



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUS SAN LUIS POTOSÍ

POSTGRADO EN
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS EN EL CULTIVO DE LA COCHINILLA FINA (*Dactylopius coccus* Costa)

JOSÉ RODOLFO ZACARÍAS ALVARADO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México

Octubre de 2019



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe José Rodolfo Zacarías Alvarado, alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del (la) Profesor(a) Santiago de Jesús Méndez Gallegos, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Influencia de factores abióticos en el cultivo de la cochinilla fina (*Dactylopius coccus* Costa) y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El (la) Consejero (a) o Director (a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, a 09 de septiembre de 2019.

José Rodolfo Zacarías Alvarado

Firma

Santiago de Jesús Méndez Gallegos
Vo. Bo. Profesor(a) Consejero(a) o Director(a) de Tesis

La presente tesis, titulada: INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS EN EL CULTIVO DE LA COCHINILLA FINA *Dactylopius coccus* Costa realizada por el alumno José Rodolfo Zacarías Alvarado, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. Santiago de Jesús Méndez Gallegos

CODIRECTOR DE TESIS:



Dr. Rafael Magallanes Quintanar

ASESORA:



M. en C. Clara Lourdes Tovar Robles

ASESOR:



Dr. Gildardo Aquino Pérez

INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS EN EL CULTIVO DE LA COCHINILLA FINA (*Dactylopius coccus* Costa)

José Rodolfo Zacarías Alvarado, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN GENERAL

Dactylopius coccus Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) es una especie de importancia económica, debido al ácido carmínico contenido en su cuerpo, el cual es empleado en diversas industrias, desde textiles hasta biomédicas. Por lo anterior, el precio de *D. coccus* varía en función de la concentración del ácido carmínico (CAC) que contenga. Sin embargo, su contenido es influenciado por diversos factores tales como: especie o variedad del nopal (*Opuntia* spp), edad y estado nutricional del hospedante, etapa de desarrollo en la que la hembra es recolectada, temperatura, humedad relativa, incidencia de luz, temporada del año en la que se cría, método de sacrificio y secado, así como el método utilizado para determinar la CAC. Por lo tanto, los objetivos del estudio fueron: comparar tres métodos de cuantificación del ácido carmínico (AC) y seleccionar el más eficiente; así como determinar el comportamiento productivo de *D. coccus* en función de la CAC (%) y del peso fresco (PF, g), en una “nopaloteca” en dos estaciones de crianza. Para la primera etapa se evaluaron tres métodos comúnmente empleados en la determinación de AC en México. En la evaluación se utilizó una muestra homogénea de cochinilla. Como resultado de dicha valoración se seleccionó aquel que permitió maximizar la CAC y se utilizó en la segunda etapa de la investigación, con algunas modificaciones para mejorar su precisión. En la segunda etapa del estudio, se estableció una “nopaloteca” de madera, con cuatro niveles de altura (0.5 m, 1.0 m, 1.5 m y 2.0 m) bajo condiciones de invernadero; las hembras se colectaron en dos fases de desarrollo: pre y postoviposición. Se llevó un registro diario de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa; el estudio se realizó en dos estaciones: primavera-verano y otoño-invierno. El PF de la cochinilla por cladodio (g), la CAC (%) obtenida en cada nivel de altura, fase de desarrollo y estación de cría; así como la CAC obtenida de cada uno de los métodos evaluados se sometieron a un análisis de varianza, empleándose la prueba

de Tukey ($p \leq 0.05$) para determinar las diferencias en promedios y se realizó un análisis de correlación utilizando el coeficiente r de Pearson. Los resultados mostraron que los métodos probados difieren estadísticamente, ya que se registraron diferencias hasta de 4.6 %, el método de Briseño-Garzón y Llanderal (2008) resultó ser el más eficiente. El comportamiento productivo de *D. coccus*, muestra una marcada variación estacional. En general, el ciclo de cultivo de otoño-invierno resultó más favorable para la cría, al generar una CAC (18 %) y PF (6.1 g por cladodio) mayor. Consistentemente, la colecta de hembras en postoviposición, registró la CAC más alta en ambas estaciones. Finalmente, se observó que los factores abióticos influyen diferencialmente sobre la calidad y rendimiento de *D. coccus*, dependiendo del ciclo del año en que se cría.

