



Z
20

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL
COLORANTE DE LA COCHINILLA
(*Dactylopius Coccus Costa*) Y SU
APLICACION EN ALIMENTOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A N
GARCIA CASANOVA ZORAYDA
ZARAGOZA SANTAMARIA NORMA LAURA

Director de Tesis: Dr. Pedro Valle Vega

A s e s o r: Dra Sara Esther Valdés Martínez



Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION

CAPITULO I ANTECEDENTES

1.1	Colorantes	4
1.2	Importancia del color en alimentos	8
1.3	Legislación	11
1.4	Aspectos perjudiciales de los colorantes sintéticos	12
1.5	Historia	15
1.6	Aspectos biológicos de la cochinilla (<u>Dactylopius Coccus Costa</u>)	19
1.7	Método de obtención	22

1.8	Cochinilla, ácido carminico y carmin.	25
1.9	Química del ácido carminico	26

CAPITULO II METODOLOGIA

2.1	Objetivos	35
2.2	Cuadro metodológico	36
2.3	Obtención de la muestra	37
2.4	Espectro de absorbancia en la región ultravioleta, visible e infrarrojo	37
2.5	Determinación del pH óptimo de solubilidad en laca de ácido carminico	38
2.6	Determinación de la estabilidad del colorante de la cochinilla (<u>Dactylopius Coccus Costa</u>)	39
2.6.1	Efecto de la temperatura	39
2.6.2	Efecto de luz y aire en la estabilidad	

	del colorante de la cochinilla	45
2.7	Aplicación del colorante de la cochinilla como realizador de color en un producto cárnico	52
2.7.1	Adición del colorante	53
2.7.2	Concentración óptima de colorante	53
2.7.3	Evaluación sensorial del producto obtenido	56
2.7.4	Comparación con respecto a costos de un colorante sintético y la laca de cochinilla	57

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

3.2	Espectro de absorbanca	58
3.3	pH óptimo de solubilidad en laca	65
3.4	Estabilidad del colorante de la cochinilla	68

3.4.1	Efecto de la temperatura	68
3.4.2	Efecto de luz y aire	79
3.5	Aplicación del colorante como realizador de color en un producto cárnico	84
3.5.1	Adición del colorante	84
3.5.2	Concentración óptima del colorante	86
3.5.3	Comparación con respecto a costos de un colorante sintético y la laca de cochinilla	86
CAPITULO IV CONCLUSIONES			89
BIBLIOGRAFIA			93

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

1.- Método de obtención del pigmento (Extracto acuoso) y la laca de aluminio del ácido carmínico.	23
2.- Estructura química recientemente aceptada para el ácido carmínico	28
3.- Estructura sugerida para el complejo carmin-metal	31
4.- Estructura sugerida para el complejo ácido carmínico-aluminio	32
5.- Representación gráfica de una reacción de primer orden	42
6.- Representación gráfica de energía de activación	43
7.- Representación gráfica de valor D_0 .	46
8.- Representación gráfica de valor Z_0 .	47
9.- Cámara oscura	49
10.- Campana de inyección de nitrógeno	50

11.- Espectro de absorbancia para laca, región ultravioleta	59
12.- Espectro de absorbancia para pigmento, región ultravioleta	60
13.- Espectro de absorbancia para laca en la región visible.	61
14.- Espectro de absorbancia para pigmento en la región visible.	62
15.- Espectro de transmitancia para laca en la región infrarrojo	63
16.- Espectro de transmitancia para pigmento en la región infrarrojo.	6 4
17.- pH de solubilidad para laca de ácido carminico.	66
18.- pH de solubilidad para pigmento de ácido carminico.	67
19.- Efecto de la temperatura (21-50°C) en la estabilidad de laca de ácido carminico	72
19A- Efecto de la temperatura (60-90°C) en la estabilidad de laca de ácido carminico.	73
20.- Efecto de la temperatura en la estabilidad de pigmento de ácido carminico.	76
21.- Comparación de valor Z entre laca y pigmento de ácido	78

carminico.

22.- Efecto de luz y aire en la estabilidad de laca de ácido
carminico

80

23.- Efecto de luz y aire en la estabilidad de pigmento de ácido
carminico.

82

INDICE DE CUADROS

INDICE DE CUADROS

NUM. DE CUADRO	T I T U L O	
1	Clasificación de colorantes naturales para alimentos	5
2	Diferencias entre las propiedades de lacas y pigmentos	7
3	Especificaciones químicas para extracto de cochinilla según FDA.	13
4	Especificaciones químicas para laca de cochinilla según FDA.	14
5	Análisis de aminoácidos para carmines solubles comerciales.	33
6	Intervalo de tiempo para lecturas de absorbancia en soluciones de laca para efecto de la temperatura.	40
7	Intervalos de tiempo para lecturas de absorbancia en	

	soluciones de pigmentos para efecto de luz y aire	51
8	Diagrama del proceso de elaboración del prototipo jamón.	55
10	Energía de activación para laca de ácido carminico	69
11	Energía de activación para pigmento de ácido carminico	70
12	Efecto de la temperatura en muestras de laca de ácido carminico	74
13	Efecto de la temperatura en muestras de pigmento de ácido carminico	77
14	Efecto de luz y aire en laca de ácido carminico	81
15	Efecto de luz y aire en pigmento de ácido carminico	83
16	pH en las diferentes etapas de preparación de la salmuera.	85
17	Resultados de los análisis estadísticos.	17

I N T R O D U C C I O N

Los colorantes en los alimentos, son usados en concentraciones muy pequeñas, pero juegan un papel muy importante en la aceptación de los mismos.

Los colorantes certificados, tienen reglamentadas concentraciones máximas de uso, son producidos por síntesis química, son de alta pureza. Por ser certificados, requieren de la aprobación de la Secretaría de Salud. Los estudios toxicológicos realizados, a menudo, ponen en evidencia la necesidad de prohibir la utilización de algunos colorantes sintéticos en alimentos, por ser éstos nocivos para la salud.

(12)

Los colorantes no certificados, son los colorantes naturales, que pueden ser obtenidos de vegetales, animales o minerales y se encuentran exentos de certificación, debido a que no se han encontrado indicios de que provoquen daños a la salud.

El rojo carmín (Laca de aluminio del ácido carminico), es un colorante natural que presenta un gran potencial como alternativa para sustituir a colorantes rojos certificados que han sido prohibidos como aditivos en alimentos.

El ácido carmínico se obtiene del insecto femenino Dactylopius Coccus Costa o Cochinilla, que se encuentra como parásito en las partes aéreas del cactus *Opuntia*. El colorante es extraído del insecto justo antes de ovopositar, ya que en este momento el colorante puede constituir hasta un 22% del peso seco del insecto. Se necesitan aproximadamente de 80,000 a 100,000 insectos para extraer un kilogramo de cochinilla.

Históricamente el pigmento se extraía con agua caliente y se denominaba extracto de cochinilla, en los últimos años se dan tratamientos con proteasas, así como diversas purificaciones de los que se obtienen colorantes conocidos como carmines, mucho más estables y potentes que el extracto puro.

Probablemente el origen del insecto fue México, siendo uno de los principales productores durante los siglos X-XV, su uso se vio desplazado por el auge de los colorantes sintéticos, que son más accesibles tanto en proceso de obtención como en costo.

La restricción de uso de colorantes sintéticos debido a problemas de toxicidad, se presenta con mayor severidad en los colorantes rojos, lo cual ha hecho que renazca el interés por los colorantes naturales. Por lo anterior, la demanda de rojo carmín ha aumentado y se hace necesario conocer su estabilidad en diferentes condiciones para saber su potencial

de aplicación en alimentos. El presente trabajo se enfocó, por lo tanto, al estudio de la estabilidad del rojo carmín en sus dos presentaciones (Pigmento y Laca), con respecto a las variables pH, T°, luz y aire, así como una aplicación en un prototipo jamón.

CAPITULO 1 ANTECEDENTES

1.1 COLORANTES:

Los colorantes son todas aquellas sustancias que se fijan sobre otras proporcionando color y presentan cierta estabilidad. Los colorantes utilizados en alimentos se dividen en naturales y sintéticos.

- Los colorantes sintéticos son producidos por síntesis química y presentan alta pureza. Para ser certificados requieren, de la aprobación de la Secretaría de Salud. A su vez, se subdividen en pigmentos y lacas (Cuando se los ha derivado en presencia de un metal).
- Los colorantes naturales pueden ser obtenidos de vegetales, animales o minerales, debido a que se consideran relativamente inocuos están exentos de certificación.
- Los colorantes naturales a su vez, pueden ser de varios tipos de acuerdo a su origen, en el cuadro N° 1 se presenta esta clasificación.

De manera muy general, podemos considerar dos formas comerciales de un colorante: Pigmento o Laca.

CUADRO No. 1:

CLASIFICACION DE COLORANTES NATURALES PARA ALIMENTOS

<u>ORGANICOS</u>	<u>VEGETALES</u>	<u>ANTOCIANINAS</u> Malvidina, Peonidina, Petunidina, Cianidina, Delfinidina, etc. <u>BETALAINAS</u> Betacianinas, Betaxantinas. <u>CAROTENOIDES</u> Caroteno, Licopeno, Xantofilas, Apocarotenal, Cantaxantina, Dixina. <u>CLOROFILA</u> A. B. C., etc. <u>FLAUONOIDES</u> Kaempferoles, Mercitina, Taninos, Mercitina, etc.
	<u>ANIMALES</u>	Acido Carminico Acido Carmésico Antroquinoides
	<u>MISCELANEOS</u>	<u>IRIDOIDES</u> Monasco rubina, monascina, etc. Bióxido de titanio Azul ultramarino Acido de Hierro Negro carbon
<u>INORGANICOS</u>		
<u>MINERALES</u>		

Santos, F. (1981) Los colorantes en la Industria Alimentaria

Un pigmento es un compuesto hidrosoluble y manifiesta su poder tintorio al ser disuelto en agua, puede tener diferentes presentaciones comerciales cuya concentración varia alrededor del 90%, entre las más importantes se encuentran: Gránulos, líquidos, mezclas o combinaciones opacas, pastas. Cada forma tiene las especificaciones necesarias para su uso, así como sus ventajas y desventajas. Cada aplicación requiere una presentación especial, por ejemplo: Los polvos o gránulos son usados para bebidas, las pastas para productos horneados y los colores líquidos para los productos lácteos, etc.

Las lacas son los pigmentos solubles en solventes orgánicos, tratados generalmente en un sustrato de alumina hidratada e imparten color por dispersión. Las lacas están disponibles en una gran variedad de colores y matices, el contenido de colorantes varia del 10 al 50%. La intensidad del color de una laca no es proporcional a la pureza o diferencia de un pigmento. En general, son usados en productos de alto contenido graso o en productos donde no hay suficiente humedad para disolver el colorante, como por ejemplo: Tabletas comprimidas, caramelo macizo, etc. Las lacas generalmente tienen mayor estabilidad química ante la luz y la temperatura, pero su costo es mayor. En el cuadro N° 2 se muestran las diferentes propiedades de lacas y pigmentos.

CUADRO No. 2'

DIFERENCIAS ENTRE LAS PROPIEDADES DE LACAS Y PIGMENTOS

<u>PROPIEDADES :</u>	<u>LACAS :</u>	<u>PIGMENTOS :</u>
1.- Solubilidad	Insoluble en la mayoría de los solventes.	Soluble en agua Propilenglicol.
2.- Método de coloración	Por dispersión.	Por disolución.
3.- Contenido de colorante puro	Del 18 al 48 %.	Colores primarios del 98 al 99 %.
4.- Rango de uso	0.1 - 0.3 %	0.01 - 0.03 %
5.- Tamaño de partícula	Aproximada 5.	Malla 12 a 200.
6.- Estabilidad con respecto a: LUZ CALOR	Superior. Superior.	Buena. Buena.
7.- Poder de tinción	No proporcional al contenido de colorante puro.	Proporcional al contenido de colorante puro.
8.- Matiz	Varía con el contenido de colorante puro.	Constante

Dziedzic, D. J. (1967) Applications of Food Colorantes, Food Technology (11).

1.2 IMPORTANCIA DEL COLOR EN ALIMENTOS

El color de un alimento es sin duda una propiedad importante en cuanto a la aceptación o rechazo por parte del consumidor, pues el color y la apariencia general son el primer contacto con los alimentos. Dado que los alimentos procesados pueden perder su color, o requieren un color determinado con el cual el consumidor los identifica, es indispensable la utilización de aditivos conocidos como colorantes, ya sea para aumentar el color existente o dar una coloración determinada.

Algunos estudios han mostrado que los alimentos no gustan cuando no están bien coloreados. La apariencia de un alimento afecta nuestras percepciones de olor, sabor y textura. Esto fue demostrado en un estudio hecho por Hall en 1958, quien encontró una relación directa entre la asociación del sabor con el color del producto presentado, concluyendo que:

- a).- El color de un producto influye en la impresión del consumidor, con respecto al sabor.
- b).- El color no solamente influye en la habilidad del consumidor para identificar sabor, sino también en su estimación de calidad.

Los colorantes pueden ser adicionados a los alimentos por las siguientes razones: (42).

- 1.- Para establecer la apariencia original del alimento cuando el color natural ha sido destruido por procesamiento con calor.
- 2.- Para garantizar uniformidad de color, por ejemplo: Frutas obtenidas en diferentes tiempos durante la estación, además proporcionando uniformidad en apariencia y estabilidad.
- 3.- Para intensificar colores naturales presentes en alimentos, cuando el color es más débil al que el consumidor asocia con un alimento de un tipo o sabor, por ejemplo: Yogurts de frutas, salsas y bebidas ligeras.
- 4.- Para ayudar a proteger las vitaminas de la sensibilidad a la luz, durante vida de almacenamiento por un efecto solar.
- 5.- Para dar una apariencia atractiva a los alimentos, los cuales pueden observarse poco atractivos o inapetecibles.
- 6.- Para ayudar a preservar la identificación o características por los cuales los alimentos son reconocidos.
- 7.- Para servir como una indicación visual de calidad.
- 8.- Para realizar la presentación de los alimentos.

Es muy importante que un producto en el mercado presente el color esperado y para que un colorante pueda ser adicionado a un alimento, debe poseer ciertas características las cuales son: (41)

- * No ser tóxicas para los seres humanos en los niveles utilizados.
- * Ser inodoro e insaboro, para no modificar las características del producto en que se usan.
- * Debe presentar estabilidad aceptable a luz, pH, oxidación, reducción y actividad microbiana.
- * Debe ser compatible, al menos con algún componente del alimento.
- * No debe presentar problemas de reacción con algún componente del alimento en que se usa.
- * Tener poder tintóreo elevado.
- * Debe proporcionar un rango de tonos deseables.
- * Deben ser solubles en agua o presentar alta dispersibilidad.

