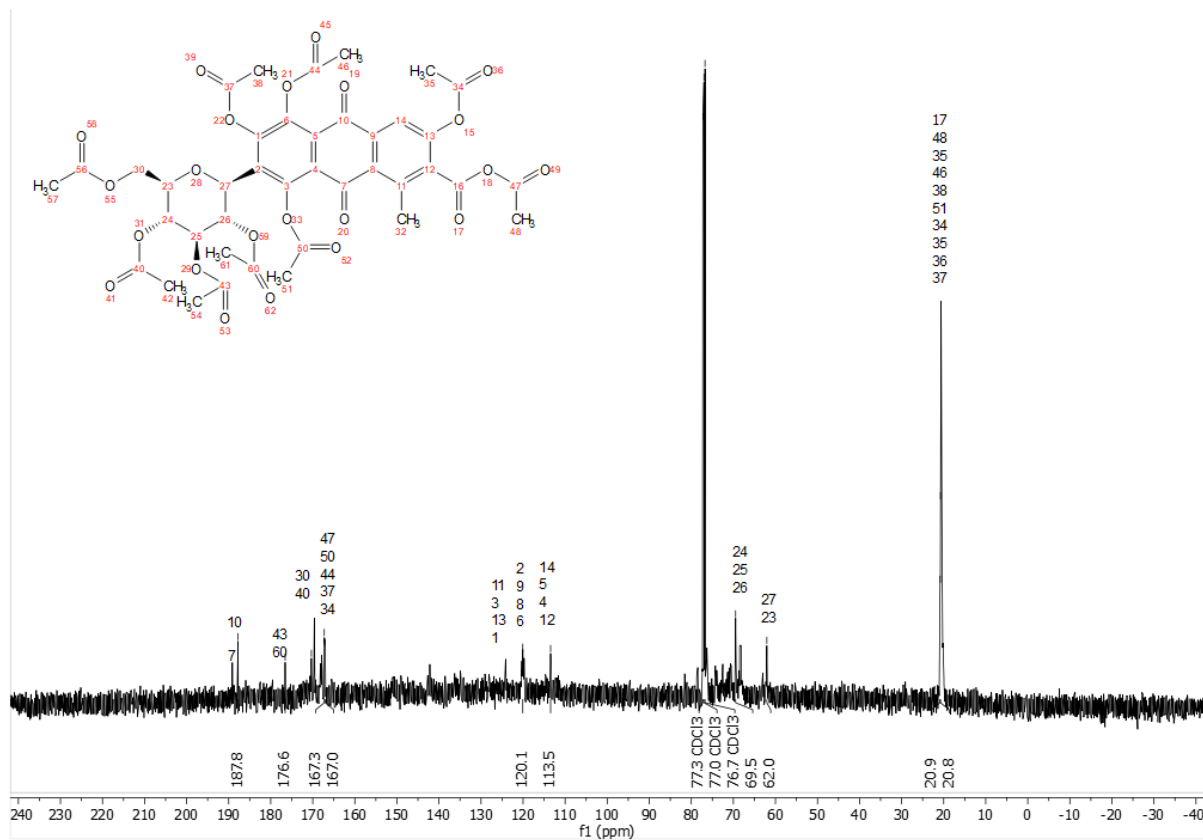


Figura 11: Resonancia magnética de ¹³C para la muestra acetilada

Tras el breve análisis, se concluye que el producto analizado si es AC acetilado.

Para poder determinar el rendimiento de cada una de las propuestas de extracción, se realizo una curva de calibración en HPLC (Anexo).

8.5.3. Cuantificación HPLC

La cuantificación del ácido carmínico también se realizó mediante HPLC, técnica que permite separar, identificar y cuantificar compuestos con alta precisión. En este estudio, se utilizó como método complementario a UV-Vis para validar los resultados de extracción y evaluar la pureza del compuesto presente en los extractos, mediante comparación con un estándar certificado.

Se realizó una curva de calibración (Anexo) para que con base en los datos de concentración obtenidos, se calcularon las concentraciones resultantes de las extracciones utilizando tanto el método de microondas como el método de extracción por medio de NADES. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 9: Rendimientos de extracciones MAE por cantidad de insecto

Numero de extracción	mg Ac. Carm./mg Insecto
Extracción 1	0.023
Extracción 2	0.015
Extracción 3	0.001

8.5.4. Extracción con NADES

Se presentan 2 señales:

- a) 10,896 minutes (la cual corresponde al ácido carmínico)
- b) 16,37 minutes

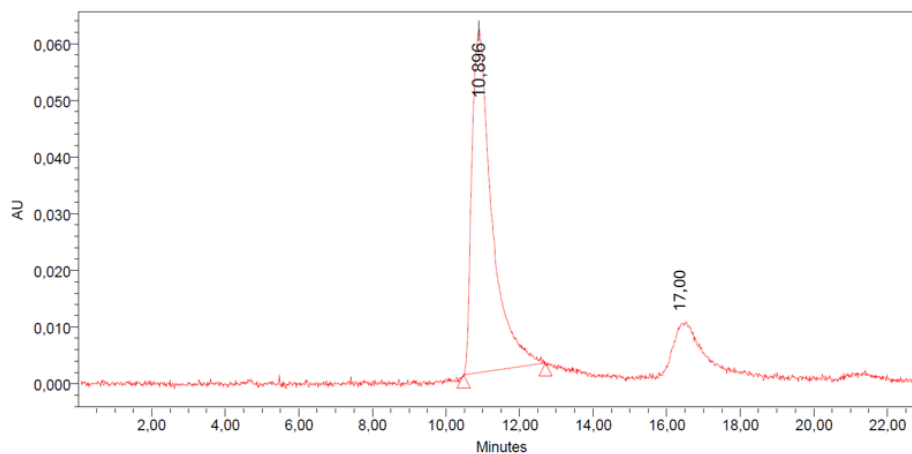


Figura 12: [Pico característico que presenta el cromatógrafo de la Extracción por NADES a 473.9 nm.

En primera instancia se pensó en la posibilidad de que el DES se rompiera en alguno de los pasos intermedios, y saliera un sobrante de este en el producto final. Por lo que se procedió a realizar pruebas a las mismas condiciones pero para los compuestos solos, pero esta opción se descartó al sacar los UV de cada componente del NADES (Anexo).

Dado que se desconoce el producto que genera la segunda señal, se procede a realizar el espectro UV vis para cada una de las señales y así tener un indicio del producto desconocido.

Espectro UV vis de cada una de las señales con tiempo de retención de 10 min (azul), tiempo de retención 17 min (roja)

Se evidencia una similitud en los espectros de las dos señales, no obstante, se observa una disparidad. Tras un análisis exhaustivo, se concluye que durante el proceso de ajuste del pH para la preparación de la muestra en cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), mediante la adición de NaHCO_3 , es factible que una fracción del ácido carmínico haya reaccionado generando una sal análoga al AC.