Palabras clave: ácido carmínico, cría, factores limitantes, nopaloteca

INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS EN EL CULTIVO DE LA COCHINILLA FINA *Dactylopius coccus* Costa

José Rodolfo Zacarías Alvarado, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019

GENERAL ABSTRACT

Dactylopius coccus Costa is a species of economic importance due to the carminic acid contained in its body, which is used in many biomedical and textile industries. Therefore, the price of *D. coccus* varies depending on the carmine acid concentration (CAC) it contains. However, its content is influenced by factors such as: opuntia species or variety, age and nutritional status of the host, stage of development in which the female is collected, temperature, relative humidity, light incidence, season of the year in which the cochineal slaughter and drying method is raised, as well as the method used to quantify the CAC. Therefore, the objectives of the study were: To compare three quantification methods and to select the one that quantified the highest CAC, as well as to determine the productive behavior of *D. coccus* according to the CAC (%) and fresh weight (FW), in an opuntia repository (nopaloteca) in two breeding stations. For the first stage, three methods commonly used in Mexico for carminic acid quantification were assessed. A homogeneous cochineal sample was used for assessing. As a result of this assessment, the most efficient method was selected and used in the second stage of this research, with some modifications to improve its robustness. In the second stage of the study, a nopaloteca of wood was established under greenhouse conditions with four levels of height (0.5 m, 1.0 m, 1.5 m and 2.0 m); the females were collected in two stages of development: pre and post-oviposition. A daily record of temperature, relative humidity and light intensity was kept, the study was carried out in two seasons: spring-summer and autumn-winter. The cochineal FW per cladode (g), the CAC (%) obtained at each height level, development phase and breeding season; as well as the CAC obtained from each of the evaluated methods, an analysis of variance was performed using the Tukey test ($p \leq 0.05$) to determine the significant differences in averages and a correlation analysis was done using Pearson's r coefficient. The results showed significant differences among the

methods used, since differences of up to 4.6% were recorded. The Briseño-Garzón and Llanderal (2008) method proved to be the most efficient among them. The autumn-winter cycle was more favorable for cochineal *D. coccus* breeding with a CAC of 18 % and the highest FW (6.1 g per cladode). During the spring-summer rearing a negative correlation was observed between the CAC and the PF. Consistently, the collection of cochineal in postoviposition recorded the highest CAC in both seasons.

Keywords: carminic acid, breeding, limiting factors, nopaloteca

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el tiempo de mis estudios de posgrado en la Maestría en Innovación en Manejo de Recursos Naturales con matrícula 41733005.

Al Colegio de Postgraduados, a los *Campus* San Luis Potosí y Montecillo porque siempre estuvieron sus puertas abiertas para mi deseo de conocimiento, por todas las facilidades, ¡Gracias!

Al Dr. Santiago de Jesús Méndez Gallegos por creer en mí desde el día en que nos conocimos, por guiarme durante el tiempo requerido para mi proyecto de investigación, por cada uno de los consejos y regaños, por inculcarme ese amor a la cochinilla, por todo, mil gracias Doc.

A mi consejo particular por su ayuda, sus críticas constructivas, por ubicarme en los objetivos durante las reuniones de consejo, al Dr. Aquino por su apoyo, por corregirme y exigirme resultados, al Dr. Magallanes por brindarme de su tiempo los fines de semana y asesorarme en estadística, a la M.C. Clarita por estar al pendiente durante el proceso de laboratorio y por su gran apoyo en la tesis y vida personal.

Al Dr. Francisco Morales por explicarme con paciencia las cosas que no comprendía. A la Dra. Brenda Trejo por su gran disposición a escucharme siempre y apoyarme en los trámites necesarios. También quiero agradecer al Sinodal externo (Dr. Jorge Cadena) por sus valiosas aportaciones.