Los colorantes naturales pueden aparecer como inadecuados en la aplicación en alimentos si los comparamos con los colorantes sintéticos en cuanto a estabilidad y poder tintóreo en general, pero en los últimos años, las investigaciones realizadas, han dejado ver propiedades superiores asociadas a los colorantes naturales en cuanto a aspectos tóxicos, químicos y tecnológicos.

1.3. LEGISLACION

La Secretaría de Salud, como órgano regulador y legislador en materia de alimentos y bebidas, en el Artículo 690 del Diario Oficial publicado el 18 de enero de 1988, define a un colorante como: 'La sustancia obtenida de los vegetales, animales o minerales, o por síntesis química para impartir o acentuar el color'. Reconoce 3 grupos de colorantes y menciona los colorantes permitidos para cada grupo:

I).- Colorantes orgánicos naturales: Aceite de Zanahoria, achiote, annato, azafrán, Beta-Apo-8-Carotenal, betabel deshidratado, Beta-Caroteno, Caramelo, Clorofilo, Cochinilla, Cúrcuma, Extracto de tegumento de uva, Harina de semilla de algodón cocida tostada y parcialmente desengrasada, Jugos de frutas, Jugos de vegetales, Pimiento, Pimiento oleo-resina, Riboflavina y Xantofilas.

II).- Colorantes orgánico sintéticos o colorantes artificiales para alimentos permitidos, son los siguientes: Amarillo # 5 (Tartrazina), Azul # 1 (Azul brillante F.C.F.), Azul # 2 (Indigotina), Rojo cítrico # 2 (Solo se permite para colorear la corteza de la naranja), Rojo # 3 (Eritrocina), Rojo # 40, Verde # 3 (Verde firme F.C.F.).

III).- Colorantes orgánico mineral permitidos son:
Gluconato ferroso, Dióxido de titanio respectivamente.

Es importante resaltar que ninguno de los colorantes que compone el grupo I tiene limite en su nivel de uso, a diferencia de los colorantes de los grupos II y III.

Hasta el momento la Secretaria de Salud no ha establecido normas de calidad que regulen el uso de colorantes naturales en alimentos, la cochinilla es uno de éstos, sin embargo en el manual de colorantes permitidos para alimentos en Estados Unidos, si menciona al extracto de cochinilla y al carmin, indicando las especificaciones que debe reunir, siendo éstas (29): (Cuadros # 3 y # 4)

1.4 ASPECTOS PERJUDICIALES DE LOS COLORANTES SINTETICOS

Existe la tendencia a examinar periodicamente, la toxicidad de los colorantes sintéticos que son permitidos actualmente como aditivos en alimentos. Se han prohibido algunos colorantes aceptados al principio y otros se hallan bajo control, debido a sus potenciales efectos peligrosos sobre la salud.

Hasta el momento no existe ninguna regla uniforme; válida

CUADRO No. 3

ESPECIFICACIONES QUÍMICAS PARA EXTRACTO DE COCHINILLA SEGUN FDA

pH (a 25 C) —————> 5-5.5

Proteína (N x 6.25) —————> 2.2 %

Sólidos totales —————> 5.7-6 %

Alcohol metílico —————> 150 ppm

Plomo (Como Pb) —————> 10 ppm

Arsénico (Como As) —————> 1 ppm

Acido carmínico —————> 1.8 % min.

Microorganismos

viables de

Salmonella —————> Ninguno

CUADRO No. 4

ESPECIFICACIONES QUÍMICAS PARA LACA DE COCHINILLA SEGUN FDA

Material volátil <135°C por 3 hrs.>	→	20 %
C E N I Z A	→	12 %
Plomo (Como Pb)	→	10 ppm
Arsénico (Como As)	→	1 ppm
Acido Carmínico	→	50 % min
Microorganismos viables de Salmonella	→	Ninguno

para todos los países, sobre cuales son los colorantes sintéticos que pueden considerarse inofensivos.

Las prescripciones varían según el colorante de que se trate. La cantidad diaria de amaranto para el hombre no debe de exceder de 1.5 mg/kg; de tartracina 7.5 mg/kg. La FDA prohibió en el primer trimestre de 1990 el rojo laca # 3 por causar problemas de cáncer en tiroides.

El que los colorantes se reabsorban poco constituye una ventaja, hay algunos de los que se eliminan por heces hasta un 98%. en el caso de los colorantes que se reabsorben es conveniente conocer e investigar los metabolitos y si pueden acumularse en el organismo a causa de una ingestión continuada (26).

ASPECTOS GENERALES SOBRE EL COLORANTE DE LA COCHINILLA

1.5 HISTORIA:

Desde la antigüedad, en el mundo mediterráneo se daba especial importancia a los colores púrpura y escarlata.

El tinte escarlata podía obtenerse de los insectos Margarodes Polinucos y Kermes Vermilio, originarios de el este de Europa y sur de Francia y España respectivamente.

Desde la antigüedad el ácido carminico se ha obtenido del insecto femenino Dactylopius Coccus Costa que se encuentra como parásito en las partes aéreas del cactus *Opuntia* y *Nopalea*. El colorante es extraído del insecto justo antes de ovopositar, ya que en este momento el colorante puede constituir, hasta un 22% del peso seco del insecto.

No se ha precisado con exactitud el origen de la cochinilla, algunos autores como Clavigero y Humboldt atribuyen su origen a la época del periodo Tolteca, aproximadamente durante el siglo X de nuestra era (24).

Se reconoce dos tipos de cochinilla: la fina y la silvestre.

La primera era cultivada para obtener el colorante y la silvestre aquella que crecía sin ser cultivada.

Las etapas del cultivo de la cochinilla en la época prehispánica eran: Plantar los nopales en terreno limpio, cercándolo para defensa del viento. Los nopales se conservaban con la mayor limpieza, evitando la invasión de otros insectos. Las plantas de nopal se desarrollaban cerca de año y medio. Bien maduros se les quitaban flores y frutos, para evitar la invasión de insectos extraños.

Se realizaba una selección de las hojas del nopal o pencas, principalmente del llamado nopal manso, que tiene un tinte

ceniciento, se dejaban secar un poco en un recinto cerrado y al fin se exponían al aire bajo un cobertizo de paja o zacate. Después de esto se depositaban los insectos pequeños, previamente preparados y con las hembras ya fecundadas. Esta operación tenía que ser continua durante el tiempo del cultivo; después de tres o cuatro meses se hacía la colecta de insectos, los cuales se sacrificaban por dos procedimientos:

- 1.- En una vasija con agua al fuego, se vaciaban ahí los insectos y se movían hasta que muriesen, para después secar y moler.
- 2.- Otro sistema era el de introducir los insectos en vasijas dentro de un baño de vapor, para que muriesen sin sumergirlos en agua, ya que parte del colorante se perdía en ella.

Ya secos los insectos se limpiaban de sustancias extrañas que podían haberse mezclado, se .enfundaban en telas, papeles o pieles muy delgadas, haciendo paquetes de diversos tamaños, nunca muy grandes, quedando así la sustancia colorante lista para transportación. Para hacer uso de este colorante bastaba diluir en agua caliente o en algún aceite los insectos previamente pulverizados. (1).

El colorante extraído de la cochinilla por los antiguos mexicanos, tuvo diversas aplicaciones entre las que destaca su utilización en alimentos como colorear tamales, utilizándose también en el teñido de trajes, mantas textiles, murales y códices entre otras (24).

Su importancia en la economía fue relevante ya que se usaba como un material muy preciado y era importante en el pago de tributos durante la época prehispánica (24).

Durante la época colonial los españoles llamaron a la cochinilla con los nombres de grana o cochinilla, tanto para referirse al insecto como al colorante.

En el año de 1523 llegó a España la noticia de que en América y específicamente en México, se producía la grana que era un colorante similar al Kermes pero con rendimientos muy superiores.

La grana fina se producía en un territorio comprendido en lo que ahora es Guerrero, Tlaxcala y parte de Oaxaca, pero su comercio abarcó terrenos mucho mayores.

Desde el siglo XVI, los españoles hicieron que se incrementara notablemente la producción de la grana e introdujeron el cultivo a nuevas zonas de México y a otros países como Honduras, pero sin obtener éxito. Se supone que

la cochinilla cultivada se llevó a Cádiz y de ahí a las Islas Canarias durante los años de 1824-1827, siendo en éstas últimas donde el cultivo proliferó notablemente.

Las exportaciones intensas de la cochinilla en regiones más extensas, propiciaron el desarrollo de plagas en el nopal, y en el insecto, además el cultivo de maíz y otras plantas alimenticias lo que fue desplazando el cultivo de la cochinilla. La exportación de este cultivo vino en decaimiento llegando a su menor actividad entre los años de 1805-1818, que corresponden a los años anteriores y posteriores a la Guerra de Independencia.

A partir de la Guerra de Independencia se tuvo libertad para el cultivo de la cochinilla por lo que se originó la competencia entre los diferentes países productores y los precios del colorante fueron declinando. Los colorantes sintéticos empezaron a hacer su aparición en el mercado en 1884, a muy bajo costo en comparación con la cochinilla, causando el desplazamiento de este producto a nivel mundial.

Sin embargo, en los últimos años, el colorante de la cochinilla, ha adquirido nueva demanda al surgir el interés de substituir a los colorantes sintéticos por naturales.

1.6 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA COCHINILLA (Dactylopius Coccus Costa)

CLASIFICACION TAXONOMICA DE LA COCHINILLA

Clase:	→	Insecta
Orden:	→	Homoptera
Sub-orden:	→	Sternorrhyncha
Super-familia:	→	Coccoidea
Familia:	→	Dactylopiidae
Género:	→	Dactylopius
Especie:	→	Coccus

A pesar de diversas clasificaciones taxonómicas propuestas, aún prevalece la sugerida por Costa (1835), quien la clasifica Dactylopius Coccus y de acuerdo a esta forma:(24)

Las características generales de este insecto son:

Las hembras tienen el cuerpo más o menos globoso y miden de 2-5 mm de diámetro. No se reconoce segmentación alguna, excepto unos pliegues intersegmentales en la porción que corresponde al abdómen. Presenta antenas de 6-7 artejos, pequeñas y cortas. Las patas muestran un desarrollo normal de todas sus partes, pero son cortas. La abertura anal consiste tan solo de una hendidura transversal, cuyo borde anterior presenta una banda esclerosada; esta banda no tiene aspecto celular, ni presenta sedas de ninguna clase. Casi todo el cuerpo está provisto de sedas alargadas de distintos tipos, cilíndricas y ensanchadas notablemente en su base.

Las hembras adultas viven fijadas en las superficies de los nopales, en los que insertan fuertemente sus estiletas. Se presupone que pueden reproducirse tanto en forma sexual, como asexual. Los machos tiene cabeza, tórax y abdómen bien diferenciados; un par de alas mesotorácicas y dos balancines, carecen de órganos bucales, son de vida muy corta y de tamaño mucho más reducido que las hembras. El abdómen termina en dos largos filamentos cerosos.

La hembra Dactylopius Coccus puede distinguirse de las otras

especies del mismo género, porque su cubierta cerosa es de forma pulverulenta, fácilmente desprendible. En cambio, la cubierta de las otras especies, es filamentososa (Como algodón) y muy difícil de desprender.

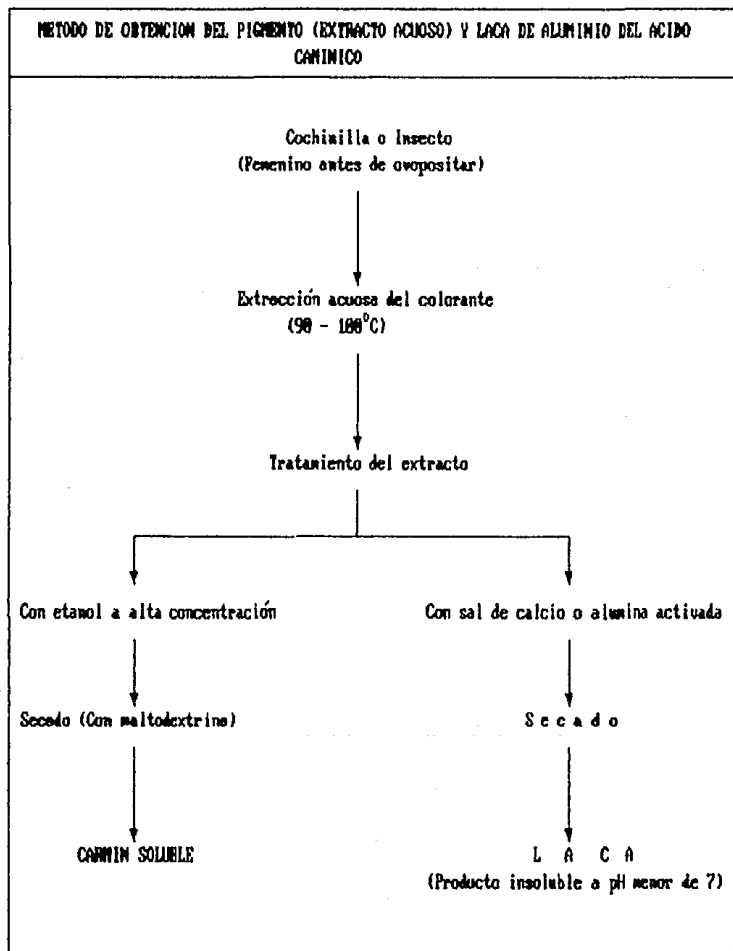
Tanto las hembras adultas como las crías, se alimentan de los jugos de las pencas de los nopales, los cuales chupan ávidamente mediante sus respectivos picos.

Las plantas en las que se cultiva la cochinilla son: El Nopal de Castilla (Opuntia ficus-indica) y el nopal de San Gabriel (Opuntia Tormentosa). La cochinilla vive asilvestrada sobre el llamado Nopal Pluma o Nopal Castorrita (Opuntia pilifera).

Las condiciones ecológicas de los lugares en los que actualmente se cultiva la cochinilla se pueden resumir como sigue: Cañadas y pequeños valles por lomerios de pendiente suave, cuyas alturas sobre el nivel del mar varían entre 1,200 y 1,400 m. En suelos delgados y calizos, que en grandes extensiones dejan expuestos el substrato rocoso. En clima templado con invierno seco no riguroso y lluvia periódica. El promedio de temperatura es de 21.7° C y el de precipitación es de 600 mm. En México, zonas con estas características pueden situarse en el estado de Oaxaca (24).

1.7 METODO DE OBTENCION:

FIGURA No. 1



El ácido carminico principio activo de la cochinilla, se encuentra hasta en un 22% del peso seco del insecto. La mayor parte del ácido carminico puede ser extraído por tratamiento del insecto femenino intacto seco con agua caliente, pero los rendimientos pueden ser incrementados si la preparación seca es pulverizada, aunque los subsiguientes estados de purificación sean más difíciles. En ambos casos, cantidades variables del pigmento quedan unidos a los residuos insolubles.

