

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**"OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CARMIM DE  
COCHONILHA (*Dactylopius coccus*)"**

**ANA PAULA MARTINS**

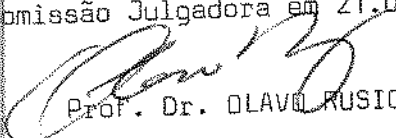
**Engenheira de Alimentos**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ANA PAULA MARTINS e aprovada pela Comissão Julgadora em 21.02.97.

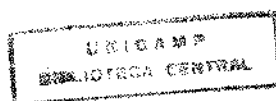
**OLAVO RUSIG**

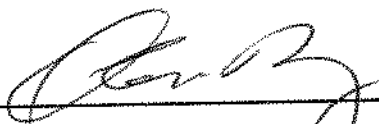
**Orientador**

  
Prof. Dr. OLAVO RUSIG  
Presidente da Banca

**TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.**

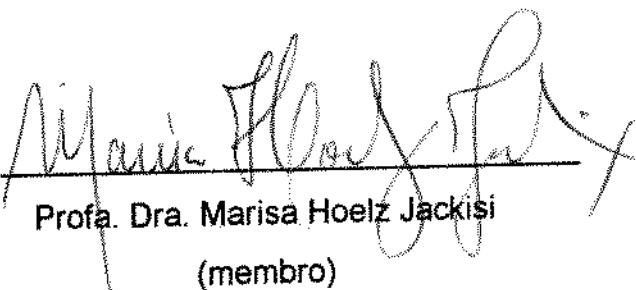
Campinas - 1997



**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Olavo Rusig  
(orientador)



---

Profa. Dra. Marisa Hoelz Jackisi  
(membro)



---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy  
(membro)

---

Profa. Dra. Maria do Carmo Guedes  
(suplente)

Campinas, 21 de fevereiro de 1997.

## AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de estudo que proporcionou a realização deste trabalho.

Ao ITAL, na pessoa da pesquisadora Vera Lúcia Pupo Ferreira, que contribuiu de forma significativa para a realização de um dos testes realizado neste trabalho.

Aos técnicos e serventes do Laboratório de Tecnologia Geral da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Aos técnicos e serventes do Laboratório de Química do ITAL.

À todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram no desenvolvimento desta pesquisa.

## ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
<b>2.1 - Cochonilha</b>	3
2.1.1 - <i>Composição Química da Cochonilha</i>	5
2.1.2 - <i>Aplicações da Cochonilha</i>	6
<b>2.2 - Ácido Carmínico</b>	7
2.2.1 - <i>Estrutura Química</i>	8
2.2.2 - <i>Características Físicas e Químicas</i>	10
<b>2.3 - Lacas</b>	13
2.3.1 - <i>Carmim</i>	14
2.3.1.1 - <i>Estrutura Química</i>	15
2.3.1.2 - <i>Características Físicas e Químicas</i>	16
2.3.1.3 - <i>Composição Química</i>	19
2.3.1.4 - <i>Especificações Técnicas</i>	19
2.3.1.5 - <i>Estabilidade</i>	20
2.3.1.6 - <i>Toxicidade</i>	22
2.3.1.7 - <i>Obtenção do Carmim</i>	24
<b>2.4 - Produtos e Aplicações</b>	31
<b>2.5 - Legislação</b>	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
<b>3.1 - Materiais</b>	33
3.1.1 - <i>Matéria - prima</i>	33
3.1.2 - <i>Reagentes</i>	33
<b>3.2 - Métodos</b>	33
3.2.1 - <i>Análise da matéria - prima</i>	33
3.2.2 - <i>Planejamento Experimental</i>	34
3.2.2.1 - <i>Estudo dos Sais</i>	34
3.2.2.2 - <i>Estudo da cor do carmim em pó</i>	37
3.2.2.3 - <i>Estudo do processo de extração do carmim em pó</i>	39
3.2.3 - <i>Identificação do Pigmento no Corante Líquido</i>	40
3.2.4 - <i>Obtenção do Corante Líquido</i>	41
3.2.5 - <i>Identificação do Pigmento no Corante Líquido</i>	41
3.2.6 - <i>Estabilidade da Laca</i>	41
3.2.6.1 - <i>Efeito da Luz</i>	42
3.2.6.2 - <i>Efeito da Temperatura</i>	42
3.2.6.3 - <i>Efeito do pH</i>	43

3.2.6.4 - Efeito da Matrix Alimentícea	44
3.2.6.5 - Análise Estatística	45
3.2.6.6 - Cálculo das Constantes e Velocidade de Reação (K) e Tempo de Meia Vida ( $t_{1/2}$ )	46
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1 - <i>Material Utilizado</i>	47
4.2 - <i>Características Físicas do Carmim em Pó</i>	47
4.3 - <i>Planejamento Experimental</i>	48
4.3.1 - <i>Estudo da cor</i>	51
4.3.2 - <i>Estudo do pH</i>	53
4.4 - <i>Processo de Obtenção proposto</i>	54
4.5 - <i>Identificação do Pigmento</i>	57
4.6 - <i>Estabilidade do carmim</i>	57
4.6.1 - <i>Estabilidade a Luz</i>	57
4.6.2 - <i>Estabilidade a Temperatura</i>	61
4.6.3 - <i>Estabilidade ao pH</i>	65
4.6.4 - <i>Estabilidade a Matrix Alimentícea</i>	71
<b>5. CONCLUSÃO</b>	74
<b>SUGESTÕES PARA NOVOS ESTUDOS</b>	75
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	76
ANEXO A - Solução Tampão de McIlvaine	85
ANEXO B - Curva de Calibração	86
ANEXO C - Estabilidade a Luz	87
ANEXO D - Estabilidade a Temperatura	89
ANEXO E - Estabilidade a pH	92
ANEXO F - Estudo dos sais - Análise de variância	95
ANEXO G - Espectros de varredura	97
ANEXO H - Decreto 55.871 - Tabela I e Anexo III	101

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Pigmentos extraídos da família coccoidea	8
Figura 2 - Estrutura química proposta para o ácido carmínico	9
Figura 3 - Estrutura química do ácido carmínico	9
Figura 4 - Degradação de produtos de ácido carmínico	11
Figura 5 - Estrutura proposta para o carmim	16
Figura 6 - Estrutura química do carmim	16
Figura 7 - Espectro de absorção do carmim em HCl 2 N	18
Figura 8 - Espectro de absorção do carmim em amônia	18
Figura 9 - Fluxograma proposto para obtenção de carmim	56
Figura 10 - Perda de ácido carmínico na presença de luz	60
Figura 11 - Perda de ácido carmínico na ausência de luz	61
Figura 12 - Perda de ácido carmínico na faixa de 25 a 100°C	64
Figura 13 - Perda de ácido carmínico na faixa de pH 2-8 - Carmim Comercial	69
Figura 14 - Perda de ácido carmínico na faixa de pH 2-8 - Carmim Laboratório	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Importações autorizadas e efetivas de cochonilha e carmim	2
Tabela 2 - Composição centesimal da cochonilha	5
Tabela 3 - Classificação da cochonilha quanto a qualidade	6
Tabela 4 - Composição centesimal do carmim	19
Tabela 5 - Solubilidade dos sais de alumínio estudados	35
Tabela 6 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial $2^{6-3}$	36
Tabela 7 - Planejamento fatorial fracional $2^{6-3}$ utilizado neste estudo	36
Tabela 8 - Planejamento fatorial $2^2$ utilizado para estudo da cor	38
Tabela 9 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial $2^2$	38
Tabela 10 - Nível dos fatores utilizados no planejamento $2^4$	39
Tabela 11 - Planejamento Fatorial $2^4$ utilizado no estudo do pH de extração	40
Tabela 12 - Composição Centesimal da Cochonilha utilizada neste estudo	47
Tabela 13 - Caracterização Física dos Carmins laboratório e comercial	47
Tabela 14 - Planejamento fatorial fracional $2^{6-3}$ - sal: $AlNaO_2$	48
Tabela 15 - Planejamento fatorial fracional $2^{6-3}$ - sal: $AlCl_3$	49
Tabela 16 - Planejamento fatorial fracional $2^{6-3}$ - sal: $Al_2(SO_4)_3$	49
Tabela 17 - Planejamento fatorial fracional $2^{6-3}$ - sal: $AlNH_4(SO_4)_2$	50
Tabela 18 - Planejamento fatorial fracional $2^{6-3}$ - sal: $KAl(SO_4)_2$	50
Tabela 19 - Resultados visuais obtidos	52
Tabela 20 - Resultado de cor obtida em relação ao padrão comercial	52
Tabela 21 - Resultados obtidos no fatorial $2^3$ para rendimento em massa de ácido carmínico	53
Tabela 22 - Resultados obtidos no fatorial $2^3$ para teor de ácido carmínico	54
Tabela 23 - Resultados obtidos para estabilidade a luz	58
Tabela 24 - Resultados de Constante de Velocidade de Reação e Tempo de Meia vida para estabilidade a luz	58
Figura 25 - Modelos de estabilidade do carmim em relação à luz	59
Tabela 26 - Resultados de estabilidade a temperatura obtidos	62
Tabela 27 - Constante de velocidade de reação e tempo de meia vida para	63

estabilidade a temperatura	
Tabela 28 - Modelos de estabilidade do carmim à temperatura	63
Tabela 29 - Resultados obtidos para estabilidade ao pH	66
Tabela 30 - Modelos de estabilidade do carmim ao pH	67
Tabela 31 - Constante de Velocidade de reação e Tempo de meia vida em relação a estabilidade ao pH	68
Tabela 32 - Resultados para cor em relação ao pH	68
Tabela 33 - Resultados de cor obtidos para a estabilidade a matrix alimentícia	71



## RESUMO

Neste trabalho foi obtido um corante natural, de coloração vermelha, a partir do inseto denominado cochonilha (*Dactylopius coccus* Costa). Para a obtenção do corante foram analisados vários fatores: pH, tempo e concentração de reagentes. Procurou-se através da variação dos fatores se obter um corante de coloração visualmente igual ao comercial e com alto teor de pigmento. O corante foi obtido sob as formas de pó e líquido.

O teor médio de ácido carmínico obtido no carmim foi de 57,35%, bem acima do mínimo recomendado, 6,74% de umidade e 21,18% de proteína. Para isto foi utilizado água como solvente na proporção 120 ml/ g de amostra, extração a temperatura de ebulição por 15 minutos, precipitação da laca em pH 6, a temperatura de ebulição por 30 minutos, tendo como reagentes sulfato de alumínio e acetato de cálcio. O rendimento em massa de ácido carmínico foi de aproximadamente 48%.

A estabilidade do corante líquido foi estudada em função dos efeitos da luz (1.200 lux), temperatura (25°C a 100°C), pH (2,3 a 7,8) e matrix alimentícia (leite integral). O efeito da luz, temperatura, pH e matrix alimentícia sobre a estabilidade do carmim foi estudado pela variação de absorbância dos três primeiros e pela variação de cor no último. A partir da variação de absorbância foi possível determinar os valores da constante de velocidade da reação e o tempo de meia vida em cada sistema além das perdas de ácido carmínico. A temperatura foi o agente mais destrutivo da cor, sendo a luz e o pH praticamente inertes. O efeito da matrix alimentícia não influenciou na estabilidade do carmim.

O presente trabalho teve como objetivo obter um corante carmim de mesma cor, composição e estabilidade que um corante padrão obtido no mercado.

## ABSTRACT

In this work was obtained a natural colorant, of red colour, from an insect called cochineal (*Dactylopius coccus* Costa). For the obtention of colorant was analised some effects: pH, time and concentration of reagents. The objective was obtain a colorant visually equal to the comercial one throw the variation of conditions and with a high concentration of pigment. The colour was obtained in powder and liquid forms.

The medium rate of carminic acid in carmine developed in this study was 57,35%, higher than the minimum recommended, 6,74% of moisture and 21,18% of protein. For this results was used water in the extration in the rate 120 ml/g of cochineal, extration in a boil temperature by 15 minutes, precipitation of lac in pH 6,0, in a boil temperature by 30 minutes, using aluminium sulfate and calcium acetate as reagents. The income in mass of carminic acid was nearly 48%.

The stability of liquid form was studied in light (1.200 lux), temperature (25°C to 100°C), pH (2,3 to 7,8) and food (whole milk). The light's, temperature's, pH's and food's effects besides the stability of carmine was studied by the variation of absorbance of the first three and by the variation of colour in the last. By the variation of absorbance was possible to determine the values of speed of reaction constant and time of half life in which system beyond the looses in carminic acid. The temperature was the effect more destructive of colour and light and pH almost do not present destroy to the carmine. The effect of food have not induced in carmine stability.

The objective of this work was to obtain a carmine of the same colour, composition and stability that a standard colour from the market.

## 1- INTRODUÇÃO

A cor de um alimento é um dos aspectos mais importantes deste sob o ponto de vista de "marketing" e aceitação do mesmo pelo consumidor. Há uma tendência a se comprar produtos de aparência mais atrativa e associar muito do sabor à cor destes alimentos.

Devido a grande resistência encontrada, principalmente internacionalmente, à adição de corantes artificiais a alimentos, criou-se a necessidade do estudo de corantes naturais. Esta substituição não é direta uma vez que as cores artificiais costumam ter um custo menor que as naturais, têm um espectro de tonalidade muito amplo e são mais estáveis.

O carmim despertou um grande interesse pela ampla faixa de tonalidade vermelha que se pode alcançar substituindo, desta forma, os corantes sintéticos, em especial a eritrosina, sendo necessário 40 ppm de cochonilha contra 5,4 ppm de eritrosina para produzir o mesmo efeito. No entanto, a cochonilha apresenta-se mais estável em produtos alimentícios do que a eritrosina (MADSEN et al., 1993).

O carmim é a laca extraída do corpo seco de fêmeas do inseto *Dactylopius coccus*, comumente denominado cochonilha, que vive em plantas da família das cactáceas *Opuntia ficus* e *Nopalea coccinellifera* conhecidas como tuna e nopal (LLOYD, 1980; MARMION, 1991).

Devido ao alto custo agregado (Tabela 1), é de interesse o desenvolvimento da tecnologia de transformação da cochonilha em corante laca de carmim para uso em alimentos.

Tabela 1 - Importações autorizadas e efetivas de cochonilha e carmim

Ano	cochonilha				carmim			
	autorizada		efetiva		autorizada		efetiva	
	peso líq. (kg)	valor FOB (US\$)	peso líq. (kg)	valor FOB (US\$)	peso líq. (kg)	valor FOB (US\$)	peso líq. (kg)	valor FOB (US\$)
95	53	3900	-	-	5530	1346352	1022	125036
94	100	3000	-	-	6475	621961	300	25058
93	40	300	-	-	27197	609874	2771	48067
92	500	7500	-	-	22194	355764	1571	54593
91	50	1500	-	-	11584	70455	100	16000

Fontes: Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo e Banco do Brasil S.A.

Os principais países produtores do cacto são México, Chile, Peru e Espanha. Dentre estes, o principal produtor de cochonilha é o Peru. A cochonilha peruana apresenta de 18 a 20% de ácido carmínico enquanto a de outras procedências possui apenas 14% (ESPINOZA et al., s.d.). Segundo MOTTIER (1974) e MARMION (1991) a cochonilha possui apenas 10% de ácido carmínico.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- Cochonilha:

A cochonilha é um inseto pertencente a ordem dos hemípteros (MOTTIER, 1974) superfamília Coccoidea. Dentro da superfamília existe a família Dactylopiidae espécie *Dactylopius coccus* Costa. Nesta família os insetos são parasitas dos filocládios - parte aérea de cactos dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* (MOTTIER, 1974). Este inseto vive nos cactos *Nopalea coccinellifera* e *Opuntia ficus* alimentando-se da seiva das folhas (BORROR et al., 1989 e MARMION, 1991). O cacto se adapta bem a condições diversas de clima e altitude. No entanto é bastante susceptível a umidade e a características do solo. Sendo conhecido como tuna (Peru), nopal e chumbera (México), chumbo, chardón indica (Espanha) e tuna espanhola (Venezuela) (ESPINOZA et al., s.d.).

A cochonilha teve sua origem no México, América Central e Peru (MOTTIER, 1974 e ESPINOZA et al., s.d.). Antigamente existiam diversas teorias sobre o inseto: alguns acreditavam que se tratasse de uma matéria vegetal secretada pelos cactos outros a consideravam animal. Somente no século XVII o microscopista holandês Antonius Van Leewenhoek provou cientificamente que se tratava de um inseto (ESPINOZA et al., s.d.).

A cochonilha foi descoberta após a conquista do Peru por Francisco Pizarro em 1533 através dos astecas que já a utilizavam como matéria corante. Apesar da comercialização do inseto desde esta época o carmim só foi fabricado em 1818 por Joseph Pelletier que foi um dos inventores da quinina (MOTTIER, 1974). No século XII o império inca utilizava a cochonilha para tingir tecidos e pintar cerâmica. No México do século XVI, os astecas utilizavam a cochonilha para obter tons vermelhos e rosados. O México chegou a exportar cochonilha no período colonial. Os espanhóis

levaram a planta para a Europa e durante muito tempo exerceram monopólio sobre a produção industrial de carmim. Atualmente se explora a cochonilha no México, Peru, Chile, Bolívia, Argentina, Espanha, São Salvador, Itália, África do Sul, Índia, entre outros (ESPINOZA et al., s.d.). Apesar disto, o carmim consumido no Brasil é praticamente todo proveniente do Peru. Em 89 e 90 o Peru exportou 187.668 kg do corpo dessecado do inseto e 34.355 kg de carmim em 89 e 31.271 kg, só no primeiro semestre de 90 (CHABARIBERY e SATO, 1991).

São comercializadas duas formas de inseto: "prata" e "negra", a primeira obtida por secagem natural e a segunda por secagem acelerada ou por extração com solvente (LLOYD, 1980). Os dois tipos ainda variam segundo a quantidade de lípidio: "prata" possui quase a totalidade da graxa original e a "negra" sem graxa é a forma mais comercializada e de melhor qualidade (MOTTIER, 1974).

O inseto tem como ciclo de desenvolvimento as fases de ovo, ninfa I, ninfa II, fêmea ou macho adultos. O macho passa ainda pelas fases de pupa e pré-pupa após ninfa II. O macho serve somente para a reprodução da espécie. As fêmeas são caracterizadas por não apresentarem asas e são maiores que os machos, 7 mm contra 3 mm (MOTTIER, 1974). As fêmeas mais desenvolvidas chegam a 6 mm de comprimento por 4 mm de altura e apesam 45 mg, mas perdem 70% do peso durante a secagem (LLOYD, 1980).

As fêmeas vivem em justaposição ao cacto com o aparelho sugador aderido a superfície do mesmo, e são cobertas por camadas de cera (LLOYD, 1980). Somente as fêmeas são coletadas para extração do pigmento. As cochonilhas são coletadas na maturidade sexual, entre 90 e 110 dias, um pouco antes da postura começar, período onde há a maior concentração de pigmentos. Este aumento de pigmento se dá pela incorporação da gema do

ovo do embrião aos tecidos da fêmea. Esta tem uma vida média de 130 dias realizando duas mudas antes de atingir o amadurecimento sexual, que ocorre aproximadamente ao 100º dia. Sua postura se dá após 20 dias da maturidade sexual (LLOYD, 1980). As fêmeas depositam uma média de 500 ovos o que pode ocorrer em qualquer época do ano. A colheita é feita manualmente de 3 a 4 vezes ao ano e se realiza após 3 meses da infestação do cacto (ESPINOZA et al., s.d.).

Um hectare do cacto produz cerca de 300 kg de cochonilha e cada cem mil insetos são necessários para produzir um kilo de carmim (MOTTIER, 1974).

### 2.1.1 - Composição Química da Cochonilha

A composição centesimal da cochonilha encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição centesimal da cochonilha:

	FOPEX (1983)	RANDICH* (1975)	MORENO (1985)
<b>ácido</b>			
<b>carmínico</b>	9,0-10,0%**	17,50%	14,71%
<b>umidade</b>	10-20%		
<b>graxas</b>	6-8%		
<b>ceras</b>	0,5-2%	4%	
<b>substâncias</b>			
<b>minerais</b>	15-30%	3%	4,53%
<b>substâncias</b>			
<b>nitrogenadas</b>	15-30%	46,37%	51,83%

\* apud MORENO (1985)

\*\* Fontes: FOPEX (1983), ENCICLOPÉDIA UNIVERSAL ILUSTRADA (1968), ALCABÉS (1970) e VARGAS et al.(1974) apud MORENO (1985)





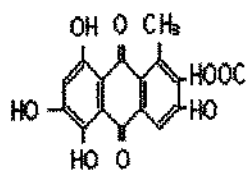
## 2.2- Ácido Carmínico

Apesar de outros insetos da família coccoidea possuírem pigmentos parecidos (Figura 1) com o ácido carmínico estes pigmentos não possuem cor e estabilidade com a qualidade da cochonilha e nem se pode obter o carmim através destes pigmentos (LLOYD, 1980 e FRANCIS, 1981).

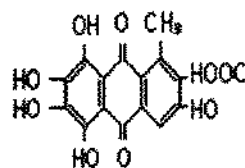
Este pigmentos são: o ácido kermésico - aglicona do ácido carmínico extraído do kerme, ácido lacaico extraído do *Coccus laccae*, eritrolaccio e deoxieritrolaccio. Há ainda um outro pigmento, o ácido ceroalbolínico, isômero do ácido kermésico que é produzido pelo *Ceroplastes albolineatus* que cresce na casca da planta *Senecio praecox* (LLOYD, 1980). O ácido carmínico possui cerca de 10 vezes mais força tintorial que o ácido kermésico (MARMION, 1991).

O extrato de cochonilha é definido como a solução concentrada obtida depois da remoção de álcool do extrato hidroalcoólico de cochonilha. O principal agente corante é o ácido carmínico, uma hidroxiantraquinona ligada a uma unidade de glicose (FEDERAL REGISTER, 1968 e MARMION, 1991).

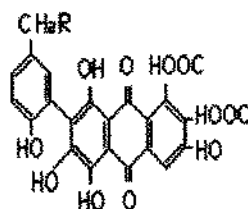
O extrato de cochonilha frequentemente é preservado com benzoato de sódio. Sua força tintorial é apenas moderada e é utilizada em níveis de 25 - 1000 ppm (MARMION, 1991).



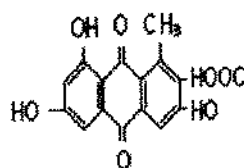
Ácido Kermésico



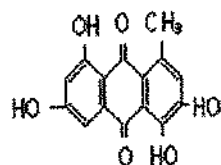
Ácido Ceroalbolínico



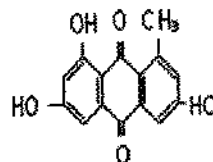
Ácidos lacaicos

A: R...CH<sub>2</sub>...NH..COCH<sub>3</sub>B: R...CH<sub>2</sub>OHC: R...CH(NH<sub>2</sub>)COOHE: R...CH<sub>2</sub>..NH<sub>2</sub>

Ácido lacaico D



Eritrolaccina



Deoxieritrolaccina

Figura 1 - Pigmentos extraídos da família coccoidea.