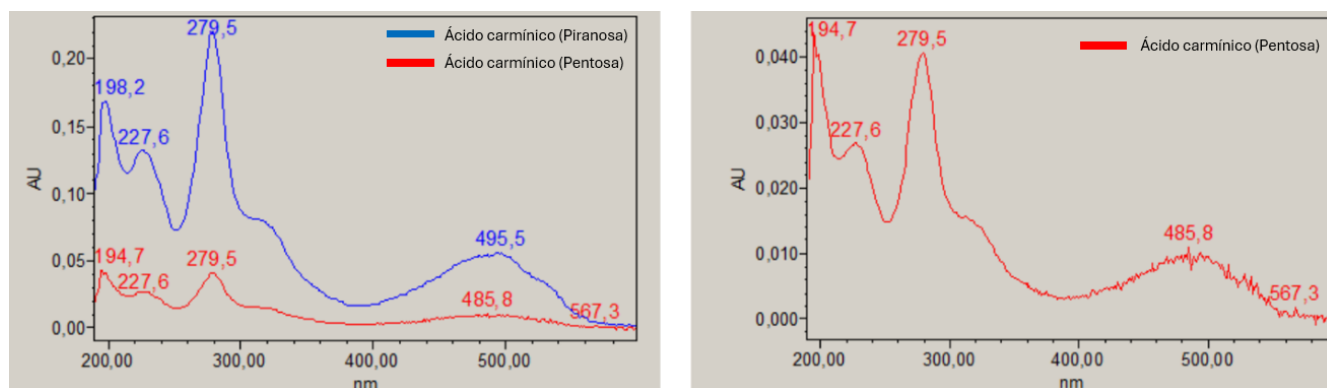


Figura 13: Espectro UV-vis de la Extracción realizada con NADES.

Otra observación en este análisis es que, dado que las longitudes de onda son casi idénticas, podría tratarse de ácido carmínico con una modificación en su estructura a carmín. Se cree que el ácido carmínico extraído de la grana cochinilla puede presentarse con una glucosa modificada, es decir, que en lugar de ser una hexosa, se trate de una pentosa.

Se determinan los rendimientos de cada extracción (Tabla 10) y se concluye que la extracción con mayor rendimiento corresponde a la extracción 1, realizada mediante MAE. Se observa que la extracción con NADES presenta un rendimiento ligeramente superior al de la extracción por microondas 3. Este resultado sugiere que el proceso con NADES llega a un punto de saturación, ya que no alcanza el mismo nivel de extracción que la extracción 1 con microondas.

Tabla 10: Tabla comparativa de extracciones por cantidad de insecto

Numero de extracción	mg Ac. Carm./mg Insecto
Extracción 1	0.023
Extracción 2	0.015
Extracción 3	0.001
Extracción DES	0.002

8.6. Diagrama de Proceso y Balance de Materia

Tras la realización de las pruebas experimentales, se reporta el siguiente diagrama de proceso, el cual resume el balance de materia en cada etapa de la extracción y purificación del ácido carmínico acetilado a partir de grana cochinilla tratada. Este diagrama refleja las corrientes de entrada y salida, así como los disolventes utilizados y los residuos generados.

Etapas (a) – Acetilación

Entradas

- Grana cochinilla tratada (GCT): 300mg
- Anhídrido acético (AA): $3.00\text{mL} \times 1.08\text{g/mL} = 3240\text{mg}$

Salidas

- Mezcla cruda (ACAC + subproductos + exceso de AA): 3540mg

Balance de masa: Entrada = 3540mg, Salida = 3540mg

Composición de mezcla cruda (fracción masa estimada)

- ACAC: $\sim 60\text{mg} \Rightarrow 60/3540 = \mathbf{0,017}$
- Subproductos (ácido acético, etc.): $\sim 2400\text{mg} \Rightarrow \mathbf{0,678}$
- Exceso de AA: $\sim 1080\text{mg} \Rightarrow \mathbf{0,305}$

Etapa (b) – Extracción Sólido-Líquido con NADES

Entradas

- Producto crudo (de etapa a): 3540mg
- NADES (cloruro de colina:ácido tartárico, 1:2): 1102mg
- Agua destilada (AD): $3.0\text{mL} \times 1.00\text{g/mL} = 3000\text{mg}$

Salidas

- Fase líquida: 7342mg (NADES + AD + ACAC + subproductos disueltos)
- Sólido no soluble (WPGCT): 300mg

Balance por especie

Tabla 11: Tabla de los valores en el balance por especie

Especie	Entrada (mg)	Salida líquida (mg)	Sólido (mg)
ACAC	60	55	5
NADES	1102	1102	0
Agua	3000	3000	0
Subproductos	2400	2300	100

Fracción masa (fase líquida)

- ACAC: $55/7342 = \mathbf{0,0075}$
- NADES: $1102/7342 = \mathbf{0,1501}$
- Agua: $3000/7342 = \mathbf{0,4085}$
- Subproductos: $2300/7342 = \mathbf{0,3132}$

Etapa (c) – Extracción Líquido-Líquido

Entradas

- Fase líquida: 7342mg
- Agua adicional: $1.0\text{mL} = 1000\text{mg}$
- Acetato de etilo (ACE): $3.0\text{mL} \times 0.90\text{g/mL} = 2700\text{mg}$

Salidas (estimadas)

- Fase orgánica (ACE + ACAC + compuestos apolares): $\sim 2800\text{mg}$
- Fase acuosa (agua + NADES + compuestos polares): $\sim 8242\text{mg}$

Fracción masa (fase orgánica, estimada)

- ACAC: $30\text{mg} \Rightarrow 30/2800 = \mathbf{0,0107}$
- ACE: $2700\text{mg} \Rightarrow 2700/2800 = \mathbf{0,9643}$
- Otros apolares: $\sim 70\text{mg} \Rightarrow 70/2800 = \mathbf{0,0250}$

Etapa (d) – Purificación (Sílica + ACE/MET)

Entradas

- Fase orgánica (ACAC impuro): 2800mg
- Acetato de etilo (1.5 mL): 1350mg
- Metanol (0.5 mL): 395mg

Total entrada: 4545mg

Salidas

- Fracción purificada (ACAC + disolventes): 400mg
- Fracción descartada (impurezas y disolventes): 4145mg

Etapla (e) – Evaporación y Recuperación

Entrada: Fracción purificada: 400mg

Operación: Evaporación de disolventes (ACE/MET)

Salida: Ácido carmínico acetilado puro (ACAC): 30mg

Resumen de Conversión y Rendimiento Global

- ACAC teórico en GCT: 60mg
- ACAC recuperado puro: 30mg

$$\text{Rendimiento global} = \frac{30}{60} \times 100 = \boxed{50\%}$$

El proceso muestra que el uso de NADES permite una extracción efectiva del ácido carmínico acetilado con un rendimiento aceptable y empleando disolventes menos tóxicos que los tradicionales.

El proceso demuestra la viabilidad del uso de NADES como medio extractivo, optimizando la recuperación del ácido carmínico acetilado sin recurrir a solventes convencionales más agresivos.