Se requieren de 4 a 5 kgs. de cochinilla en bruto para producir 1 kg. de carmín comercial. Los procesos de extracción acuosa pueden ser continuos o por lote a temperaturas entre 90 y 100°C.

Los subsiguientes pasos del proceso involucran un tratamiento al extracto con sales de aluminio. En función del producto final pretendido, el complejo resultante puede ser tratado con etanol a alta concentración para precipitar un carmín soluble, alternativamente puede ser aislado en esa forma la cual es insoluble abajo de pH 7, por adición de una sal de calcio a la solución final.

Tradicionalmente, el aislamiento de un ácido carminico puro depende de la habilidad para formar un complejo insoluble con plomo y los métodos basados en la precipitación de plomo aún

parecen ser usados en la preparación del ácido carminico con fines histológicos. Recientes investigaciones han establecido que los mejores rendimientos pueden ser obtenidos si el insecto es tratado con soluciones acuosas de enzimas proteolíticas en presencia de agentes surfactantes adecuados y la purificación es altamente simplificada usando cromatografía de intercambio iónico (27).

1.8 COCHINILLA, ACIDO CARMINICO Y CARMIN

Cochinilla es el insecto *Dactylopius Coccus*, del cual se extrae el ácido carminico.

El ácido carminico, también conocido como rojo cochinilla, es una antraquinona derivada, siendo el principio activo del colorante.

Se conoce con el nombre de carmin a la sal de aluminio alcalina (Laca) preparada directamente del ácido carminico, y contiene un 10% mínimo de éste último (15).

Las presentaciones comerciales que existen en el mercado son:
(41)

- CARMIN De color rojo claro, el cual es obtenido por extracción acuosa de la cochinilla utilizando enzimas

proteolíticas. Se usa principalmente en alimentos donde la base principal sea agua o alcohol (Bases para bebidas, bebidas líquidas y aderezos para ensalado). Proporciona coloraciones claras en soluciones diluidas en agua. Contiene como mínimo 50% de ácido carmínico como poder colorante).

- CARMIN ACIDO ESTABLE De color rojo claro, obtenido por extracción acuosa y tratamiento proteolítico a partir de la cochinilla. Su uso se prefiere en alimentos donde la base principal sea agua o alcohol. Cuenta con un mínimo de 2.5% de ácido carmínico como poder colorante disponible.

- ACIDO LIQUIDO Solución color rojo magenta, está compuesto por carmin, agua, hidróxido de amonio y sodio y glicerina. Se obtiene por extracción acuoso-enzimática, a partir de la cochinilla. Contiene como mínimo 3.3% de ácido carmínico como poder colorante. Para alimentos base agua, con pH superior a 3.5, como ejemplo: Yogurts, malteadas, etc.

- CARMIN LACA De color rojo magenta, obtenida por extracción acuosa-enzimática, a partir de la cochinilla. Tiene un poder colorante no menor de 50% de ácido carmínico, puede ser usado en productos farmacéuticos, en cosméticos y en confitería.

1.9 QUIMICA DEL ACIDO CARMINICO

Diversos investigadores han estudiado la estructura del ácido carminico y compuestos relacionados, sin embargo, las conclusiones hechas por estos investigadores han sido modificadas por trabajos posteriores y aún continúan apareciendo con mucha regularidad representaciones estructurales incorrectas .

Recientes investigaciones muestran que el núcleo de la antraquinona del ácido carminico tiene una estructura como se muestra en la Figura # 2; con el grupo carboxil en la segunda posición.

En 1959, después de diversas investigaciones, Ali & Haynes establecieron que el grupo sustituyente en la posición 7 de la mitad antraquinona era, en efecto, una unidad de glucosa ligada a la hidroxiantraquinona por un enlace C-glucosídico.

En común con otros compuestos C-glucosídicos, la glucosa unida en el ácido carminico exhibe una notable resistencia a la hidrólisis ácida, aun cuando la unidad de glucosa misma no es susceptible a modificación por muchas enzimas del metabolismo de carbohidratos.

En suma, la estructura del ácido carminico es descrita correctamente como 7-C-D-glucopiranosil-3,5,6,8,-tetrahidroxil-1-metil-9,10-dioxo-2-ácido antracencarboxílico. Se considera

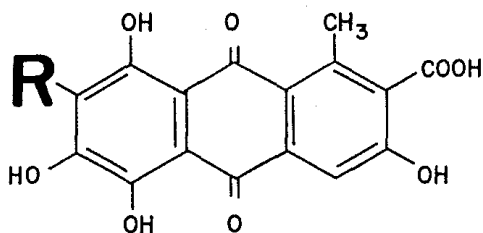


Fig. 2: ESTRUCTURA QUIMICA RECIENTEMENTE ACEPTADA PARA EL ACIDO CARMINICO (27).

que la configuración estereoquímica de la ligadura C-glucosil es la responsable de la habilidad del ácido carminico para formar complejos con una variedad de metales. (27)

La habilidad del ácido carminico para formar complejos con metales es explotado en la manufactura de carmines, aunque los orígenes de la técnica están perdidos en la antigüedad. Muchas técnicas para la preparación de carmines han sido publicados, pero los detalles de los procesos comerciales usados por manufactureros individuales son celosamente cuidados. Estos procesos son diseñados para obtener el máximo rendimiento de color y las mejores propiedades de pigmentación al mínimo costo, obviamente afectando ejecución y precio competitivo en el mercado. Los carmines pueden ser aislados en forma directamente soluble en los solventes base-agua bajo un amplio rango de pH o en forma insoluble abajo de pH 7. Sin embargo, en la práctica comercial, los carmines insolubles pueden ser solubilizados por tratamiento en medio acuoso arriba de pH de 7, antes de la adición en alimentos o bebidas.

Se requiere de 4 a 5 kgs. de cochinilla en bruto para producir 1 kg. de carmin comercial. Los procesos de extracción acuosa pueden ser continuos o por lote a temperatura entre 90 y 100°C.

Los subsecuentes pasos del proceso involucran un tratamiento

del extracto con sales de aluminio. En función del producto final pretendido, el complejo resultante puede ser tratado con etanol a alta concentración para precipitar un carmin soluble, alternativamente puede ser aislado en esa forma la cual es insoluble abajo de pH 7, por adición de una sal de calcio a la solución final.

No existe duda, que la clave para la permanencia tecnológica y propiedades de pigmentación de todos los carmines es la presencia de complejo ácido carminico metal. Los factores fisico-químicos bajo los cuales la formación y estructura eventual de estos complejos se lleva a cabo, es motivo de numerosas investigaciones.

En las figuras 3 y 4 se presentan dos estructuras sugeridas para la formación de complejos ácido carminico-metal:

Todos los carmines comerciales contienen variadas cantidades de proteínas derivadas del insecto de origen durante la extracción del pigmento. Thomas & Lloyd (1980), aislaron aminoácidos de 5 lotes de un carmin soluble comercial, encontrando la presencia de 17 aminoácidos, los resultados de estudio son presentados en el cuadro # 5, se expresan como residuos de aminoácidos por 1,000 residuos.

Esta tabla muestra el hecho de que el contenido de aminoácidos aromáticos y azufrados, es bajo, mientras que el

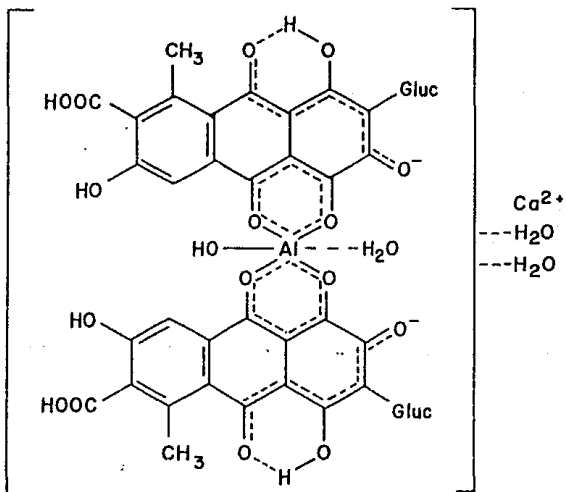


Fig. 3: ESTRUCTURA SUGERIDA PARA UN COMPLEJO CARMIN-METAL (27)

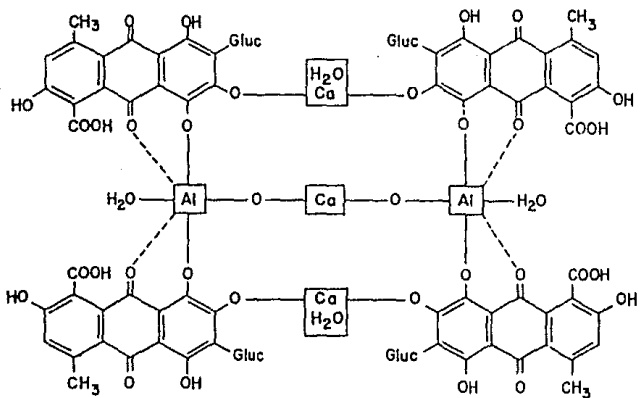


Fig. 4: ESTRUCTURA PARA EL COMPLEJO ACIDO CARMINICO ALUMINIO (27).

CUADRO No. 5:

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS PARA CARMINES SOLUBLES COMERCIALES

(Expresado como aminoácidos residuales por 1,000 residuos)

Aspártico	116	Metionina	12
Treonina	46	Isoleucina	20
Serina	56	Leucina	29
Prolina	53	Tirosina	24
Glutamina	151	Fosfoalanina	16
Glisina	171	Histidina	50
Alanina	56	Lisina	123
Valina	29	Arginina	40
Cisteína	8		

Lloyd, A. G. (1908) Extraction and Chemistry of Cochineal, Food Chemistry.

contenido de ácido aspártico, glutámico, glicina y lisina constituye más de la mitad de todos los amino ácidos detectados.

Hasta el momento, las preparaciones purificadas de ácido carmínico, no son los mejores artículos de comercio. La mayoría de las presentaciones comerciales son disponibles en pequeñas cantidades, son muy costosas y son más ampliamente usadas como manchas biológicas o como reactivos analíticos.

CAPITULO II METODOLOGIA

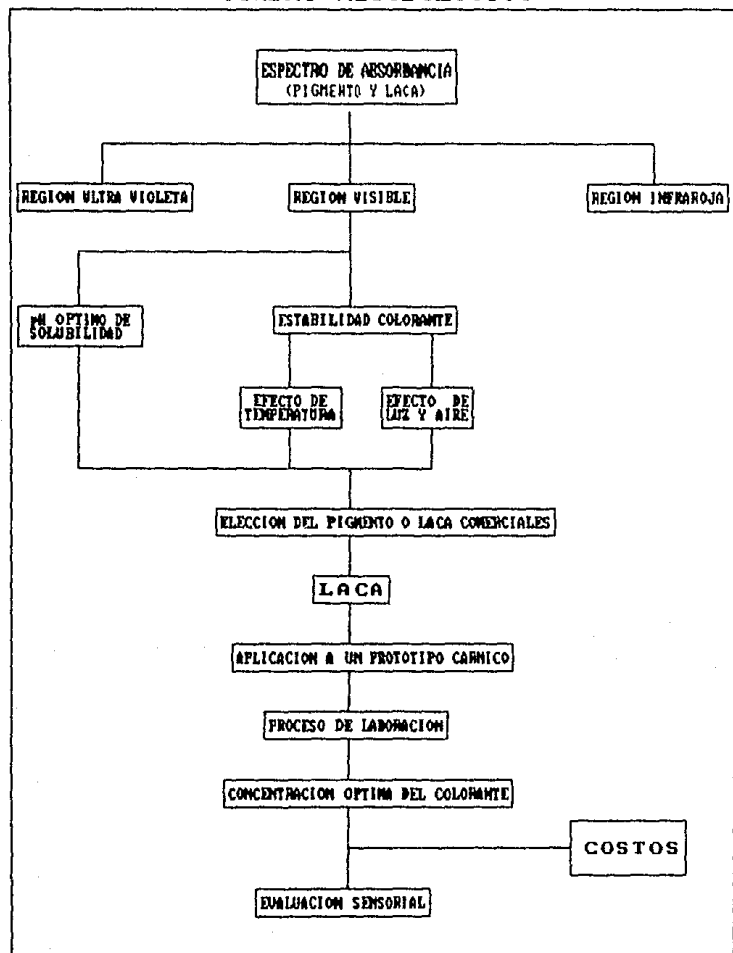
2.1 OBJETIVOS:

Determinar las condiciones de mayor estabilidad del colorante natural de la cochinilla (Dactylopius Coccus Costa), como extracto acuoso y laca

Análisis de la cinética de degradación del colorante de la cochinilla en base a los parámetros: Temperatura, aire, luz y pH, para la obtención de tiempo de vida media ($t_{1/2}$), valor D, valor t, Energía de activación relativa (Ea rel).

Análisis del potencial del colorante de cochinilla como un realizador de color, para emplearse en la elaboración de jamones.

CUADRO METODOLOGICO



2.3 OBTENCION DE LA MUESTRA:

Para llevar a cabo la experimentación se contó con dos presentaciones de la cochinilla: pigmento. (Extracto acuoso al 8% y su derivado como laca de aluminio al 52%. Ambas muestras fueron proporcionadas por SPECTRUM, S.A. de C.V. (Benvenuto Cellini # 97, Col. Alfonso XIII).

2.4 ESPECTRO DE LA ABSORBANCIA EN LA REGION ULTRAVIOLETA, VISIBLE E INFRAROJO

La laca de cochinilla se solubilizó al 0.008% en HCl a 0.02M (30). El pigmento de cochinilla se preparó en una solución acuosa al 0.08% en agua destilada y desionizada a pH neutro. Se realizó un barrido en espectrofotómetro, en la región ultravioleta-visible de 200 a 800 nm para encontrar la longitud de onda a la cual se tiene máxima absorbancia de las soluciones de colorante en laca y en el extracto acuoso. La solución de laca se corrió con un blanco de referencia de HCl 0.02 M. y la solución de pigmento con un blanco de referencia de agua destilada y desionizada. Los barridos fueron

realizados con espectrofotómetro Beckman DU-65.

Se realizó un barrido de laca y al pigmento en la región infrarrojo (2.5 μ - 10 μ), tomando aire como blanco de referencia.

En base a los barridos, se determinó la longitud de onda a la cual se observa la máxima absorbancia, tanto para laca como para pigmento.

2.5 DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE SOLUBILIDAD EN LACA.

Se prepararon 12 soluciones de laca de cochinilla al 0.016%, variándose el pH del 1 al 12. Las muestras se hicieron por triplicado y se tomó lectura de absorbancia a 500 nm, con lo cual se obtuvo el perfil de solubilidad de acuerdo al pH.

Se prepararon 4 soluciones de laca al 0.0032% que variaron de 10-12 de pH, para determinar el pH óptimo de solubilidad.