Fonte: LLOYD (1980)

### 2.2.1 - Estrutura Química:

MELOAN et al. (1971 apud MORENO, 1985) demonstraram que a fórmula de ácido carmínico amplamente aceita (Figura 2) está incorreta: o grupo

carboxila não se encontra na posição 4 e sim na posição 2, e a cadeia lateral não é uma metil-pentose e sim uma hexose. Isto foi estudado por BHATIA e VENKATARAMAN (1965) que confirmaram esta segunda estrutura (Figura 3) através de reações químicas e métodos físicos de ressonância magnética nuclear. A nomenclatura correspondente é Ácido 7 - D - glucopiranosil - 9, 10 - dihidro - 3, 5, 6, 8 - tetrahidroxy - 1 - metil - 9, 10 - dioxo - 2 - antraceno carboxílico (MERCK INDEX, 1983).

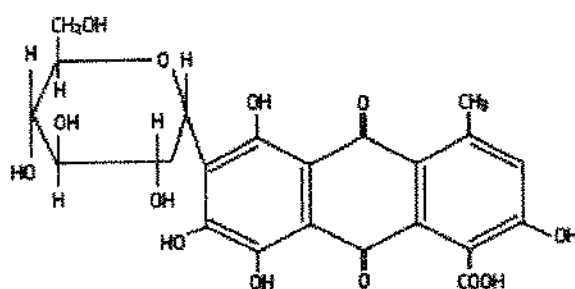


Figura 2 - Estrutura química proposta para o ácido carmínico

Fontes: MARMION (1991), ITINTEC (1982 apud MORENO, 1985) e MOTTIER (1974).

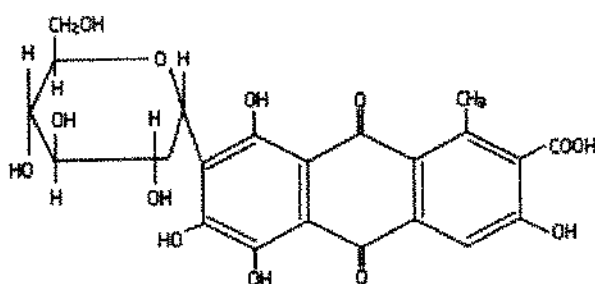


Figura 3 - Estrutura química do ácido carmínico

Fontes: OVEREEN e VAN DER KERK (1964 apud MORENO, 1985) e MERCK INDEX (1983).

A configuração estereoquímica da ligação C-glicosídica é de considerável relevância para determinar a facilidade com que o ácido carmínico forma complexo com muitos metais. Presume-se que esta ligação seja em alfa (LLOYD, 1980).

### 2.2.2 - Características Físicas e Químicas

O ácido carmínico, obtido por purificação através de sais de chumbo, forma cristais vermelhos que escurecem a 130°C e carbonizam a 250°C. A fórmula molecular  $C_{22}H_{22}O_{13}$  proposta por LIEBERMANN apud MAYER (1943) foi alterada por DIMROTH e KÄMMERER (1920 apud MAYER, 1943) para  $C_{22}H_{20}O_{13}$ . A oxidação com ácido nítrico forma ácido nitrocóccico. Pela ação da bromina dois produtos são obtidos:  $\beta$ -bromocarmim e  $\alpha$ -bromocarmim; o primeiro um derivado de naftoquinona e o segundo um derivado de indanedione. Oxidação com peróxido de hidrogênio na presença de catalizadores forma um composto convertido em carminazarina pelo permanganato de potássio. O mesmo produto é obtido do ácido carmínico em presença de permanganato de potássio em ácido sulfúrico a 0°C.

Ainda segundo o mesmo autor, a oxidação de ácido carmínico com persulfato de potássio forma ácido cochenílico que se degrada em  $\alpha$ - ou  $\beta$ -ácido coccínico ou ácido cresotínico. A fusão de ácido carmínico com potassa forma coccinica que cristaliza em forma de agulhas amarelas. Coccinica se dissolve em álcalis dando uma solução amarela que gradualmente passa a violeta através da conversão irreversível desta em coccinona.

Na destilação com pó de zinco forma-se um produto de antraceno e  $\alpha$ -metilantraceno e com ácido sulfúrico é obtido provavelmente um ácido metiltrihidroxiantraquinona carboxílico (MAYER, 1943).

Na redução do ácido carmínico com pó de zinco e ácido acético é formado um leucocomposto o qual se oxida dando origem ao ácido desoxicarmínico (MAYER, 1943).



O ácido carmínico é solúvel em água, álcool e soluções alcalinas e insolúvel em éter de petróleo, benzeno e clorofórmio e muda de cor conforme o pH: a pH 4,8 tem coloração roxa e a pH 6,2 violeta. Segundo outro autor (MOTTIER, 1974) a coloração a pH 4,8 é amarela. Seu peso molecular é de 492 e seu ponto de fusão de 136°C (ESPINOZA et al., s.d e MOTTIER, 1974) contudo, segundo MERCK INDEX (1983) o ácido carmínico não apresenta ponto de fusão definido.

O ácido carmínico é um ácido fraco, insípido e inodoro, cristaliza em forma de prisma de cor vermelho brilhante (MERCK INDEX, 1983).

O ácido carmínico se decompõe pelo calor, hidrolisa-se rapidamente por ebulição com ácido diluído produzindo carmin vermelho de decomposição,  $C_{11}H_{12}O_7$  (MORENO, 1985).

O ácido carmínico é susceptível a oxidação e em modelos de degradação oxidativa descobriu-se que esta está estritamente ligada ao pH da solução, na pressão parcial de oxigênio e exposição à luz (MADSEN et al., 1993).

O ácido carmínico forma sais de diferentes colorações de acordo com o composto utilizado na precipitação (ALCABÉS, 1970 apud MORENO, 1985):

Alumínio e Estanho.....	escarlate
Enxofre.....	roxo
Bário.....	violeta mate
Cromo.....	púrpura
Ferro.....	vermelho acinzentado
Chumbo.....	vermelho achocolatado
Magnésio.....	rosado
Urânio.....	verde
Zinco.....	roxo

A solução aquosa do pigmento precipitada por óxidos metálicos forma lacas verdadeiras que são a base de sua aplicação como corante (MORENO, 1985).

O extrato de cochonilha varia do laranja ao vermelho dependendo do pH. É insolúvel em solventes típicos como água, glicerina e propileno glicol, sendo no entanto dispersível em água (MARMION, 1980).

### **2.3- Lacas**

Lacas são a precipitação de pigmentos e adsorção de corantes em base ou substrato insolúveis. A base normalmente é o hidrato de alumina. (WARNER-JENKINSON, 1984)

A preparação da laca se dá com a formação de um precipitado branco, difícil de filtrar, pela adição de hidróxido de sódio diluído em uma solução de sal de alumínio solúvel. Este precipitado consiste no hidróxido de alumínio ou alumina.

A maneira como o hidróxido de alumínio é preparado e as condições em que o pigmento é adicionado ou absorvido determina a forma, tamanho da partícula, dispersão e força tintorial da laca. Outras variáveis importantes são a temperatura, a concentração dos reagentes, o pH final da reação e o tipo de agitação.

As lacas colorem por dispersão ao contrário dos corantes solúveis que agem por dissolução (WARNER-JENKINSON, 1984).

As lacas, segundo a resolução 37/ 77 são sais preparados a partir do corante incluído na Tabela 1, anexa ao decreto 55871/ 65, em combinação com radical básico de alumínio ou cálcio (ANEXO H).

Estas deverão atender as seguintes especificações:

- cloretos e sulfatos como sal de sódio ..... máx 2%
- matéria inorgânica insolúvel em HCl ..... máx 0,5%

O corante deverá ser exposto à venda sob o nome de "laca" (alumínio ou cálcio) seguido do nome comum à venda do corante utilizado. O rótulo deverá conter, ainda, a concentração do corante puro.

### 2.3.1- Carmim

O corante carmim é a laca de alumínio ou laca de alumínio e cálcio em substrato de hidróxido de alumínio ( $Al(OH)_3$ ) cujo principal pigmento é o ácido carmínico obtido do extrato aquoso de cochonilha (LARA e TAKAHASHI, 1994; MARMION, 1991 e MOTTIER, 1974).

Internacionalmente o carmim é conhecido como "natural red 4" , "lebensmittel rot 2", "carmin nacarat" ou carmim 40, E120 (Mercado Comum Europeu), nº 75.470 (Color Index 2ª ed.) (MOTTIER, 1974).

Soluções de ácido carmínico têm ótima coloração abaixo de pH 7 (onde o anel quinônico tem grande fotoestabilidade) e na região de pH 4 tem uma cor pálida dependendo da concentração. As propriedades de formar complexos com metal são parecidas com as de outras quinonas (ex.: alizarina). Desta forma a absorção máxima na faixa do visível vai para comprimentos de onda maiores e há um aparente aumento na intensidade



da cor vista pelo olho humano. As cores mais brilhantes são produzidas com estanho e alumínio (LLOYD, 1980).

O carmim pode ser isolado de forma direta em solventes a base de água sobre uma ampla faixa de pH ou em formas insolúveis em pH abaixo de 7. Comercialmente entretanto, carmim insolúvel pode ser solubilizado por tratamentos em água a pH acima de 7.5 antes de sua adição a alimentos.

Necessita-se de 4 - 5 kg de cochonilha bruta para produzir 1 kg de carmim comercial. O processo envolve a extração em água a 90° - 100°C. O estágio subsequente é o tratamento do extrato com sal de alumínio. De acordo com o desejado, o complexo pode ser tratado com etanol em alta concentração para precipitar um carmim solúvel ou pode ser isolado na forma insolúvel em pH abaixo de 7 pela adição de sal de cálcio na solução final. Apesar de mais caro o carmim solúvel tem vantagens tecnológicas, além de sua solubilidade numa faixa de pH mais ampla em misturas aquosas de etanol é possível, através de ajuste na taxa ácido carmínico/ alumínio, produzir carmim que cobre toda a faixa do vermelho, desde o morango pálido até o amora escuro. Uma forma de ajustar a cor e diminuir custos é o uso do spray-dryer com e sem adição de diluentes e outros aditivos (LLOYD, 1980).

#### 2.3.1.1 - Estrutura Química:

A primeira estrutura proposta para o carmim foi elaborada por HARMS (1957) segundo LLOYD (1980) e era baseada na representação de RUTISHAUSER (1940) do complexo de alumínio/ cálcio da alizarina (Figura 5).

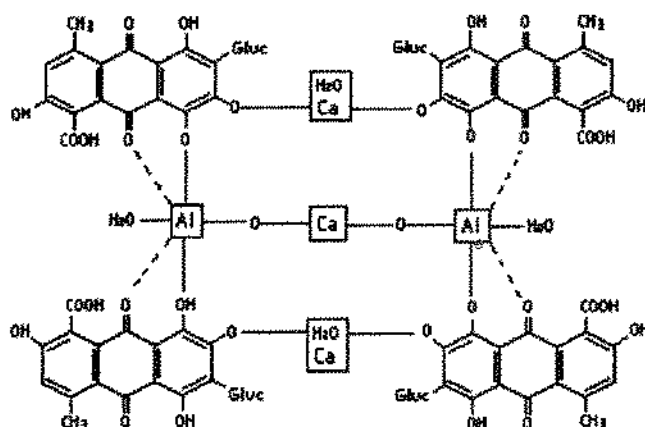


Figura 5 - Estrutura Proposta para o Carmim

Esta estrutura quando estudada por MELOAN et al. (1971) não se mostrou satisfatória devido à impossibilidades estereoquímicas. Desta forma Meloan propôs outra estrutura (Figura 6) que mais tarde foi confirmada (LLOYD, 1980).

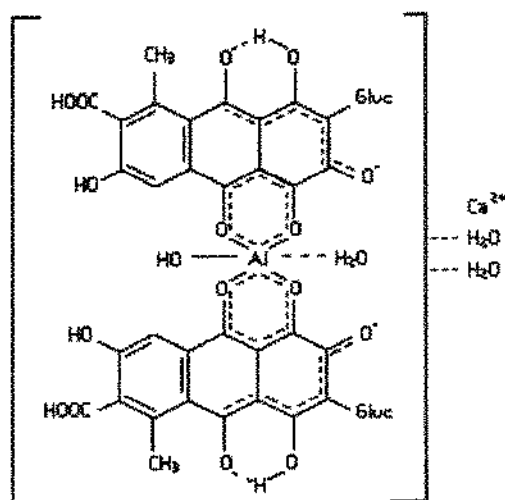


Figura 6 - Estrutura química do carmim

### 2.3.1.2 - Características Físicas e Químicas

O carmim possui pouca solubilidade na maioria dos solventes. Mas como laca de alumínio pode ser solubilizada por ácidos e bases fortes que causam a degradação do substrato e liberam a cor (MARMION, 1991).

O carmim é pouco solúvel em água, insolúvel em álcool e éter. Em presença de ácido se torna laranja e em amônia se dissolve completamente com coloração vermelha intensa. Em sulfato de sódio não se descolore. Em solução de cloreto de cálcio se descora. Queima despreendendo odor de substâncias nitrogenadas e deixando poucas cinzas (VILLAVECCHIA, 1964 apud MORENO, 1985). O carmim amoniacal é facilmente solúvel em água na faixa de pH 3,0 a 8,5. Já o carmim cálcico é pouco solúvel em água a pH 3,0 e facilmente solúvel a pH 8,5 (LARA e TAKAHASHI, 1994).

O carmim possui grandes quantidades de proteína derivadas de partes do inseto durante a fase de extração do pigmento. Alguns estudos indicam que esta proteína pode determinar a solubilidade do corante (LLOYD, 1980).

O carmim forma coloração violeta em presença de solução de hidróxido de sódio ou potássio à 10%. Pequena adição de cristais de ditionato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) à solução da amostra não a descora. Em cromatografia em papel com solução de citrato trissódico em amônia aparece uma única mancha violácea (LARA e TAKAHASHI, 1994).

O espectro de absorção do carmim em HCl 2 N com máximo de absorção a 494 nm está apresentado na Figura 7. O máximo de absorção em amônia é de 518 nm (Figura 8).

Nos produtos comerciais o princípio corante está presente sob a forma dos cátions amônio, cálcio, sódio ou potássio isolados ou associados, podendo haver excesso destes cátions. Os produtos comerciais poderão conter ainda matéria protéica oriunda de inseto e carminato livre ou pequeno excesso de cátion alumínio (LARA e TAKAHASHI, 1994).

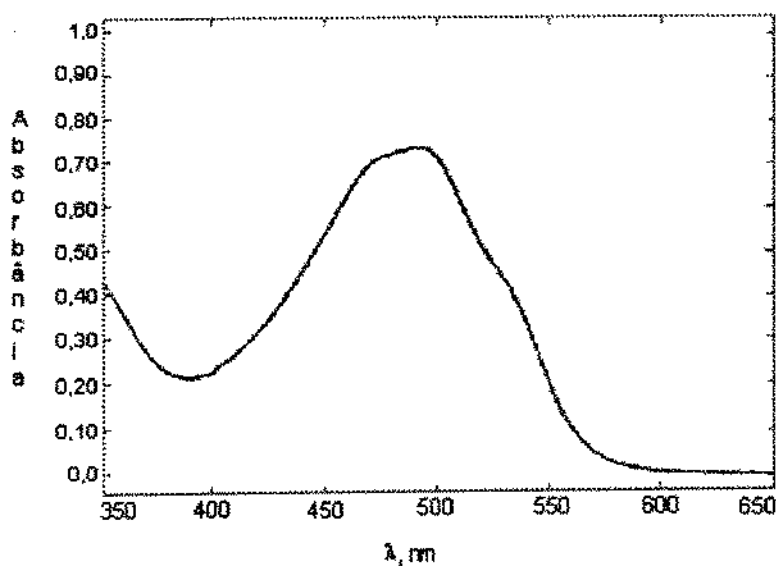


Figura 7 - Espectro visível de absorção do carmin em HCl 2 N.

Fonte: MARMION (1991).

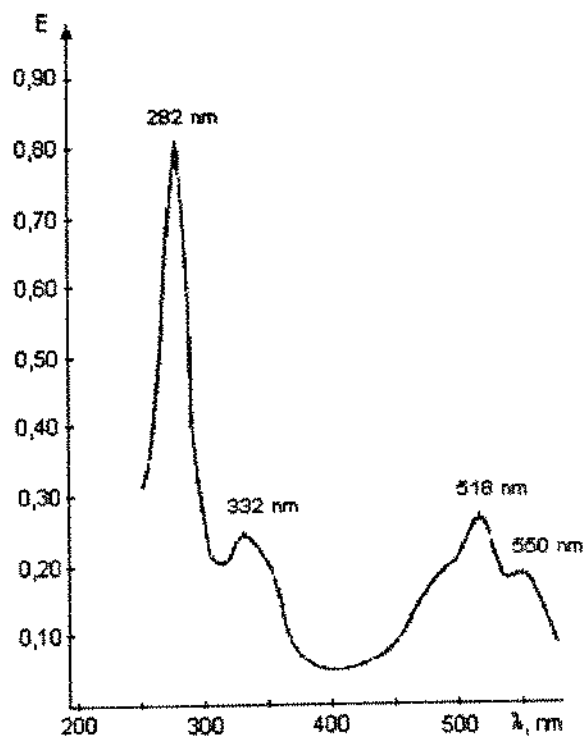


Figura 8 - Espectro de absorção do carmin em amônia

Fonte: WEINHEM (1988)

### 2.3.1.3- Composição Química

A composição centesimal do carmim está na Tabela 4.

Tabela 4- Composição centesimal do carmim

Fonte	ácido carmínico	substância nitrogenada	umidade	cinzas
<b>LIEBERMANN*</b> <b>(1900)</b>	56%	20%	20%	7%
<b>AMAYA** (1984)</b>	30-65%		2-20%	5-14%
<b>LARA e TAKAHASHI</b> <b>(1994)</b>	mín. 42%	máx. 25%	20%	máx. 12%
<b>MARMION (1991)</b>	mín. 50%			12%
<b>LLOYD (1980)</b>	mín. 50%	15-25%	10-18%	máx. 15%
<b>MOTTIER (1974)</b>	40-50%	18-20%	13-20%	6-10%

\* apud MORENO (1985)

\*\* apud FALCONE (1989)

### 2.3.1.4- Especificações Técnicas

O carmim deve seguir as seguintes especificações (MARMION, 1991 e FDA, 1983):

- chumbo (como Pb) máx.= 10ppm
- arsênio (como As) máx.= 1ppm
- ausência de células viáveis de *Salmonella*

Segundo LARA e TAKAHASHI (1994):

- As máx. = 3mg/kg
- Pb máx. = 10mg/kg
- metais pesados com Pb máx. = 20mg/kg
- insolúveis em amônia diluída máx. = 1%
- ausência de *Salmonella* em 25g de amostra

### 2.3.1.5- Estabilidade

A estabilidade do ácido carmínico diminui com o aumento de pH e a cor é sensível a exposição à luz (JORGENSEN e SKIBSTED, 1991).

O extrato de cochonilha é estável ao calor até a temperatura de 100°C. Sua estabilidade ao pH se dá na faixa de 2,2 - 8,0 a temperatura de 7°C sendo que deixa de sê-lo em pH acima de 5,0 a altas temperaturas. Além disto não é influenciado pela atividade de água de substratos. Sua estabilidade à luz não é muito boa em pH 5,0 e temperatura de 25°C. A cor se mantém constante em geléias armazenadas por 90 dias a temperaturas de 14° e 25°C (KEARSLEY e KATSABOXAKIS, 1980).

O extrato de cochonilha varia do laranja ao vermelho dependendo do pH. Possui boa estabilidade a luz e oxidação mas pequena ao pH e ataques microbiológicos. Desta forma é freqüentemente preservado com benzoato de sódio (MARMION, 1991).

O carmim é completamente estável à luz, muito estável ao calor e a presença de agentes oxidantes. Tolerância a presença de agentes redutores como o sulfito em níveis superiores a 150 ppm (SIDE, 1987).

O carmim é vermelho até pH 5 se tornando rosa em valores de pH mais altos. A estabilidade a luz e calor é extremamente boa. (CHRISTIAN HANSEN'S, 1995). Possui boa estabilidade à luz e oxidação e pouca estabilidade a mudanças de pH e ataques microbiológicos (MARMION, 1980)

Sucos de cactus reproduzidos usando métodos convencionais com a adição de carmim foram expostos a luz solar e a estabilidade da cor foi estudada. As amostras de suco contendo ágar, pectina e gelatina como espessantes apresentaram mudanças de cor em 1 - 2 dias. Em amostras contendo vitamina C, mas sem espessantes, a cor se manteve de 3 - 5 dias. Em soluções aquosas o corante não mudou de tonalidade em um mês de exposição à luz solar. Estes resultados demonstram que os vários componentes do suco agem em conjunto com a luz solar. Para estudar a proteção à cor foi adicionado ao suco 1% de mel, 0,5% hidronitrito de sódio, 0,2% metafosfato de sódio, 0,5% ciclodextrina, 0,0025 - 0,05% EDTA; 0,0025% EDTA mais 0,2% metafosfato de sódio ou 0,0025% EDTA mais 0,5% ciclodextrina. A cor se alterou em um dia em sucos com mel e levou de 6 - 45 dias nos sucos contendo EDTA (0,0025 - 0,05%). Em sucos com 0,0025% EDTA mais espessantes a cor durou até 10 - 20 dias. Daí se concluiu que o EDTA é um protetor de cor eficiente em sucos de cactus (MA et al., 1994).

Carmim foi encapsulado para fabricação de corante natural com uma alta força tintorial. Desta forma, o pó encapsulado apresentou grande solubilidade e aumento de estabilidade em relação ao pó comum. O pó encapsulado pode ser utilizado em grande número de aplicações incluindo bebidas (sucos de frutas e refrigerantes) nas quais se pretende a tonalidade de cores abrangidas pelo carmim (DIDRIKSEN, 1995).

### 2.3.1.6 - Toxicidade

Estudos realizados por GRANT, GAUNT e CARPANINI (1987) com ratas grávidas demonstram que não houve efeito sobre o desenvolvimento do embrião em mães alimentadas com doses orais acima de 1000 mg carmim/ kg peso corpóreo/ dia durante a gravidez.

Outros estudos realizados por GRANT e GAUNT (1987) em ratos de ambos os sexos por três gerações demonstram que não há efeitos adversos quando administradas doses iguais ou menores a 500 mg carmim/ kg peso corpóreo/ dia no crescimento e fertilidade de ratos adultos ou no desenvolvimento pré e pós natal da cria quando tratada durante o acasalamento, gestação, lactação e vida adulta de três gerações sucessivas.

Segundo FORD et al. (1987) não há efeitos adversos ou incidência de tumores em ratos tratados com carmim por 109 semanas. Concluiu-se que o carmim quando administrado em doses diárias de até 500 mg/ kg peso corpóreo não é carcinogênico e não apresenta outros efeitos indesejáveis.

Foi relatado por KAEGI et al. (1994) apenas um caso de choque anafilático em presença de carmim. O caso se deu com uma paciente após consumir Campari. A mesma paciente apresentou sintomas parecidos em relação a cosméticos contendo carmim. Testes demonstraram que a paciente produziu anticorpos IgE específicos ao carmim.