A mis hermanas y hermano que, aunque no siempre coincidimos en las ideas, que a pesar de la distancia yo sé que cuando los necesite ahí estarán para apoyarme o aconsejarme; en especial a ti Mary por ser mi confidente y amiga toda la vida, por escucharme cuando tengo problemas, por hacerme reír y contagiarme de tu positivismo y buena energía. A Lupita, por tu buena compañía cuando llego a casa, por compartir momentos tan divertidos juntos, gracias. Por todo, hermanos, por todo, gracias.

A mis padres que a pesar de no comprender mi interés por la ciencia siempre me apoyan, que siempre están ahí para apoyarme en todo, mi vida no fuera la misma sin ustedes. A mi padre por ser tan duro y a la vez el mejor padre que pude tener, sé que en muchas ocasiones no saldremos de acuerdo en nuestros intereses, pero sé también cuanto lo quiero y me quiere. A mi madre por escucharme y darme votos de confianza cuando muchos me dieron la espalda, por no rendirse y no dejarme rendir en este camino, por su fuerza y comprensión, pero sobre todo por su amor (no pude tener mejor madre). El cariño de ambos es la semilla de mi vida y su fuerza es el pilar de mi existencia, con todo mi corazón, este trabajo es para ustedes. ¡Por siempre en el corazón, los amo!

“ Cuando solo en la tierra vivían los Dioses, en una región de las tierras mixtecas llamada Apoala, región de los hombres nubes, vivían la reina Culebra de Tigre, el Dios Ciervo y sus hijos; dos, los más valientes pelearon una cruenta batalla por la posesión de un enorme sembradío de hermosos nopales, siendo tan feroz y trágica la batalla que los dos murieron a causa de sus heridas.

Como resultado de su encarnizada lucha, la sangre de sus cuerpos salpicó las pencas de las plantas, convirtiéndose en Grana Cochinilla, confiriéndoles la posibilidad de transmitir a la posteridad la tinta que circulaba por sus venas.

Los otros Dioses no quisieron dejar a sus dos hermanos y mandaron a las nubes a protegerlos y así fue como estas rodearon a la Grana Cochinilla y la cubrieron con un manto blanco que hasta ahora conservan”

Contenido

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| LITERATURA CITADA | 3 |
| CAPITULO I. COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CARMÍNICO EN <i>Dactylopius coccus</i> COSTA | 5 |
| 1.1 RESUMEN | 5 |
| 1.2 ABSTRACT | 6 |
| 1.3 INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.4 MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| 1.4.1. Ubicación de sitio experimental | 9 |
| 1.4.2. Obtención de muestra biológica..... | 9 |
| 1.4.3. Criterios para la selección de métodos para cuantificar la concentración de ácido carmínico..... | 12 |
| 1.4.4 Modificaciones a la metodología de Briseño-Garzón y Llanderal (2008) | 15 |
| 1.4.5 Análisis estadístico..... | 16 |
| 1.5 RESULTADOS | 16 |
| 1.5.1. Comparación de tres métodos para la cuantificación de la concentración de ácido carmínico..... | 16 |
| 1.5.2. Determinación del tiempo de ebullición sobre la concentración de ácido carmínico..... | 17 |
| 1.5.2.2 Metodología de Briseño-Garzón y Llanderal (2008) con las modificaciones realizadas..... | 19 |
| 1.6 DISCUSIÓN | 20 |

| | |
|---|----|
| 1.7 CONCLUSIONES | 22 |
| 1.8 LITERATURA CITADA | 23 |
| CAPITULO II. PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE <i>Dactylopius coccus</i> COSTA, EN UNA NOPALOTECA, EN DOS ESTACIONES CRIANZA | 28 |
| 2.1. RESUMEN | 28 |
| 2.2 ABSTRACT | 30 |
| 2.3 INTRODUCCIÓN | 31 |
| 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 2.4.1 Ubicación del sitio de estudio..... | 33 |
| 2.4.2 Simiente y hospedante utilizado..... | 33 |
| 2.4.3 Técnica de propagación artificial..... | 33 |
| 2.4.4 Características del sistema de cría | 34 |
| 2.4.6 Análisis estadístico..... | 39 |
| 2.5 RESULTADOS | 40 |
| 2.5.1 Concentración de ácido carmínico en dos estaciones de crianza de <i>D. COCCUS</i> | 40 |
| 2.5.2 Peso fresco (PF) en dos estaciones de crianza de <i>D. coccus</i> | 44 |
| 2.6.3 Análisis de correlación (primavera-verano y otoño-invierno)..... | 48 |
| 2.7 DISCUSIÓN | 50 |
| 2.8 CONCLUSIONES | 53 |
| 2.9 LITERATURA CITADA | 55 |
| CONCLUSIONES GENERALES | 58 |