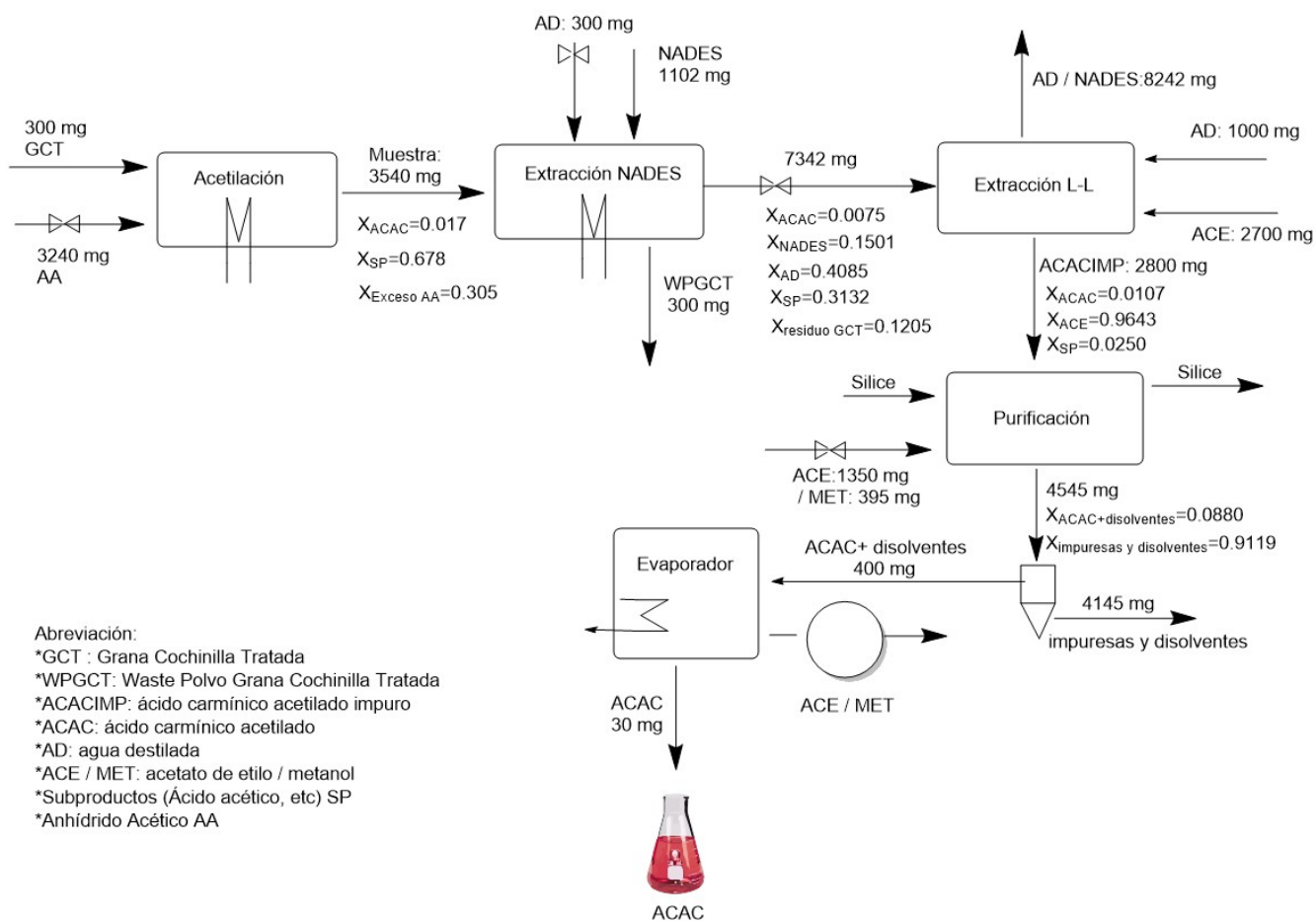


Figura 14: Diagrama del proceso de extracción del AC acetilado, mediante NADES

Al analizar los resultados de las extracciones, se observa que el rendimiento de ácido carmínico (AC) es inferior en el sistema NADES, lo que sugiere que las condiciones químicas favorecen la formación de la sal carmínica. Esta observación plantea la necesidad de un estudio teórico más profundo del ácido carmínico en sus formas protonadas y desprotonadas, dado que los cambios significativos en el pH a lo largo del proceso de extracción influyen en las interacciones de puentes de hidrógeno. Estas interacciones pueden verse fortalecidas o debilitadas dependiendo del estado de ionización del AC, lo que impacta directamente en la eficiencia de la extracción.

8.7. Estudio teórico de la desprotonación de grupos hidroxilo en el AC

La evaluación se realizó en dos fases: fase acuosa y fase gaseosa, para analizar el efecto del medio en la estabilidad relativa de los aniones formados. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla: Para el AC neutro en fase acuosa se obtuvo una energía libre de -1828.530992 en Hartrees y -1147403.197 en [kcal/mol]

Tabla 12: Resultados de energía libre de Gibbs, pKa y Δ pKa para los aniones en fase acuosa.

Anión	Energía libre Gibbs [Ha]	Energía libre Gibbs [kcal/mol]	pKa	Δ pKa
A11	-1828.085	-1147123.711	6.75	0.0
A12	-1828.067	-1147112.280	15.16	8.40
A13	-1828.082	-1147121.596	8.31	1.55
A14	-1828.069	-1147113.912	13.96	7.20
A15	-1828.053	-1147103.476	21.63	14.87
A16	-1828.052	-1147102.786	22.14	15.38
A17	-1828.025	-1147085.878	34.57	27.81
A18	-1828.045	-1147098.300	25.44	18.68
A19	-1828.068	-1147112.798	14.78	8.02

Los resultados muestran que la desprotonación más favorable, tanto en fase acuosa como en fase gaseosa, ocurre en el grupo ácido carboxílico (sitio A11), seguido por la desprotonación del hidroxilo en posición orto (A12). La desprotonación menos favorecida corresponde al grupo hidroxilo en posición para ubicado en el tercer anillo (A13). La mayor estabilidad del anión formado en A11 puede atribuirse a la deslocalización de carga a través del grupo carboxilato y el sistema conjugado de la antraquinona, lo que reduce la energía libre de Gibbs del sistema. En comparación, los sitios A12 y A13, aunque conectados al esqueleto π -conjugado, presentan menor estabilización de carga aniónica debido a su posición relativa en la estructura molecular.

- A11: Desprotonación en el grupo ácido carboxílico.
- A12: Desprotonación en el grupo hidroxilo en posición *orto* respecto al grupo carboxílico.
- A13: Desprotonación en el hidroxilo del tercer anillo de la antraquinona, en posición *para* respecto al carboxilo.

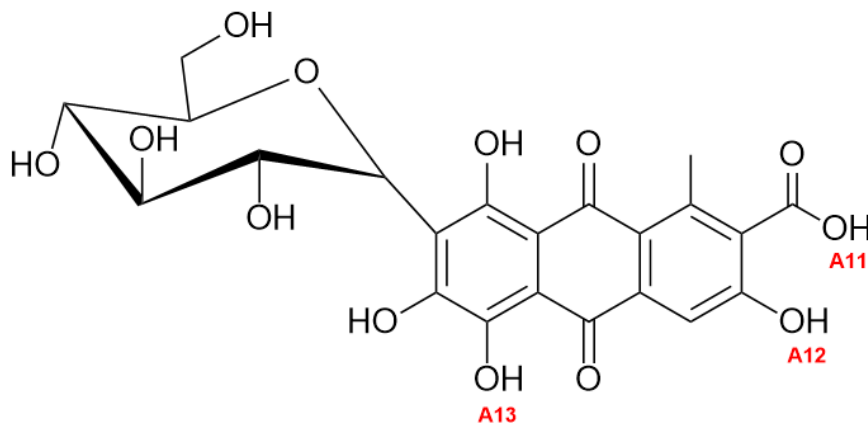


Figura 15: Ácido carminico aniones de prioridad

8.7.1. Análisis de los Resultados en Función de ΔpK_a

En la **Tabla 9**, se observan los valores de pK_a y las diferencias (ΔpK_a) para los diferentes sitios de desprotonación en el ácido carmínico, con base en las energías libres de Gibbs de las especies en fase acuosa. La

columna de ΔpK_a representa la variación en la acidez relativa de cada sitio de desprotonación con respecto al sitio más estable (A11), lo que permite comparar la facilidad de desprotonación entre los diferentes grupos funcionales.