A atividade genotóxica potencial do ácido carmínico foi avaliada em alguns testes rápidos "in vitro in vivo": mutação reversa de *Salmonella*, aberrações cromossômicas e mudanças cromátidas irmãs "in vitro" em células do ovário de "hamsters" chineses, e teste micronúcleo em camundongos. Todos os estudos deram resultados negativos. Os valores obtidos suportam



fortemente a atividade não-mutagênica e não-carcinogênica do composto. Valores genotóxicos previamente obtidos para ácido carmínico, referentes a indução de séries de outros pontos genéticos em diferentes sistemas de testes foram considerados e descobriu-se que não há atividade carcinogênica em preparações de extrato de cochonilha contendo 29,8% de ácido carmínico (LOPRIENO et al., 1992).

Um estudo realizado por MAITANI et al. (1994) demonstrou que produtos acondicionados em latas de alumínio devem ser melhor estudados quando da adição de corantes carmim pois o nível de alumínio pode aumentar bastante e se tornar prejudicial à saúde. Assim, cerejas enlatadas sem adição de carmim apresentam 0,1 - 0,4 mg/ g alumínio enquanto cerejas coloridas com carmim possuem de 1,0 - 4,0 mg/ g alumínio.

KAWASAKI et al. (1994) realizaram testes de toxidez durante treze semanas em ratos de cinco semanas que foram alimentados com vários níveis de extrato de cochonilha e sulfato duplo de alumínio e potássio (0,75% de cada (1,5% do total da dieta), 1,5% de cada (3% do total da dieta), 3% somente extrato de cochonilha ou 3% sulfato de alumínio e potássio). Não foram observados sintomas de toxidez e não ocorreu nenhuma morte em nenhum grupo. Após as treze semanas, os níveis de fosfolipídeos, triglicérides e o total de colesterol diminuíram nos machos e triglicérides diminuiu nas fêmeas das dietas contendo 3% de extrato de cochonilha, 3% de sulfato duplo de alumínio e potássio ou 3% da mistura dos dois. Simultaneamente a administração das duas substâncias inicialmente aumentou a glutamato desidrogenase. Não foram observados efeitos histopatológicos.

Estudos realizados por MORI et al. (1991) com ratos B6C3F1 demonstraram que o extrato de cochonilha quando administrado por dois anos ao nível de 0,3% ou 6% da dieta não apresenta diferença significativa, em relação aos três grupos, no desenvolvimento de tumores. Estes resultados se mostraram

consistentes com ensaios realizados "in vitro" com o extrato de cochonilha e o ácido carmínico.

### 2.3.1.7 - Obtenção do Carmim

Devido a delicadeza da técnica de fabricação existem diferenças nas tonalidades dos carmins comerciais de marcas e mesmo diferentes lotes da mesma marca (MOTTIER, 1974). Apesar do procedimento comercial ser um segredo mantido desde a antiguidade, muitas fórmulas de preparação foram publicadas. Estas fórmulas possuem algumas fases em comum e características específicas.

Os processos mais simples como MOTTIER (1974), Thorpe (GIBAJA e ALDANA, 1977 apud MORENO, 1985) e CHRISTIAN HANSEN (1995) possuem as fases de extração do ácido carmínico seguido de decantação e filtração, formação da laca alumínica-cálcica e secagem para a obtenção de pó ou diluição em meio álcali para obtenção do corante líquido.

Algumas técnicas incluem um pré-tratamento (MORENO, 1985 e ESPINOZA, s.d.) para a extração de ceras do inseto antes da fase de moagem.

A fase de extração do ácido carmínico de alguns processos incluem reagentes como solução de citrato de sódio - processo Carré (MORENO, 1985), carbonato de sódio - processo Inglês (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989), carbonato de potássio ou sódio - processo Muspratt (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989), soda - processo Napier (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989), álcool (MORENO, 1985).

Alguns processos incluem uma fase de clarificação do extrato: processo Carré (MORENO, 1985) utiliza negro animal ou carbono ativado, processo

Inglês (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989) utiliza colapiz ou albumina ou, ainda, clara de ovo diretamente.

A maioria dos processos utiliza-se de sulfato duplo de alumínio e potássio como sal de precipitação, no entanto, há exceções: processo Cenette (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989) utiliza nitrato de potássio e tetraoxalato de potássio, processo Chino (MORENO, 1985) utiliza, além do  $KAl(SO_4)_2$ , cloreto de estanho em solução de ácido nítrico e clorídrico, processo Francês (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989) utiliza, além de  $KAl(SO_4)_2$ , tartarato ácido de potássio, processo Muspratt (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989) utiliza-se de uma mistura de bitartarato de potássio e  $KAl(SO_4)_2$ , processo MORENO (1985) utiliza-se, além de  $KAl(SO_4)_2$ , de acetato de cálcio, processo Napier (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989) utiliza-se, além de  $KAl(SO_4)_2$ , cremor tártaro e clara de ovo ou colapiz.

As formas de secagem variam entre estufas, secador de silicagel, cristalizadores planos de vidro e exposição a luz.

Abaixo estão descritos, resumidamente, estes processos.

#### Processo MOTTIER, 1974:

O carmim é obtido pela extração de ácido carmínico da cochonilha em meio aquecido ácido ou básico. Os resíduos da cochonilha são retirados através de decantação e filtração. Após a purificação é formada a laca alumínica-cálcica que é secada para formar o pó. As soluções alcalinas do carmim após atomizadas tornam-se solúveis em água diretamente.

### Processo Alemão: (MORENO, 1985)

Consiste em submeter a ebulição 50g de cochonilha em pó com 3 litros de água destilada, durante 15 minutos e filtrar a solução. Adicionar 8g de sulfato duplo de alumínio e potássio a solução filtrada e aquecer até ebulição durante 15 minutos. Deixar em repouso por duas horas e então filtrar. O precipitado se separa e lava com água destilada fria. Deixa-se em estufa a 35-40°C durante 15 minutos, continua-se a secagem em um secador de silicagel por 48 horas (CASSANO, 1962, ALCABES, 1970 e por GIBAJA e ALDANA, 1977).

Variações citadas em FALCONE, 1989 se dão na quantidade de matéria prima e reagentes e tempos de ebulição e repouso.

### Processo Carré: (MORENO, 1985)

Preparar uma solução de citrato de sódio adicionando 25g de carbonato de sódio a 22,5 g de ácido cítrico com 3 litros de água. Deixar em ebulição por 15 minutos e agregar 80 g de cochonilha em pó, agitando constantemente. Deixar em repouso durante uma hora e filtrar. Ao licor adiciona-se 3 g de negro animal para clarificá-lo. Depois de 10 minutos de repouso adiciona-se 25 g de sulfato duplo de alumínio e potássio e deixa a ebulição por 5 minutos. Coloca-se a solução para repousar por duas horas e por último separa-se a laca por filtração. Lava-se o precipitado com água destilada e deixa secar no escuro (CASSANO, 1962).

ALCABES citado pelo mesmo autor faz algumas alterações neste processo em relação a quantidades utilizadas de matéria prima e reagentes, tempos de ebulição e repouso e utiliza-se de carbono ativado para a clarificação.

#### Processo Cenette: (MORENO, 1985)

Consiste em ebulir 10 g de cochonilha durante 15 minutos com meio litro de água. Agrega-se 0,25 g de nitrato de potássio e deixa em ebulição por mais 5 minutos. Adiciona-se 0,3 de tetraoxalato de potássio e ferve por mais 5 minutos. Deixa repousar por uma hora e se separa o licor da polpa decantada. A laca obtida é seca em cristalizadores planos de vidro de onde se deixa evaporar por uma semana em exposição a luz e por último se seca no escuro (CASSANO, 1962, ALCABES, 1970 e GIBAJA e ALDANA, 1977).

FALCONE, 1989 menciona variações no método em função das quantidades utilizadas e os tempos de repouso e ebulição. Além disto não há a etapa de adição de nitrato de potássio.

#### Processo Chino: (MORENO, 1985)

Realiza-se a ebulição de 50g de cochonilha com 1,5 litros de água durante 10 minutos. Agrega-se 0,5 g de sulfato duplo de alumínio e potássio e se filtra. A parte clara ainda quente adiciona-se gota a gota uma solução de cloreto de estanho em solução de ácidos nítrico e clorídrico, até que todo o carmim se precipite. Filtra-se a solução para separar o carmim e o seca em um cristalizador plano ( CASSANO, 1962).

#### Processo Francês: (MORENO, 1985)

Submete-se 50 g de cochonilha em pó com 3 litros de água destilada durante 15 minutos. Adiciona-se 2 g de tartarato ácido de potássio e torna a ebulir por mais 5 minutos. Adiciona-se 5 g de sulfato duplo de alumínio e potássio e deixa ebulir por mais 10 minutos. Repousa por duas horas e filtra. Separa-se o precipitado, lava-se com água destilada e seca em estufa a 35-40°C (CASSANO, 1962, ALCABES, 1970 e GIBAJA e ALDANA, 1977).

FALCONE, 1989 menciona variações de quantidades de reagentes e tempos de ebulição para este método.

Processo Inglês: (MORENO, 1985)

Ebulir 50g de cochonilha com 2 g de carbonato de sódio em 3 litros de água durante 15 minutos. Adicionar 5 g de sulfato duplo de alumínio e potássio, agitar e ebulir durante 15 minutos. Decantar e clarificar a laca com 1 g de colapiz. Aquece-se novamente agitando e deixa em repouso por meia hora. A laca se separa por decantação e seca-se no escuro (CASSANO, 1962 e ALCABES, 1970).

FALCONE, 1989 cita variações em termos de quantidades de reagentes e tempos de ebulição e repouso. Além de mencionar como agente clarificador albumina ou clara de ovo diretamente.

Processo Muspratt: (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989)

Processo desenvolvido por MUSPRATT em 1860 e mencionado por MELOAN et al., 1971. O carmim é preparado por ebulição da cochonilha com carbonato de potássio ou carbonato de sódio e precipitado com um ácido fraco ou sal ácido (às vezes bioxalato de potássio ou uma mistura de bitartarato de potássio e sulfato duplo de alumínio e potássio). Ocasionalmente a precipitação é acelerada pela adição de gelatina ou albumina.

Processo Napier: (MORENO, 1985 e FALCONE, 1989)

Descrito por NAPIER, 1875 e citado por MELOAN et al., 1971. Ferver cochonilha com água e soda. Adicionar um pouco de sulfato duplo de

alumínio e potássio, cremor tártaro e clara de ovo ou colapiz. Separa-se o carmim como um precipitado escamoso.

#### Processo Thorpe: (MORENO, 1985)

Consiste em submeter a ebulição 50g de cochonilha em pó com 3 litros de água destilada, durante 10 minutos e filtrar a quente. A solução filtrada se adiciona 8g de sulfato duplo de alumínio e potássio e coloca-se em ebulição por 15 minutos. Deixa em repouso por 5 horas e se filtra. O precipitado é lavado com água e seco em estufa a 35-40°C ( GIBAJA e ALDANA, 1977).

#### Processo MORENO (1985):

Desenvolvido por MORENO (1985). É retirada a graxa da cochonilha e moe-se a mesma. Submete-a a uma extração alcoólica a 25% em extrator Soxhlet por 12 horas, realizando 5 trocas de solvente. Separa-se o álcool do extrato por ebulição a pressão atmosférica e filtra-se a solução. Ao extrato filtrado é adicionado acetato de cálcio e sulfato duplo de alumínio e potássio. Aquece-se a mistura por 10 minutos, esfria-se a temperatura ambiente, filtra-se retendo o carmim. Seca-se a laca em estufa a 60°C por 30 minutos.

#### Processo CHRISTIAN HANSEN (1995):

As fêmeas do inseto são inseminadas no cacto de onde se faz a coleta. Os insetos passam então por uma pré-seleção e peneiramento, ao que se segue a morte e secagem ao sol das cochonilhas. As cochonilhas dessecadas são novamente selecionadas e peneiradas tornando-se a matéria-prima para a formação da laca. Dá-se, então, a extração do ácido carmínico, formação da laca cálcica-alumínica, diluição em meio alcali (amônia ou hidróxido de potássio) para a obtenção do corante líquido.

Processo ESPINOZA et al. (s.d.):

Tendo a cochonilha como matéria-prima faz-se a extração de graxas e ceras do inseto antes do processo de moagem. Do inseto moído é extraído, a quente, o pigmento. Ocorrem, então, as fases de peneiramento, filtração ou precipitação do resíduo fino, ajuste do pH, precipitação, sedimentação, separação do sedimento, lavagem do precipitado, secagem e, finalmente, o envase do corante.

Há alguns fatores que influenciam na extração do corante (ESPINOZA et al., s.d):

- temperatura: geralmente a extração se desenvolve com maior rendimento em quantidade extraída e velocidade quanto maior a temperatura de extração. No entanto, não se pode exceder um limite permitido para não haver perdas na qualidade do produto final.
- tamanho das partículas: as partículas menores são as que possuem maior área interfacial carmim-líquido, desta forma a velocidade de transferência de massa é maior. No entanto, partículas muito finas dificultam a extração e impedem a livre circulação do líquido na filtração.
- agitação: a agitação aumenta a difusão e conseqüentemente a concentração de carmim.
- solvente: o solvente não deve ser tóxico e sua viscosidade deve ser baixa a fim de facilitar a extração.
- tempo de extração: o tempo deve ser suficiente para que os sólidos possam se difundir no solvente.



- secagem: a secagem tem como finalidade o aumento do tempo de armazenamento e transporte.

#### **2.4 - Produtos e Aplicações**

Comercialmente existem três produtos (ESPINOZA et al., s.d.):

A) ácido carmínico - pigmento extraído da cochonilha fresca ou seca. Utilizado como indicador da digestibilidade dos animais, para tingir tecidos, como indicador em análises volumétricas (titulação de álcalis, ácidos inorgânicos e alcalóides), como corante alimentício, possui valor medicinal e é utilizado na obtenção de pós dentríficos de várias cores.

B) Extrato de cochonilha - é a solução aquosa do pigmento. Utilizado em indústria de alimentos e farmacêutica.

C) Carmim - é a laca do corante - complexação do ác. carmínico extraído da cochonilha com metais, em especial o alumínio. Utilizado em alimentos como bebidas, sorvetes, iogurtes, recheio de biscoitos, cerejas em calda, balas, embutidos cárneos, massas com vegetais, bebidas lácteas em pó, xarope de frutas entre outros.

O carmim é comercializado sob duas formas: líquido em solução alcalina ou pó em dispersão com uma mistura de sal de nitrato, açúcar, ácido ascórbico ou seus sais (MOTTIER, 1974).

Todos os produtos têm coloração na faixa do vermelho. Sua principal diferença é o teor de pigmento, sendo a laca bastante estável.

## **2.5 - Legislação**

É considerado “corante natural” o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal (Decreto nº 55.871/ 65). A Comissão Nacional de Normas Técnicas e Padrões para Alimentos (C.N.N.P.A.) em seu Anexo II estabelece a cochonilha e o ácido carmínico como corantes orgânicos naturais (C.I), o Anexo III, estabelece ainda o carmim como corante natural (Decreto - lei nº 986/ 69).

É permitido o uso do carmim em alimentos processados a base de cereais, “bitters” e aperitivos, balas, caramelos e similares, batidas, cerejas em calda, cobertura e pós para a cobertura de bolos, coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas, “cooler” , creme vegetal, gelados comestíveis, gomas de mascar, gorduras e compostos gordurosos, iogurtes aromatizados, leites aromatizados, leites gelificados aromatizados e licores. Em todos estes alimentos não existe limite máximo permitido. Em geléias o limite máximo permitido é 0,02g/ 100g (Resolução 44/ 77).

Internacionalmente o carmim é rotulado com o número 120 (CODEX ALIMENTARIUS, 1992).

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Materiais**

##### **3.1.1 - Matéria-prima**

a) A matéria-prima utilizada neste estudo foi a cochonilha dessecada proveniente do Peru e adquirida em São Paulo através da empresa Adicon Indústria e Comércio de Aditivos Ltda. em fevereiro de 1995. A mesma foi moída em moinho de facas e peneirada. O pó obtido foi armazenado ao abrigo da luz em temperatura de geladeira para uso ao longo do experimento.

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

##### **3.1.2 - Reagentes**

Todos os reagentes e solventes foram utilizados de acordo com a especificação exigida pelas análises.

#### **3.2 - Métodos**

##### **3.2.1 - Análise da matéria-prima**

###### **a) Umidade**

O método utilizado foi descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). Consiste na secagem em estufa à vácuo até peso constante à temperatura de 70°C.

## b) Matéria graxa

Foi utilizado o método de Stold-Weibull (DIEMAIR, 1963) onde as substâncias diferentes de graxas e ceras são destruídas com ácido clorídrico e a matéria graxa resultante é solubilizada em éter etílico e extraída em extrator Soxhlet.

## c) Cinzas

Baseado no método descrito por HORWITZ (1975), que mede a perda decorrente da incineração da amostra em mufla a 525°C.

## d) Proteína

Utilizou-se do método de Kjeldahl (HORWITZ, 1960) baseado na combustão líquida por ebulição com ácido sulfúrico concentrado convertendo o conteúdo de nitrogênio da amostra em sulfato de amônio concentrado para liberar o amoníaco que é titulado com ácido clorídrico 0,02 N.

## e) Ácido Carnínico

Quantificação feita através de método descrito por LARA e TAKAHASHI (1994). A leitura da absorbância se dá no comprimento de onda de 494 nm.

### 3.2.2 - *Planejamento Experimental*

#### 3.2.2.1 - Estudo dos sais

Neste estudo foram comparados cinco sais de alumínio para a obtenção do pó de carmim. Estes sais foram escolhidos de acordo com sua habilidade de formar lacas e o grau de solubilidade em água (Tabela 5) que é o solvente

utilizado para a extração do ácido carmínico. Os sais utilizados foram: sulfato duplo de alumínio e sódio ( $\text{AlNaO}_2$ ), cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de alumínio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ), sulfato duplo de alumínio e amônia ( $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato duplo de alumínio e potássio ( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ).

Tabela 5 - Solubilidade dos sais de alumínio estudados

	Solubilidade	PM
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	1 parte de água	342,1
$\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g/ 20 ml água fria	453,3
$\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1 g/ 0,9 ml água	241,4
$\text{NaAlO}_2$	muito solúvel	81,97
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	1 g/ 7,2 ml água fria	474,4

Fonte: MERCK INDEX (1983)

Constatou-se através de testes preliminares a existência de vários fatores que influenciavam o processo de formação da laca, a cor resultante e o rendimento de obtenção do corante. A fim de se estudar esses três resultados, considerando-se todos os fatores de influência, utilizou-se a quimiometria de forma a se direcionar o trabalho e poder se analisar os dados obtidos.

Para o estudo de parâmetros e suas influências no processo de obtenção do corante fez-se uma avaliação inicial dos mesmos para cada sal de alumínio seguindo um planejamento fatorial incompleto, segundo BOX e HUNTER (1978), do tipo  $2^{6-3}$  descrito nas Tabelas 6 e 7. Cada parâmetro foi trabalhado em dois níveis.

Optou-se pelo delineamento fracionado em virtude do grande número de fatores e sais de alumínio que demandariam grande quantidade de matéria-prima.

Tabela 6 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial  $2^{6-3}$ 

Fatores		Níveis	
		(-)	(+)
pH de extração		3,5	6
tempo de extração		15 minutos	45 minutos
pH de precipitação		3,5	6
tempo de precipitação		30 minutos	60 minutos
concentra- ção de alumínio	$AlNaO_2$	0,032 g	0,095 g
	$AlCl_3$	0,10 g	0,30 g
	$Al_2(SO_4)_3$	0,14 g	0,42 g
	$AlNH(SO_4)_2$	0,18 g	0,55 g
	$KAl(SO_4)_2$	0,19 g	0,57 g
concentração de cálcio		0,063 g	0,19 g

Tabela 7 - Planejamento fatorial fracional  $2^{6-3}$  - avaliação inicial

ensaio	t*	Fatores					
		pH extração	tempo extração	pH precipitação	tempo precipitação	concentração alumínio	concentra- ção cálcio
1	I	-	-	-	+	+	+
2	a	+	-	-	-	-	+
3	b	-	+	-	-	+	-
4	ab	+	+	-	+	-	-
5	c	-	-	+	+	-	-
6	ac	+	-	+	-	+	-
7	bc	-	+	+	-	-	+
8	abc	+	+	+	+	+	+

\*t: tratamento

Estes ensaios foram randomizados para garantir a análise estatística dos dados.

A extração do pigmento e obtenção da laca utilizados neste estudo seguiram o seguinte procedimento: utilizou-se aproximadamente 5 g de cochonilha moída e peneirada adicionada a 600 ml de uma solução aquosa com pH corrigido de acordo com as Tabelas 6 e 7. A solução foi aquecida e mantida em ebulição durante o tempo de estudo. Após o resfriamento e filtração à vácuo, o líquido resultante teve seu pH corrigido de acordo com o determinado nas Tabelas 6 e 7 como pH de precipitação. Os reagentes foram adicionados nas quantidades descritas no estudo e a solução foi novamente aquecida e mantida à ebulição pelo tempo de estudo. A solução foi resfriada e decantada até completa precipitação da matéria corante. O material precipitado foi separado do líquido através de filtração à vácuo. O corante retido no papel de filtro (Whatman nº 42) foi seco em estufa à vácuo em temperatura próxima a 70°C. O material resultante foi pesado, moído em almofariz e o teor de ácido carmínico e a massa de corante foram determinados.

#### 3.2.2.2 - Estudo da cor do carmim em pó

Para o estudo da cor realizou-se um planejamento fatorial completo  $2^2$ , segundo BARROS NETO et al. (1995), com a utilização de apenas um sal de alumínio. Para este estudo fez-se uma nova extração onde os únicos fatores estudados foram as concentrações dos sais de alumínio e cálcio.

A extração do pigmento e obtenção da laca para efeitos de estudos da cor seguiram o seguinte procedimento: utilizou-se aproximadamente 5 g de cochonilha moída e peneirada adicionada a 600 ml de uma solução aquosa com pH corrigido para 3,5. A solução foi aquecida e mantida em ebulição durante 30 minutos. Após o resfriamento e filtração à vácuo, o líquido

resultante teve seu pH corrigido para 6. Os reagentes foram adicionados nas quantidades descritas nas Tabelas 8 e 9 e a solução foi novamente aquecida e mantida à ebulição por 30 minutos. A solução foi resfriada e decantada até completa precipitação da matéria corante. O material precipitado foi separado do líquido através de filtração à vácuo. O corante retido no papel de filtro (Whatman nº 42) foi seco em estufa à vácuo em temperatura próxima a 70°C. O material resultante foi pesado, moído em almofariz e o teor de ácido carmínico e a massa de corante foram determinados.

Tabela 8 - Planejamento fatorial  $2^2$  utilizado para estudo da cor

	concentração Al	concentração Ca
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	+	-
<b>3</b>	-	+
<b>4</b>	+	+

Tabela 9 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial  $2^2$

	(-)	(+)
<b>concentração Al</b>	0,14 (50% da relação estequiométrica)	0,28 (relação estequiométrica)
<b>concentração Ca</b>	0,063 (50% da relação estequiométrica)	0,19 (150% da relação estequiométrica)



### 3.2.2.3 - Estudo do processo de extração de ácido carmínico do carmim em pó

Para determinação do pH de extração utilizou-se um planejamento fatorial  $2^4$  onde fixou-se as concentrações dos sais e foram alterados os outros quatro parâmetros.