ANEXO 1. Imágenes del ciclo biológico de *Dactylopius coccus* durante el estudio
realizado..... 59

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Concentración de ácido carmínico (%) en <i>D. coccus</i> obtenida por tres métodos de cuantificación..... | 17 |
| Cuadro 2. Concentración de ácido carmínico (%) en <i>D. coccus</i> obtenida en diferentes tiempos de ebullición. | 18 |
| Cuadro 3. Valores promedio de temperatura (°C) máxima (TMX), promedio (TPROM), mínima (TMIN), humedad relativa (%) máxima (HRMAX), promedio (HRPROM) y mínima (HRMIN), iluminación (lux) total (ILTOTAL) y proporción de iluminación (%IL) registrados en dos estaciones de crianza, dos fases de desarrollo y en cuatro niveles de altura de una “nopaloteca”..... | 37 |
| Cuadro 4. Concentración de ácido carmínico (%) de <i>D. coccus</i> criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca” en dos estaciones de crianza. | 41 |
| Cuadro 5. Concentración de ácido carmínico (%) en <i>D. coccus</i> criada en cuatro niveles de “nopaloteca”, durante el ciclo primavera-verano. | 42 |
| Cuadro 6. Concentración de ácido carmínico (%) de <i>D. coccus</i> criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”, durante el ciclo de cultivo otoño-invierno..... | 44 |
| Cuadro 7. Valores promedio de peso fresco (g) de <i>D. coccus</i> criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”, en dos estaciones de crianza..... | 45 |
| Cuadro 8. Valores promedio de peso fresco (g) de <i>D. coccus</i> criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”, durante la estación de crianza primavera-verano..... | 46 |
| Cuadro 9 . Valores promedio de peso fresco (g) en <i>D. coccus</i> criada en cuatro niveles altura en “nopaloteca”, durante el ciclo otoño-invierno. | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Sistema de cría de <i>D. coccus</i> utilizado durante el experimento. | 10 |
| Figura 2. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) mantenidas para la cría de <i>D. coccus</i> durante el estudio. | 11 |
| Figura 3. Método de recolección de las hembras de <i>D. coccus</i> utilizado. | 12 |
| Figura 4. Curva de calibración que confirma la linealidad de la respuesta del equipo.. | 18 |
| Figura 5. A: Técnica de infestación artificial de <i>D. coccus</i> empleada. B: Acomodo de los cladodios infestados en la estructura de la “nopaloteca” | 34 |
| Figura 6. Ubicación del sensor de temperatura y humedad relativa empleado. | 36 |
| Figura 7 . Concentración de ácido carmínico en dos fases de desarrollo de <i>D. coccus</i> criada en “nopaloteca”. | 40 |
| Figura 8 . Concentración de ácido carmínico obtenida en cuatro niveles y dos fases de desarrollo de <i>D. coccus</i> criada en “nopaloteca”, en el ciclo de primavera-verano. | 42 |
| Figura 9. Concentración de ácido carmínico en dos fases de desarrollo de <i>D. coccus</i> criada en cuatro niveles de “nopaloteca”, en la estación otoño-invierno. | 43 |
| Figura 10 . Peso fresco (g) de <i>D. coccus</i> criada en “nopaloteca” en cuatro niveles de altura en dos estaciones de crianza. | 45 |
| Figura 11. Peso fresco (g) en dos fases de desarrollo de <i>D. coccus</i> criada durante el ciclo de cultivo primavera-verano. | 47 |
| Figura 12. Peso fresco (g) en dos fases de desarrollo de <i>D. coccus</i> durante el ciclo de otoño-invierno. | 48 |
| Figura 13. Correlación entre peso fresco (PF) y concentración de ácido carmínico (AC) de <i>D. coccus</i> en la estación de primavera-verano y humedad relativa mínima (HRM), humedad relativa promedio (HRPROM), humedad relativa máxima (HRMAX), temperatura mínima (TMIN), temperatura promedio (TPROM), temperatura máxima (TMAX) e iluminación total (ILTOTAL). | 49 |
| Figura 14. Correlación entre peso fresco (PF) y concentración de ácido carmínico (AC) de <i>D. coccus</i> en la estación de otoño-invierno y humedad relativa mínima (HRMIN), humedad relativa promedio (HRPROM), humedad relativa máxima (HRMAX), | |