A12 (Hidroxilo en posición orto): El valor de pK_a es **15.1631**, y $\Delta pK_a = 8,4053$. Este sitio, aunque relativamente menos ácido que A11, muestra una desprotonación relativamente favorable debido a la proximidad del grupo hidroxilo al grupo carboxílico, lo que permite cierta estabilización mediante interacciones entre los grupos funcionales. Sin embargo, su ΔpK_a más alto sugiere que la estabilidad del anión formado es menor en comparación con A11.

A13 (Hidroxilo en posición *para* del tercer anillo): El valor de pK_a es **8.3127**, y $\Delta pK_a = 1,5549$. La desprotonación en este sitio es también menos favorable que en A11, pero más favorable que en A12. La menor estabilización de la carga negativa en este sitio se debe a que el grupo hidroxilo en posición *para* tiene menor interacción con el sistema conjugado de la antraquinona, lo que resulta en una menor estabilización electrónica del anión formado.

A14 (Hidroxilo en posición orto, pero no tan cercano al grupo carboxílico): El valor de pK_a es **13.9630**, y $\Delta pK_a = 7,2052$. Este sitio muestra una desprotonación menos favorecida, ya que su posición orto, pero relativamente alejada del grupo carboxílico, proporciona menos estabilización a través de la conjugación electrónica.

A15 y A16 (Otros grupos hidroxilo): Los valores de pK_a para A15 y A16 son **21.6360** y **22.1440**, respectivamente, con $\Delta pK_a = 14,8782$ y $\Delta pK_a = 15,3862$. Estos sitios muestran la desprotonación más desfavorable, ya que sus posiciones en la estructura molecular, alejadas de los grupos funcionales más estables, hacen que la carga negativa generada en estos sitios no esté tan bien estabilizada.

A17 (Hidroxilo en una posición más alejada): El valor de pK_a es **34.5759**, con $\Delta pK_a = 27,8181$, lo que indica una desprotonación altamente desfavorable. La distancia entre este sitio y el sistema conjugado de la antraquinona contribuye a una menor estabilización del anión formado.

A18 (Otro grupo hidroxilo): Con un valor de pK_a de **25.4425** y $\Delta pK_a = 18,6847$, este sitio también muestra una desprotonación menos favorable en comparación con A11, A12 y A13, aunque sigue siendo más favorable que A17 y A19.

A19 (Último sitio evaluado): El valor de pK_a es **14.7820**, con $\Delta pK_a = 8,0242$, lo que lo coloca como un sitio moderadamente ácido, pero menos favorable que A11.

En base a los resultados, podemos concluir que la desprotonación más favorable ocurre en el grupo ácido carboxílico (A11), lo que se refleja en su menor pK_a y la estabilidad del anión formado. A medida que nos desplazamos hacia los grupos hidroxilo en posiciones orto y *para* (A12, A13), los valores de pK_a aumentan, indicando que la desprotonación se vuelve progresivamente menos favorable. Este fenómeno es el resultado de la mayor o menor capacidad de los sitios para estabilizar la carga negativa en el anión mediante deslocalización electrónica o interacciones con el sistema conjugado de la antraquinona.

Cálculo de la Acidez en Fase Gaseosa (GA)

Los resultados obtenidos para cada sitio de desprotonación se presentan en la siguiente tabla: Para el AC neutro en fase gaseosa se obtuvo una energía libre de -1828.496922 en Hartrees y -1147381.82 en [kcal/mol]

Tabla 13: Resultados de energía libre de Gibbs y acidez en fase gaseosa (GA) para los aniones en fase gaseosa.

Anión	Energía libre Gibbs [Ha]	Energía libre Gibbs [kcal/mol]	GA [kcal/mol]
A11	-1827.989	-1147063.64	311.89
A12	-1827.971	-1147052.15	323.38
A13	-1827.996	-1147067.84	307.69
A14	-1827.986	-1147061.77	313.76
A15	-1827.949	-1147038.00	337.53
A16	-1827.942	-1147033.88	341.65
A17	-1827.958	-1147044.09	331.44
A18	-1827.976	-1147055.32	320.22
A19	-1827.979	-1147057.26	318.27

Los resultados obtenidos para la acidez en fase gas del 4-hidroxibenzoico reportado por Notario (17) muestran diferencias importantes entre los valores de GA asociados a los grupos funcionales principales. En particular

para el AC, el GA del grupo carboxílico (A11) fue de 311.89 kcal/mol, mientras que el del grupo hidroxilo (A13) fue de 307.69 kcal/mol. Esto indica que el grupo hidroxilo (en este trabajo) es más ácido en fase gas, lo cual está en línea con lo reportado por Notario .

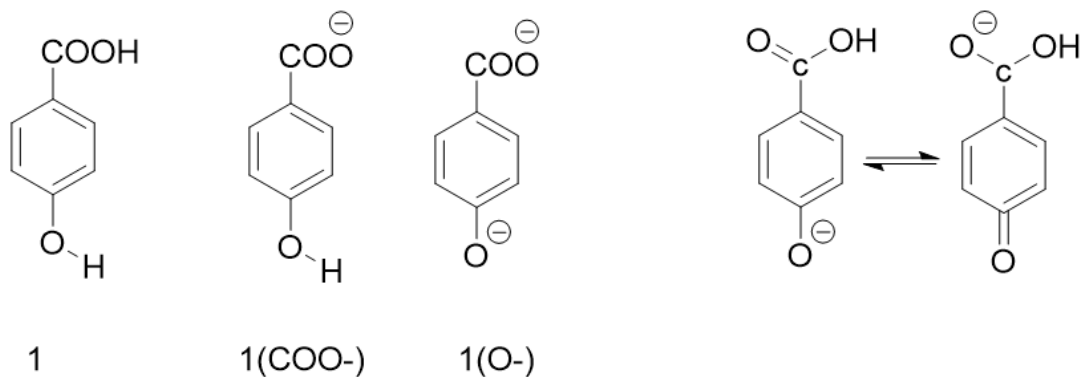


Figura 16: Aniones del ácido salicílico [(17)]

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, en fase gas, la desprotonación del grupo fenol (-OH) se favorece en comparación con el grupo carboxílico (-COOH). Esta tendencia se atribuye a la estabilización del anión fenóxido mediante resonancia, lo que reduce la energía libre de Gibbs del anión y, por lo tanto, su energía de desprotonación en comparación con el anión carboxilato. Los valores obtenidos para la energía libre de Gibbs (GA) en fase gas muestran que el GA para el anión A11 (-OH) es de 311.89 kcal/mol, mientras que para A12 (-COOH) es de 323.38 kcal/mol, lo que resulta en una diferencia de aproximadamente 11.5 kcal/mol, lo cual confirma que el grupo -OH es el sitio preferido para la desprotonación.

En contraste, los valores reportados por Notario (17) en fase gas indican un GA de 495.45 kcal/mol para A11 y 495.46 kcal/mol para A12, con una diferencia mucho menor de 0.01 kcal/mol. Esta diferencia más pequeña puede estar relacionada con las variaciones en los métodos de cálculo empleados en ambos estudios. En fase acuosa, Notario reporta valores de GA de 492.69 kcal/mol para A11 y 492.67 kcal/mol para A12, mientras que en esta investigación se obtiene un valor de pKa de 6.75 para A11 y 15.16 para A12, con una diferencia de 8.4 unidades de pKa. Esta diferencia pone de manifiesto las variaciones en la contribución de los grupos funcionales en cada fase, respaldando la observación de que el grupo -OH es el sitio preferido para la desprotonación en fase gas. (17)

9. Conclusiones

Extracción selectiva del ácido carmínico con NADES: Se logró extraer ácido carmínico (AC) a partir de grana cochinilla utilizando diferentes sistemas NADES, cumpliéndose el objetivo general. Los resultados mostraron que la composición del NADES influye significativamente en la eficiencia y selectividad de la extracción. El sistema más eficaz fue el compuesto por cloruro de colina y ácido tartárico, seguido por el sistema con ácido oxálico, lo cual sugiere que los NADES ácidos y con mayor capacidad de formar puentes de hidrógeno favorecen la extracción del pigmento.