A extração do pigmento e obtenção da laca utilizados neste estudo seguiram o seguinte procedimento: utilizou-se aproximadamente 5 g de cochonilha moída e peneirada adicionada a 600 ml de uma solução aquosa com pH corrigido para 3,5 ou não ajustado (aproximadamente 4,5) de acordo com as Tabelas 10 e 11. A solução foi aquecida e mantida em ebulição durante o tempo de estudo. Após o resfriamento e filtração à vácuo, o líquido resultante teve seu pH corrigido de acordo com as Tabelas 10 e 11. Os reagentes foram adicionados nas seguintes quantidades: sal de alumínio 0,14 g (50% da relação estequiométrica) e sal de cálcio 0,13 g (relação estequiométrica). A solução foi novamente aquecida e mantida à ebulição pelo tempo de estudo. A solução foi resfriada e decantada até completa precipitação da matéria corante. O material precipitado foi separado do líquido através de filtração à vácuo. O corante retido no papel de filtro (Whatman nº 42) foi seco em estufa à vácuo em temperatura próxima a 70°C. O material resultante foi pesado, moído em almofariz e o teor de ácido carmínico e a massa de corante foram determinados.

Tabela 10 - Nível dos fatores utilizados no planejamento  $2^4$

	(-)	(+)
<b>pH extração</b>	3,5	sem ajuste (4,5)
<b>tempo extração</b>	15 minutos	45 minutos
<b>pH precipitação</b>	4,0	6,0
<b>tempo precipitação</b>	30 minutos	60 minutos

Tabela 11 - Planejamento Fatorial 2<sup>4</sup> utilizado no estudo do pH de extração

ensaios	pH extração	tempo extração	pH precipitação	tempo precipitação
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

### 3.2.3 - Identificação do Pigmento no Corante em Pó

O ácido carmínico foi identificado através da comparação do espectro de varredura na região do visível do carmim em pó obtido e do padrão comercial utilizado, além de espectros de literatura.

### *3.2.4 - Obtenção do Corante Líquido*

O corante líquido foi obtido através da solubilização do pó em amônia diluída, na proporção de 6:3:91 de amônia: corante em pó: água.

O teor de carmim utilizado no corante líquido foi de 2,3% para a solução desenvolvida neste trabalho e 3,0% para a solução padrão. Desta forma obteve-se uma concentração final de ácido carmínico de 1,3% nas duas soluções que corresponde a um dos padrões comerciais para carmim líquido (CHRISTIAN HANSEN'S, 1995).

A solução básica de corante desenvolvida neste trabalho será chamada de corante laboratório e a solução preparada com o carmim comercial será mencionada como corante comercial de agora em diante.

### *3.2.5 - Identificação do Pigmento no Corante Líquido*

O corante solúvel (líquido) em água teve seu pigmento identificado através do espectro de varredura na região do visível e comparado com o padrão comercial.

### *3.2.6 - Estabilidade da laca*

A variação da absorbância em função do tempo de reação, foi o parâmetro usado para medir a estabilidade do carmim.

A partir da variação da absorbância das soluções quantificou-se a variação, em função do tempo de reação, do teor de ácido carmínico no carmim. A absorbância foi lida a 518 nm, utilizando espectrofotômetro. Foi usada amônia diluída como branco.

### 3.2.6.1 - Efeito da luz

Foi preparada uma solução aquosa com tampão de McIlvaine (ANEXO A) a fim de conservar pH 7 durante todo o experimento. A solução recebeu 0,05% de solução de benzoato de sódio a 5% para evitar crescimento de fungos. O estudo se deu a temperatura aproximada de 25°C.

A esta solução foram adicionados os corantes laboratório e comercial líquidos na proporção 0,8 ml por 100 ml de solução.

Após a leitura inicial da absorbância (tempo zero), as soluções foram distribuídas (8 ml) em tubos de 35 ml com tampa rosqueada. Do total de tubos, metade foi estocado no escuro e a outra metade exposta a uma lâmpada fluorescente de 15 W, colocada a 30 cm dos tubos. A lâmpada forneceu luminosidade de 1200 lux, que segundo CREDER (1966) corresponde a um nível padrão de iluminação de exposição de destaque em lojas.

Os tubos permaneceram inclinados em relação à fonte de luz, tiveram suas posições trocadas em intervalos determinados e foram protegidos de qualquer outra fonte de luz.

Foram retiradas amostras, em duplicata, para leitura de absorbância nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

### 3.2.6.2 - Efeito da temperatura

Para este estudo foram utilizadas soluções contendo 0,4 ml do corante líquido laboratório e comercial diluídos em água destilada até completar 100 ml.

Os testes foram realizados a 25, 50, 75 e 100°C. As temperaturas foram obtidas em banho de água termostaticado.

Tubos âmbar de 15 ml de capacidade, com tampa rosqueada, receberam adição de solução aquosa com concentração conhecida, foram fechados fortemente para evitar evaporação e perda de líquido.

Após a leitura da absorbância inicial (tempo zero), 14 tubos contendo solução de carmim foram colocados em banho a 25°C e protegidos da luz.

Os tubos foram retirados do banho, em duplicata, nos tempos de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos e colocados em banho de gelo. Foram feitas as leituras de absorbância. O mesmo procedimento foi repetido nas temperaturas de 50, 75 e 100°C. Todos os procedimentos descritos foram realizados para as soluções de carmim comercial e laboratório.

#### 3.2.6.3 - Efeito do pH

Foram preparadas diversas soluções aquosas de pHs conhecidos na faixa de 2,3 a 7,8 utilizando-se tampão de McIlvaine - fosfato dissódico/ ácido cítrico (ANEXO A)

As soluções receberam, ainda, adição de 0,05% de solução de benzoato de sódio a 5% para evitar o crescimento de fungos.

Tubos de 35 ml de capacidade, com tampa rosqueada receberam adição de 7 ml de solução aquosa com concentração conhecida e foram fechados fortemente para evitar evaporação e perda de líquido.

Na preparação das soluções de carmim laboratório 0,4 ml do corante líquido obtido neste experimento foram misturados com 100 ml de solução tampão

até pH 2,31. O mesmo procedimento foi realizado na obtenção de soluções com pH 3,20; 4,00; 5,03; 6,19; 7,19 e 7,88. Após repouso de uma hora foram realizadas as leituras de absorbância das soluções (tempo zero). Doze tubos contendo soluções de carmim, nos diversos pHs, foram estocadas a 7°C. Foram retiradas amostras, em duplicata, para leitura de absorbância nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

Na preparação das soluções de carmim comercial estocadas a 7°C, 0,4 ml do corante líquido foi misturado com 100 ml de solução tampão até pH 2,55. O mesmo procedimento foi realizado na obtenção de soluções com pH 3,30; 4,26; 5,19; 6,09; 7,03 e 7,85.

#### 3.2.6.4 - Efeito de matrix alimentícia

O carmim líquido obtido com o pó desenvolvido no laboratório e com o carmim comercial (item 3.2.4) após serem filtrados de maneira asséptica em membranas microporo foram diluídos em leite integral homogeneizado esterilizado adquirido no comércio local na proporção de 4,5 ml de corante para 5 litros de leite.

As soluções foram distribuídas em frascos de vidro transparente de 200 ml com tampão esterilizados em autoclave. Os tubos foram estocados à temperatura de aproximadamente 25°C expostos indiretamente à luz natural. Todos os procedimentos foram efetuados assepticamente a fim de garantir a esterilidade do método.

Foram retirados amostras, em triplicata, para leitura em espectrofotômetro nos tempos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias.

As leituras de cor por reflexão foram feitas por meio do espectrofotômetro Comcor 1500 Plus, ângulo de observação de 10°, iluminante C e sistema de

cor  $L^*a^*b^*$  CIE (configuração DREOL). Foi comprovada a opacidade das amostras (FERREIRA e MAEDA, 1984).

O espectrofotômetro utiliza uma cápsula de fundo de vidro óptico munida de um adaptador de fundo branco ( $L^* = 90,67$ ;  $a^* = -1,1$  e  $b^* = 5,40$ ) que tem a finalidade de refletir a luz transmitida até um fotodetector.

### 3.2.6.5 - Análise estatística

As variações de concentração de ácido carmínico em soluções de carmim, em função do tempo de reação, obtidas conforme apresentado nos itens 3.2.6.1, 3.2.6.2 e 3.2.6.3 foram submetidos à análise de variância.

Estudou-se a relação funcional entre o tempo de tratamento e o teor de ácido carmínico e confrontaram-se os coeficientes angulares das retas de regressão linear pelo teste de Tukey, ao nível de erro de 5%.

### 3.2.6.6 - Cálculo das constantes de velocidade de reação (K) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ )

A partir das variações de concentração de ácido carmínico em carmim, função do tempo de reação, obtidas dos resultados apresentados nos itens 3.2.6.1, 3.2.6.2 e 3.2.6.3 foram calculados os valores das constantes de velocidades das reações (K).

Os valores de K foram determinados utilizando-se a equação 1, para cinética de 1ª ordem, conforme TEIXEIRA NETO et al. (1993).

$$- \ln C / C_0 = K t \quad (\text{equação 1})$$

onde:

C: concentração final de ácido carmínico  
Co: concentração inicial de ácido carmínico  
t: tempo de reação

Do gráfico -  $\ln C$  em função do tempo de reação obtém-se uma reta cuja inclinação representa a constante de velocidade da reação.

Também foram calculados os tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) através da equação 2.

$$t_{1/2} = \ln 2 / K \quad (\text{equação 2})$$



## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Material Utilizado

A cochonilha, obtida de acordo com o item 3.1.1, utilizada neste trabalho apresentou as características físicas representadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Composição centesimal (%) da cochonilha utilizada neste estudo

ácido carmínico	umidade	lípidos	proteína	cinzas	carboidratos
15,86 ± 0,21	8,88 ± 0,11	5,06 ± 0,11	50,09 ± 0,35	4,56 ± 0,13	31,41

\*Resultados obtidos em base seca

\*\* Média de três repetições

Segundo ESPINOZA et al. (s.d.) esta matéria-prima classifica-se como de primeira qualidade, exceptuando o teor de ácido carmínico que deveria ser de no mínimo 18%. No entanto, há discussão sobre os valores citados para concentração de ácido carmínico, uma vez que a literatura não cita o método de determinação do mesmo nem tampouco a base de leitura.

### 4.2 - Características Físicas do Carmim em Pó

Os resultados obtidos (Tabela 13) estão de acordo com as especificações da legislação brasileira.

Tabela 13 - Caracterização física dos carmins laboratório e comercial

	% proteína	% umidade	% ácido carmínico
carmim laboratório	21,18 ± 0,04	6,74 ± 0,42	57,35 ± 3,73
carmim comercial	17,57 ± 0,61	5,30 ± 0,10	44,25 ± 0,45

O teor de ácido carmínico conseguido é bastante elevado se comparado com o mínimo exigido pela legislação e o apresentado pelo corante comercial. Isto demonstra o grau de pureza do corante obtido neste estudo.

### 4.3 - Planejamento Experimental

Após os testes preliminares constatou-se que os fatores que mais poderiam contribuir para a mudança nos resultados finais eram seis: pH de extração do pigmento, tempo de extração do pigmento, pH de precipitação da laca, tempo de precipitação da laca, concentração do sal de alumínio e concentração do sal de cálcio.

O planejamento fatorial incompleto  $2^{6-3}$  forneceu os dados apresentados nas Tabelas 14 a 18.

Tabela 14 - Planejamento fatorial fracional  $2^{6-3}$  - sal:  $AlNaO_2$

en- saio	t	Fatores*						% AC**	$\eta$ ***
		1	2	3	4	5	6		
1	l	-	-	-	+	+	+	55,64	57,79
2	a	+	-	-	-	-	+	55,91	37,07
3	b	-	+	-	-	+	-	51,87	44,06
4	ab	+	+	-	+	-	-	54,42	29,73
5	c	-	-	+	+	-	-	53,26	7,23
6	ac	+	-	+	-	+	-	-	-
7	bc	-	+	+	-	-	+	56,35	63,71
8	abc	+	+	+	+	+	+	50,53	22,55

Tabela 15 - Planejamento fatorial fracional  $2^{6-3}$  - sal:  $AlCl_3$ 

en- saio	t	Fatores*						% AC**	$\eta$ ***
		1	2	3	4	5	6		
1	l	-	-	-	+	+	+	54,53	41,95
2	a	+	-	-	-	-	+	57,81	18,76
3	b	-	+	-	-	+	-	54,63	18,55
4	ab	+	+	-	+	-	-	56,73	6,37
5	c	-	-	+	+	-	-	54,79	39,80
6	ac	+	-	+	-	+	-	59,65	6,37
7	bc	-	+	+	-	-	+	53,55	42,14
8	abc	+	+	+	+	+	+	70,14	10,90

Tabela 16 - Planejamento fatorial fracional  $2^{6-3}$  - sal:  $Al_2(SO_4)_3$ 

en- saio	t	Fatores*						% AC**	$\eta$ ***
		1	2	3	4	5	6		
1	l	-	-	-	+	+	+	56,32	37,63
2	a	+	-	-	-	-	+	52,15	15,80
3	b	-	+	-	-	+	-	56,80	48,99
4	ab	+	+	-	+	-	-	69,13	45,14
5	c	-	-	+	+	-	-	54,78	44,35
6	ac	+	-	+	-	+	-	56,64	38,59
7	bc	-	+	+	-	-	+	54,93	43,24
8	abc	+	+	+	+	+	+	61,48	66,49

Tabela 17 - Planejamento fatorial fracional  $2^{6-3}$  - sal:  $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 

en- saio	t	Fatores*						% AC**	$\eta$ ***
		1	2	3	4	5	6		
1	l	-	-	-	+	+	+	58,51	37,88
2	a	+	-	-	-	-	+	-	-
3	b	-	+	-	-	+	-	58,47	26,42
4	ab	+	+	-	+	-	-	48,78	14,49
5	c	-	-	+	+	-	-	55,91	41,12
6	ac	+	-	+	-	+	-	59,11	28,26
7	bc	-	+	+	-	-	+	57,45	37,81
8	abc	+	+	+	+	+	+	57,30	61,28

Tabela 18 - Planejamento fatorial fracional  $2^{6-3}$  - sal:  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 

en- saio	t	Fatores*						% AC**	$\eta$ ***
		1	2	3	4	5	6		
1	l	-	-	-	+	+	+	55,44	42,23
2	a	+	-	-	-	-	+	-	-
3	b	-	+	-	-	+	-	55,61	38,36
4	ab	+	+	-	+	-	-	55,38	26,24
5	c	-	-	+	+	-	-	54,77	42,63
6	ac	+	-	+	-	+	-	55,88	38,38
7	bc	-	+	+	-	-	+	52,23	46,82
8	abc	+	+	+	+	+	+	54,53	69,95

\*Fatores - 1: pH de extração

2: tempo de extração

3: pH de precipitação

4: tempo de precipitação

5: concentração do sal de alumínio

6: concentração do sal de cálcio

\*\* teor de ácido carmínico medido em porcentagem

\*\*\* rendimento em massa de ácido carmínico medido em porcentagem

Foi feita a análise de variância dos rendimentos em peso ( $\eta$ ). Concluiu-se que não há diferença significativa entre os sais. Existe diferença significativa a nível de 5% entre os tratamentos 2 e 7 (ANEXO F). Nota-se que a diferença entre os tratamentos consiste em três fatores: pH de extração, tempo de extração e pH de precipitação. Como a média dos rendimentos do tratamento 7 é maior que a do 2 conclui-se que o pH de extração é melhor quando próximo a 3,5, o tempo de extração quando próximo a 45 minutos e o pH de precipitação próximo a 6,0.

Foi feita a análise de variância considerando a porcentagem de ácido carmínico nas lacas obtidas (ANEXO F). Não há diferença significativa entre os sais nem entre os tratamentos em relação a porcentagem de pigmento obtido em cada ensaio ao nível de 5% de significância.

Como não houve diferença significativa entre os sais optou-se por continuar o trabalho com apenas um sal. Este foi escolhido de forma aleatória como o sulfato de alumínio.

#### 4.3.1 - Estudo da cor

Através da análise da cor das amostras obtidas no estudo anterior pode-se prever os fatores de maior influência na formação da cor do carmim semelhante, visualmente, ao corante padrão (Tabela 19).

Tabela 19 - Resultados visuais obtidos para cor

ensaio	$AlNaO_2$	$AlCl_3$	$Al_2(SO_4)_3$	$AlNH_4(SO_4)_2$	$KAl(SO_4)_2$
1					
2	X	X	X		
3					
4	X				
5		X	X	X	X
6					
7		X	X	X	X
8					

onde: X - representa cor visualmente igual ao padrão comercial

Observa-se que as semelhanças entre os tratamentos 2, 4, 5 e 7 consistem na baixa concentração de sal de alumínio e na alteração do pH: quando o pH de extração é (-), o pH de precipitação é (+) e vice-versa.

Fixando-se os pH de extração em (-) e o de precipitação em (+) verificou-se se a concentração do sal de alumínio é realmente importante (Tabela 20).

Tabela 20 - Resultado de cor obtida em relação ao padrão

ensaio	concentração de Al	concentração de Ca	resultado
1	-	-	cor padrão
2	+	-	muito escuro
3	-	+	cor padrão
4	+	+	muito escuro

Assim concluiu-se que a baixa concentração de sal de alumínio é determinante para a obtenção de cor padrão. Além disto conclui-se que a concentração de sal de cálcio não tem influência sobre a cor do carmim.

#### 4.3.2 - Estudo do pH

Determinado no estudo do item (4.3.1) a concentração do sal de alumínio como (-) e visto que a concentração do sal de cálcio não influi na cor do carmim, optou-se por mantê-la dentro das relações estequiométricas.

Os ensaios de números 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 e 12 não formaram laca. Este resultado confirmou indicação da literatura - WARNER JENKINSON (1984) - de que para a formação de lacas é necessária a utilização de hidróxidos durante o processo a fim de se elevar o pH.

Os ensaios nos quais houve formação de laca foram transformados num fatorial completo  $2^3$  segundo indicação de BARROS NETO (1995) e seus resultados estão apresentados nas Tabela 21 e 22.

Tabela 21 - Resultados obtidos no fatorial  $2^3$  para rendimento em massa de ácido carmínico

ensaio	pH extração	tempo extração	tempo precipitação	$\eta^*$	Estimativa dos Efeitos
1	-	-	-	46,96	47,75
2	+	-	-	48,07	1,00
3	-	+	-	48,75	1,25
4	+	+	-	53,36	1,00
5	-	-	+	47,96	-1,00
6	+	-	+	45,27	-0,75
7	-	+	+	46,73	-0,50
8	+	+	+	49,57	0,25

\* rendimento em massa

Através da estimativa dos efeitos considerando-se o rendimento de ácido carmínico em massa e em teor nota-se que não há fator significativo. Desta forma optou-se pelo pH de extração próximo a 4,5 por ser o pH sem ajuste, ou seja, assim diminuiu-se uma etapa no processo de obtenção da laca.

Concluiu-se também que, para as condições estudadas, os tempos de extração e precipitação não têm influência direta nos teores e rendimento em massa de ácido carmínico.

Tabela 22 - Resultados obtidos no fatorial  $2^3$  para teor de ácido carmínico

ensaio	pH extração	tempo extração	tempo precipitação	% ácido carmínico	Estimativa dos Efeitos
1	-	-	-	58,71	56,63
2	+	-	-	57,05	- 0,25
3	-	+	-	57,67	0,25
4	+	+	-	58,42	1,75
5	-	-	+	57,65	- 1,75
6	+	-	+	54,38	- 0,25
7	-	+	+	55,07	0,25
8	+	+	+	57,38	0,75

#### **4.4 - Processo de obtenção proposto**

Através dos resultados apresentados nos itens anteriores foi possível propor um processo de obtenção do carmim, conforme Figura 9.

A extração do pigmento tem como solvente água destilada. A solução água mais cochonilha é aquecida até ebulição. O tempo de extração - medido a



partir do início da ebulição - é estabelecido em 15 minutos para uma proporção de solvente igual a 120 ml/ g de matéria-prima.

Após a extração o extrato é resfriado e filtrado à vácuo. O líquido resultante tem seu pH ajustado para 6 e recebe a adição dos sais.

A concentração de sulfato de alumínio estabelecida equivale a 50% do valor estequiométrico, ou seja, para cada grama de ácido carmínico deve-se utilizar 0,17 g de  $Al_2(SO_4)_3$ .

A concentração de acetato de cálcio estabelecida equivale a relação estequiométrica, ou seja, para cada grama de ácido carmínico deve-se utilizar 0,16 g de  $Ca(COOH_3)_2 \cdot H_2O$ .

Esta solução é aquecida e mantida em ebulição por 30 minutos. Após este tempo a mistura é resfriada e o material precipitado é separado por filtração à vácuo. O corante obtido é seco em estufa à vácuo em temperatura próxima a 70°C, triturado e envasado.

Apesar do rendimento em peso de ácido carmínico ser baixo (aproximadamente 48%) este é justificado pelo alto teor de ácido carmínico obtido (aproximadamente 57%). Esta concentração de pigmento no corante permite a obtenção de corante líquido (forma mais comercializada) de maneira menos onerosa para o fabricante.

O rendimento em massa pode ser otimizado com o aumento do pH de extração para níveis básicos (acima de 7). No entanto, este procedimento acarreta arraste de vários componentes do inseto (como matéria graxa e proteína) que não são desejáveis no produto final. Além disto torna o processo de filtração do extrato uma operação extremamente lenta exigindo o ajuste do pH para níveis ácidos. Assim, tem-se duas fases a mais no

processo que não se justificam visto que o maior rendimento em massa não é acompanhado de um alto teor de ácido carmínico como se observa no estudo realizado por CARVALHO (1996).

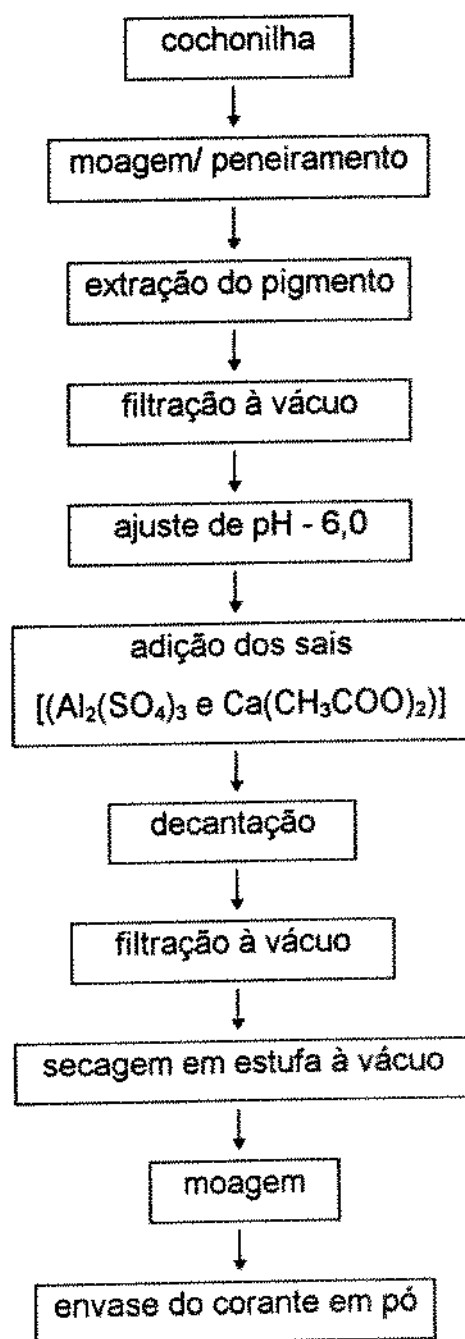


Figura 9: Fluxograma proposto para obtenção de carmim

Outra técnica empregada para o aumento de rendimento é a reciclagem do resíduo da extração. Esta técnica oferece um aumento de rendimento em massa, no entanto, estudos como o de CARVALHO (1996) e MORENO (1989) onde esta técnica foi empregada revelam que o produto final possui teores de pigmento mais baixos do que os obtidos neste trabalho. FALCONE (1989) expõe que através desta metodologia obtém-se corantes de segunda categoria.