| | |
|---|----|
| temperatura mínima (TMIN), temperatura promedio (TPROM), temperatura máxima (TMAX) e iluminación total (ILTOTAL)..... | 50 |
| Figura 15. Hembras adultas de <i>D. coccus</i> y ninfas con minutos de haber nacido..... | 59 |
| Figura 16 . Proceso de muda de las ninfas de la primera fase de desarrollo de <i>D. coccus</i> a la segunda fase de desarrollo (puntos rojos)..... | 60 |
| Figura 17. Hembras adultas de <i>D. coccus</i> establecidas en los cladodios. | 60 |
| Figura 18. Macho adulto de <i>D. coccus</i> en fase reproductiva. | 61 |
| Figura 19. Muestra de <i>D. coccus</i> antes de cuantificar su concentración del ácido carmínico. | 62 |
| Figura 20. Dosis de una misma muestra de <i>D. coccus</i> analizadas con diferentes métodos..... | 62 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

La cochinilla fina *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae), es un insecto parásito obligado de diversas especies de *Opuntia* Mill y *Nopalea* Salm-Dyck, en los cuales se alimenta y reproduce. Las cochinillas y el nopal son especies nativas del continente americano (Diodato *et al.*, 2004; Claps, 2010; Ramírez-Puebla *et al.*, 2010), en donde se distribuyen ampliamente. Todas las especies de *Dactylopius* se caracterizan por tener el cuerpo cubierto de cera, pulverulenta o filamentosa, y por la presencia de ácido carmínico, principal componente de su hemolinfa (Chávez-Moreno *et al.*, 2010; Claps, 2010).

El tamaño, la concentración de ácido carmínico (CAC) y las características de la cubierta cerosa permiten distinguir dos grupos de cochinillas, silvestre y la denominada cochinilla fina o *D. coccus*. Esta última, se caracteriza por ser de mayor tamaño y presentar cera pulverulenta que le brinda protección (Chávez-Moreno *et al.*, 2010). El grupo de cochinillas silvestres está constituido, hasta el momento, por 10 especies, las cuales se distinguen por ser de menor tamaño, con cera en forma de filamentos, semejante al algodón, y conformar colonias densas (Mathenge *et al.*, 2009; Torres y Giorgi, 2018); sin embargo, la CAC en *D. coccus* es mayor que en las especies silvestres (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). Estudios previos registran concentraciones en *D. coccus* entre 14 % y 26 %; mientras que, en el grupo de las especies silvestres, no excede 8 % del peso total del insecto (Yamada *et al.*, 1993; Hernández-Hernández *et al.*, 2005; Chávez-Moreno *et al.*, 2010).

El precio de *D. coccus* depende de la CAC que contenga (Müller-Maatsch y Gras, 2016) y ésta depende de diversos factores, tanto biológicos como ambientales (Tello y Vargas, 2015). Entre los biológicos destacan: la especie y variedad del nopal, edad del cladodio, estado nutricional (Méndez-Gallegos *et al.*, 2010) y etapa de desarrollo en la que se recolecta la hembra (Ramírez-Cruz y Llanderal-Cázares, 2013), entre otros. Dentro de los factores físicos influye la temperatura, humedad relativa, altura de la planta en que se cría la cochinilla, cantidad de luz (Tello y Vargas, 2015), temporada del año en la que se críe, así como, los métodos de sacrificio, secado y conservación, así como las técnicas empleadas en la cuantificación del ácido carmínico (Rodríguez *et al.*, 2005).