Evaluación de eficiencia y comparación con MAE: Al comparar la eficiencia de los NADES con el método de extracción asistida por microondas (MAE), se observó que MAE sigue siendo más eficiente en términos de cantidad extraída (hasta 0.023 mg AC/mg insecto). Sin embargo, la extracción con NADES mostró resultados similares o superiores a una de las tres repeticiones de MAE, lo que indica que el sistema NADES tiene potencial como alternativa verde, especialmente si se optimizan condiciones como pH y proporciones de mezcla.

Propuesta de protocolo optimizado: Se estableció un protocolo que incluye el pretratamiento de la grana para remover ceras, uso de NADES con pH ácido controlado, y cuantificación por espectroscopía UV-Vis y HPLC. También se evaluó el efecto de la acetilación del AC para modificar su interacción con el solvente, lo que permitió confirmar la presencia de productos acetilados por FTIR y RMN. Este protocolo puede ser base para futuras optimizaciones.

Interacciones ácido-solvente y comportamiento estructural: El seguimiento del pH y la aparición de nuevas señales en TLC y HPLC sugieren que los NADES no solo extraen AC, sino que también pueden inducir cambios estructurales o reacciones secundarias, como la formación de sales carmínicas. Esta observación apoya la hipótesis de que el NADES interactúa preferentemente con grupos funcionales específicos del AC, como los hidroxilos y el grupo carboxílico.

Evaluación teórica de los sitios desprotonables del AC: Los cálculos de energía libre de Gibbs y pKa permitieron identificar el grupo carboxílico como el sitio más ácido en fase acuosa ($pK_a = 6.75$), seguido del hidroxilo orto. En fase gaseosa, se observó un cambio en el orden de acidez, siendo el grupo hidroxilo más favorable para la desprotonación. Estos resultados evidencian cómo el entorno (fase y solvente) afecta la acidez relativa de los grupos funcionales, y respaldan las interacciones observadas experimentalmente con los NADES.

Impacto del modelo de solvatación: El uso del modelo de solvatación implícito SCRF=(Solvent=Water) permitió simular el entorno acuoso de extracción y mostró que la solvatación disminuye la energía de desprotonación de los grupos funcionales del AC. Esto ayuda a entender por qué ciertos NADES facilitan la extracción, al modificar la estabilidad de las formas ionizadas del AC.

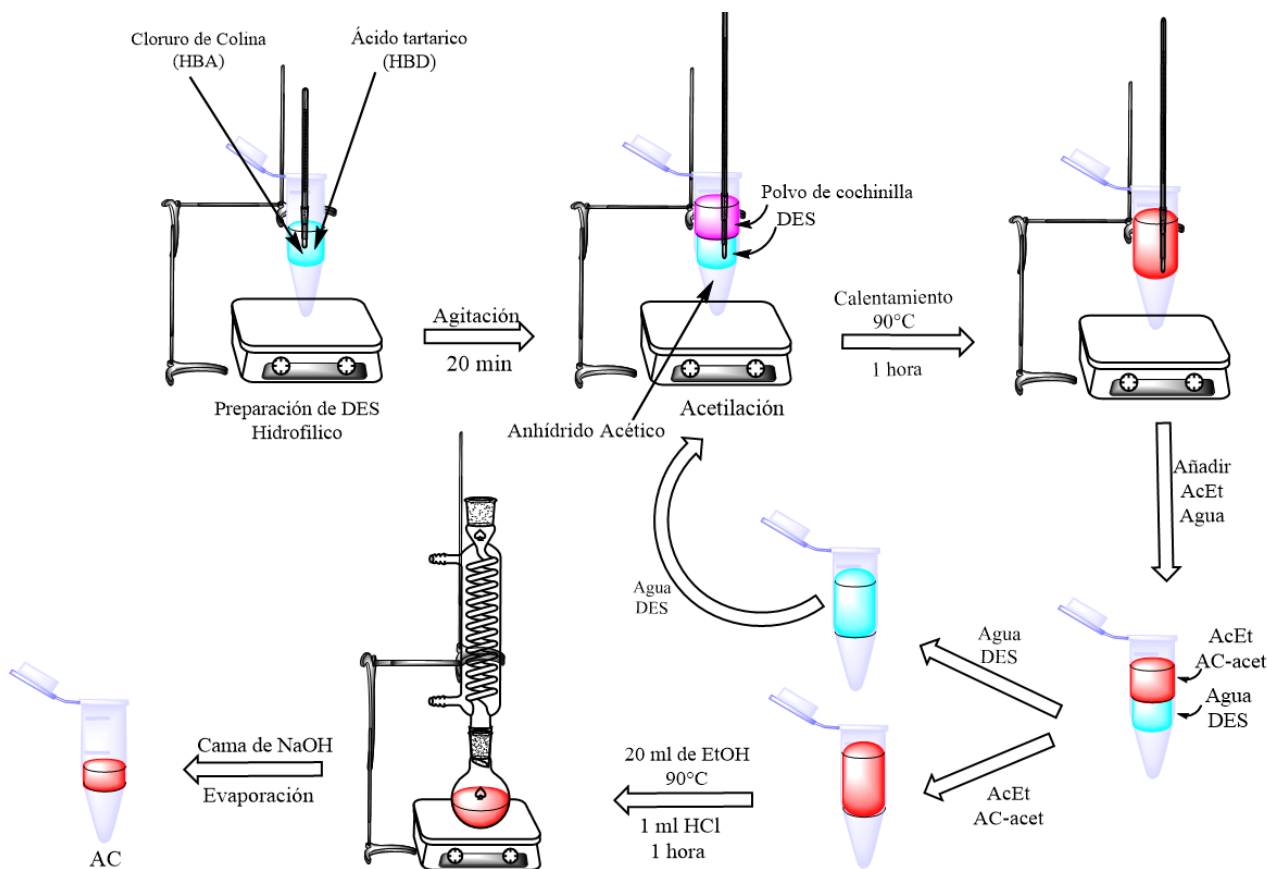


Figura 17: Metodología de extracción de AC con NADES

10. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo abren diversas líneas futuras tanto a nivel experimental como teórico, en torno al uso de NADES como medios extractivos verdes para pigmentos naturales como el ácido carmínico. En primer lugar, si bien se logró identificar un sistema NADES (cloruro de colina + ácido tartárico + agua) con alto rendimiento extractivo y buena selectividad, persisten desafíos relacionados con la eficiencia de extracción frente a métodos convencionales como la MAE. Esto sugiere la necesidad de profundizar en el diseño racional de NADES, optimizando proporciones molares, presencia de agua, viscosidad y polaridad, para maximizar la interacción específica con los sitios activos del ácido carmínico.

Además, la aparición de posibles productos secundarios, como sales carmínicas o derivados estructuralmente modificados del AC, evidencia la importancia de controlar las condiciones de pH, tiempo de extracción y presencia de aditivos (como agentes acetilantes), para evitar reacciones no deseadas o minimizar la formación de derivados estructuralmente distintos.