#### **4.5 - Identificação do Pigmento**

Através da comparação dos espectros de varredura no visível dos carmins laboratório e comercial constatou-se que o corante produzido neste estudo apresenta as mesmas características químicas (mesmos formato e picos de absorção) que o comercializado.

Além disto estes espectros estão de acordo com os mencionados na literatura (item 2.3.1.2).

Os espectros encontram-se no ANEXO G.

#### **4.6 - Estabilidade do carmim**

Após a obtenção do carmim através da extração do pigmento da cochonilha, estudou-se a estabilidade do mesmo utilizando-se como comparação o carmim comercial obtido no mercado.

##### **4.6.1 - Estabilidade a luz**

Os resultados da concentração de ácido carmínico no carmim líquido utilizado neste estudo foram obtidos através da leitura de absorbância a 518

nm e calculados com base nas diluições feitas. A curva de calibração utilizada encontra-se no ANEXO B.

Através da concentração obtida (Tabela 23) foi possível determinar a constante de velocidade da reação e o tempo de meia vida da mesma (Tabela 24), bem como a equação da reta que descreve o modelo de estabilidade do corante em relação a luz (Tabela 25) utilizando-se para isto regressão linear (ANEXO C).

Tabela 23 - Resultados obtidos para estabilidade a luz

ensaios	comercial		laboratório	
	luz (mg/ml)	escuro (mg/ml)	luz (mg/ml)	escuro (mg/ml)
inicial	0,0551	0,0559	0,0557	0,0557
24 horas	0,0518	0,0558	0,0524	0,0549
48 horas	0,0510	0,0559	0,0523	0,0540
72 horas	0,0513	0,0553	0,0528	0,0539
96 horas	0,0509	0,0553	0,0527	0,0538
120 horas	0,0511	0,0553	0,0528	0,0538
144 horas	0,0508	0,0553	0,0525	0,0538

Tabela 24 - Resultados de Constante de Velocidade de Reação e Tempo de Meia vida para estabilidade a luz

	condição	$K \times 10^{-4} (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$	dias
<b>carmim comercial</b>	luz	4,06	1.707,26	71,14
<b>carmim laboratório</b>	luz	2,30	3.016,81	125,70
<b>carmim comercial</b>	escuro	0,91	7.586,24	316,09
<b>carmim laboratório</b>	escuro	2,21	3.138,78	130,78

Tabela 25 - Modelos de estabilidade do carmim em relação a luz

	tratamento	equação*	r
carmim comercial	luz	$C = - 2,93 - 0,00041 t$	0,73
	escuro	$C = - 2,88 - 0,00009 t$	0,86
carmim laboratório	luz	$C = - 2,92 - 0,00023 t$	0,54
	escuro	$C = - 2,90 - 0,00022 t$	0,84

\* C: teor de carmim (%) e t: tempo (horas)

Comparando-se as duas amostras de corante - comercial e laboratório - verificou-se que ao nível de significância de 5% não há diferença significativa entre as mesmas. A diferença mínima significativa (d.m.s.) é 0,00195 e a diferença entre elas é 0,0002 (ANEXO C).

A análise das equações mostra que o carmim laboratório na luz apresentou uma taxa de degradação de 0,00023% de ácido carmínico por hora de tratamento, enquanto que no escuro a degradação foi de 0,00022%.

O carmim comercial apresentou uma taxa de degradação de 0,00041% de ácido carmínico por hora de tratamento na presença de luz e 0,00009% em sua ausência.

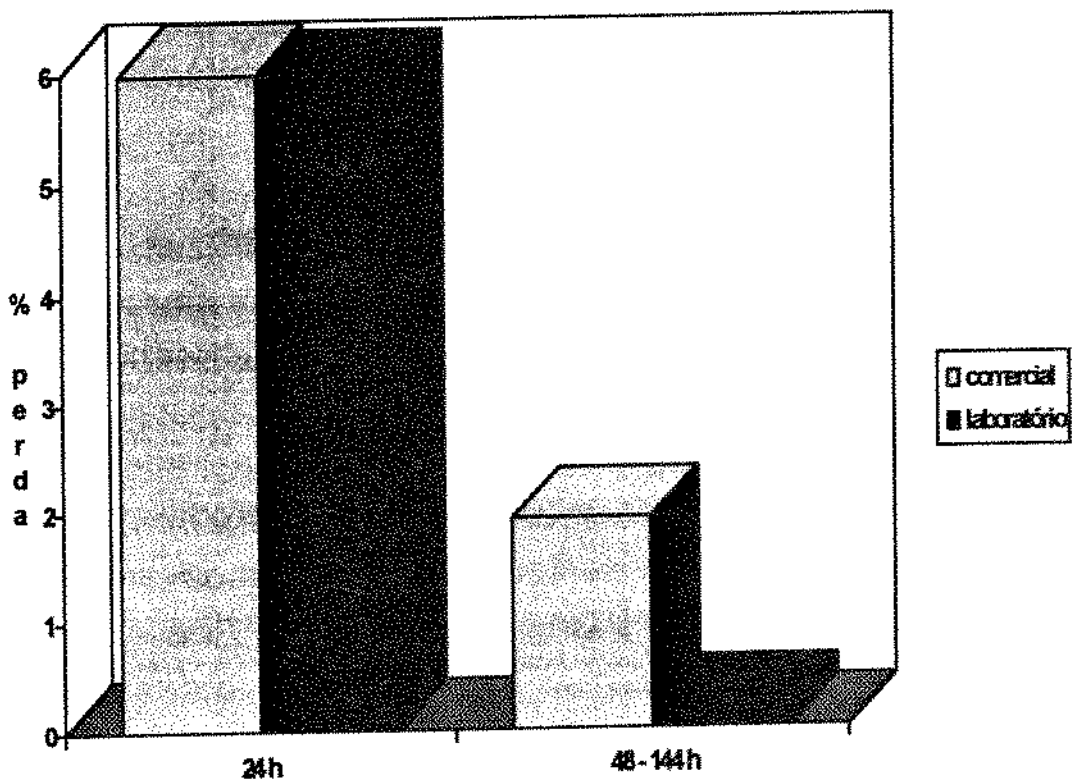
Uma vez que a d.m.s. ao nível de 5% é 0,00195 para que haja diferença entre os tratamentos, e este valor não foi atingido, conclui-se que não há diferença significativa entre os ensaios na presença ou ausência de luz no que se refere a estabilidade do corante.

Os dois corantes apresentaram perda acentuada de cor durante o primeiro dia de exposição a luz (Figura 10). A porcentagem de perda foi bastante próxima para estas duas medidas.

Já do segundo ao sexto dias na presença de luz o corante comercial teve perda bem maior que o laboratório.

Nas amostras que não foram expostas a luz (Figura 11) o corante laboratório apresentou perdas maiores que o comercial. Nota-se, ainda, que no escuro as perdas ocorridas no primeiro dia foram bem menores que na presença de luz.

Figura 10 - Perda de ácido carmínico na presença de luz

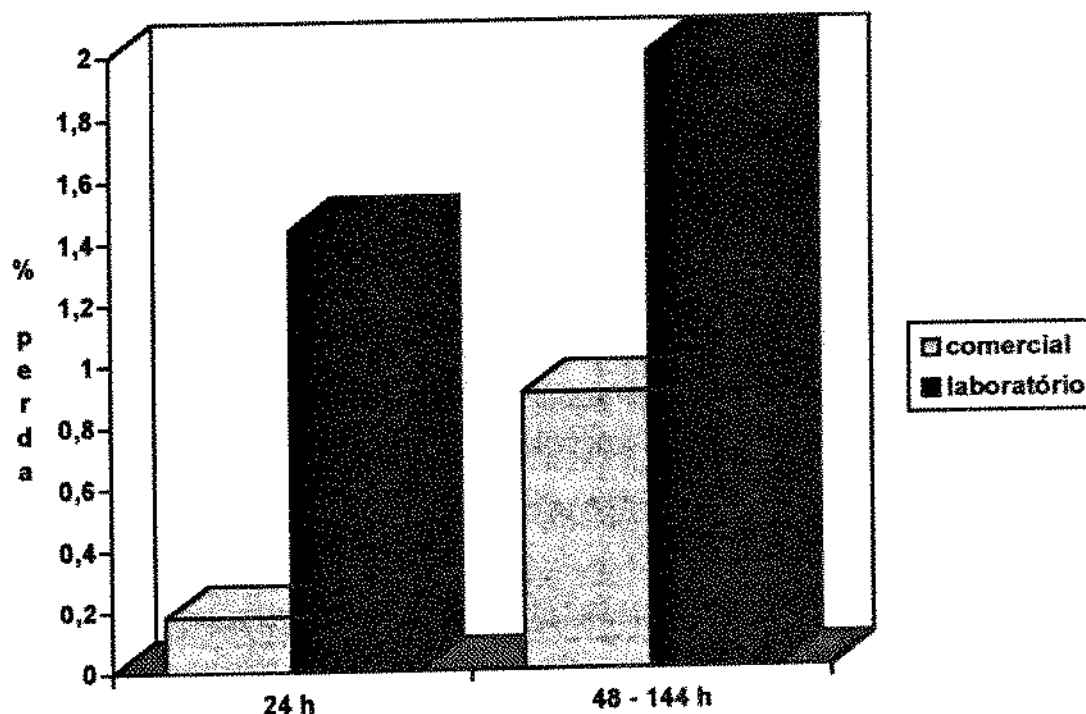


Os resultados obtidos na presença de luz estão de acordo com os resultados apresentados por KEARSLEY e KATSABOXAKIS (1980) onde se constatou que há uma perda acentuada de cor nas primeiras vinte e quatro horas e perda gradual a partir disto (Figura 10).

Os valores obtidos nos ensaios realizados na ausência de luz (Figura 11) diferem do encontrado pelos autores citados uma vez que a perda no

primeiro dia foi pouco acentuada em relação as outras medidas feitas neste trabalho. Esta diferença provavelmente se dá porque o estudo de KEARSLEY e KATSABOXAKIS (1980) se deu em pH 5 no qual o carmin é menos estável que a pH 7 utilizado neste trabalho.

Figura 11 - Perda de ácido carmínico na ausência de luz



#### 4.6.2 - Estabilidade a temperatura

A absorbância medida a 518 nm para cada tratamento foi transformada em concentração de ácido carmínico (Tabela 26) através de uma curva de calibração e das diluições feitas. A curva de calibração encontra-se no ANEXO B.

Tabela 26 - Resultados obtidos para estabilidade a temperatura

	tempo (h)	25°C (mg/ml)	50°C (mg/ml)	75°C (mg/ml)	100°C (mg/ml)
<b>laboratório</b>	0	0,0472	0,0444	0,0417	0,0506
	0,50	0,0471	0,0444	0,0415	0,0503
	1,00	0,0471	0,0443	0,0415	0,0493
	1,50	0,0471	0,0442	0,0414	0,0473
	2,00	0,0471	0,0443	0,0413	0,0457
	2,50	0,0470	0,0442	0,0413	0,0426
	3,00	0,0470	0,0438	0,0412	0,0401
	3,50	0,0471	0,0436	0,0412	0,0393
	4,00	0,0470	0,0436	0,0408	0,0347
<b>comercial</b>	0	0,0547	0,0421	0,0478	0,0548
	0,50	0,0546	0,0418	0,0478	0,0529
	1,00	0,0546	0,0417	0,0476	0,0528
	1,50	0,0545	0,0416	0,0468	0,0511
	2,00	0,0541	0,0418	0,0461	0,0502
	2,50	0,0539	0,0418	0,0429	0,0493
	3,00	0,0544	0,0416	0,0414	0,0471
	3,50	0,0546	0,0415	0,0411	0,0460
	4,00	0,0545	0,0414	0,0410	0,0408

O resultados da Tabela 26 foram submetidos a regressão linear sendo desta forma possível se determinar as constantes de velocidade e tempo de meia vida (Tabela 27) para cada um dos tratamentos, bem como as equações que melhor os descrevem (Tabela 28).



Tabela 27 - Constante de velocidade de reação e tempo de meia vida para estabilidade a temperatura

	condição	$K \times 10^{-3} (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$	dias
carmim comercial	25 °C	1,11	626,34	26,10
carmim laboratório	25 °C	0,77	900,19	37,51
carmim comercial	50 °C	20,96	234,17	9,76
carmim laboratório	50 °C	5,00	138,63	5,78
carmim comercial	75 °C	47,78	14,51	0,60
carmim laboratório	75 °C	4,19	165,56	6,90
carmim comercial	100 °C	60,73	11,41	0,48
carmim laboratório	100 °C	92,23	7,52	0,31

Tabela 28 - Modelos de estabilidade do carmim à temperatura

	tratamento	equação*	r
carmim comercial	25°C	$C = - 2,91 - 0,0011 t$	0,31
	50°C	$C = - 3,17 - 0,0030 t$	0,82
	75°C	$C = - 3,01 - 0,0478 t$	0,95
	100°C	$C = - 2,88 - 0,0607 t$	0,92
carmim laboratório	25°C	$C = - 3,05 - 0,0008 t$	0,75
	50°C	$C = - 3,11 - 0,0050 t$	0,91
	75°C	$C = - 3,18 - 0,0042 t$	0,93
	100°C	$C = - 2,94 - 0,0923 t$	0,97

\* C: teor de carmim (%) e t: tempo (horas)

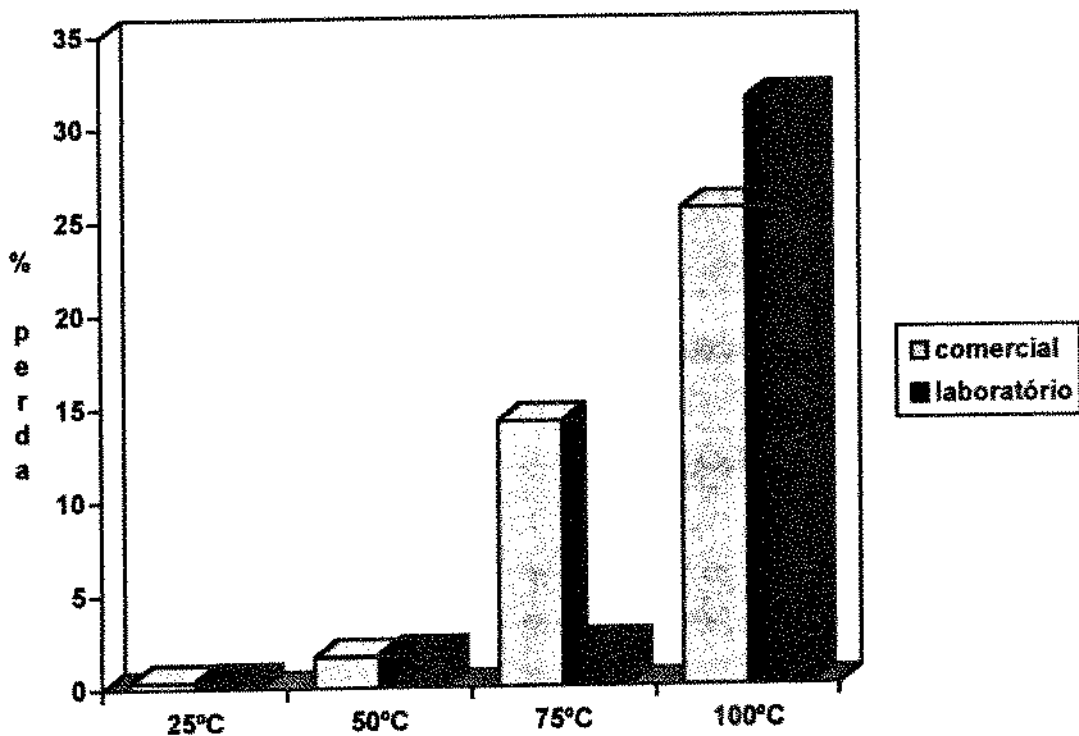
Comparando-se as duas amostras de corante - comercial e laboratório - verificou-se que ao nível de significância de 5% não há diferença significativa entre as mesmas. A diferença mínima significativa (d.m.s.) é 0,0492 e a diferença entre elas é 0,0025 (ANEXO D).

A análise das equações mostra que o carmim laboratório nas temperaturas de 25, 50, 75 e 100°C apresentou as seguintes taxas de degradação de ácido carmínico 0,0008%; 0,0050%; 0,0042% e 0,0923% por hora de tratamento.

O carmim comercial apresentou taxa de degradação de ácido carmínico de 0,0011%; 0,0030%; 0,0478% e 0,0607% por hora de tratamento nas temperaturas de 25, 50, 75 e 100°C respectivamente.

Estes valores não diferem significativamente entre si ao nível de 5% dada a d.m.s. ser 0,1056. Desta forma, conclui-se que o comportamento dos corantes laboratório e comercial na faixa de temperatura de 25 a 100°C se mantém com a mesma estabilidade.

Figura 12 - Perda de ácido carmínico na faixa de 25 a 100°C



Os dois corantes apresentaram perdas graduais nas diversas temperaturas (Figura 12). A 25°C e 50°C as perdas das duas soluções foram praticamente iguais. Na temperatura de 75°C o comercial teve perda 65 vezes mais acentuada que o corante laboratório. Aos 100°C o corante laboratório apresentou perda um pouco maior que o comercial.

Os dois corantes comportaram-se semelhante ao estudo realizado por KEARSLEY e KATSABOXAKIS (1980) nas temperaturas de 25 e 50°C.

Na temperatura de 75°C o corante laboratório apresentou resultados semelhantes ao do estudo dos autores citados anteriormente. No entanto, o corante comercial apresentou perda de cor acentuada diferindo do referido estudo.

Aos 100°C a maior perda de cor assemelha-se aos resultados obtidos pelos dois autores citados.

#### *4.6.3 - Estabilidade ao pH*

As concentrações de ácido carmínico apresentadas na Tabela 29 foram obtidas através de uma curva de calibração (ANEXO B) que relaciona leituras de absorvância a 518 nm e a concentração do pigmento. Foram calculadas, também, através das diluições feitas.

Antes de se alterar o pH das amostras foi medida a concentração de ácido carmínico. As concentrações de pigmento tanto no carmim laboratório quanto no comercial eram iguais a 0,0343.

Tabela 29 - Resultados obtidos para estabilidade ao pH

corante	tempo	pH*							
		2	3	4	5	6	7	8	
laboratório	0	0,0331	0,0259	0,0305	0,0352	0,0411	0,0511	0,0500	
	24	0,0327	0,0248	0,0270	0,0309	0,0393	0,0509	0,0497	
	48	0,0326	0,0244	0,0253	0,0285	0,0370	0,0507	0,0495	
	72	0,0324	0,0242	0,0246	0,0272	0,0362	0,0507	0,0494	
	96	0,0324	0,0240	0,0243	0,0268	0,0355	0,0504	0,0494	
	120	0,0323	0,0240	0,0242	0,0266	0,0351	0,0503	0,0493	
	144	0,0322	0,0239	0,0241	0,0268	0,0346	0,0502	0,0494	
comercial	0	0,0400	0,0327	0,0396	0,0418	0,0551	0,0570	0,0587	
	24	0,0366	0,0315	0,0347	0,0371	0,0526	0,0570	0,0588	
	48	0,0362	0,0306	0,0326	0,0346	0,0506	0,0567	0,0588	
	72	0,0361	0,0306	0,0321	0,0337	0,0500	0,0567	0,0588	
	96	0,0361	0,0306	0,0319	0,0335	0,0489	0,0565	0,0587	
	120	0,0360	0,0302	0,0319	0,0334	0,0484	0,0565	0,0586	
	144	0,0360	0,0302	0,0318	0,0327	0,0480	0,0564	0,0586	

\* medidas em mg/ml

As equações obtidas através de regressão linear estão relacionadas na Tabela 30 enquanto que as constantes de velocidade e tempo de meia vida referentes a cada tratamento estão relacionadas na Tabela 31 (ANEXO E).

A comparação dos corantes laboratório e comercial a nível de significância de 5% apresenta d.m.s. de 0,00026 mostrando que não existe diferença significativa entre os mesmos.

A análise das equações mostra que o carmin laboratório nos pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 apresentou as seguintes taxas de degradação de ácido carmínico

0,00017%; 0,00048%; 0,00144%; 0,00176%; 0,00117%; 0,00012% e 0,0008% por hora de tratamento.

Tabela 30 - Modelos de estabilidade do carmim ao pH

	tratamento	equação*	r
<b>carmim comercial</b>	pH 2	$C = - 3,27 - 0,00052 t$	0,70
	pH 3	$C = - 3,44 - 0,00048 t$	0,87
	pH 4	$C = - 3,31 - 0,00126 t$	0,81
	pH 5	$C = - 3,24 - 0,00146 t$	0,87
	pH 6	$C = - 2,92 - 0,00092 t$	0,96
	pH 7	$C = - 2,86 - 0,00008 t$	0,96
	pH 8	$C = - 2,83 - 0,00002 t$	0,69
<b>carmim laboratório</b>	pH 2	$C = - 3,41 - 0,00017 t$	0,94
	pH 3	$C = - 3,68 - 0,00048 t$	0,88
	pH 4	$C = - 3,56 - 0,00144 t$	0,86
	pH 5	$C = - 3,42 - 0,00176 t$	0,87
	pH 6	$C = - 3,22 - 0,00117 t$	0,95
	pH 7	$C = - 2,97 - 0,00012 t$	0,99
	pH 8	$C = - 3,00 - 0,00008 t$	0,86

\*C: teor de carmim (%) e t: tempo (horas)

O carmim comercial apresentou taxa de degradação de ácido carmínico de 0,00052%; 0,00048%; 0,00126%; 0,00146%; 0,00092%; 0,00008% e 0,0002% por hora de tratamento.

Os dois corantes apresentaram-se estáveis na faixa de pH estudada sendo que em pH básico não houve nenhuma oscilação na medida feita. No entanto, os dois apresentaram coloração diferenciada em cada pH.