Para el pigmento de cochinilla su solubilización fue hecha en agua destilada y desionizada a pH de 7 con 0.1% de metil parabeno como conservador.

2.6 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DEL COLORANTE DE LA COCHINILLA (Dactylopius Coccus Costa)

2.6.1 EFECTO DE TEMPERATURA:

De los resultados del punto anterior se seleccionó el pH de mejor solubilidad y se procedió de la siguiente manera:

Se preparó una solución de laca de cochinilla al 0.48% en agua a pH de 11. De este concentrado inicial, se prepararon diluciones al 0.0048%. En tubos de ensaye se pusieron 30 ml. de dicha soluciones las cuales se sometieron a las siguientes temperaturas: 21, 28, 40, 50, 60, 70, 80, 85 y 90° C por triplicado. Las muestras a las temperaturas seleccionadas fueron cubiertas con papel aluminio para evitar el paso de la luz. La temperatura se mantuvo en una estufa de laboratorio (Riossa Mod. EC).

La degradación del colorante se determinó mediante la lectura de absorbancia a 515 nm a intervalos regulares de tiempo, como se indica en el cuadro 6, en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-120-02). Debido a que las variables manejadas afectan de manera diferente la velocidad de degradación del ácido carminico, los intervalos de tiempo son diferentes para cada experimento.

CUADRO No. 6:

INTERVALOS DE TIEMPO PARA LECTURAS DE ABSORBANCIA EN SOLUCIONES DE LACA PARA EFECTOS DE LA TEMPERATURA		
$T^{\circ}C$	INTERVALOS DE TIEMPO:	OBSERVACIONES:
28	Cada 24 horas	
40	Cada 48 horas	
50	Dos veces al día	Mañana y tarde.
60	Cada hora	Durante 4 días, tomando 6 lecturas al día.
70	Cada 2 horas	Durante 4 días, tomando 4 lecturas por día.
80	Cada hora	Durante 1 día.
85	Cada hora	Durante 1 día.
90	Cada hora	Durante 1 día.

Para pigmento, se preparó una solución de metil parabeno al 0.1%, como conservador, en agua destilada y desionizada. A dicha solución se le ajustó pH a 7. Con ellas se preparó una solución de pigmento al 0.15%. Se procedió a preparar 3 muestras de soluciones en tubos de ensaye, como se hizo para laca, para las temperaturas de 50, 60, 70, 80, 85 y 90° C. La degradación del pigmento se evaluó tomando lecturas de absorbancia a 528 nm a intervalos regulares de tiempo, cada 48 hrs.

A continuación se muestra la representación gráfica de una reacción de primer orden, misma que se empleó para determinar el orden de reacción. (Fig. # 5)

El cálculo de vida media ($t_{1/2}$), se obtuvo de la siguiente fórmula (25):

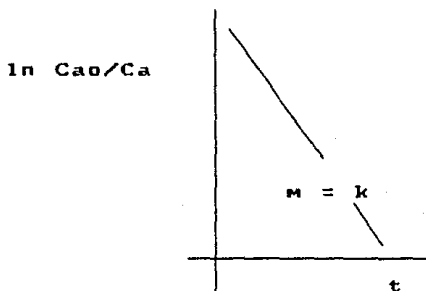
$$t_{1/2} = \frac{\ln C_{a0}/2 - \ln b}{k}$$

Se eligió este parámetro por ser un valor comparativo usual.

Para muchas reacciones, y en particular para las reacciones elementales, la expresión de la velocidad de reacción puede escribirse como un producto de un factor dependiente de la temperatura y de la composición (Fig. 6). Para la mayoría

FIGURA No. 5

REPRESENTACION GRAFICA DE UNA REACCION DE PRIMER ORDEN (25) (47)



DONDE:

C_{ao} : Concentración inicial al tiempo 0 *

C_a : Concentración al tiempo "t" *

t : Tiempo

$m = k$: Pendiente, constante de velocidad (Hr^{-1})

* Tomando en ambos casos a la absorbancia como parámetro de la concentración..

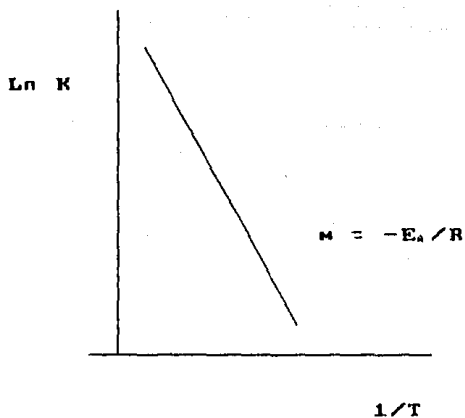


Fig. 6: REPRESENTACION GRAFICA DE ENERGIA DE ACTIVACION. (25)

de estas reacciones se ha encontrado que estos modelos se ajustan a la ecuación de Arrhenius:

$$K = K_0 e^{E_a/RT}$$

$$\ln K/K_0 = -E_a / RT$$

$$\ln K/K_0 = 1/T [-E_a/R]$$

Donde:

E_a : Energía de activación (Kcal)

T: Temperatura ($^{\circ}K$)

K : Constante de velocidad (Hr)

R : Constante de la Ley de los Gases Ideales (1.98 kcal/mol $g^{\circ}K$)

K_0 : Factor de frecuencia *

* De la ecuación de Arrhenius se deduce que el factor de frecuencia (K_0), no afecta a la influencia de la temperatura sobre la reacción. En una reacción real puede haber una pequeña influencia de la temperatura sobre este factor, sin embargo es muy pequeña y puede despreciarse.

El valor D es el tiempo a una temperatura específica requerido para la disminución decimal de un parámetro, el cual puede ser referido a componentes termolábiles presentes en un alimento, en el presente estudio, el ácido carminico. Dicho de otra manera, el valor D , es el tiempo a una temperatura específica, necesario para que esta curva cruce un ciclo logarítmico en una gráfica de degradación térmica.

Los valores D para cada condición estudiada fueron calculados mediante la construcción de la curva de degradación mostrada en la fig. 7.

El valor " z " es la temperatura requerida para que los valores de la degradación $[D]$ sean a su vez reducidos decimalmente. Este valor está representado por la pendiente de la ecuación de la recta $\log D$ vs T .

Los valores " z " se calcularon para el pigmento y la laca mediante la curva de tiempo de degradación térmica como se muestra en la fig. # 8.

2.6.2 EFEECTO DE LUZ Y AIRE EN LA ESTABILIDAD DEL COLORANTE DE LA COCHINILLA

Log % R.A.

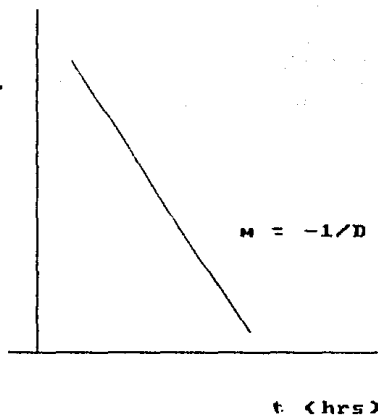


Fig. 7: REPRESENTACION GRAFICA DE VALOR "D"
(47)

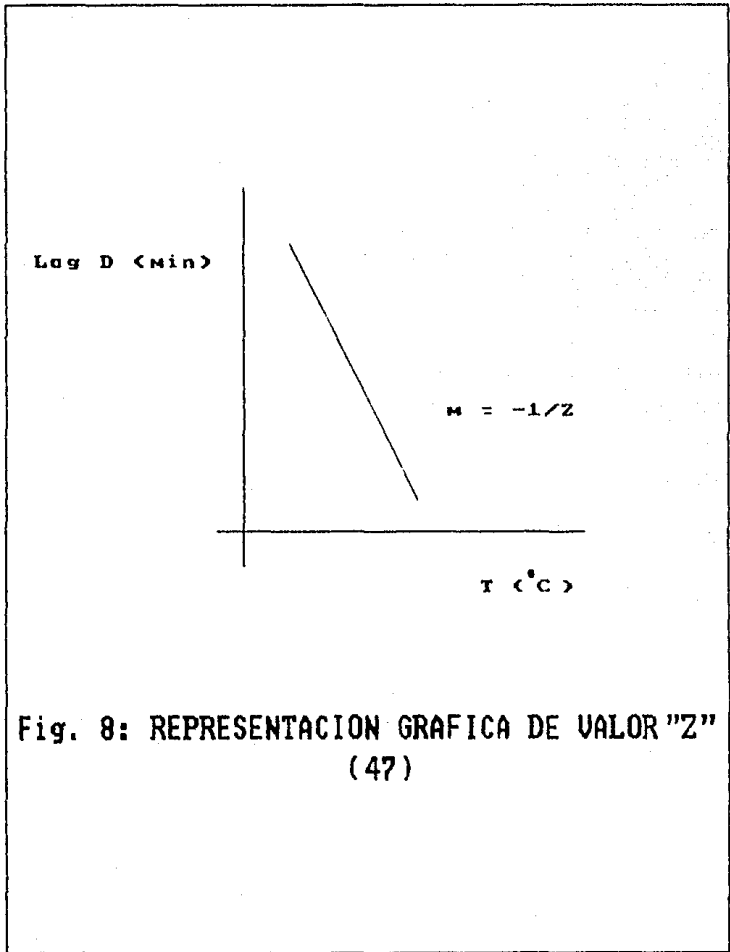


Fig. 8: REPRESENTACION GRAFICA DE VALOR "Z"
(47)

Se prepararon soluciones de laca de ácido carmínico al 0.0048% y pH de 11 y soluciones de pigmento de ácido carmínico al 0.15% y pH = 7 de igual forma que para el estudio del efecto de la temperatura.

Se prepararon muestras de 30 ml, por triplicado, para cada una de las siguientes condiciones:

a) Luz y aire (Temperatura promedio 40°C)

La luz utilizada fue obtenido de una fuente luminosa de 100 watts dentro de una cámara oscura como muestra la figura f 9.

b) Luz y nitrógeno (Temperatura promedio 40°C, debido a que la fuente luminosa provocaba un aumento en la temperatura en el interior de la cámara).

c) Oscuridad y nitrógeno (Temperatura ambiente promedio 21°C)

d) Oscuridad y aire (Temperatura ambiente promedio 21°C)

e) Condiciones ambientales (Temperatura ambiente promedio 21°C y luz del día).

Las muestras en presencia de nitrógeno, se prepararon

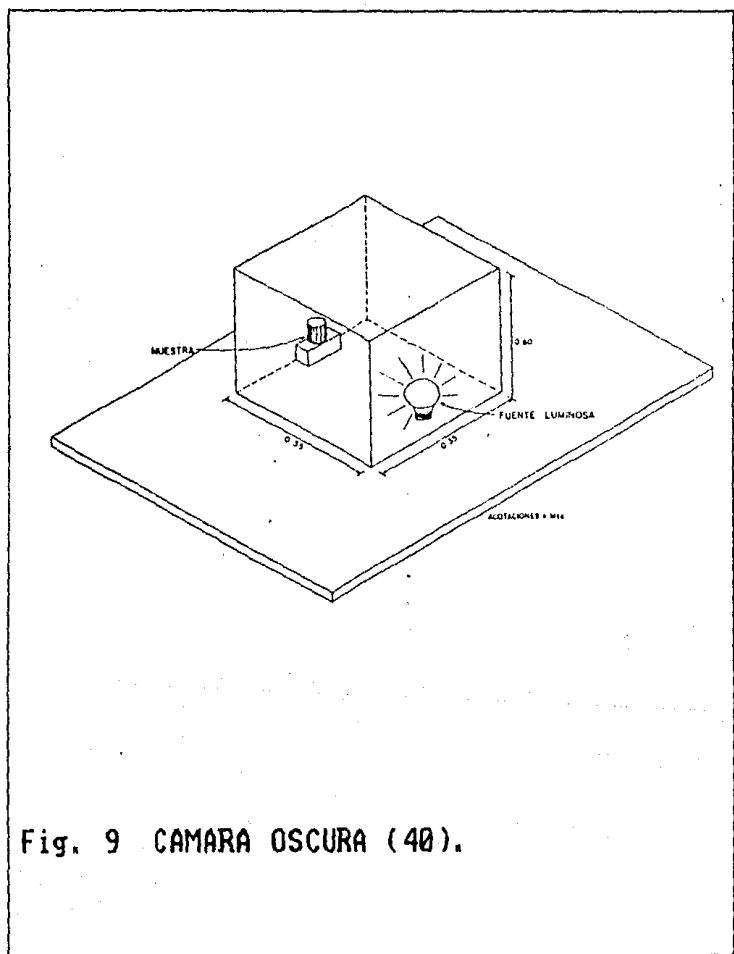
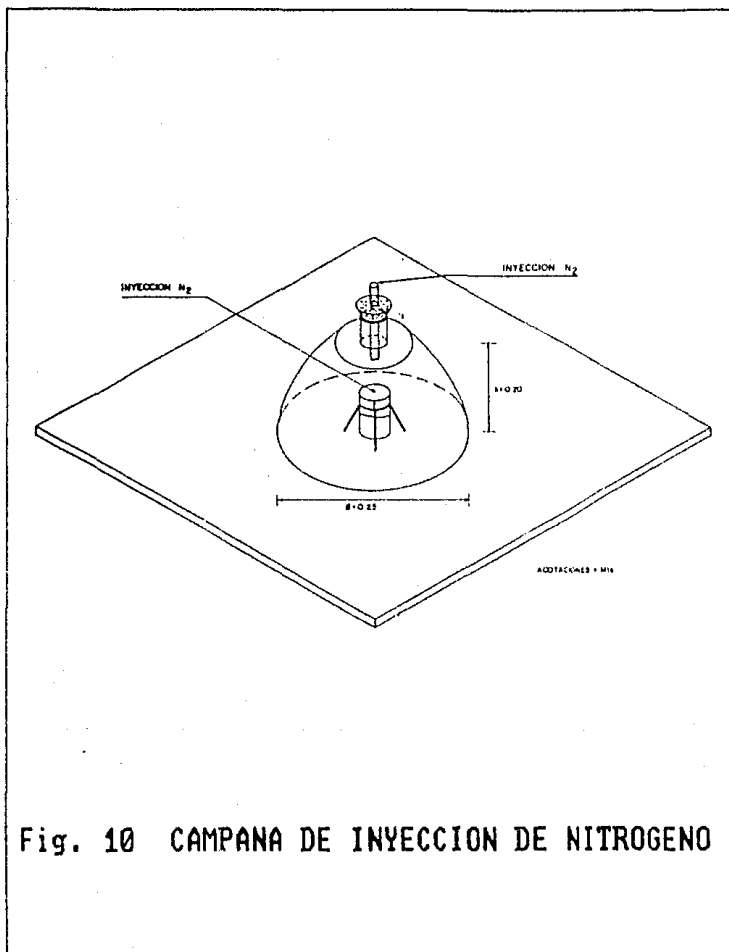


Fig. 9 CAMARA OSCURA (40).