Considerando que todos estos aspectos pueden influir en la CAC y productividad de *D. coccus*, en la presente investigación se pretende contribuir a la solución de dicha problemática. Este documento consta de dos capítulos; en el primero se aborda la valoración de tres métodos de cuantificación del ácido carmínico, y la selección y optimización del más eficiente y confiable; y el segundo incluye aspectos relacionados al comportamiento productivo de *D. coccus*, en una “nopaloteca”, en dos estaciones de cría, en función de la CAC (%) y el peso fresco (g), y considerando el impacto diferencial de algunos factores abióticos.

LITERATURA CITADA

- Chávez-Moreno, C. K., A. Tecante., and A. Casas. 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodiversity and Conservation* 18(13):3337.
- Chávez-Moreno, C. K., A. Tecante., M. Fragoso-Serrano, and R. Pereda-Miranda. 2010. Metabolic profiling of *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) species pigments by geographical origin and hosts using multivariate data analysis. *Biochemical Systematics and Ecology* 38(1): 671-679.
- Claps L., E. 2010. Morfología, sistemática y distribución de Dactylopiidae (Hemiptera: Coccoidea). *In: Portillo, L. y Viguera, A. L. (eds). Conocimiento y Aprovechamiento de la Grana Cochinilla. Universidad de Guadalajara, México. pp: 17-29.*
- Diodato, L., M. Iturre., y M. E. Paz. 2004. Especies de *Dactylopius* en Argentina y factores que inciden en su producción. *Quebracho-Revista de Ciencias Forestales* 11(1): 67-72.
- Hernández-Hernández, C. F., G. M. F. García., D. I. Del Río., y M. H. Lanz., 2005. La cochinilla fina del nopal, colorante mexicano para el mundo. *Ciencia* 56(4): 78-86.
- Mathenge, C. W., P. Holford., J. H. Hoffmann., R. Spooner-Hart., G. a. C. Beattie., and H. G. Zimmermann., 2009. The biology of *Dactylopius tomentosus* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Bulletin of Entomological Research* 99(6):551-559.
- Méndez-Gallegos, S. de J., L. A. Tarango-Arámbula., A. Carnero., R. Tiberi., y O. Díaz-Gómez. 2010. Crecimiento poblacional de la cochinilla *Dactylopius coccus* Costa criada en cinco cultivares de nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. *Agrociencia* 44(2):225-234.
- Müller-Maatsch, J., and C. Gras. 2016. The “Carmine Problem” and Potential Alternatives. *In: Carle R. and Schweiggert, R. M. (eds), Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. pp: 385-428.*
- Ramírez-Cruz, A., y C. Llanderal-Cázares. 2013. Fecundidad potencial de *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae) bajo condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Entomología* 39(1):170-173.
- Ramírez-Puebla, S. T., M. Rosenblueth., C. K. Chávez-Moreno., M. C. C. P. de Lyra., A. Tecante., and E. Martínez-Romero. 2010. Molecular phylogeny of the genus *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) and identification of the symbiotic bacteria. *Environmental Entomology* 39(4):1178-1183.

- Rodríguez, L. C., E. Faundez., J. Seymour., L. Escoba., L. Espinoza., M. Petrouts., A. Ayres., y H. Niemeyer. 2005. Factores bióticos y concentración de ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* COSTA) (Homoptera: Dactylopiidae). *Agricultura Técnica* 65(1): 323-329.
- Tello, V., y J. Vargas. 2015. Efecto de la luz artificial a diferentes fotoperiodos sobre dos variables productivas de la grana cochinilla, *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) para su cultivo bajo condiciones controladas. *Idesia (Arica)* 33(3): 23-30.
- Torres, J. B., and J. A. Giorgi. (2018). Management of the false carmine cochineal *Dactylopius opuntiae* (Cockerell): perspective from Pernambuco state, Brazil. *Phytoparasitica* 46: 331-340.
- Yamada, S., N. Noda., E. Mikami., and J. Hayakawa. 1993. Analysis of natural coloring matters in food. 4. Methylation of cochineal color with diazomethane for the analysis of food products. *J. Agric. Food Chem.* 41(1): 1071-1075.