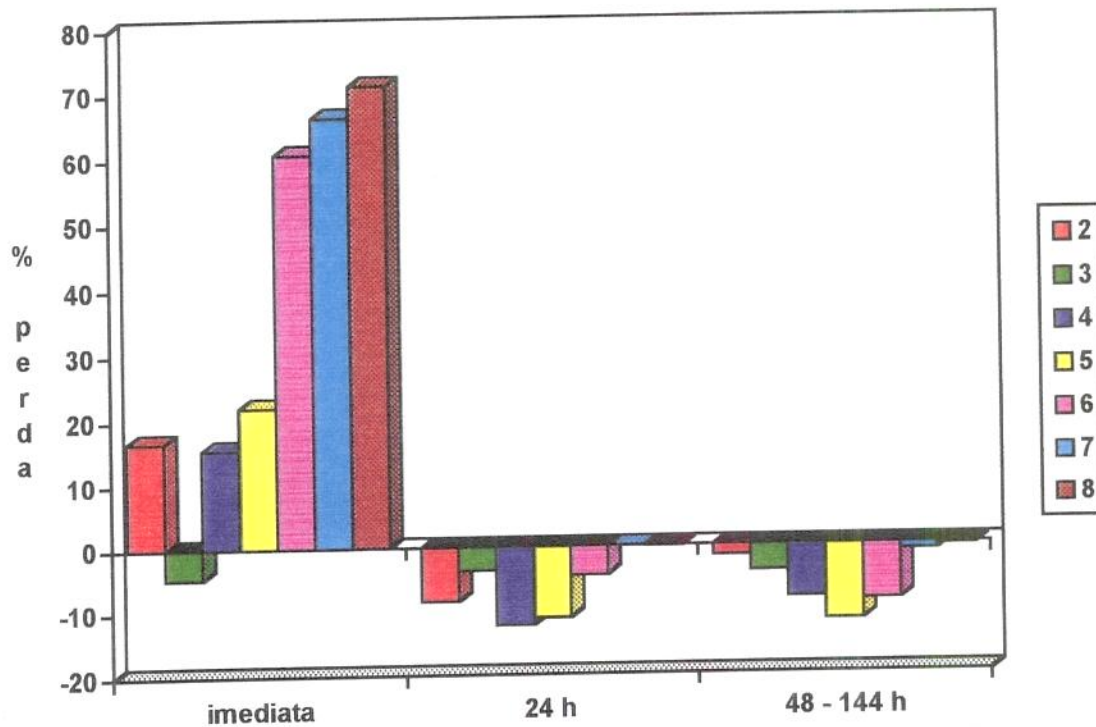
Tabela 31 - Constante de Velocidade de reação e Tempo de meia vida em relação a estabilidade ao pH

	condições	$K \times 10^4 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$
<b>camim comercial</b>	pH 2,55	5,23	1.324,41
<b>camim laboratório</b>	pH 2,31	1,69	4.100,31
<b>camim comercial</b>	pH 3,30	4,80	1.443,43
<b>camim laboratório</b>	pH 3,20	4,81	1.440,75
<b>camim comercial</b>	pH 4,26	12,62	549,22
<b>camim laboratório</b>	pH 4,00	14,37	482,29
<b>camim comercial</b>	pH 5,19	14,57	475,79
<b>camim laboratório</b>	pH 5,03	17,55	395,01
<b>camim comercial</b>	pH 6,09	9,15	757,64
<b>camim laboratório</b>	pH 6,19	11,67	593,97
<b>camim comercial</b>	pH 7,03	0,79	8.805,20
<b>camim laboratório</b>	pH 7,19	1,23	5.618,76
<b>camim comercial</b>	pH 7,85	0,20	34.249,63
<b>camim laboratório</b>	pH 7,88	0,81	8.578,18

Tabela 32 - Resultados para cor em relação ao pH

pH	cor
2	vinho
3	laranja claro
4	laranja escuro
5	vermelho alaranjado
6-8	vinho

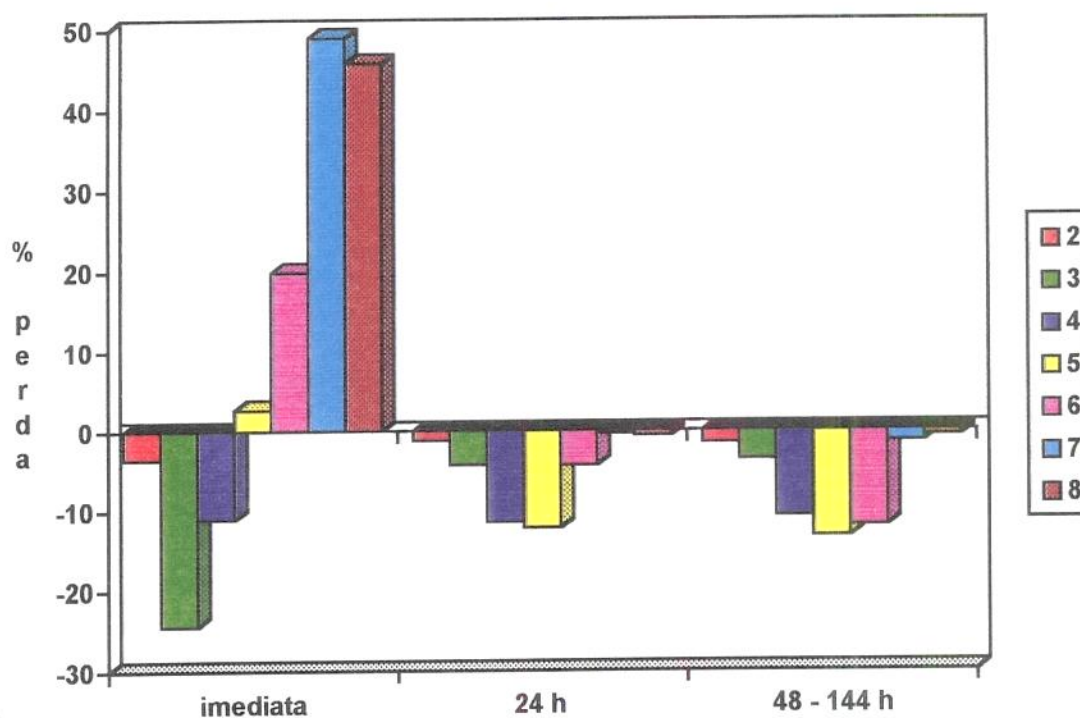
Figura 13 - Perda de ácido carmínico na faixa de pH 2 - 8 - Carmim comercial



Ao nível de 5% de significância com d.m.s. de 0,0008 os tratamentos a pH 2 e 4; 2 e 5; 3 e 4; 3 e 5; 4 e 7; 4 e 8; 5 e 7; 5 e 8; 6 e 7 e 6 e 8 diferem entre si. Destes, os tratamentos que conferem maior estabilidade aos corantes são os de pH 2, 3, 7 e 8.

No estudo da estabilidade do carmin frente ao pH das soluções os resultados se deram de forma peculiar. Considerando-se a variação no teor de ácido carmínico que ocorreu imediatamente após a alteração do pH das soluções, algumas amostras apresentaram aumento de concentração do pigmento. Nos pHs 2 e 4 apenas o corante comercial teve incremento de cor. O carmin laboratório apresentou queda (Figuras 13 e 14).

Figura 14 - Perda de ácido carmínico na faixa de pH 2 - 8 - Carmim laboratório



Nos pHs 5, 6, 7 e 8 os dois corantes apresentaram aumento de coloração. Sendo que o carmin comercial demonstrou níveis maiores de cor.

No pH 2 o corante comercial apresentou perda maior que o laboratório nas primeiras vinte e quatro horas. Nos demais pHs, durante as primeiras vinte e quatro horas os dois corantes tiveram perdas semelhantes. Nota-se que as maiores perdas se dão em pH 4 e 5 enquanto em pH 7 e 8 as perdas são irrisórias.

Do segundo ao sexto dias os dois carmins apresentaram perdas semelhantes entre si. Sendo nos pHs 4, 5 e 6 as maiores perdas. Nos pHs 2 e 7 as perdas foram bem pequenas e praticamente irrisórias em pH 8.



Os resultados obtidos estão em concordância com os apresentados por KEARSLEY e KATASABOXAKIS (1980) que realizaram o experimento a 7°C e mostra que as maiores perdas se dão nos pHs 3, 4, 5 e 6.

#### 4.6.4 - Estabilidade a Matrix Alimentícia

Os resultados obtidos para cor estão relacionados na Tabela 33.

Tabela 33 - Resultados de cor obtidos para a estabilidade a matrix alimentícia

	cor	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4	tempo 5	tempo 6	tempo 7	tempo 8	tempo 9
	L*	85,10 ± 0,01	85,02 ± 0,01	84,96 ± 0,04	85,09 ± 0,14	84,87 ± 0,13	84,09 ± 0,42	84,77 ± 0,03	84,58 ± 0,15	84,42 ± 0,42
labora- tório	a*	12,40 ± 0,01	12,48 ± 0,02	12,60 ± 0,05	12,54 ± 0,05	12,82 ± 0,16	13,01 ± 0,32	12,89 ± 0,02	12,88 ± 0,13	13,09 ± 0,38
	b*	3,88 ± 0,01	3,92 ± 0,04	3,89 ± 0,10	3,96 ± 0,15	3,59 ± 0,13	4,37 ± 0,20	3,78 ± 0,47	4,08 ± 0,10	3,83 ± 0,09
	L*	84,66 ± 0,01	84,52 ± 0,08	84,56 ± 0,05	84,43 ± 0,14	84,59 ± 0,04	84,56 ± 0,04	83,55 ± 0,65	84,17 ± 0,52	84,30 ± 0,14
comer- cial	a*	12,59 ± 0,02	12,69 ± 0,08	12,88 ± 0,09	12,88 ± 0,09	12,79 ± 0,06	12,76 ± 0,06	13,69 ± 0,56	13,08 ± 0,29	13,00 ± 0,13
	b*	3,42 ± 0,01	3,71 ± 0,28	3,42 ± 0,05	3,58 ± 0,27	3,18 ± 0,17	3,16 ± 0,18	4,04 ± 0,58	3,15 ± 0,48	3,23 ± 0,13

onde: L\* - luminosidade

a\* - vermelho

b\* - amarelo

Ao zero dia, a cor das duas amostras, comercial e laboratório, foram praticamente iguais, observando-se apenas que a amostra laboratório apresentou valores de luminosidade e amarelo ligeiramente superiores aos da amostra comercial, e que visualmente, numa avaliação grosseira, estas diferenças não foram notadas.

A amostra laboratório durante o armazenamento apresentou pequena variação dos valores de L\* (luminosidade), a\* (vermelho) e b\* (amarelo), notando-se a tendência para diminuir os valores de luminosidade e para aumentar os valores de vermelho e amarelo, sem que contudo afetasse a aparência visual das amostras em relação ao zero dia.

A amostra comercial apresentou as mesmas tendências que a amostra laboratório, quanto à luminosidade e o teor de vermelho. Quanto ao amarelo, não apresentou tendência definida.

Observou-se ainda pequenas alterações na aparência das amostras. Na quarta e quinta leituras as duas amostras apresentaram gordura branca na superfície. Na sexta e sétima medidas a amostra laboratório apresentou gordura alaranjada na superfície enquanto a comercial manteve a gordura branca na superfície. No oitavo tempo, duas repetições da amostra laboratório e uma da comercial apresentaram gordura alaranjada e uma laboratório e duas comerciais apresentaram gordura branca na superfície. Na nona leitura apenas uma amostra laboratório apresentou gordura alaranjada na superfície enquanto todas as outras amostras apresentaram gordura branca. As três primeiras medidas não apresentaram separação de gordura.

Estas separações de gordura provavelmente devem-se ao fato das amostras estarem armazenadas acima da temperatura de geladeira. Fato este que provoca a coalescência das moléculas de lipídios. Amostras piloto preparadas conjuntamente com as estudadas mas mantidas sob refrigeração durante aproximadamente quatro meses não apresentaram esta característica.

## 5. CONCLUSÃO

- O carmim obtido neste estudo apresenta um teor de ácido carmínico elevado em relação ao comercializado escolhido.
- A metodologia proposta para obtenção do carmim é bastante simples e rápida conferindo resultados extremamente satisfatórios podendo, portanto, ser utilizada em escala industrial.
- O estudo de estabilidade do pigmento em relação a luz, temperatura, pH e matrix alimentícia demonstraram que o corante obtido neste trabalho possui a mesma estabilidade que o comercial.
- O carmim obtido neste estudo mostrou ser bastante estável à luz, às temperaturas de 25°, 50° e 75°C e na faixa de pH 2 - 8.
- O corante obtido neste estudo apresentou a mesma cor que o corante comercial quando colocado em matrix alimentícia opaca.

## **SUGESTÕES PARA NOVOS ESTUDOS**

- Dada a infinidade de fatores que podem alterar o processo de obtenção da laca pode-se estudar outros fatores ou, ainda, os mesmos fatores em outros níveis.
- A estabilidade poderia ser aumentada com a utilização de técnica de microencapsulamento por "spray-dryer".
- A utilização de diferentes metodologias ou concentração dos sais proporciona tonalidades de vermelho variadas podendo constituir nova fonte de estudos e padronização.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCABES V.B., C.J. Estudio de Factibilidad de Instalación de una Planta de Industrialización de la Cochinilla para la Obtención del Carmín. Ayacucho, 1970. 105 p. Tese (Engenheiro Químico) - Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

AMAYA B., J.L. Proyecto de Exportación de Carmín de Cochonilla al Brasil. Asociación de Exportadores, Escuela de Comercio Exterior. Lima. 1984 apud FALCONE R.,E. Utilización del Método Carré Modificado para la Obtención del Carmín. Lima, 1989. 92 p. Tese (Engenheiro de Indústria de Alimentos) - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

BANCO DO BRASIL S.A. Setor de estatísticas de Comércio Exterior. São Paulo/ SP.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. e BRUNS, R.E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Ed. da Unicamp. Campinas/ SP. 1995. 299p.

BHATIA, S.B. e VENKATARAMAN, K. Indian Journal Chemistry, v.3, p.92. 1965 apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

- BORROR, D.J.; TRIPLEHORN, C.A. e JOHNSON, N.F. An Introduction to the Study of Insects. 6<sup>th</sup> ed. Orlando: Harcourt Brace Jovanovich College Publishers. 1989. 875 p.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G. e HUNTER, J.S. Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. New York; Wiley. 1978.
- BRASIL. Decreto n. 55.871 de 26.03.1965. Refere-se a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos.
- BRASIL. Decreto - lei n. 986 de 21.10.1969. Institui normas básicas sobre alimentos.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas Técnicas e Padrões para Alimentos (C.N.N.P.A.) - Resolução n. 44/ 77 de 25.11.1977. Estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos (e bebidas).
- CARVALHO, P.R.N. Extração de ácido carmínico e análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Campinas, 1996. 96 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- CASSANO C., M. del C. Proyecto de una planta Industrial para la obtención del Carmín de Cochonilla. Lima, 1962. Tese. Universidad Nacional Mayor de San Marcos apud MORENO P., D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

CHABARIBERY, D. e SATO, G.S. Informações Econômicas. São Paulo, v.21, n. 11, nov. 1991.

CHRISTIAN HANSEN. Folheto técnico distribuído durante palestra ministrada na Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Out., 1995.

CODEX ALIMENTARIUS. Joint FAO/ WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Rome. 2<sup>nd</sup> ed. General Requirements - v.1. 1992.

DIDRIKSEN, C. Unique and powerful natural colors. Food Marketing & Technology, n. 9, v. 1. p. 11 - 12, 14. 1995.

DIEMAIR, W. Laboratorium fur Lebensmittelschemiker. Dresden: Theodor Steinkopff. 8 Aufl. 1963.

DIMROTH, O. e KÄMMERER, H. Berichte der Bunsen, v.53, p. 471. 1920 apud MAYER, F. The Chemistry of Natural Coloring Matters. ACS monographs series. New York: Reinhold. 1943. 354 p.

ENCICLOPEDIA UNIVERSAL ILUSTRADA. Tomo XI. Ed. Espasa Calpe S.A. Madrid, 1968. 1523 p apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

ESPINOZA, M., E.; CALCIN P., F. e SFARCICH R., Y. Cochinilla del Carmín. Lima, s.d.. 95 p.



FALCONE R.,E. Utilización del Método Carré Modificado para la Obtención del Carmín. Lima, 1989. 92 p. Tese (Engenheiro de Indústria de Alimentos) - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

FEDERAL REGISTER, v. 33, n° 243, p. 18577-78, Dec. 1968.

FDA. Code of Federal Regulation. Título 21. Food and Drugs, partes 1 a 99. Washington, USA. 1983.

FERREIRA, V.L.P. e MAEDA, S.L. Medida del color de las infusiones de café y del café con leche. Revista Agroquímica Tecnología Alimentaria, n. 24, v. 2, p. 249-255. 1984.

FOPEX. Cochinilla - Carmín. Lima, 1983. 43 p apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

FORD, G.P.; GOPAL, T.; GRANT, D.; GAUNT, I.F.; EVANS, J.D. e BUTLER, W.H. Chronic toxicity/ carcinogenicity study of carmine of cochineal in the rat. Food Chemical Toxicology, v.25, n.12, p. 897-902. 1987.

FRANCIS, F.J. Natural Food Colorants. Cereal Foods World, v.26, n.10, p.565-567.1981.

GIBAJA, S. e L. ALDANA. Preparación del Carmín. Evaluación de cuatro procesos para preparar Carmín. Boletín de la Sociedad Química del Perú, v. XLIII, n.3. Lima, Peru. 1977 apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

GRANT, D. e GAUNT, I.F. Three generation reproduction study on carmine of cochineal in the rat. Food Chemical Toxicology, v.25, n.12, p. 903-912. 1987.

GRANT, D., GAUNT, I.F. E CARPANINI, F.M.B. Teratogenicity and Embryotoxicity study of carmine of cochineal in the rat. Food Chemical Toxicology, v.25, n.12, p.913-917. 1987.

HARMS, H. Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. II Liefg. Stanfen. 1957 apud LLOYD, A.G. Extraction and Chemistry of Cochineal. Food Chemistry, v. 5, p.91-107. 1980.

HORWITZ, W. (Ed.). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12<sup>th</sup> ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists. 1975. 1094 p.

—————. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13<sup>th</sup> ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists. 1980. 1018 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Vol. 1. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3<sup>a</sup> ed. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1985.

ITINTEC. Cochinilla. Método de ensayo espectrofotométrico para determinar ácido carmínico. Norma Técnica Nacional 011.208. Peru. Fev,1982 apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

- JORGENSEN, K. e SKIBSTED, L.H. Sensitivity of Cochineal. Quantum Yields for Photodegradation of Carminic Acid and Conjugated Bases in Aqueous Solution. Food Chemistry, v. 40, p. 25-34. 1991.
- KAEGI, M.K. WUETHRICH, B. E JOHANSSON, S.G.O. Campari orange anaphylaxis due to carmine allergy. Lancet, v.344, n.8914, p. 60-61. 1994.
- KAWASAKI, Y.; UEMURA, T.; SAI, K.; HASEGAWA, R.; MOMMA, J.; SAITOH, M.; MATSUSHIMA, Y.; NAKAJI, Y.; TSUDA, M. e KUROKAWA, Y. A 13-week toxicity study of simultaneous administration of cochineal and aluminium potassium sulfate in rats. Bulletin of the National institute of Health Sciences, n. 112, p. 48-56. 1994.
- KEARSLEY, M.W. E KATSABOXAKIS, K.Z. Stability and use of natural colours in foods. Red beet powder, copper chlorophyll powder and cochineal. Journal of Food Technology, v.15, n.5, p. 501-514. 1980.
- LARA, W.H. E TAKAHASHI, M.Y. Monografia de Corantes Naturais para Fins Alimentícios; Padrões de Identidade e Qualidade. São Paulo: M.Y.Takahashi. 1994. 118 p.
- LIEBERMANN, C.; HÖRING e WILDERMANN. Berichte der Bunsen, v.33, p. 149. 1900 apud MORENO P.,D. Obtención de Carmin a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".
- LLOYD, A.G. Extraction and Chemistry of Cochineal. Food Chemistry, v. 5, p.91-107. 1980.

- LOPRIENO, G.; BONCRISTIANI, G. e LOPRIENO, N. Genotoxicity studies in vitro and in vivo on carminic acid (natural red 4). Food and Chemical Toxicology, n. 30, v. 9. p 759-764. 1992.
- MA, C.C.; LI, Q.F. e ZHANG, Q.S. Fading and protection of colours in fruit juices. Food Science - China, n. 5, p. 16 - 18. 1994.
- MADSEN, H.L.; STAPELFELDT, H.; BERTELSEN, G.; e SKIBSTED, L.H. Cochineal as a colorant in processed pork meat. Colour matching and oxidative stability. Food Chemistry, v.46, p. 265-271. 1993.
- MAITANI, T.; DA RONG XING; IKEDA, C.; GODA, Y.; TAKEDA, M. e TOSHIHIRA, K. Application of ICP atomic emission spectrometry with ultrasonic nebulizer to screening for carmine: determination of aluminium in canned cherries. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, n. 35, v. 2, p. 201-205. 1994.
- MAYER, F. The Chemistry of Natural Coloring Matters. ACS monographs series. New York: Reinhold. 1943. 354 p.
- MARMION, D.M. Handbook of U.S. Colorants: foods, drugs, cosmetics and medical devices. 3<sup>rd</sup> ed. New York: J. Wiley. 1991. 573 p.
- MARTINS, A.P. e RUSIG, O. Departamento de Tecnologia de Alimentos - Eng. Alim. - UNICAMP, Campinas, SP, comunicação pessoal, 1995.
- MELOAN, S.; VALENTINE, L. e PUCHTLER, H. On the structure of carminic acid and carmine. Histochemie, v. 27, p.87. 1971 apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

MERCK INDEX. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 10<sup>th</sup> ed. New York: Merck & Co, Inc. 1983.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, DO COMÉRCIO E DO TURISMO. Departamento de Operações de Comércio Exterior. Gerência de Estatística, 1995.

MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

MORI, H.; IWATA, H.; TANAKA, T.; MORISHITA, Y., MORI, Y.; KOJIMA, T. e OKUMURA, A. Carcinogenicity study of cochineal in B6C3F1 mice. Food and Chemical Toxicology, n. 29, v. 9. p. 585-588. 1991.

MOTTIER, R. Cochenille, Acide Carminique et Carmin. Revue de la Conserve Alimentation Moderne, v.27, p. 83, 85-86. 1974.

OVEREEM, J.C. e VAN DER KERK, G.J. Revised structure for cochenillic acid and for the insects pigments, carminic and kermesic acid. Recueil, v.83, p. 1023-1035. 1964 apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

RANDICH, J.A. Ensayo Tecnológico para la Obtención de Extracto de Cochonilla en Polvo. Lima, 1975. 163 p. Tese - Universidade Nacional Agraria "La Molina" apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".