CUADRO No. 7.

INTERVALOS DE TIEMPO PARA LECTURAS DE ABSORBANCIA EN SOLUCIONES DE PIGMENTO PARA EFECTO DE LUZ Y AIRE		
CONDICION:	INTERVALO DE TIEMPO:	OBSERVACIONES
Ambiente	Cada 24 horas	
N ² s\luz	Cada 24 horas por 21 días.	Posteriormente se tomaron lecturas dos veces por semana.
Luz y aire	Cada 24 horas	
Luz y N ²	Cada 24 horas	
Ambiente sin luz	Cada 48 horas	

burbujeando el gas dentro del tubo durante 30 seg. en una campana saturada de nitrógeno como lo muestra la figura 10:

Las muestras en oscuridad además de ser cubiertas, se les confinó en un cuarto oscuro.

Para el estudio en condiciones ambientales, se colocaron los tubos cerrados, a temperatura ambiente permitiendo el paso de la luz del día y la ausencia de luz por las noches.

A todas estas muestras se les tomaron lecturas de absorbancia a intervalos regulares de tiempo, así como la temperatura, como se muestra en el cuadro # 7.

Para el efecto de luz y aire en soluciones de laca de cochinilla, se tomaron lecturas de absorbancia cada 48 horas.

Se calcularon los valores D como se indicó en el estudio del efecto de la temperatura.

2.7 APLICACION DEL COLORANTE DE LA COCHINILLA EN ALIMENTOS

La elaboración del prototipo jamón, con la laca de cochinilla fue realizada en las instalaciones de "Empacadora Key, S. A. de C. V." Calz. Legaria # 312-A. Col. Pensil, México, D. F.

En base a experiencias anteriores de la Compañía Key, se ha observado la conveniencia de utilizar un colorante como realizador de color en la elaboración de jamones.

En base a los resultados de la primera parte de este estudio y a las características del producto cárnico a elaborar se decidió emplear laca de la cochinilla como realizador de color y compararlo con el colorante sintético usual.

El producto se elaboró de acuerdo a la formulación y el proceso indicados (ver pg. 54 y cuadro No. 8).

2.7.1 ADICION DEL COLORANTE

Durante el proceso de elaboración de la salmuera se determinó el pH más alto, para la mejor solubilización del colorante, siendo éste en donde se agregaría el colorante.

Para esto se midió pH durante las diferentes etapas de la elaboración de la salmuera, ver cuadro # 8.

2.7.2 CONCENTRACION OPTIMA DE COLORANTE

Encontrada la forma adecuada de adición de la laca, se buscó la concentración óptima de ésta en un intervalo de 0.0011 a

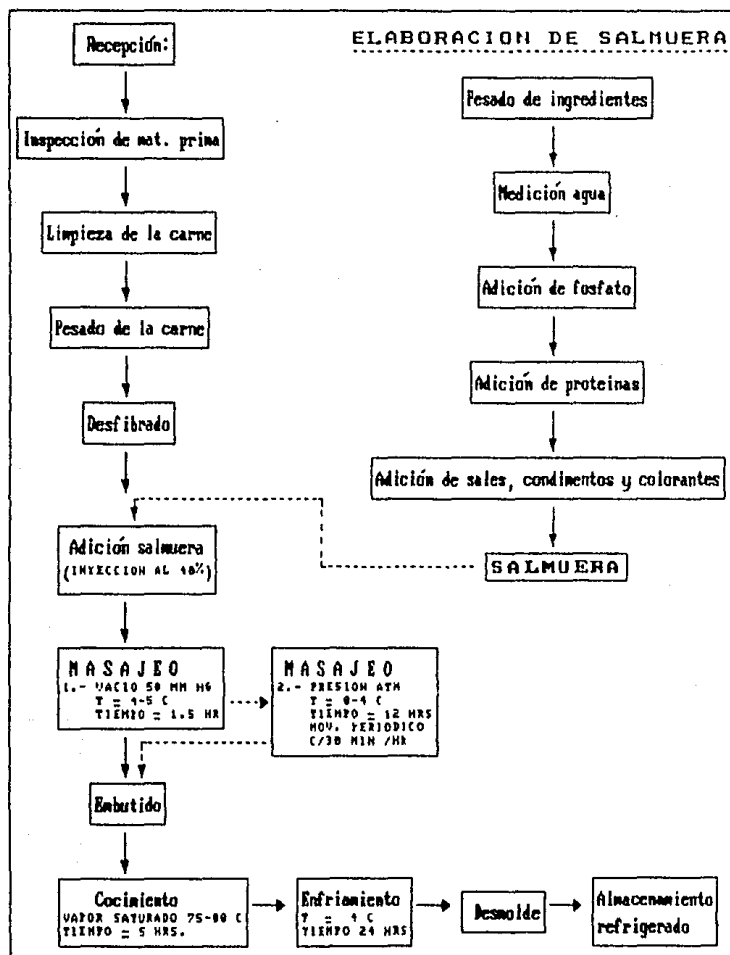
FORMULACION DE LA SALMUERA PARA EL PROTOTIPO JAMON

<u>INGREDIENTES</u>		<u>%</u>
Agua	—————>	83.69
Proteínas	—————>	8.00
Fosfatos	—————>	1.28
Sales de curación	—————>	1.81
Sal común	—————>	2.80
Azúcar	—————>	0.76
Eritorbato	—————>	0.12
Condimentos	—————>	1.36
Colorante sintético	—————>	0.0015

T O T A L :	—————>	99.9115

CUADRO No. 8:

DIAGRAMA DEL PROCESO DE ELABORACION DEL PROTOTIPO JAMON: (14)



0.005% con cuatro niveles de prueba para una salmuera de un prototipo jamón elaborado con la siguiente formulación típica (pg. 54).

Inicialmente se realizó un análisis de Duo-Trio para saber si los jueces 'semientrenados' estaban capacitados para detectar la diferencia entre los dos colorantes comparados.

Los jamones elaborados a las diferentes concentraciones de laca de ácido carminico fueron sometidas a una evaluación sensorial y análisis estadístico para establecer la concentración óptima de este colorante.

La evaluación sensorial se hizo mediante la resolución de un cuestionario de preferencia con 6 niveles de prueba que iban desde excelente hasta muy deficiente por un panel de 10 jueces semi-entrenados (33).

Los resultados fueron tratados mediante un análisis de varianza (ANOVA) (33).

2.7.3 EVALUACION SENSORIAL DEL PRODUCTO OBTENIDO:

El producto obtenido , fue evaluado sensorialmente mediante la resolución de un cuestionario dondes se evaluaron independientemente los parámetros de sabor (Con 5 niveles de

prueba que van desde sabroso y característico a insípido), color (Con 3 niveles de prueba de intenso a deficiente), olor (3 niveles de prueba, de muy aromático a nada aromático) y apariencia general (3 niveles de prueba que van de intachable a necesita mejora) por un panel de 8 jueces semi-entrenados (14).

Simultáneamente se evaluó sensorialmente el jamón comercial elaborado con la misma formulación y proceso, pero utilizando como colorante sintético al rojo # 3 (Eritrocina).

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de 2 muestras apareadas, por un intervalo de confianza de 0.05 (33).

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

ESPECTRO DE ABSORBANCIA:

Para el espectro ultravioleta (uv), se tiene la máxima absorbancia a 280 nm para soluciones de laca fig. 11 y de 285 nm para el pigmento fig. 12.

Para la región visible se obtuvo un espectro de absorbancia donde la máxima absorbancia se observa a una longitud de onda de 515 nm (Fig. 13) para la laca y de 528 nm para el pigmento (Fig. 14). Marshall & Harobin (1974), reportan la máxima absorbancia a 490 nm para una muestra comercial en medio acuoso de HCl 0.02 N. Los resultados encontrados en el presente estudio, no coinciden con los reportados bibliográficamente, esta variación puede explicarse en términos del tipo de extracción realizada, del grado de pureza del ácido carminico usado, y de los compuestos que acompañen a ésta. En este trabajo se empleó una muestra de ácido carminico no purificado, unido a proteínas, aminoácidos, carbohidratos, etc., remanentes de una extracción comercial.

Las diferencias entre las longitudes de onda de máximo absorbancia para las dos presentaciones comerciales, se pueden explicar debido al tratamiento de obtención que recibe

FIG. 11 ESPECTRO DE ABSORBANCIA PARA LACA EN LA REGION ULTRAVIOLETA.

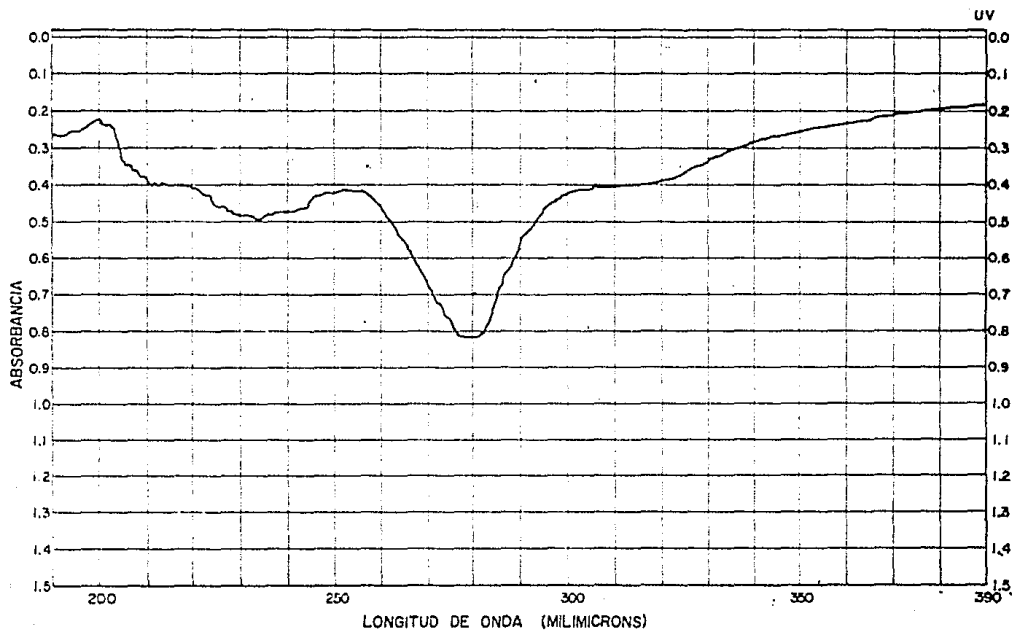


FIG. 12 ESPECTRO DE ABSORBANCIA PARA PIGMENTO EN LA REGION ULTRAVIOLETA.

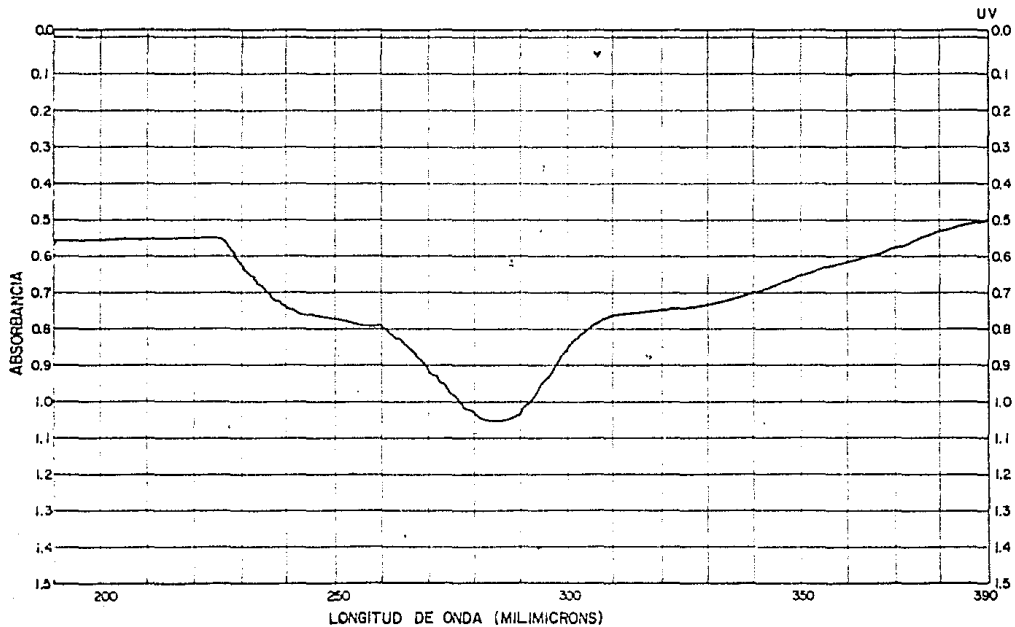


FIG.13 ESPECTRO DE ABSORBANCIA PARA LACA EN LA REGION VISIBILE.

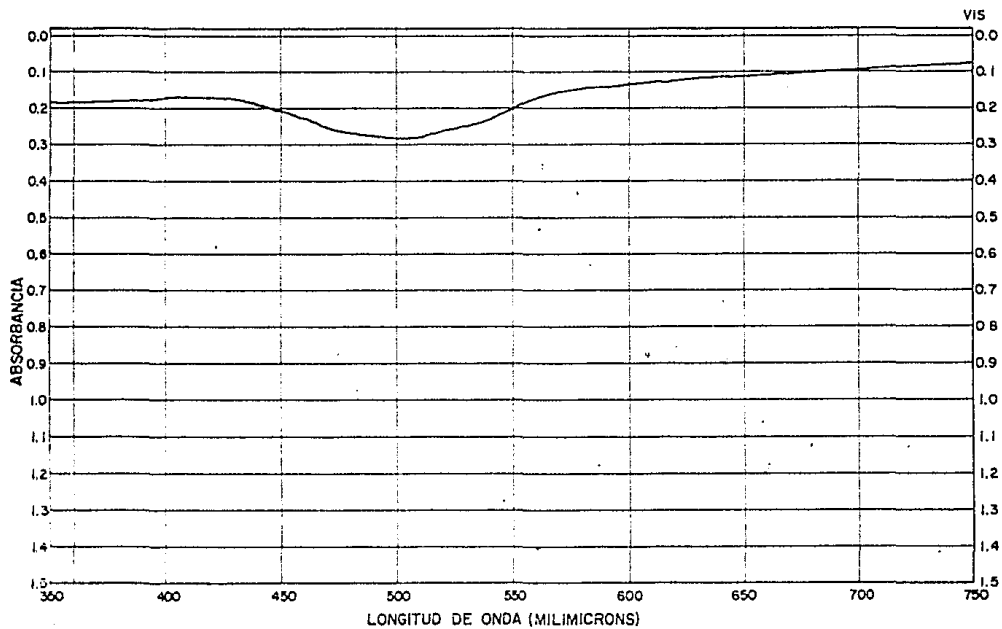


FIG. 14 ESPECTRO DE ABSORBANCIA PARA PIGMENTO EN LA REGION VISIBILE.