CAPITULO I. COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CARMÍNICO EN *Dactylopius coccus* COSTA

1.1 RESUMEN

El ácido carmínico (AC) es un colorante de origen natural del grupo de las antraquinonas, de alta calidad y poder colorante obtenido principalmente de las hembras de *D. coccus*, utilizado en diferentes industrias, debido a la ausencia de efectos genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. Para su cuantificación existen diferentes técnicas tales como la espectrofotometría, fluorimetría, cromatografía líquida de alta eficacia, espectrografía de masas, cromatografía de gases con electroforesis capilar y colorimetría, entre otros. Sin embargo, su empleo está supeditado por las limitantes de materiales y equipo de laboratorio necesarios. Adicionalmente, cada metodología presenta variaciones en precisión, generando controversias e incertidumbre entre productores y empresas formuladoras. Ante la ausencia de una técnica de cuantificación estándar o normalizada que brinde mayor certidumbre y permita monitorear la calidad como resultado de los diversos factores que interactúan, la investigación evaluó tres métodos de cuantificación del ácido carmínico, y con el fin de seleccionar y proponer una metodología confiable, económica y simple, para determinar la concentración de ácido carmínico en *D. coccus*. Se seleccionaron y compararon tres métodos empleados en México que requieren equipo de uso común en los laboratorios. A partir de una sola muestra homogénea de cochinilla se determinó la concentración de AC para en cada método empleado. En el diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones y 10 observaciones por método y se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para determinar diferencias en concentraciones. Los resultados mostraron que los tres métodos comparados determinaron valores estadísticamente diferentes de AC, que oscilaron entre 12.9 y 17 %, en una misma muestra. La metodología propuesta por Briseño-Garzón y Llanderal (2008) resultó la más eficiente. Esta metodología, con algunas modificaciones puede brindar mayor confiabilidad.

Palabras clave: Cochinilla, evaluación, métodos de cuantificación.

1.2 ABSTRACT

Carminic acid is a dye of natural origin of the anthraquinone group of high quality and coloring power obtained mainly from the females of *D. coccus*, used in different industries, due to the absence of genotoxic, mutagenic and carcinogenic effects. For carmine acid quantification there are different techniques such as: spectrophotometry, fluorometry, high efficiency liquid chromatography, mass spectrography, gas chromatography with capillary electrophoresis and colorimetry, among others. However, its use is contingent on the limitations of materials and laboratory equipment. Additionally, each methodology has accuracy variations which generating controversies and uncertainty between producers and formulating companies. In the absence of a standard or standardized quantification technique that provides greater certainty and allows quality monitoring as a result of the various interacting factors, this research aims were to evaluate three methods of carminic acid quantification, and to select and propose a reliable, economical and simple methodology, to determine the concentration of carminic acid in *D. coccus*. Three methods used in Mexico that require common use laboratory equipment were selected and compared. The concentration of carmine acid in each technique was quantified from a single homogeneous sample of cochineal. The experimental design was completely randomized with three replications and 10 observations per method and the Tukey test ($p \leq 0.05$) was used to determine differences among concentrations. The results showed statistically different values of carmine acid among the three methods with values ranging between 12.9 and 17% in the same sample. As a result, the methodology proposed by Briseño-Garzón and Llanderal (2008) was the most efficient.

Key words: Cochineal, assessing, quantification methods.