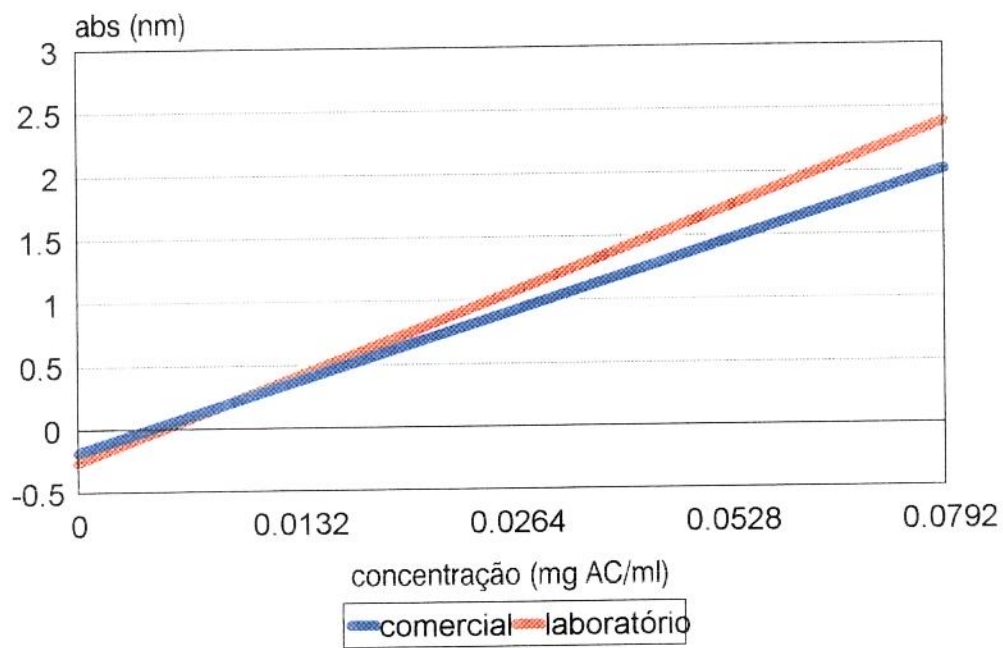
- RUTISHAUSER, M. Zur Kenntnis der Alizarinlacke. Zurich, 1940. Tese apud LLOYD, A.G. Extraction and Chemistry of Cochineal. Food Chemistry, v. 5, p.91-107. 1980.
- SIDE, C. Natural Colours. Food Trade Review, v.57, n.10 p.541-542, 544.1987.
- TEIXEIRA NETO, R. O.; VITALI, A. A.; QUAST, D. G. e MORI, E. E. M. Transformação e Vida - de - Prateleira de Alimentos Processados. Manual Técnico Nº 6. Campinas, Ital, 1993. 36 P.
- VARGAS, P.; PAULEN, B. e LIVCHITZ, P. La Industria del Carmín y su Exportación; Proyecto. ESAN. Lima, 1974. 70 p apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".
- VILLAVECCHIA, V. Tratado de Química Analítica Aplicada. 2ª ed. Barcelona: Ed. Gilli S.A. 1964. 1012 p apud MORENO P.,D. Obtención de Carmín a partir de Extracto de Cochonilla. Lima, 1985. 74 p. Tese - Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria "La Molina".
- WARNER-JENKINSON COMPANY. All About Lake Pigments, folheto técnico. Junho, 1984.
- WEINHEIM. Farbstoffe für Lebensmittel. 2. bearbeitete Aufl. Farbstoff-Kommission. VCH Verlagsgesellschaft mbH. DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft. trad. Dr. Anthony Tricker. 1988.

**ANEXO A****Solução Tampão de McIlvaine ( fosfato dissódico - ácido cítrico)**Ácido cítrico 0,1M ( $C_6H_8O_7$ ) e Fosfato dissódico 0,1M ( $Na_2HPO_4$ )

<b>pH</b>	<b><math>Na_2HPO_4</math> (ml)</b>	<b><math>C_6H_8O_7</math> (ml)</b>
<b>2,2</b>	0,40	19,60
<b>3,0</b>	4,11	15,89
<b>4,0</b>	7,71	12,29
<b>5,0</b>	10,30	9,70
<b>6,0</b>	12,63	7,37
<b>7,0</b>	16,47	3,53
<b>8,0</b>	19,45	0,55

## ANEXO B

# Curva de Calibração





## ANEXO C

## Estabilidade a luz

## Resultados de estabilidade - medidas de absorvância

ensaios tempos	comercial		laboratório	
	luz (nm)	escuro (nm)	luz (nm)	escuro (nm)
inicial	1,5046	1,5046	1,7864	1,7864
24 horas	1,3905	1,4662	1,6539	1,7094
48 horas	1,3783	1,5192	1,6749	1,7277
72 horas	1,4146	1,4884	1,6881	1,7242
96 horas	1,3956	1,5350	1,6923	1,7102
120 horas	1,3885	1,5391	1,6886	1,7218
144 horas	1,4848	1,5762	1,7463	1,7205

## Análise de variância

	luz	escuro	soma
comercial	0,000406	0,000091	0,000497
laboratório	0,000230	0,000221	0,000451
soma	0,000636	0,000312	0,000948

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F <sub>calculado</sub>	F <sup>5%</sup>
tratamento	1	$2,62 \cdot 10^{-8}$	$2,62 \cdot 10^{-8}$	1,12	161,4
amostra	1	$5,29 \cdot 10^{-10}$	$5,29 \cdot 10^{-10}$	0,02	
resíduo	1	$2,35 \cdot 10^{-8}$	$2,35 \cdot 10^{-8}$		
total	3	$5,02 \cdot 10^{-8}$			

Teste de Tukey:

Para tratamentos:

$$\Delta 5\% = 18,0 (2,345 \cdot 10^{-8} / 2)^{1/2} = 0,001945 \text{ (d.m.s.)}$$

Para amostras:

$$\Delta 5\% = 18,0 (2,345 \cdot 10^{-8} / 2)^{1/2} = 0,001945 \text{ (d.m.s.)}$$

Diferença entre tratamentos:

	luz	escuro
	0,000318	0,000156
luz	-	0,000162
escuro		-

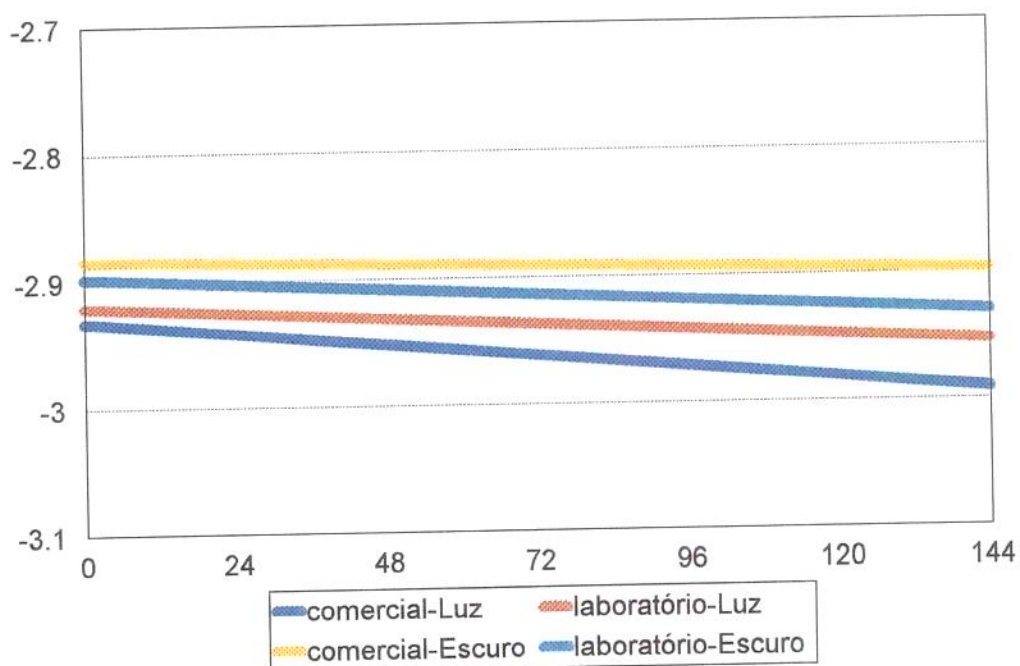
Diferença entre amostras:

	comercial	laboratório
	0,000248	0,000225
comercial	-	0,000023
laboratório		-

Gráfico referente a regressão linear (eixo das abcissas expresso em log)

## Estabilidade à Luz

regressão linear



## ANEXO D

## Estabilidade a temperatura

## Resultados de estabilidade - medidas de absorvância

	tempo (h)	25°C (nm)	50°C (nm)	75°C (nm)	100°C (nm)
laboratório	0	1,4883	1,3909	1,3058	1,6072
	0,50	1,4796	1,3784	1,3079	1,6161
	1,00	1,4902	1,3150	1,3065	1,5693
	1,50	1,4920	1,0843	1,3035	1,5012
	2,00	1,4926	1,5796	1,3442	1,4501
	2,500	1,4906	1,6561	1,3217	1,3425
	3,00	1,4858	1,4054	1,0948	1,2586
	3,50	1,4966	1,3784	1,2959	1,2326
	4,00	1,4875	1,2469	1,2821	0,9662
comercial	0	1,4789	1,1248	1,2895	1,4866
	0,50	1,4773	1,1228	1,2899	1,4014
	1,00	1,4783	1,1205	1,2852	1,4302
	1,50	1,4669	1,1182	1,2619	1,3813
	2,00	1,4626	1,4578	1,2441	1,3497
	2,50	1,4692	1,4423	1,1536	1,3031
	3,00	1,4752	1,3339	1,1130	1,2574
	3,50	1,4633	1,2443	1,4291	1,2399
	4,00	1,4797	1,3388	1,2348	1,0155

## Análise de variância

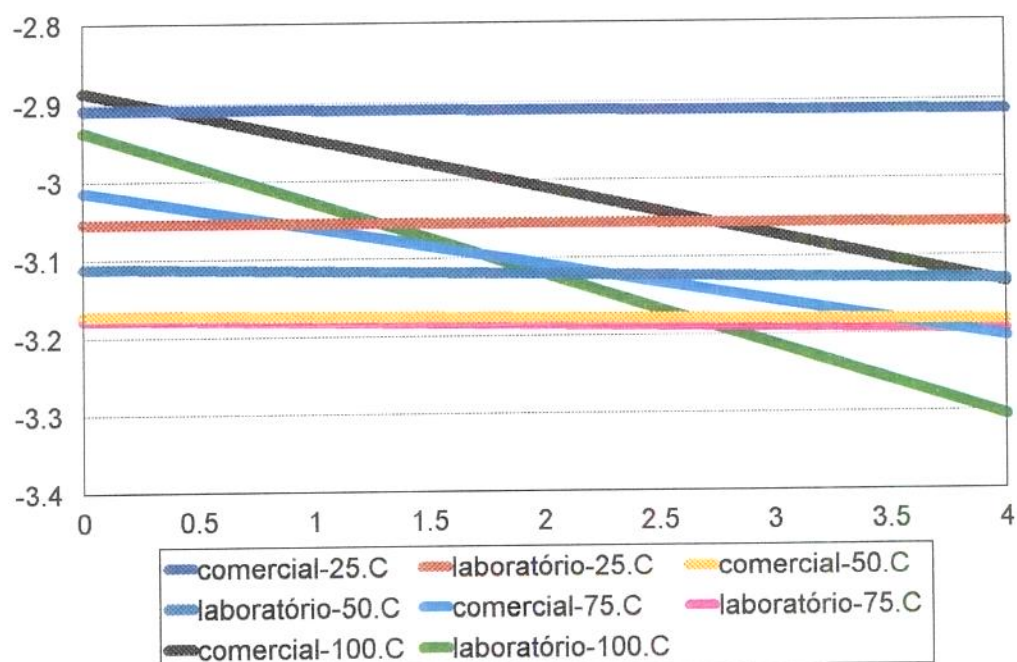
	25°C	50°C	75°C	100°C	soma
comercial	0,001107	0,002960	0,047773	0,060728	0,112568
laboratório	0,000770	0,005000	0,004187	0,092227	0,102184
soma	0,001877	0,007960	0,051960	0,152955	0,214752

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F <sub>calculado</sub>	F <sup>5%</sup>
tratamento	3	0,007316	0,002439	5,10	9,28
amostra	1	0,000013	0,000013	0,03	
resíduo	3	0,001435	0,000478		
total	7	0,008764			

Gráfico referente a regressão linear (eixo das abcissas expresso em log).

## Estabilidade à Temperatura

### regressão linear



Teste de Tukey:

Para tratamentos:

$$\Delta 5\% = 6,83 (0,000478 / 2)^{1/2} = 0,105589 \text{ (d.m.s.)}$$

Para amostras:

$$\Delta 5\% = 4,50 (0,000478 / 4)^{1/2} = 0,049192 \text{ (d.m.s.)}$$

## Diferença entre tratamentos:

	25°C	50°C	75°C	100°C
	0,000939	0,003980	0,025980	0,076478
25°C	-	0,003041	0,025041	0,075539
50°C		-	0,022000	0,072498
75°C			-	0,050498
100°C				-

## Diferença entre amostras:

	comercial	laboratório
	0,028142	0,025546
comercial	-	0,002596
laboratório		-

## ANEXO E

## Estabilidade a pH

## Resultados de estabilidade - medidas de absorvância

	pH	tempo 0	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4	tempo 5	tempo 6
labora- tório	2	0,9774	1,0108	1,0049	0,9985	0,9908	1,0116	1,0036
	3	0,7803	0,7428	0,7295	0,7219	0,7168	0,7313	0,7292
	4	0,9335	0,8166	0,7579	0,7359	0,7243	0,7344	0,7333
	5	1,0947	0,9486	0,8665	0,8253	0,8086	0,8113	0,8111
	6	1,2937	1,2331	1,1537	1,1275	1,1041	1,0896	1,0747
	7	1,6105	1,4199	1,6172	1,6167	1,6057	1,6226	1,6222
	8	1,5664	1,5831	1,5752	1,5749	1,5730	1,5938	1,5800
	comer- cial	2	0,9688	0,9789	0,9678	0,9636	0,9638	1,0569
3		0,8698	0,8367	0,8118	0,8215	0,8107	0,9400	0,8295
4		1,0621	0,9257	0,8680	0,8532	0,8483	0,9354	0,8455
5		1,1241	0,9914	0,9235	0,8962	0,8904	0,8885	0,8685
6		1,4926	1,6310	1,3673	1,3510	1,3197	1,3235	1,3087
7		1,5439	1,5462	1,5371	1,5371	1,5334	1,5499	1,5478
8		1,5934	1,5990	1,6030	1,5978	1,5949	1,6115	1,6055

\* medidas em nm

## Análise de variância

	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	soma
comercial	0,00052	0,00048	0,00126	0,00146	0,00061	0,00008	0,00002	0,00474
laboratório	0,00017	0,00048	0,00144	0,00175	0,00117	0,00012	0,00008	0,00521
<b>soma</b>	<b>0,00069</b>	<b>0,00096</b>	<b>0,00270</b>	<b>0,00321</b>	<b>0,00208</b>	<b>0,00020</b>	<b>0,00010</b>	<b>0,00995</b>

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F <sub>calculado</sub>	F <sub>5%</sub>
tratamento	6	0,000005	0,000001	21,31	4,28
amostra	1	$1,644 \cdot 10^{-8}$	$1,644 \cdot 10^{-8}$	0,42	
resíduo	6	$(2,346 \cdot 10^{-7})$	$(3,91 \cdot 10^{-8})$		
total	13	0,000005			

Teste de Tukey:

Para tratamentos:

$$\Delta 5\% = 5,89 \left( (3,91 \cdot 10^{-8}) / 2 \right)^{1/2} = 0,000824 \text{ (d.m.s.)}$$

Para amostras:

$$\Delta 5\% = 3,46 \left( (3,91 \cdot 10^{-8}) / 7 \right)^{1/2} = 0,000259 \text{ (d.m.s.)}$$

Diferença entre tratamentos:

	2	3	4	5	6	7	8
	0,00034	0,00048	0,00135	0,00161	0,00104	0,00010	0,00005
2	-	0,00013	0,00100	0,00126	0,00069	0,00024	0,00029
3		-	0,00130	0,00112	0,00056	0,00038	0,00043
4			-	0,00026	0,00031	0,00125	0,00130
5				-	0,00056	0,00150	0,00155
6					-	0,00094	0,00099
7						-	0,00005
8							-

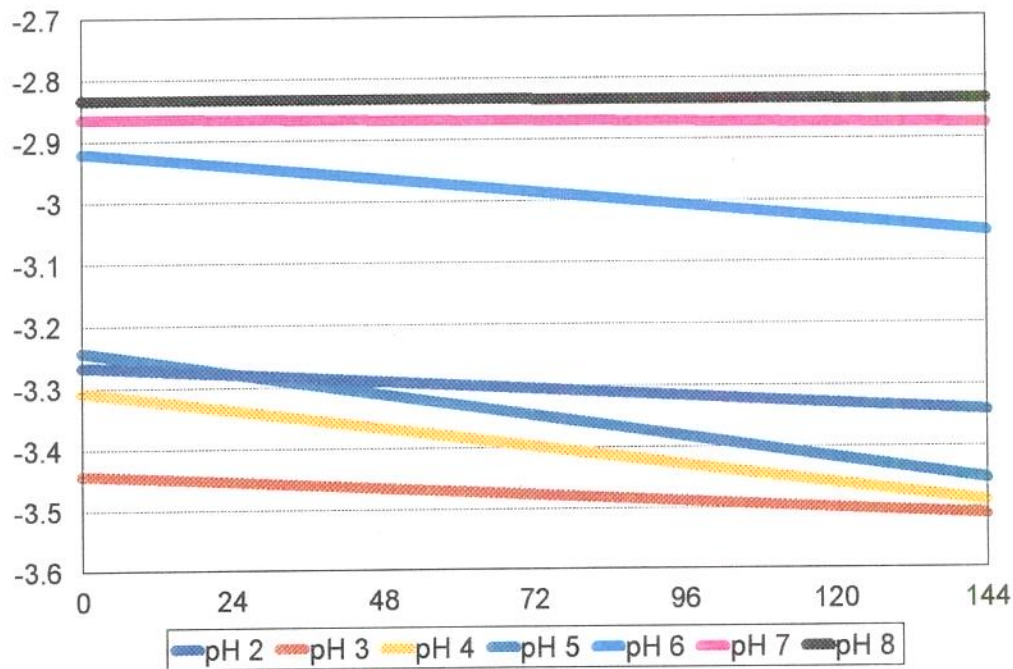
Diferença entre amostras:

	comercial	laboratório
	0,000677	0,000745
comercial	-	0,000068
laboratório		-

Gráficos referentes a regressão linear (eixo das abcissas expresso em log)

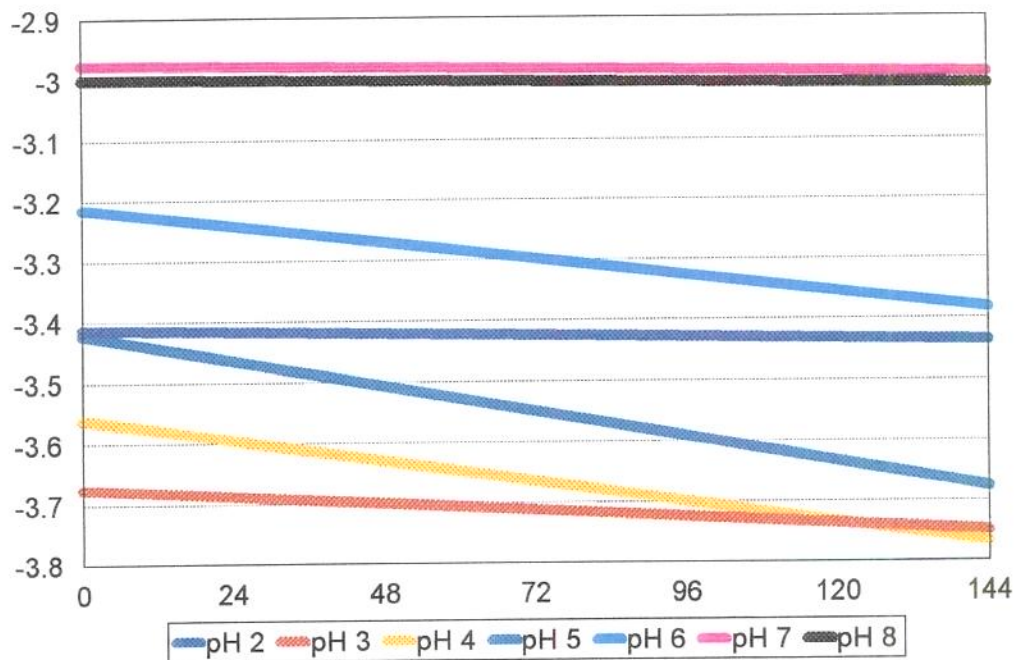
## Estabilidade ao pH

### regressão linear - carmim comercial



## Estabilidade ao pH

### regressão linear - carmim laboratório





## ANEXO F

Anova dos 5 sais estudados em relação aos rendimentos em peso

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F <sub>calc.</sub>	F <sub>5%</sub>
sais	4	1.742,17	435,54	1,82 <sup>n.s.</sup>	2,71
ensaios	7	5.092,56	727,51	3,04 <sup>*</sup>	2,36
resíduo	28	6.697,35	239,19		
total	39	13.532,08			

onde:

C.V.: causas de variação

G.L.: graus de liberdade

S.Q.: soma dos quadrados

Q.M.: quadrados médios

<sup>n.s.</sup>: não significativo ao nível de 5%<sup>\*</sup>: significativo ao nível de 5%

Teste de Tukey para os ensaios:

$$\Delta 5\% = 4,64 (239,19 / 5)^{1/2} = 32,09$$

Diferença entre ensaios do Planejamento Experimental - Estudo dos Sais

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8
	43,49	14,33	35,28	24,39	35,02	22,32	46,74	46,23
1	-	29,16	8,21	19,10	8,47	21,17	3,25	2,74
2		-	20,95	10,06	20,69	7,99	32,41 <sup>*</sup>	31,90
3			-	10,89	0,26	12,96	11,46	10,95
4				-	10,63	2,07	22,35	21,84
5					-	12,70	11,72	11,21
6						-	24,42	23,91
7							-	0,51

## Anova dos 5 sais estudados em relação ao teor de ácido carmínico

<b>C.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F<sub>calc.</sub></b>	<b>F<sup>5%</sup></b>
<b>sais</b>	4	892,00	223,00	1,04 <sup>n.s.</sup>	2,71
<b>ensaios</b>	7	2.509,98	358,57	1,68 <sup>n.s.*</sup>	2,36
<b>resíduo</b>	28	5.980,86	213,60		
<b>total</b>	39	9.382,84			

onde:

C.V.: causas de variação

G.L.: graus de liberdade

S.Q.: soma dos quadrados

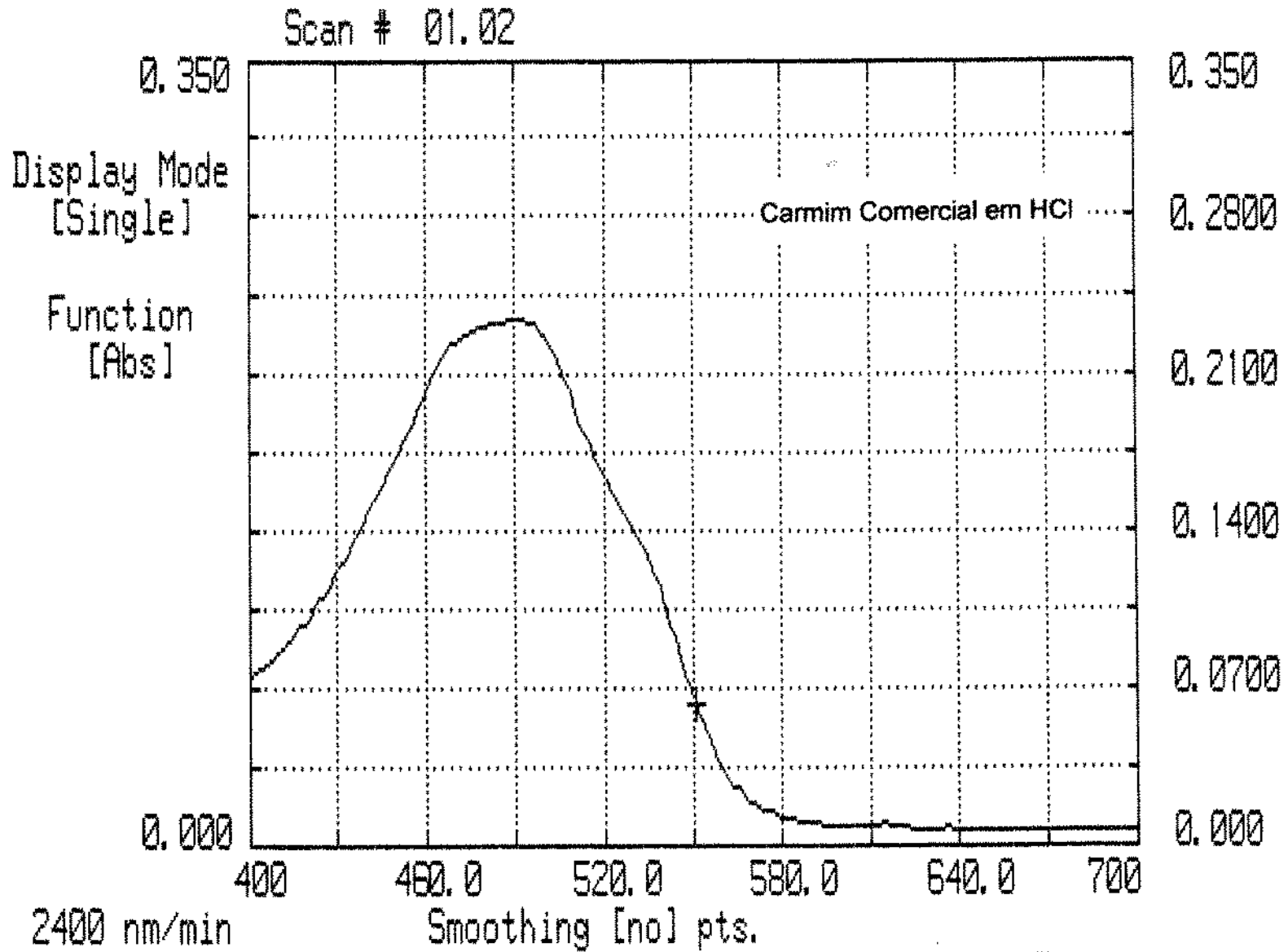
Q.M.: quadrados médios

<sup>n.s.</sup>: não significativo ao nível de 5%

\* : significativo ao nível de 5%

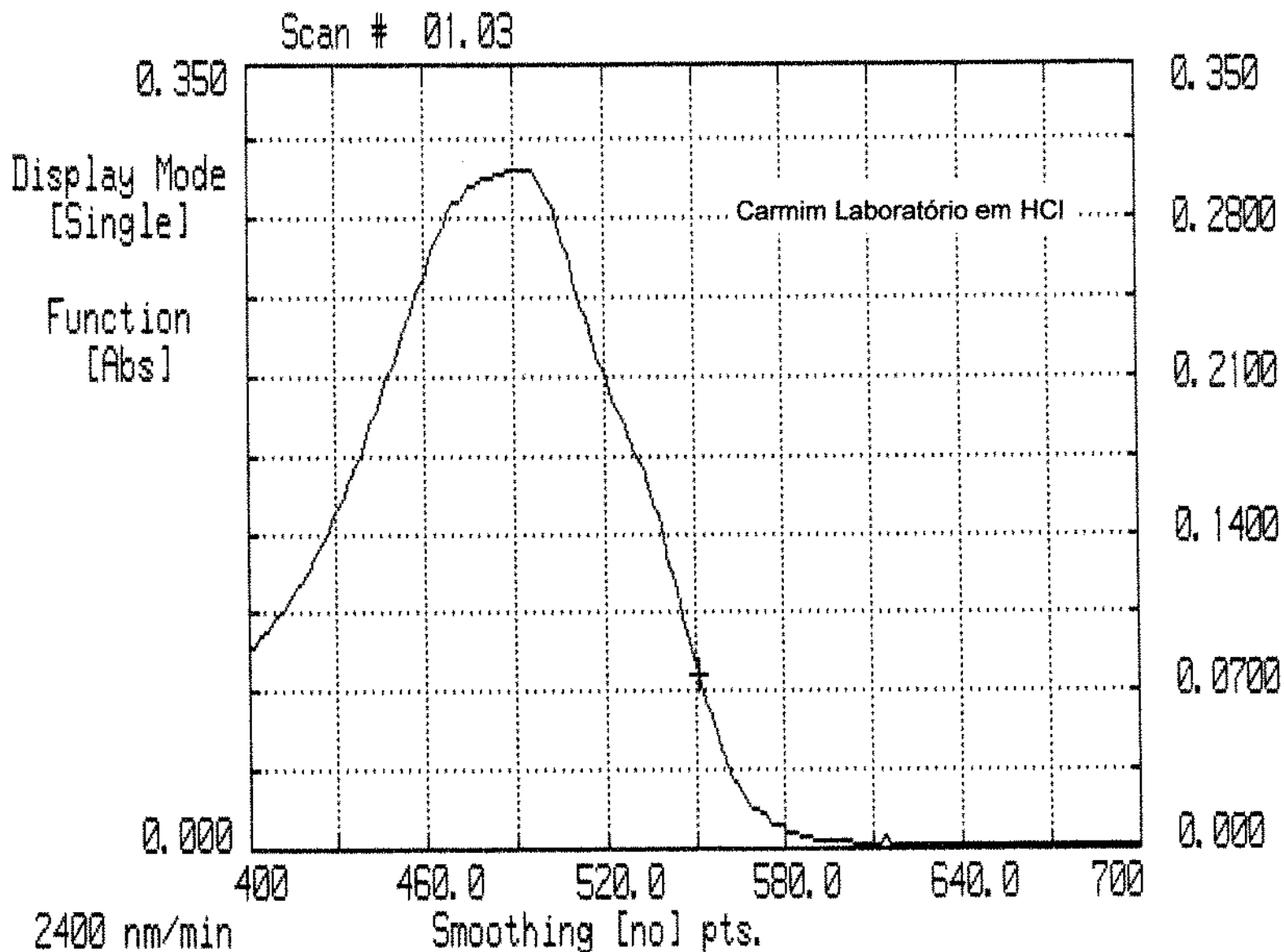
ANEXO G

Espectros de varredura do carmim



λ ABS SOURCE 21:03  
700.0 0.0044 Visible 15/08/96

TRACE  
λ ABS  
550.00 0.0634

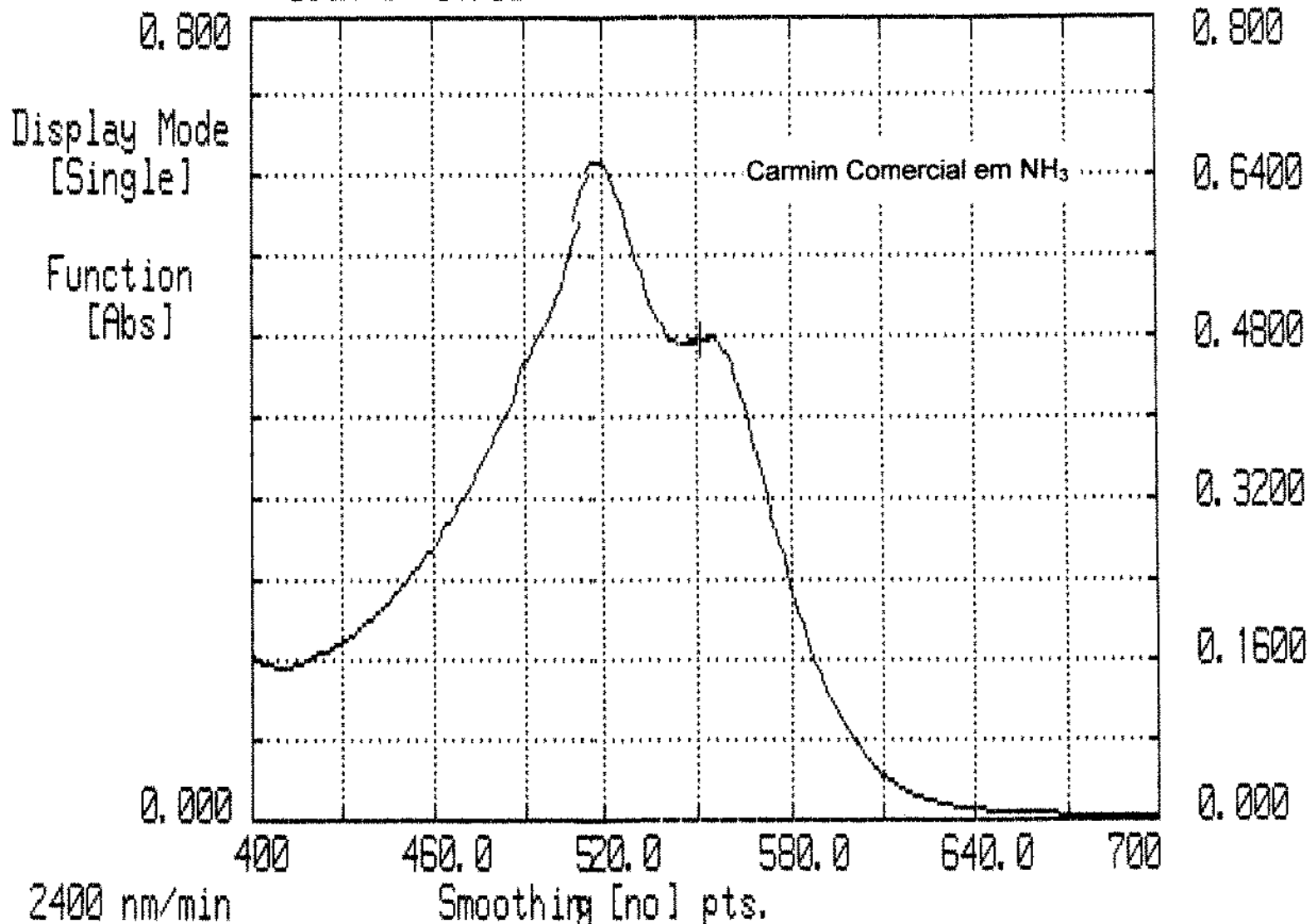


TRACE

$\lambda$	ABS	SOURCE	21:06	$\lambda$	ABS
700.0	-0.0008	Visible	15/08/96	550.00	0.0772

Scan # 01.03

99

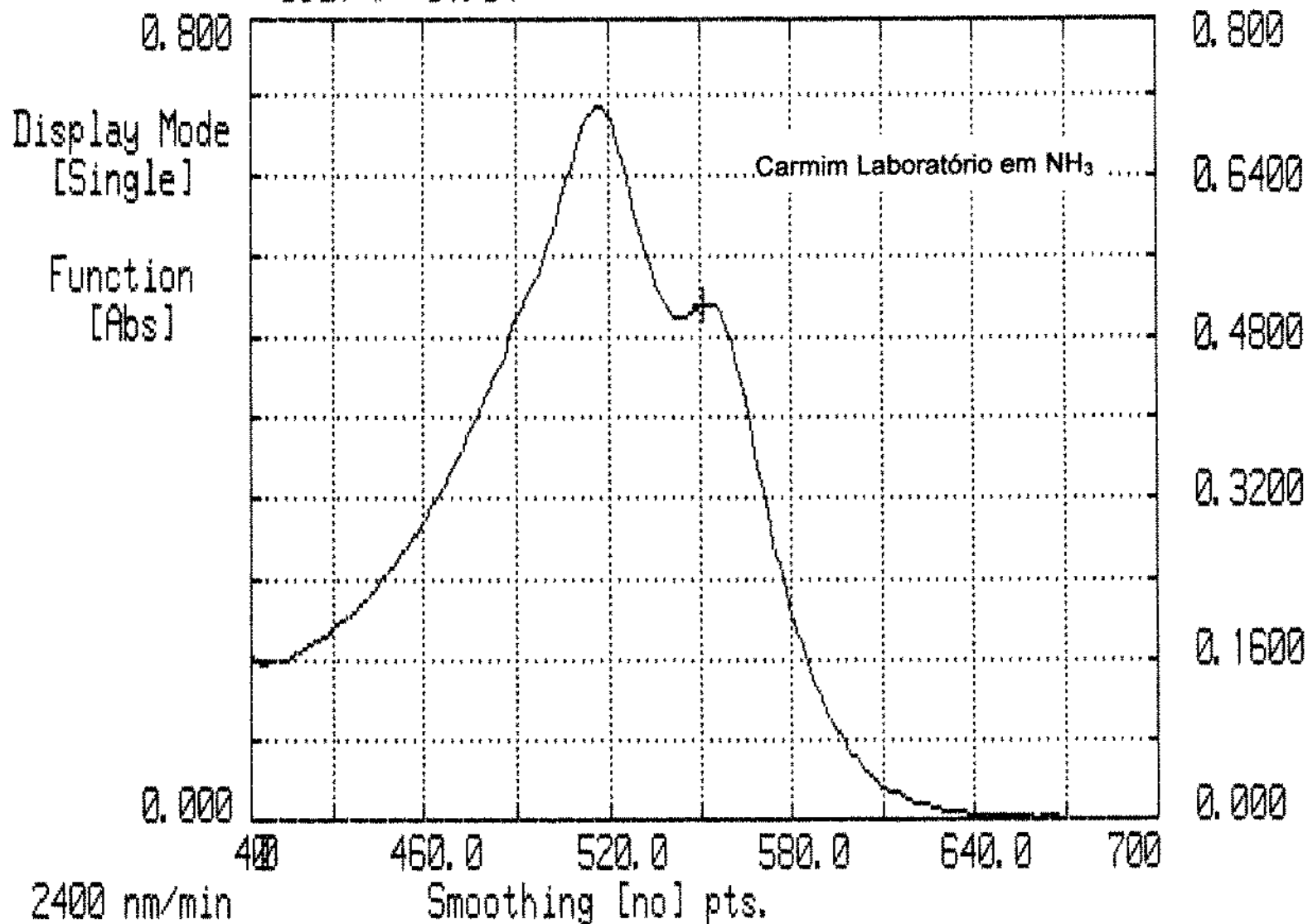


---

TRACE

$\lambda$	ABS	SOURCE	2055	$\lambda$	ABS
700.0	0.0021	Visible	15/09/96	550.00	0.4780

Scan # 01.04



λ ABS SOURCE 20:58  
700.0 -0.004 Visible 15/08/96

TRACE

λ ABS  
550.00 0.5135

## ANEXO H

**TABELA I - ADITIVOS INTENCIONAIS POR CLASSE FUNCIONAL**  
*Atualizada pela ABIA ate 15-de marco de 1990*

## CORANTES

ADITIVO	CODIGO DE ROTULAGEM	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO g/100g - g/100ml
CORANTE CARAMELO	C.V	Aguardente composta	q.s.p.
		Aguardente de cana envelhecida	q.s.p.
		Alimentos processados a base de cereais	q.s.p.
		Amargos e aperitivos	q.s.p.
		Balas, caramelos e similares	q.s.p.
		Batidas	q.s.p.
		Bebida alcoolica de gengibre	q.s.p.
		Bebida alcoolica de jurubeba	q.s.p.
		Bebidas alcoolicas mistas	q.s.p.
		Biscoitos e similares	q.s.p.
		Cereais processados industrialmente	q.s.p.
		Cervejas	q.s.p.
		Coberturas e pos para cobertura de bolos	q.s.p.
		Coberturas e xaropes para gelados comestiveis e sobremesas	q.s.p.
		Condimentos preparados	q.s.p.
		Conhaque	q.s.p.
		Cooler	q.s.p.
		Gelados comestiveis	q.s.p.
		Geleias	q.s.p.
		Gomas de mascar	q.s.p.
		Iogurtes aromatizados	q.s.p.
		Leites aromatizados	q.s.p.
		Leites gelificados	q.s.p.
		Licores	q.s.p.
		Mistelas compostas	q.s.p.
		Molhos para conservas de carne	q.s.p.
		Preparados solidos e liquidos para refrescos e refrigerantes	q.s.p.
		Produtos a base de proteina de soja texturizada (exceto a ser utilizada em produtos carneos)	q.s.p.
		Produtos de confeitaria	q.s.p.
		Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,01
		Proteina texturizada de soja	q.s.p.
		Recheios de bombons e similares	q.s.p.
		Recheios e revestimentos de biscoitos e produtos de confeitaria (com excecao dos recheios de cremes com ovos)	q.s.p.
		Refrescos e refrigerantes	q.s.p.
		Rum	q.s.p.
		Sangria	q.s.p.
		Sobremesas e pos para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	q.s.p.
		Sopas e caldos concentrados	q.s.p.
		Uisque	q.s.p.
		Vinhos compostos	q.s.p.
		Vinhos licorosos	q.s.p.
		Xaropes para refrescos	q.s.p.
		CORANTES ARTIFICIAIS: AMARELO CREPUSCULO FCF, AZUL BRILHANTE FCF, BORDEAUX S OU AMARANTO, ERITROSINA, INDIGOTINA, PONCEAU 4R, TARTRAZINA, VERMELHO 40. (N)	C.II
Balas, caramelos e similares	0,01		
Cerejas em calda (somente para reconstituicao da cor)	0,01		
Coberturas e xaropes para gelados comestiveis e sobremesas	0,01		
Gelados comestiveis	0,01		
Geleia de cereja	0,01		

**TABELA I - ADITIVOS INTENCIONAIS POR CLASSE FUNCIONAL**  
*Atualizada pela ABIA ate 15 de marco de 1990*

## CORANTES

ADITIVO	CODIGO DE ROTULAGEM	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO g/100g - g/100ml
CORANTES ARTIFICIAIS: AMARELO CREPUSCULO FCF, AZUL BRILHANTE FCF, BORDEAUX S OU AMARANTO, ERITROSINA, INDIGOTINA, PONCEAU 4R, TARTRAZINA, VERMELHO 40 (#) (continuacao)	C.II	Gomas de mascar	0,01
		Iogurtes aromatizados	0,01
		Leites aromatizados	0,005
		Leites fermentados aromatizados	0,005
		Leites gelificados aromatizados	0,005
		Licores	0,01
		Preparados liquidos ou solidos para refrescos e refrigerantes	0,01 no p.s.c.
		Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingrediente para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,01
		Queijos - fuccina ou magenta somente na crosta dos tipos consagrados	0,01
		Recheios de bombons e similares	0,01
		Recheios de chocolates	0,01
		Recheios e revestimentos de produtos de confeitaria, biscoitos e similares (com excecao dos recheios de cremes com ovos)	0,01
		Refrescos e refrigerantes	0,01
Sobremesas e pos para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,01 no p.s.c.		
Xaropes para refrescos	0,01 no p.s.c.		
ERITROSINA (#)	C.II	Proteina de soja texturizada (quando utilizada em produtos de salsicharia)	0,01 calculada sobre o peso da proteina antes da reidratacao
CORANTES INORGANICOS: ALUMINIO, CARBONATO DE CALCIO, DIOXIDO DE TITANIO, OXIDOS E HIDROXIDOS DE FERRO, OURO E PRATA (#)	C.IV	Drageas, confeitos e similares (somente para revestimento)	q.s.p.
		Preparados solidos para refrescos refrigerantes (dioxido de titanio)	q.s.p.
CORANTES NATURAIS - CORANTES SINTETICOS IDENTICOS AOS NATURAIS (vide anexo III)	C.I C.III	Alimentos processados a base de cereais	q.s.p.
		Amargos e aperitivos (somente corantes naturais)	q.s.p.
		Balas, caramelos e similares	q.s.p.
		Batidas (somente corantes naturais)	q.s.p.
		Cerejas em calda (somente para reconstituicao da cor perdida durante o processamento)	q.s.p.
		Cobertura de bolos, pos para cobertura de bolos	q.s.p.
		Coberturas e xaropes para gelados comestiveis e sobremesas	q.s.p.
		Cooler	q.s.p.
		Creme vegetal	q.s.p.
		Gelados comestiveis	q.s.p.
		Geleias	0,02
		Gomas de mascar	q.s.p.
		Gorduras e compostos gordurosos	q.s.p.
		Iogurtes aromatizados	q.s.p.
		Leites aromatizados	q.s.p.
		Leites gelificados aromatizados	q.s.p.
		Licores	q.s.p.



## ANEXO III

## CORANTES DE USO PERMITIDO EM ALIMENTOS E BEBIDAS

Atualizado pela ABIA ate 15 de marco de 1990

CORANTE NATURAL

- Acafrão
- Acido carminico
- Antocianinas
- Cacau
- Carmim
- Carotenoides:
  - . Alfa caroteno
  - . Beta caroteno
  - . Bixina
  - . Capsantina
  - . Capsorubina
  - . Gama caroteno
  - . Licopeno
  - . Norbixina
- Carvão
- Clorofila:
  - . Clorofila cuprica
  - . Sal de amonio de clorofilina cuprica
  - . Sal de potassio de clorofilina cuprica
  - . Sal de sodio de clorofilina cuprica
- Conchonilha
- Curcuma, Curcumina
- Hemoglobina
- Indigo
- Paprika
- Riboflavina
- Urzela:
  - . Orceinas
  - . Orceina sulfonada
- Urucu
- Vermelho de beterraba
- Xantofilas:
  - . Cantaxantina
  - . Criptoxantina
  - . Flavoxantina
  - . Luteina
  - . Rodoxantina
  - . Rubixantina
  - . Violaxantina

CORANTES SINTETICOS IDENTICOS AOS NATURAIS

- Beta caroteno
- Beta-apo-8'-carotenal
- Ester etilico do acido beta-apo-8'-carotenico
- Riboflavina
- Riboflavina 5 - (fosfato de sodio)
- Xantofilas:
  - . Cantaxantina
  - . Criptoxantina
  - . Flavoxantina
  - . Luteina
  - . Rodoxantina
  - . Rubixantina
  - . Violaxantina

CORANTE CARAMELO

- Caramelos

CORANTES ARTIFICIAIS

Color Index 1971

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| - Amarelo crepusculo FCF  | 15.985 |
| - Azul brilhante FCF      | 42.090 |
| - Bordeaux S ou amarantho | 16.185 |
| - Eritrosina              | 45.430 |
| - Indigotina              | 73.015 |
| - Ponceau 4R              | 16.255 |
| - Tartrazina              | 19.140 |
| - Vermelho 40             | 16.035 |

CORANTES INORGANICOS

- |                                |        |
|--------------------------------|--------|
| - Alumínio                     | 77.000 |
| - Carbonato de calcio          | 77.220 |
| - Dioxido de titanio           | 77.891 |
| - Ouro                         | 77.480 |
| - Oxidos e hidroxidos de ferro | -      |
| - Prata                        | -      |

## ERRATA

Página			onde lê-se:	leia-se:
x	Resumo	3º § 8ª linha	A temperatura	O pH
x	Resumo	3º § 9ª linha	o pH	a temperatura
xi	Abstract	3º § 8ª linha	The temperature	The pH
xi	Abstract	3º § 9ª linha	the pH	the temperature
2	última linha da Tabela 1		70455	704455
4	3º § 7ª linha		apesam	pesam
6	3º § 2ª linha		classificam	classifiquem
7	2º § 1ª linha		Este	Estes
12	3º § 2ª linha		ebulicão	ebulição
13	5º § 2ª linha		determina	determinam