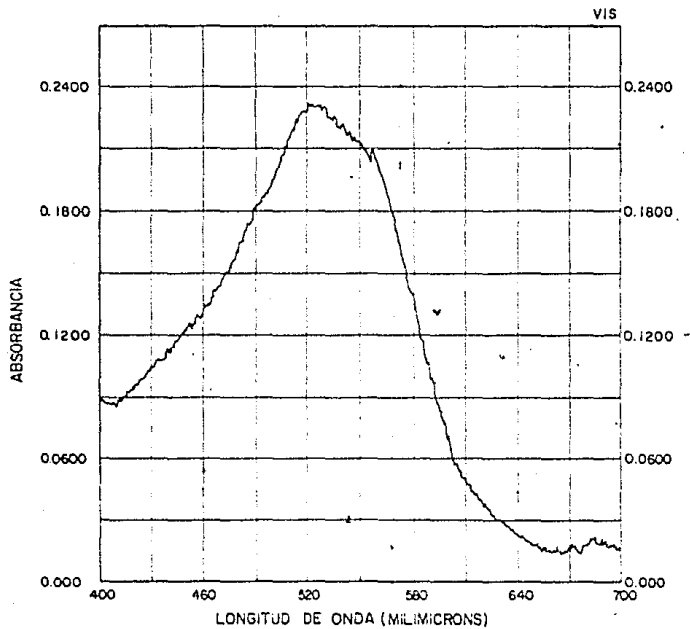


FIG. 15 ESPECTRO DE TRANSMITANCIA EN LA REGION INFRARROJO PARA LACA

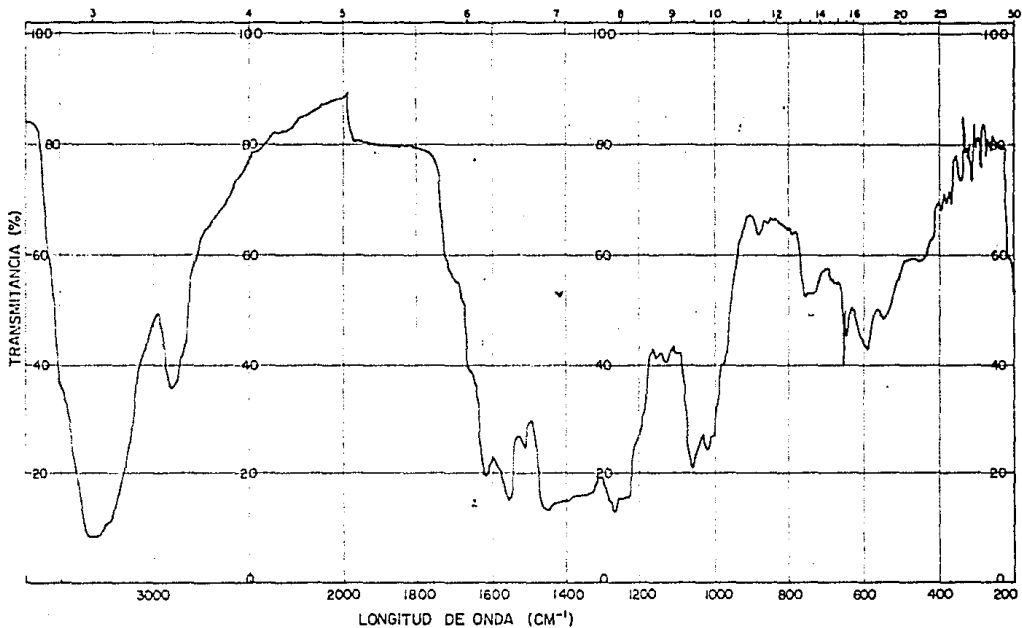
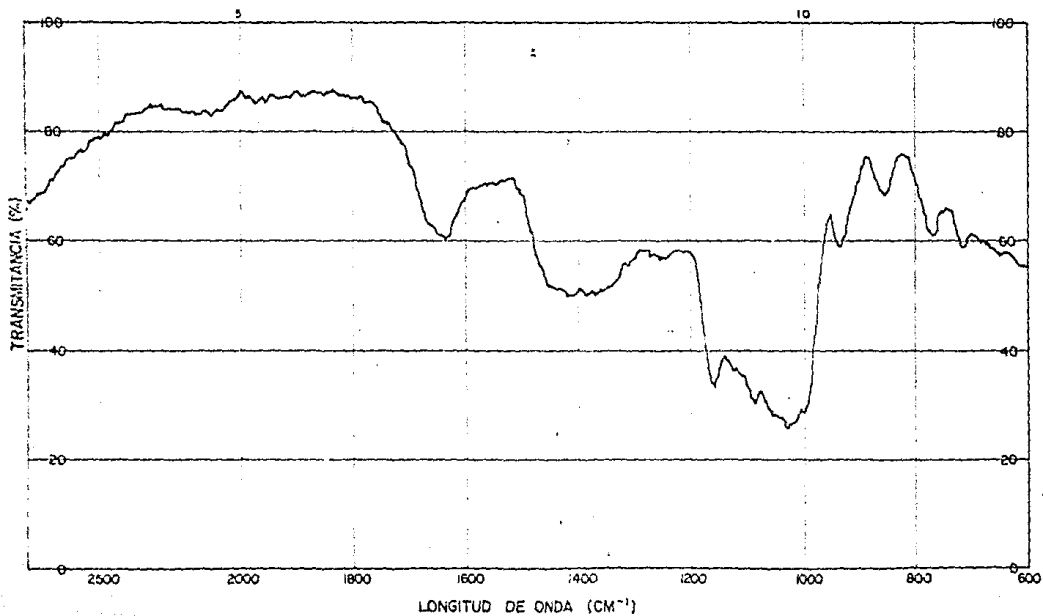


FIG. 16 ESPECTRO DE TRANSMITANCIA EN LA REGION INFRARROJO PARA PIGMENTO.



la laca de cochinilla. (Ver fig. 1).

Los resultados obtenidos para el espectro infrarrojo se muestran en las figuras 15 y 16.

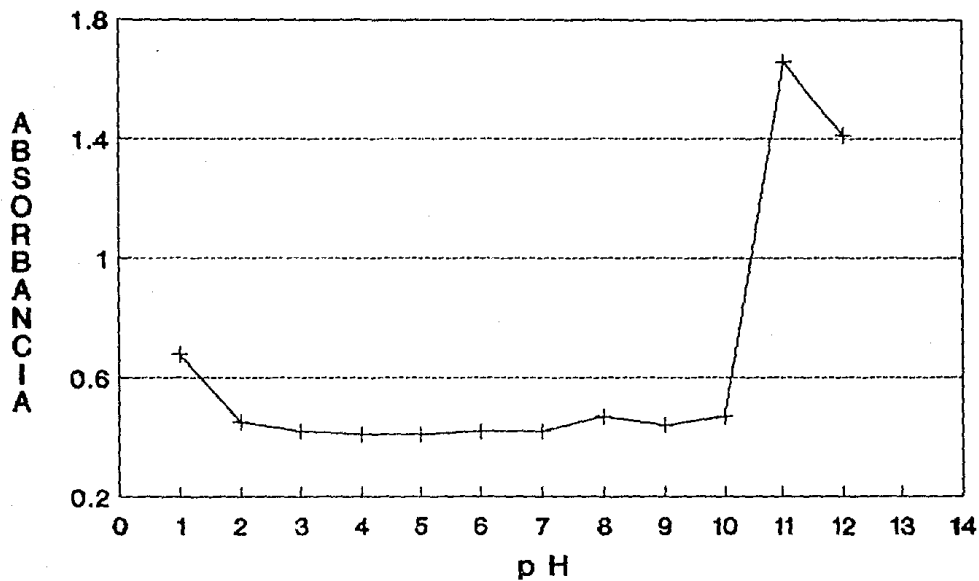
pH OPTIMO DE SOLUBILIDAD EN LACA

La solubilidad de la laca de ácido carmino con respecto al pH se muestra en la fig. 17 .

Cabe resaltar que la absorbancia es una medida indirecta de la solubilidad ya que se manejaron diferentes soluciones con diferentes pHs a la misma concentración, como se explicó en el capítulo anterior, la porción de laca que no se lograba solubilizar se separaba de la muestra por filtración, antes de realizar la lectura de absorbancia (Esto implica que la concentración a la cual se hacían las lecturas de absorbancia eran conocida solo cuando se solubilizaba completamente la laca).

Se puede observar en la fig. 17, que la solubilidad es baja a pH ácido y, conforme el pH aumenta, se incrementa ésta llegando a un máximo, para luego disminuir.

Como podemos observar, el punto de mayor absorbancia se tiene en el pH de 11, fig. 18. Este punto también corresponde al



**Fig. 17 pH DE SOLUBILIDAD PARA LACA
DE ACIDO CARMINICO**

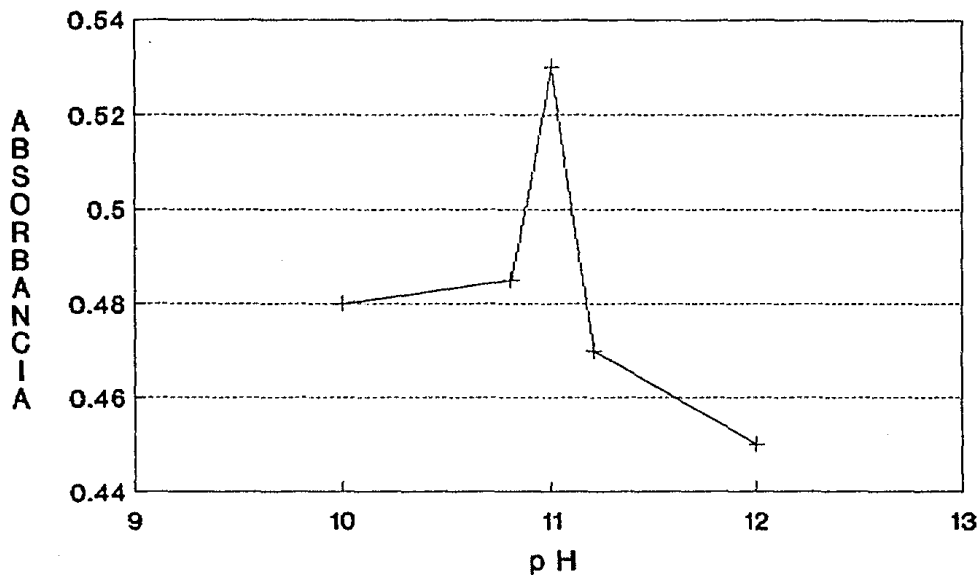


Fig. 18 pH OPTIMO DE SOLUBILIDAD EN LACA DE ACIDO CARMINICO

de mayor solubilidad de la laca debido a que en este valor de pH no se presentaron precipitados de laca insoluble.

Debido a que el pigmento de ácido carminico es completamente soluble en agua a pH neutro, fue posible estudiar su estabilidad directamente en soluciones acuosas neutras.

ESTABILIDAD DEL COLORANTE DE LA COCHINILLA.

EFECTO DE LA TEMPERATURA

Los cálculos realizados fueron hechos de acuerdo a las ecuaciones descritas en la metodología. De los resultados obtenidos se realizó una regresión lineal donde se calculó la pendiente (m) y el coeficiente de correlación (R^2).

Los resultados obtenidos con respecto a la cinética de degradación del colorante, para cada temperatura estudiada, tanto en laca como en pigmento, se ajusta a una reacción de degradación de primer orden.

Los cuadros 10 y 11 muestran los datos utilizados para el cálculo de la energía de activación para laca y pigmento respectivamente.

CUADRO No. 10

ENERGIA DE ACTIUACION PARA LACA

$^{\circ}\text{C}$	T° $^{\circ}\text{K}$	R^2	k (1/cal)
21.0	294.1	0.987	0.00072
28.0	301.0	0.929	0.00038
40.0	313.0	0.963	0.00016
50.0	323.0	0.992	0.0050
60.0	333.0	0.979	0.0109
70.0	343.0	0.997	0.0180
81.0	354.0	0.997	0.0640
85.0	358.0	0.997	0.0617
90.0	363.0	0.951	0.3400

CALCULO DE ENERGIA DE ACTIUACION

$$\begin{aligned}
 R^2 &= 0.9143 \\
 n &= - 12495.04 \\
 E_a &= 24740 \text{ cal}
 \end{aligned}$$

CUADRO No. 11

ENERGIA DE ACTIVACION PARA PIGMENTO

°C	T° °K	R ²	k (1/cal)
50.0	323.0	0.9809	0.000058
60.0	333.0	0.9960	0.000440
70.0	343.0	0.9998	0.000630
80.0	353.0	0.9996	0.0011
85.0	358.0	0.9998	0.0023
90.0	363.0	0.9540	0.0034

CALCULO DE ENERGIA DE ACTIVACION

R ²	=	0.9660
m	=	- 8369.17
E _a	=	16570.96 cal

La energía de activación relativa para laca es de 24740 cal y para el pigmento es de 16570.9 cal.

La energía de activación es menor para pigmento que para laca, lo cual significa una menor sensibilidad a la temperatura por parte del pigmento, ya que las reacciones con energía de activación grande son muy sensibles a la temperatura y viceversa.

Comparativamente citamos, valores relativos de energía de activación para colorantes rojos naturales como la betacianina con 19,200 cal y la betaxantina con 16,300 cal (35). Estos valores pueden considerarse relativamente similares a los calculados para laca y pigmento de ácido carmínico debido a que todos son materiales naturales.