Desde el punto de vista computacional, los resultados de desprotonación obtenidos mediante cálculos en fase gas y acuosa aportan una base sólida para entender la reactividad ácido-base del ácido carmínico en diferentes medios. Sin embargo, sería pertinente extender estos estudios empleando modelos de solvatación explícita, simulaciones de dinámica molecular y análisis de interacciones específicas entre los NADES y los sitios funcionales del ácido carmínico. Esto permitiría predecir con mayor precisión los mecanismos de extracción y afinar el diseño de solventes a medida.

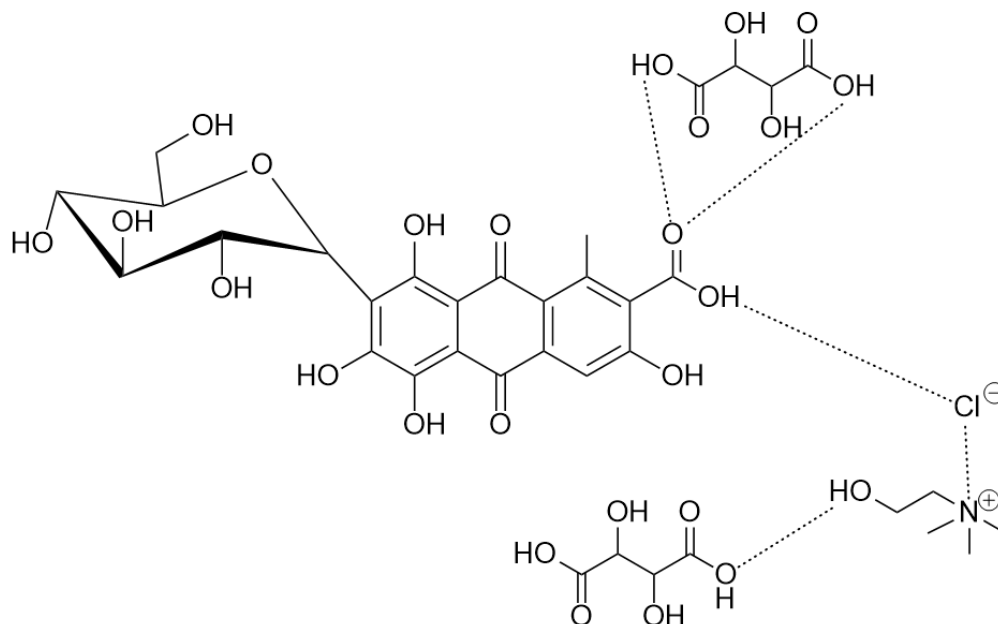


Figura 18: Imagen ilustrativa AC y NADES (Cloruro de colina y ácido tartárico)

Finalmente, considerando el interés creciente en procesos de extracción sostenibles, el uso de NADES representa una alternativa prometedora a disolventes convencionales, particularmente en industrias como la alimentaria, cosmética y farmacéutica. La validación de estos extractos desde el punto de vista de pureza, bioactividad y estabilidad será esencial para su escalamiento y aplicación industrial. Además, la metodología puede adaptarse a la extracción de otros compuestos fenólicos o antraquinónicos presentes en matrices naturales similares, ampliando su aplicabilidad.

11. Anexo

11.1. El ácido carminico y el Itrio

En el estudio realizado por (3), se llevó a cabo una valoración ácido-base del ácido carmínico utilizando una solución que contenía itrio (Y^3). El uso de este catión trivalente se justifica por su capacidad para formar complejos estables con compuestos que poseen grupos funcionales ácidos, como los carboxilos y fenoles presentes en la estructura del ácido carmínico. Estas interacciones pueden modificar significativamente el comportamiento ácido-base del compuesto, incluyendo desplazamientos en los valores de pKa y cambios en la especiación a lo largo del rango de pH.

Por otro lado, dado que el ácido carmínico es un colorante natural cuya coloración es sensible tanto al pH como a la presencia de iones metálicos, la inclusión de itrio permite observar cómo estas interacciones afectan no solo su acidez, sino también sus propiedades ópticas. La formación de complejos con Y^3 puede influir en la estabilidad del color, lo que resulta relevante para aplicaciones en matrices donde coexisten colorantes y metales.

En este contexto, el itrio actúa como un modelo útil de ion metálico trivalente, capaz de simular condiciones donde el ácido carmínico pueda formar complejos, sin generar interferencias significativas en técnicas analíticas como la espectroscopía UV-Vis. Esto permite una evaluación más precisa de los efectos del pH y de las interacciones ácido-metal en el sistema.

11.2. IR Ácido carmínico

Dado el espectro IR figura 19 del ácido carmínico, se puede resaltar las señales de los grupos importantes en esta extracción

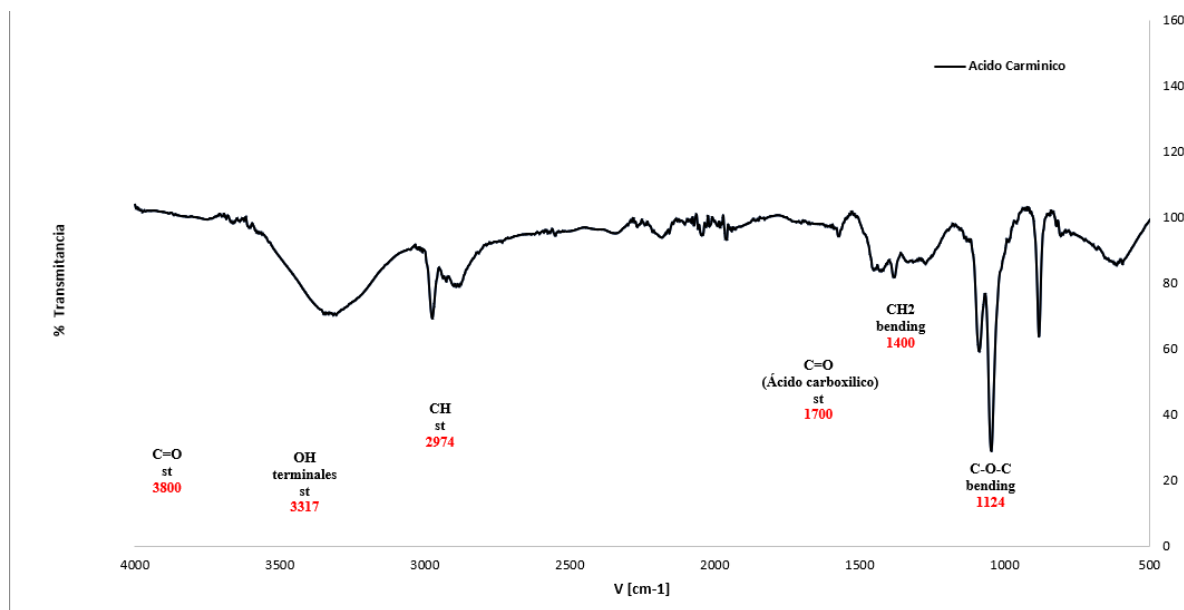


Figura 19: Interpretación del espectro infrarrojo de la muestra de ácido carmínico comercial marca ALDRICH, usado como referencia.