Las figuras 19 y 19-A muestran el efecto de las diferentes temperaturas estudiadas en la estabilidad de la laca. Se observa que el aumento de la temperatura tiene un efecto esperado negativo en la estabilidad de la laca. Siendo además, este efecto de mayor intensidad a partir de 50°C. La temperatura a la cual es más estable la laca, en las condiciones estudiadas, es la temperatura considerada como ambiente (21°C) y con un valor $D=2620.5$ días. Aunque la estabilidad a 28 y 40°C aún es buena (Si pensamos en términos de aplicación en alimentos), con valores D de 2450.98 y 530.1 días respectivamente, como se muestra en el

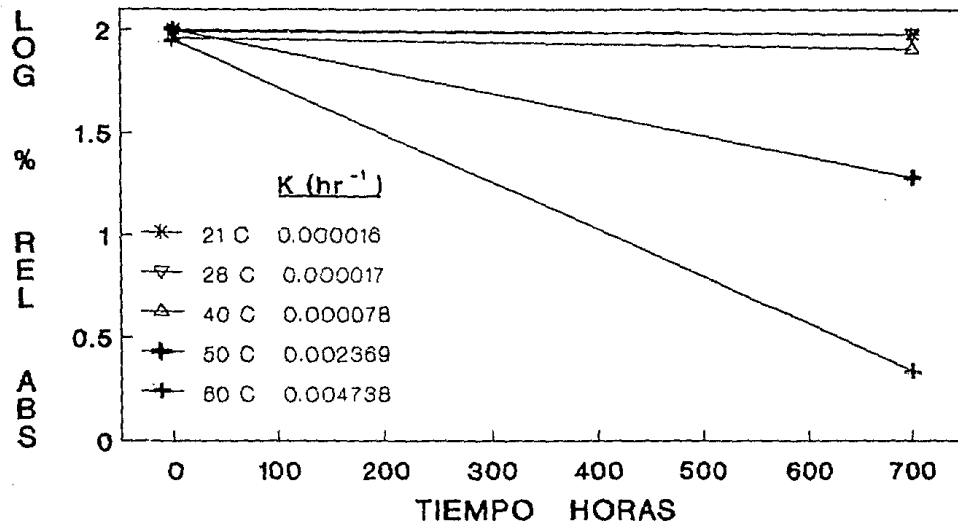
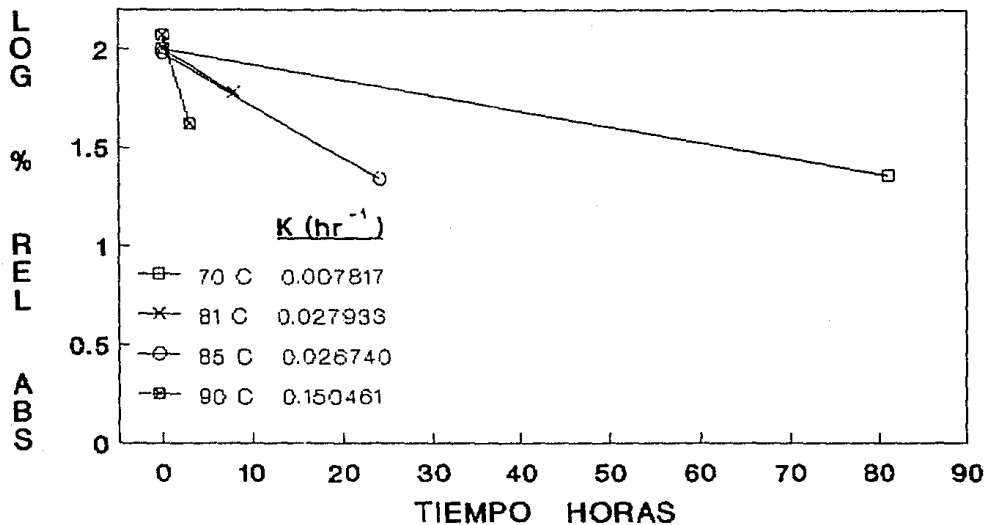


Fig. 19 EFECTO DE LA TEMPERATURA
(21 A 60 C) EN LA ESTABILIDAD DE
LACA DE ACIDO CARMINICO



**Fig. 19a EFECTO DE LA TEMPERATURA
(70 A 90 C) EN LA ESTABILIDAD DE
LACA DE ACIDO CARMINICO**

CUADRO No. 12

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN MUESTRAS DE LACA DE ACIDO CARMINICO

T°		R ²	K (Hr ⁻¹)	1/K = D (Días)	t 1/2 (Días)
°C	°F				
21.1	69.9	0.9674	0.000016	2,620.58	5,375.26
28.0	82.4	0.9311	0.000017	2,458.9	5,011.27
40.0	104.0	0.9602	0.000070	530.18	1,076.70
50.0	122.0	0.9923	0.002369	17.60	36.30
60.0	140.0	0.9799	0.004730	8.00	10.00
70.0	158.0	0.9970	0.007017	5.30	11.26
81.1	176.0	0.9972	0.027933	1.50	3.07
85.0	185.0	0.9902	0.026740	1.60	3.02
90.0	194.0	0.9520	0.150461	0.27	0.59

z	=	21.739 °C
m	=	- 0.04642
R ²	=	0.9630

cuadro # 12.

La utilización del metil parabeno en muestras de pigmento fue necesaria para evitar el crecimiento de microorganismos ya que en las soluciones se tenía pH de 6. El metil parabeno es activo en un amplio rango de pH, no se disocia en soluciones aún en condiciones muy alcalinas y es el que presenta mayor solubilidad de el grupo de los parabenos (2). No obstante pudo haberse utilizado otro conservador que brindara protección en pH neutro.

Para el pigmento, la figura 20, muestra el efecto de la temperatura en la estabilidad de éste. Se observa que al aumento de la temperatura afecta negativamente la estabilidad del mismo, como en el caso de la laca, pero aquí la estabilidad es mayor.

La temperatura de mayor estabilidad es la de 50 °C, con una $D = 1,666.6$ días. Los resultados del cálculo es D y Z son presentados en el Cuadro 13.

Valores altos de D muestran mayor estabilidad térmica del colorante. Esta misma relación se tiene entre valor Z y resistencia térmica. La figura 21 muestra comparativamente los valores Z para laca y pigmento.

El valor Z es relativamente mayor para pigmento que para

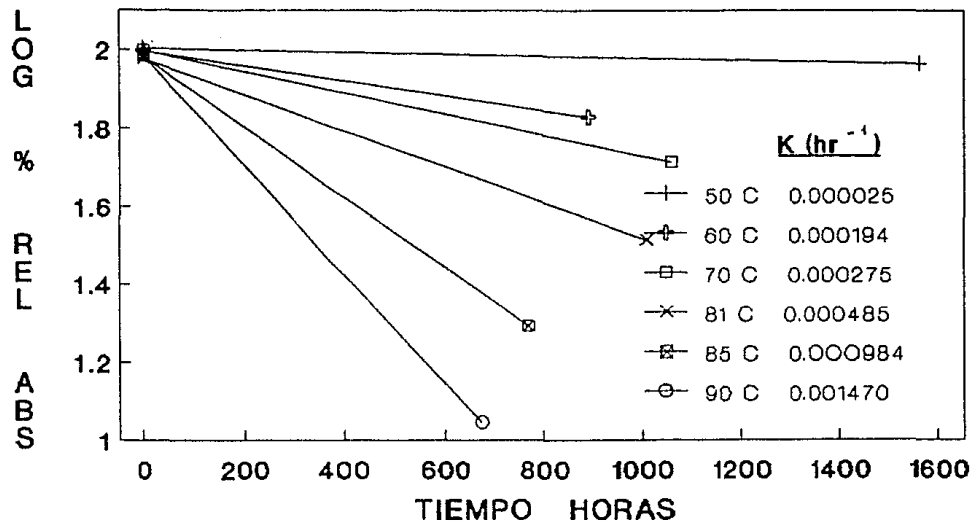


Fig. 20 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DEL PIGMENTO DE ACIDO CARMINICO

CUADRO No. 13

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN MUESTRAS DE PIGMENTO

T°		R^2	K (Hr^{-1})	$1/K = D$ (Días)	$t_{1/2}$ (Días)
$^{\circ}C$	$^{\circ}F$				
58.0	122	0.9798	- 0.000025	1,666.6	3,641.66
68.0	148	0.9978	- 0.000194	214.6	478.58
78.0	158	0.9997	- 0.000275	151.8	336.88
81.1	176	0.9823	- 0.000485	85.9	188.54
85.0	185	0.9958	- 0.000904	42.3	92.47
98.0	194	0.9998	- 0.001478	28.3	61.7
z	=	$25.3^{\circ}C$			
m	=	- 0.03953			
R^2	=	0.9864			

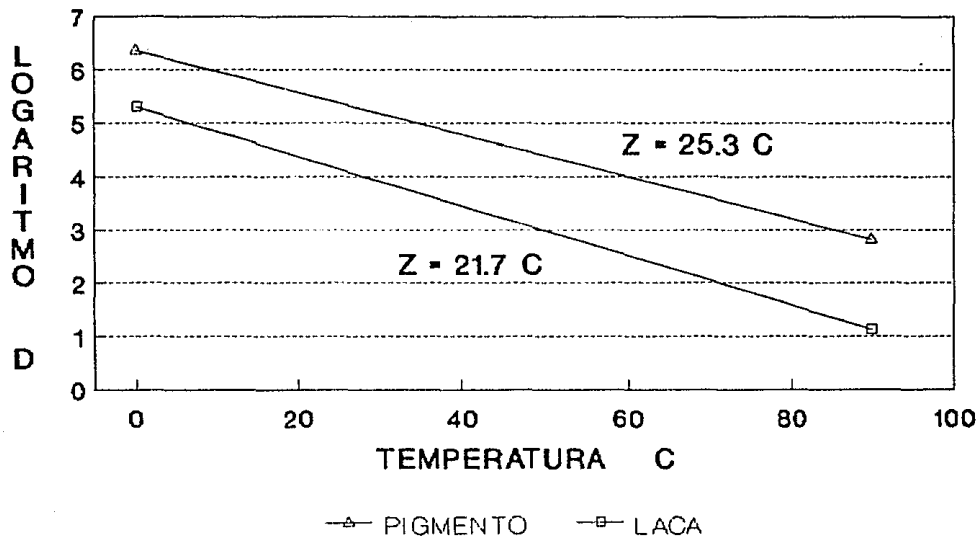


Fig. 21 COMPARACION DE VALOR "Z" ENTRE LACA Y PIGMENTO DE ACIDO CARMINICO

laca, lo cual muestra mayor estabilidad del pigmento a temperatura superiores a 50°C.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Toledo (43), reporta para clorofila un valor de $D=13.2$ días y una $Z=38.8^{\circ}\text{C}$ y para caroteno de hígado de res un valor $Z=25.3^{\circ}\text{C}$. En este caso, como en la comparación de E_a relativa, podemos asumir que son relativamente similares a los calculadas para laca y pigmento de ácido carminico por tratarse de materiales naturales.

EFECTO DE LUZ Y AIRE:

Como podemos observar en la figura 22 y cuadro # 14, se tiene que las condiciones más adversas para la estabilidad de la laca son en presencia de luz y aire, con un valor $D=51.4$ días y un tiempo de vida media de 241.8 días. Como era de esperarse la atmósfera de nitrógeno y la ausencia de luz, favorecen la estabilidad de la laca con un valor $D=3,019.3$ días y un tiempo de vida media de 436.1 días.

En base a la figura 22, podemos inferir que el agente más negativo para la estabilidad de la laca es la luz.

En la figura 23 y cuadro # 15, se muestra el efecto de luz y aire en la estabilidad del pigmento. Se observa que las

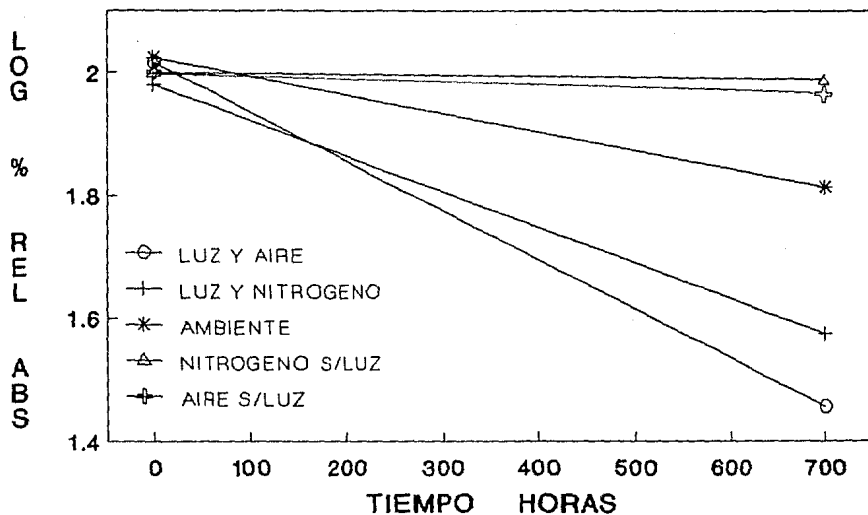


Fig. 22 EFECTO DE LUZ Y AIRE EN LA ESTABILIDAD DE LACA DE ACIDO CARMINICO

CUADRO No. 14

EFECTO DE LUZ Y AIRE EN LACA DE ACIDO CARMINICO

<u>CONDICION</u>	<u>R²</u>	<u>K</u> (Hr ⁻¹)	<u>1/K = D</u> (Días)	<u>t^{1/2}</u> (Días)
Luz y aire	0.99452	- 0.00001	51.44	241.04
Luz y nitrógeno	0.99227	- 0.00058	71.03	239.96
Ambiente	0.98704	- 0.00031	134.48	265.58
Ambiente sin luz	0.96740	- 0.000015	2,620.58	341.72
Nitrógeno sin luz	0.95533	- 0.000013	3,819.32	436.18

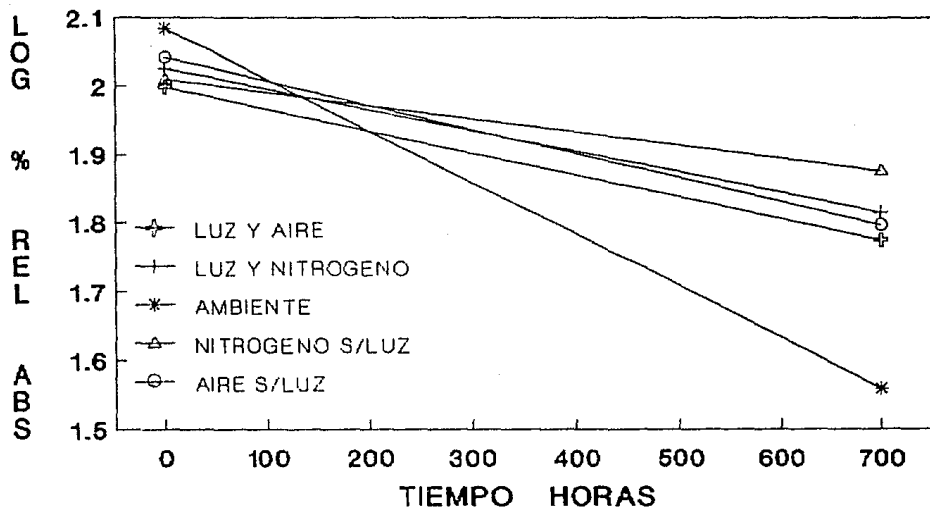


Fig. 23 EFECTO DE LUZ Y AIRE EN LA ESTABILIDAD DEL PIGMENTO DE ACIDO CARMINICO

CUADRO No. 15

EFECTO DE LUZ Y AIRE EN PIGMENTO DE ACIDO CARMINICO

<u>CONDICION</u>	<u>R²</u>	<u>K</u> (Hr ⁻¹)	<u>1/K = D</u> (Días)	<u>t^{1/2}</u> (Días)
Luz y aire	0.93470	- 0.000350	116.4	262.47
Luz y nitrógeno	0.90500	- 0.000305	136.30	305.09
Ambiente	0.95700	- 0.00075	55.31	203.03
Ambiente sin luz	0.99940	- 0.000321	129.52	204.20
Nitrógeno sin luz	0.94040	- 0.000194	214.00	400.00

condiciones ambiente (T° ambiente, luz del día y aire), son las más adversas ya que presenta un valor D=55.31 días y un tiempo de vida media de 283.83 días.

Análogamente que para la laca las condiciones de mayor estabilidad son en atmósfera de nitrógeno y sin luz, presentando un valor D=214.0 días y un tiempo de vida media de 480.0 días. Cabe resaltar que aunque las condiciones de mayor estabilidad sean las mismas para ambas muestras, el valor D es superior para laca que para pigmento, por lo tanto es más estable.

APLICACION DEL COLORANTE COMO REALZADOR DE COLOR EN UN PRODUCTO CARNICO

ADICION DEL COLORANTE

Los valores de pH durante las etapas de la preparación de la salmuera se presentan en el cuadro # 16 :

Como se puede observar, en la segunda etapa (agua + fosfato), se obtiene el pH más alcalino (9.45) por ello, es el más adecuado para la adición de la laca, ya que favorece la solubilización del colorante.

CUADRO No. 16

pH EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE PREPARACION DE LA SALMUERA

NUM. REPETICIONES	AGUA	AGUA + FOSFATO	AGUA + FOSFATO + PROTEINA	AGUA + FOSFATO + PROTEINA + SALES
1	4.21	9.5	8.7	8.7
2	4.23	9.41	8.67	8.67
3	4.22	9.45	8.68	8.68
x	4.22 ± 0.01	9.45 ± 0.01	8.68 ± 0.01	8.68 ± 0.01
<p>DONDE:</p> <p style="text-align: center;">x = Promedio aritmetico de pH</p>				

CONCENTRACION OPTIMA DE COLORANTE

Con respecto a la concentración de colorante, se determinó como óptima la de 0.00117%, como resultado de una evaluación sensorial que se efectuó para 4 muestras, correspondiendo cada una, a una concentración diferente en un intervalo de 0.001% a 0.005%. (Las concentraciones probadas fueron: A=0.0011, B=0.00117, C=0.0025 y D=0.005%)

Los resultados de los análisis estadísticos son presentados en el cuadro # 17.

3.5.3 COMPARACION CON RESPECTO A COSTOS DE UN COLORANTE SINTETICO Y LA LACA DE COCHINILLA

En base a las concentraciones utilizadas de colorantes (rojo de la cochinilla y eritrocina) encontradas para la elaboración de un producto cárnico prototipo jamón, se realizó un análisis comparativo de costos.

El costo por kg. de colorante sintético rojo # 3 (Eritrocina) es, en el año 1990 de 44,990 pesos, y el del colorante natural rojo de cochinilla en laca es de 900,000 pesos.

CUADRO No. 17

RESULTADOS DE ANALISIS ESTADISTICOS

DETERMINACION:	METODO:	α		OBSERVACIONES:
1 CAPACITACION DE LOS JUECES SEMI-ENTRENADOS PARA DETECTAR DIFERENCIAS ENTRE LOS COLORANTES EMPLEADOS	DUO-TRIO	0.05	PROBABILIDAD 1/2	SE DETERMINO QUE DE LOS 32 JUICIOS EMITIDOS POR LOS 8 JUECES, EL 78% DE LAS RESPUESTAS FUERON CORRECTAS, POR LO QUE SE CONCLUYE QUE LOS JUECES ESTABAN DEBIDAMENTE CAPACITADOS PARA DETECTAR DIFERENCIAS ENTRE LOS COLORANTES EMPLEADOS.
2 CONCENTRACION OPTIMA DEL COLORANTE DE LA COCHINILLA EN EL PROTOTIPO JAMON.	ANOVA	0.05	F _c = 27.16 F _t = 2.96	COMO F _c ES MAYOR QUE F _t SE DETERMINO QUE EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MUESTRAS. POSTERIORMENTE LA PRUEBA DUNCAN MOSTRO QUE LA CONCENTRACION OPTIMA FUE 0.00117%.
3 ESTUDIO DE PREFERENCIA CON RESPECTO A COLOR, OLOR SABOR, Y APARIENCIA GENERAL, ENTRE EL PROTOTIPO JAMON COLOREADO CON LACA DE COCHINILLA Y CON ERITROSINA	ANALISIS PARA DOS MUESTRAS APAREADOS	0.05	T _c = 8.36 T _t = 1.90	DEBIDO A QUE T _c ES MAYOR QUE T _t , SE ASUME QUE EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MUESTRAS. TAMBIEN SE ENCONTRO QUE LA LACA DE COCHINILLA, ADEMÁS DE REALZAR EL COLOR, FAVORECE AL OLOR, SABOR Y APARIENCIA GENERAL.

La concentración de colorante sintético adicionada, representa 0.67 pesos (0.00023 dls.) por kilogramo de salmuera y de 10.53 (0.0037 dls.) pesos por kilogramo de salmuera para la laca de cochinilla.

Esto representa 0.000094 dolares por kilogramo de producto para el caso de eritrocina y 0.0014 dolares por kilogramo de producto si se usa laca de cochinilla como realizador de color del prototipo jamón, pensando en un producto para exportación.

Esto implica que el uso de colorante de cochinilla aumenta considerablemente el costo de colorante por kg de producto. Sin embargo la FDA prohibió en el primer trimestre de 1990 al rojo laca # 3 por causar problemas de cáncer en tiroides lo cual hace que el colorante rojo de la cochinilla sea más atractivo como alternativa a este color sintético. Cabe mencionar que el pigmento rojo núm. 3 aún es permitido.

CAPITULO IV CONCLUSIONES

1. La longitud de onda a la cual se tiene la mayor absorbancia, varía de acuerdo a la presentación comercial (laca o pigmento), además de que se ve influenciada por el tipo de extracción realizada, la purificación del ácido camúrico y los compuestos que acompañan a éste ácido.

En el espectro ultravioleta, las lecturas de absorbancia deberán efectuarse a 280 nm para laca y 285 nm para pigmento.

Evaluaciones de degradación del colorante de la cochinilla podrán realizarse a través de lecturas de absorbancia a la longitud de onda de 515 nm para laca y 528 nm para pigmento en el espectro visible.

2. El pH en el cual se logra mayor solubilidad de laca de cochinilla, es en la región alcalina cercana a 11 y para pigmento es en pH neutro.

Para fines de aplicación deberá tomarse en cuenta que para aprovechar al máximo la laca de cochinilla, deberá ser usada a partir de concentrados alcalinos. Debido a que el pigmento es soluble en pH cercanos a la neutralidad, podrá ser utilizado directamente en productos alimenticios que contengan una adecuada cantidad de agua libre.

3. El ácido camúrico es un colorante poco sensible a las condiciones del medio en que se encuentra, ya que es ligeramente afectado por la temperatura y un poco más afectado por factores físicos como la luz y el oxígeno. Se observa que la degradación del colorante sigue una cinética de primer orden, lo cual permitió expresar la estabilidad del colorante en términos de vida media.

En general, el aumento de la temperatura afecta negativamente la estabilidad de la laca. La laca tiene un tiempo de vida media de 14 hr a 90°C , lo cual muestra que este producto puede ser sometido a procesos térmicos severos, sin degradarse significativamente. Para el pigmento se tiene un tiempo de vida media de 61 días a 90°C , por lo cual, también puede ser aplicada en alimentos que necesiten tratamientos térmicos severos.

La Energía de Activación para el colorante de la cochinilla, tanto en laca como en pigmento, indica mayor estabilidad con respecto a otros colorantes rojos naturales como la betaxantina y las betacianinas.

El valor Z, como un parámetro de degradación térmica, muestra que es más resistente el pigmento que la laca a las temperaturas estudiadas (laca $Z = 21.7^{\circ}\text{C}$ y pigmento $Z = 28.3^{\circ}\text{C}$).

El valor D a la temperatura de menor estabilidad es para la laca $D = 0.27$ días y para pigmento $D = 28.3$ días. Sin embargo el pigmento se degrada -- perdiendo absorbancia al mismo tiempo que cambia de tonalidad, lo cual debe de tomarse en cuenta para una posible aplicación.

4. Al igual que otros colorantes naturales como los pigmentos de betabel y de la riboflavina, el colorante de la cochinilla es fotolábil por lo cual debe de evitarse la sobreexposición a la luz. El colorante de la cochinilla es ligeramente afectado por la presencia de oxígeno, pero es mucho más estable con respecto a otros colorantes rojos naturales, como los de betabel que presentan oscurecimiento y pérdida de capacidad tintórea.

5. Con respecto a la elaboración del prototipo jamón, se logró la mayor solubilidad de la laca de cochinilla al finalizar la adición de los fosfatos durante la preparación de la salmuera, ya que en éste punto se tenía la mayor alcalinidad.

Mediante un análisis sensorial se logró optimizar la concentración de la laca de cochinilla como realzador de color, siendo ésta de 0.00117%.

Al comparar sensorialmente los dos productos elaborados (con laca de cochinilla y con eritrocina), el análisis estadístico mostró diferencia significativa entre ellos, además que la laca de cochinilla realza el color.

Todo lo anterior debe estimular la realización de posteriores investigaciones encaminadas a la aplicación de éste colorante natural en diversos productos alimenticios, que sean canalizados para mercados internos y externos.

RESUMEN DE RESULTADOS

PARAMETRO	L A C A	PIGMENTO
pH de mayor solubilidad	11	neutro
Temperatura de mayor estabilidad (°C)	21	50
Valor D (días)	2600.2	1666.6
Tiempo de vida media (días)	5375.2	3641.6
Valor Z (°C)	21.7	25.3
Energía de Activación rel.	24740 cal	16570,9 cal
Mayor estabilidad con respecto a luz y aire	N ₂ sin luz D= 3019.3 días t = 436.1 "	N ₂ sin luz D = 214 días t = 480 días
Concentración óptima de laca aplicada en jarrones	0.00117%	

BIBLIOGRAFIA

- 1 Allen R. L. (1971). Colour Chemistry. Nelson, Great Britain
- 2 Badui D.S. (1981). Química de los Alimentos. UNAM, México.
- 3 Blanchard R. (1983). Les Coccides Utiles. Balliere Effils. France
- 4 Blenford D. (1985). Situación de los Colorantes Naturales. Food Tech. 7 (7) 19.
- 5 Daniel W.W. (1984) Bioestadística. Limusa. México.
- 6 Diario Oficial de la Federación. (9 - Enero- 1976). Amaranto Rojo No.2 México.
- 7 Diario Oficial de la Federación. (3 - Febrero- 1976). Carmosina (Rojo No. 5. México.
- 8 Diario Oficial de la Federación. (25- Septiembre- 1975). Determinación de Colorantes subsidiarios. México.
- 9 Diario Oficial de la Federación. (3- Febrero- 1976). Ponceau Rojo No.6 México.
- 10 Diario Oficial de la Federación. (18- Enero- 1988). Aditivos Alimenticios. México.
- 11 Diccionario Porrúa (1986). Historia, Biografía y Geografía de México. Porrúa. México.
- 12 Dziezac D.J. (1987). Applications of Food Colorants. Food Tech.. (4) 78.
- 13 Francis F. (1978). Lesser Know Food Colorants. Food Tech. 8 (8) 65.
- 14 Frey W. (1983). Fabricación Fiable de Embutidos. Acribia. España.
- 15 Furia T. (1975). Handbook of Food Aditives. Press. U.S.A.
- 16 Hart & Fisher. (1984) Análisis Moderno de los Alimentos. Acribia. España.

- 17 Herrera M. (1921). Los principales insectos mexicanos útiles y nocivos. Vida. México.
- 18 Hudson B.J. (1983). Developments in Food Proteins. Applied Science. Publishers. London.
- 19 Ilker R. (1987) In vitro Pigment Production: An Alternative to Color Synthesis. (40) 70.
- 20 Institute of Food Technologist. (1986). Food Colors. Institute of Food Technologist. USA. 6 (6) 49.
- 21 Kaerrsley M.W. and Rodríguez N. (1981). The Stability and Use of Natural Colours in Foods: Antocyanines, B- Carotene and Rivoflavin. J. Food. Technol. 16 (4) 431.
- 22 Kassner J.E. (1987) Modern Technologist in the Manufacture of Certified Food Colors. (4) 74.
- 23 Kristen W. Mc.Nutt. (1986). Food Colors. Flavors and Safety. Food Tech. (8) 72.
- 24 LANFI & COPREDEO . (1979) Grana ó Cochinilla del Nopal. LANFI & COPREDEO. México.
- 25 Levenspiel O. (1978) Ingeniería de las Reacciones Químicas. Reverté Barcelona España.
- 26 Lindner.E. (1980). Toxicología de los Alimentos. Acribia.Zaragoza España.
- 27 Loyd A.G.(1980). Extaction and Chemistry of Cochineal. Food Chemistry. 5 (9) 1.
- 28 Macguilliauray A. (1921) The Coccidae. Scarab. Illinois.USA.
- 29 Marmion M.D. (1981). Handbook of U.S. Colorants for Foods, Drugs and Cosmetics. Interscience. USA.

- 30 Marshall P.N. (1974). A simple Assay Procedure for Carmin Acids Samples
Stain Tech. 49 (1) 19.
- 31 Megos H. (1984). Colors Key Food Ingredients. Food Tech.
- 32 Metcalf C.L. (1972). Grana Costumbres y su Control. Continental. México.
- 33 Miñosa G.M. (1981). Sensory Evaluation. Methods with Statistical Analysis. Philippines. Univ. Phillipines.
- 34 Newman L. (1986). Food Colors. Food Tech. 6 (49)
- 35 Palacios R.F. (1981) Las Betalainas como Colorantes Naturales en Alimentos.
- 36 Pedrero F. & Payborn R.E. (1989) Evaluación Sensorial de los Alimentos Alambra. México.
- 37 Piña, L. (1981). Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 26 (1) 10.
- 38 Piña L. (1981). Observaciones sobre la Grana y sus Nopales Hospederos en el Perú.
- 39 Phillip T. (1984). Purification and Concentration of Natural Colorants by Membranes. Food Tech. (12) 107.
- 40 Ramos B.V. (1983). Utilización de Pigmentos Rojos de Escontria Chiotilla como Colorante en Alimentos. TESIS. UNAM. México.
- 41 Read Seal Report. (1984). Warner-Jenkinson. 46. USA.
- 42 Read Seal Reporte. (1985). Warner-Jenkinson. 84. USA.
- 43 Salazar A. (1986) Comercialización y Producción de la Grana del Nopal Rios. México.
- 44 Santos S.E. (1981). Colorantes en la Industria Alimentaria. UNAM. México.
- 45 Segarin E. (1957). Cosmetic Science, Interscience. New York.
- 46 Toledo F.T. & Chans S.Y. (1990). Advantages of Accepting Processing.

Food Tech. 44 (2) 72.

47 Valle V.P. & Merson L.R. (1983). Procesamiento Térmico de los Alimentos Enlatados. UACH. México.