11.3. Espectro UV

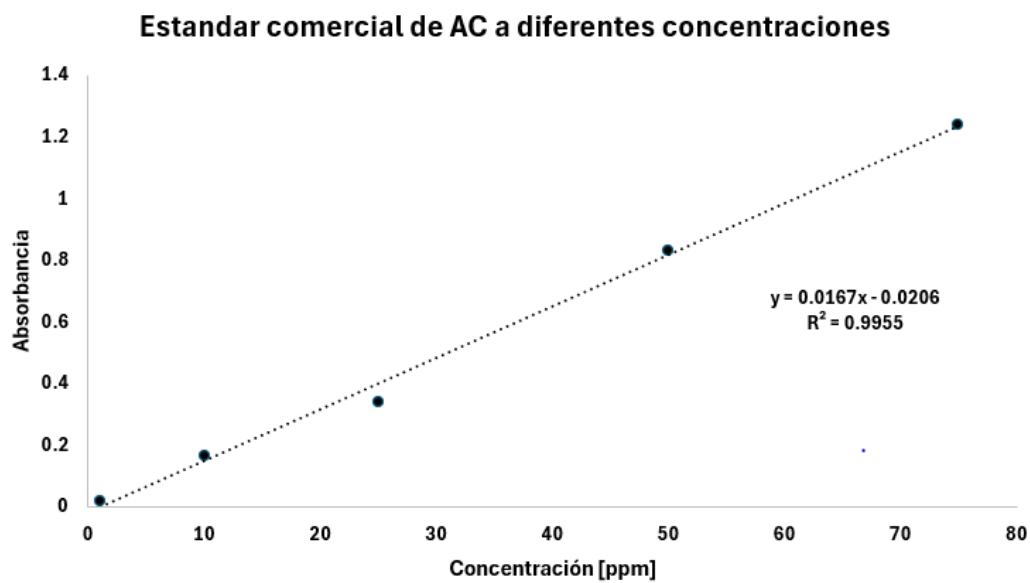


Figura 20: [Estandar comercial AC] / (ppm)

11.4. RMN Ácido carminico 13C

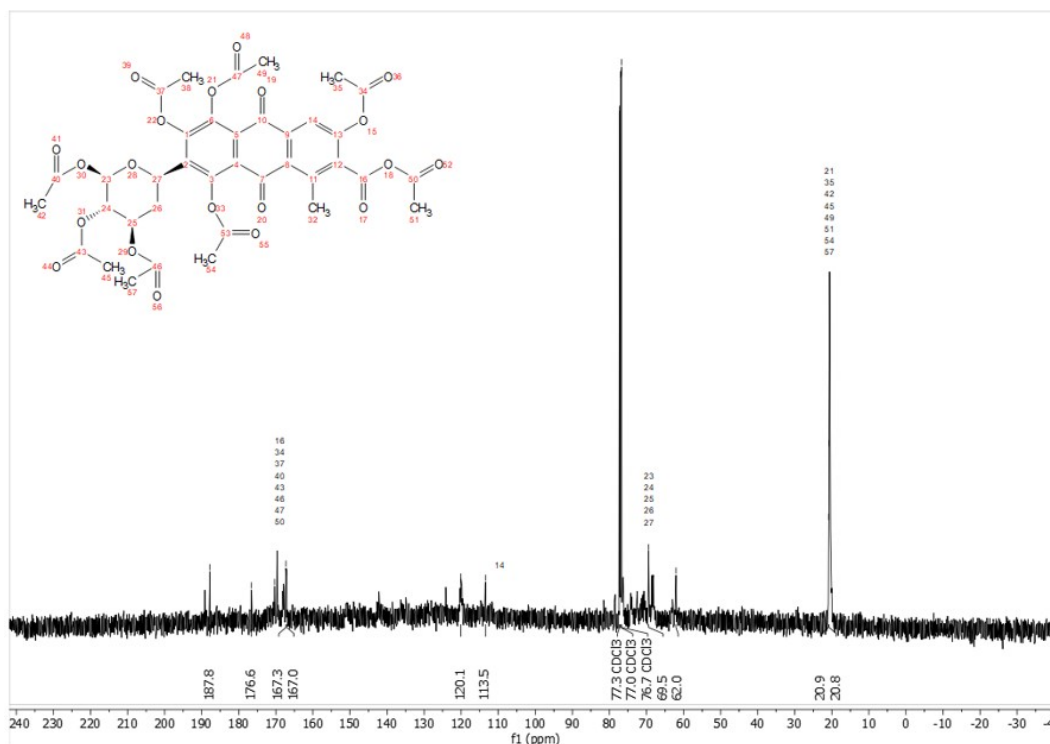


Figura 21: Resonancia magnética de ^{13}C para la muestra de ácido carmínico comercial marca ALDRICH, usado como referencia.

El espectro de RMN- ^{13}C del ácido carmínico muestra una serie de señales que pueden ser asignadas a los carbonos numerados en la estructura química. Estas señales varían en desplazamiento químico (ppm) debido a los diferentes entornos químicos de cada carbono.

- Metilos de acetilación del azúcar: C_{57} , C_{42} , C_{54} , C_{61} . Estos carbonos pertenecen a grupos metilo ($-\text{CH}_3$) asociados a los grupos acetilo en la estructura de la molécula de ácido carmínico. El desplazamiento hacia 20.9 ppm es característico de estos carbonos, debido a la baja deslocalización electrónica en estos entornos alifáticos.
- Metilos de acetilación en la antraquinona: C_{48} , C_{35} , C_{46} , C_{38} , C_{51} . Estos carbonos también forman parte de grupos metilo derivados de la acetilación, y están asociados a la porción de antraquinona en la molécula. Al igual que en los metilos del azúcar, estos carbonos muestran desplazamientos característicos en la región de 20.8 ppm.
- Metilos de ésteres como productos de acetilación: C_{47} , C_{50} , C_{44} , C_{37} , C_{34} . Estos carbonos están involucrados en la formación de ésteres a partir de los grupos hidroxilo del ácido carmínico durante el proceso de acetilación. Los desplazamientos entre 167 y 176.6 ppm son típicos de carbonos en grupos carbonilo, lo que refleja la fuerte atracción electrónica de los oxígenos en estos entornos.

11.5. Curva de calibración HPLC

Se llevaron a cabo cuatro diluciones sucesivas de concentraciones conocidas de 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm y 250 ppm, respectivamente. Estas extracciones se efectuaron con el propósito de generar una curva de calibración específica para el ácido carmínico. Los datos obtenidos de estas extracciones fueron empleados para trazar la curva de calibración correspondiente, la cual se presenta a continuación.

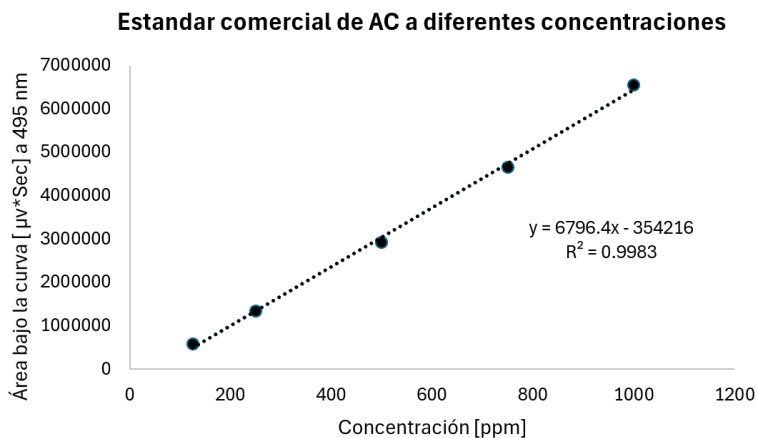


Figura 22: [Estándar comercial AC] / (ppm)

11.6. Espectro HPLC para Extracción (MAE)

Se inició el calentamiento mediante el reactor de microondas (Microondas Discover Proteomics (CEM Automated Synthesis System)) con potencia de 200 W.

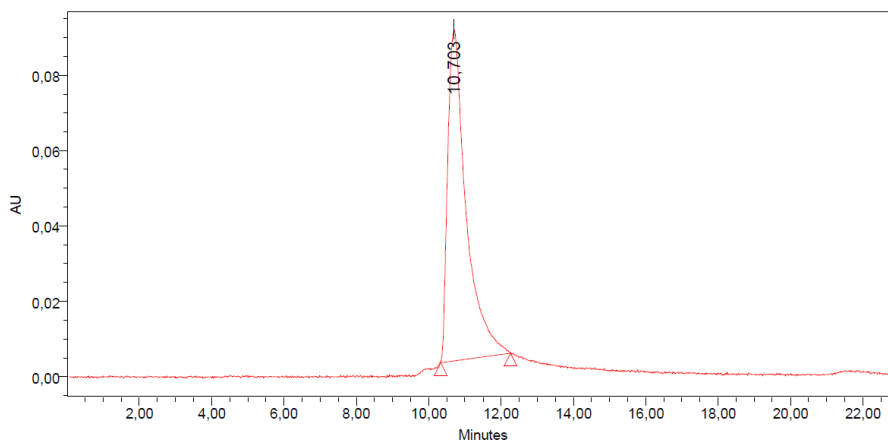


Figura 23: [Pico característico que presenta el cromatógrafo de la muestra de extracción MAE]

11.7. Espectros UV de los NADES

Espectrograma cloruro de colina ($\lambda=495.5\text{nm}$)

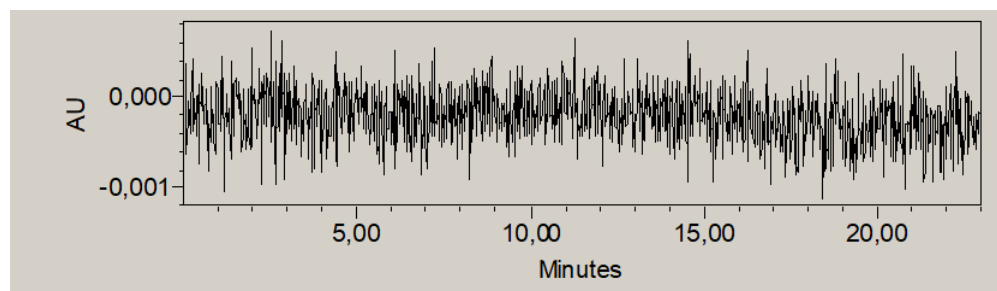


Figura 24: Espectrograma cloruro de colina

Espectrograma de ácido tartárico ($\lambda=495.5\text{nm}$)

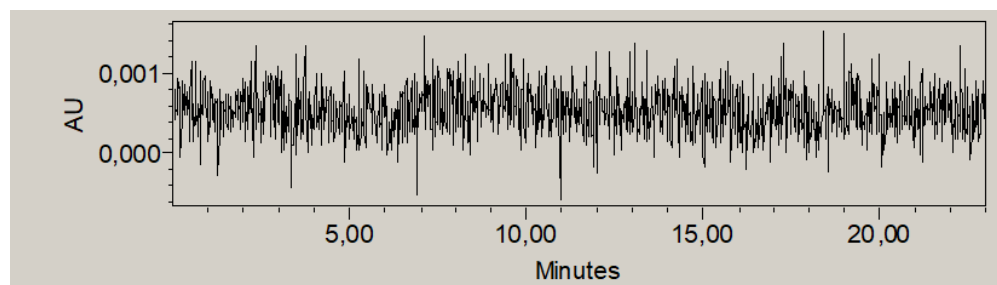


Figura 25: Espectrograma Ac. Tartarico

Referencias

1. Y.-H. Ho, A. P. Periasamy y S.-M. Chen, *International Journal of Electrochemical Science* **6**, 3922-3937, ISSN: 1452-3981, ([http://dx.doi.org/10.1016/s1452-3981\(23\)18300-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1452-3981(23)18300-3)) (sep. de 2011).
2. D. Ferreyra-Suarez, L. Paredes-Vargas, S. M. Jafari, O. García-Depraect y R. Castro-Muñoz, *Advances in Colloid and Interface Science* **323**, 103052, ISSN: 0001-8686, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2023.103052>) (ene. de 2024).
3. O. H. Aragon-Martinez *et al.*, *Insects* **14**, 811, ISSN: 2075-4450, (<http://dx.doi.org/10.3390/insects14100811>) (oct. de 2023).
4. J. Manzoori, *Talanta* **53**, 61-68, ISSN: 0039-9140, ([http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00383-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00383-0)) (oct. de 2000).
5. F. J. Roque-Rodríguez, *Journal of Insect Science* **22**, ed. por M. Chaudhury, ISSN: 1536-2442, (<http://dx.doi.org/10.1093/jisesa/ieab098>) (dic. de 2021).
6. D. Ferreyra-Suarez, L. Paredes-Vargas, S. M. Jafari, O. García-Depraect y R. Castro-Muñoz, *Advances in Colloid and Interface Science* **323**, 103052 (2024).
7. Tesis de mtría., 2021.
8. M. Borges, R. Tejera, L. Díaz, P. Esparza y E. Ibáñez, *Food Chemistry* **132**, 1855-1860 (2012).
9. A. Ali Redha, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **69**, 878-912, ISSN: 1520-5118, (<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06641>) (ene. de 2021).
10. I. Benucci, C. Lombardelli, C. Mazzocchi y M. Esti, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **21**, 2715-2737 (2022).
11. D. A. Alonso *et al.* (2018).

12. T. Zhekenov, N. Toksanbayev, Z. Kazakbayeva, D. Shah y F. S. Mjalli, *Fluid Phase Equilibria* **441**, 43-48, ISSN: 0378-3812, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2017.01.022>) (jun. de 2017).
13. M. Francisco, A. van den Bruinhorst y M. C. Kroon, *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 3074-3085, ISSN: 1521-3773, (<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201207548>) (feb. de 2013).
14. G. García, M. Atilhan y S. Aparicio, *Chemical Physics Letters* **634**, 151-155, ISSN: 0009-2614, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2015.06.017>) (ago. de 2015).
15. Y. Liu *et al.*, *Industrial Crops and Products* **140**, 111620, ISSN: 0926-6690, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111620>) (nov. de 2019).
16. B. Thapa y H. B. Schlegel, *The Journal of Physical Chemistry A* **121**, 4698-4706 (2017).
17. R. Notario, *Journal of Molecular Structure* **556**, 245-252 (2000).
18. J. Martínez *et al.*, *Solid State Sciences* **124**, 106804 (2022).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00131

Matrícula: 2231802469

Extracción y caracterización de ácido carminico a partir de grana cochinilla utilizando solventes eutécticos profundos.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 20 del mes de junio del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE ANTONIO MORENO RAZO
DRA. CLAUDIA ARACELI CONTRERAS CELEDON
DR. SERGIO ANTONIO GOMEZ TORRES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

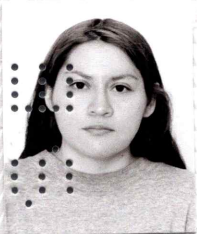
MAESTRA EN CIENCIAS (QUÍMICA)

DE: KATYA KIMBERLY GUERRERO VAZQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Kimberly

KATYA KIMBERLY GUERRERO VAZQUEZ

ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

Román Linares Romero

DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

J Antonio Moreno

DR. JOSE ANTONIO MORENO RAZO

VOCAL

CLC

DRA. CLAUDIA ARACELI CONTRERAS
CELEDON

SECRETARIO

SAT

DR. SERGIO ANTONIO GOMEZ TORRES