1.3 INTRODUCCIÓN

El ácido carmínico (AC) es un colorante conformado por un núcleo de antraquinona con ácido carboxílico, un grupo metilo, cuatro hidroxilos y hexosa, unidos (Dapson, 2007), que ha sido objeto de numerosas investigaciones desde 1818 hasta nuestros días. Fue sintetizado por primera vez por Allevi *et al.* (1991); su fórmula molecular condensada es $C_{22}H_{20}O_{13}$ (Shamim *et al.*, 2014), su estructura química: ácido 7-beta-D-glucopiranosil-9,10-dihidro-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxo-2-antracencarboxílico (Müller-Maatsch y Gras, 2016) y su peso molecular es de 492.4 Da (Nakayama *et al.*, 2015). Es un ácido triprótico con valores de pKa, $pK_{a1} = 2.81 \pm 0.09$, $pK_{a2} = 5.43 \pm 0.04$, $pK_{a3} = 8.10 \pm 0.03$ (Guillermin *et al.*, 2018). Es soluble en agua, ésteres, ácidos, alcoholes, y soluciones alcalinas e insoluble en éter de petróleo, cloroformo y benceno (Borges *et al.*, 2012); es estable en la luz, aunque su color depende del pH (Dufossé, 2014); ya que a valores inferiores de 4.5, se torna de color naranja tenue; en el rango de 7 a 7.7 se torna rojo claro y rojo, y a pH superior a 12, su color es rojo magenta (Gamboa y Leidinger 1988; Şahinbaşkan *et al.*, 2018).

El AC ha sido utilizado en industrias de cosméticos, textiles (Luo *et al.*, 2017), como pigmento pictórico (Dupey, 2017), biomedicina y alimentos, para los cuales no requiere certificación (Schlüter *et al.*, 2017); recientemente también se ha utilizado en la determinación de boro (en ácido sulfúrico) y como reactivo para la determinación de metales, en medios acuosos, y asociado con algunos metales es útil para determinar fosfato y otras sales (Fain *et al.*, 2007). Destaca su uso para sensibilizar los semiconductores en celdas solares, donde aumenta la eficiencia (Park *et al.*, 2014; Kumara *et al.*, 2017; Roslan *et al.*, 2018), para tinciones microbianas (Rojas y Pérez, 2018), además de ser útil en la elaboración de placas reveladoras dentobacterianas utilizadas en odontología (Guzmán *et al.*, 2011) entre otros usos. Las antraquinonas, grupo al que pertenece el AC, tienen además propiedades antimicrobiales, antivirales, citostáticas (Pankewitz y Hilker, 2008); y la gran variedad de usos que tiene se debe a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, principalmente, a su alta estabilidad al calor y a la luz, resistencia a la oxidación, y propiedades no cancerígenas ni toxicidad para el

humano (Harp y Barrows, 2015). A pesar de lo anterior, se ha observado que en algunos consumidores puede provocar reacciones adversas (Ohgiya *et al.*, 2009; Dufossé, 2014; Mokhtari *et al.*, 2015).

El AC puede ser obtenido a partir de los insectos *Porphyrophora hamelii* y *P. polonica* (Hemiptera: Margarodidae) (Rasmussen *et al.*, 2018) y también se encuentra presente en las especies del género *Dactylopius*, en estas últimas funge como disuasivo (Kannangara *et al.*, 2017). Se ha sugerido como coadyuvante en la prevención de infecciones por entomofágos (Pankewitz y Hilker, 2008). Por su facilidad de cría y recolección se extrae principalmente, de los cuerpos secos de las hembras de *D. coccus* (Borges *et al.*, 2012; Solymosi *et al.*, 2015), registrando la concentración más alta (14-26 %) de su peso seco total (Yamada *et al.*, 1993). *D. coccus* contiene, además del AC, otros elementos, entre los que resaltan cera (4.7 %), grasas (3.81%), proteínas (37.3 %), carbohidratos (31 %) y cenizas (1.1%) (Zheng *et al.*, 2008).

El componente de mayor importancia en *D. coccus* es el AC, por lo que su precio en el mercado internacional depende de la concentración de éste en su cuerpo (Flores-Alatorre *et al.*, 2014). Para su determinación, existen métodos mediante la espectrofotometría, fluorometría (Dapson *et al.*, 2007), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés), cromatografía de masas (Sabatino *et al.*, 2012), cromatografía de gases con electroforesis capilar y colorimetría (Tomasini *et al.*, 2018; Kramell *et al.*, 2019), entre otros. No obstante, la mayoría de estas técnicas requieren de equipos costosos, lo que restringe su uso (Dapson *et al.*, 2007). En respuesta a esta problemática, las agencias y empresas formuladoras, universidades, centros de investigación y productores han generado métodos *ad hoc* para la cuantificación de AC. Sin embargo, éstos métodos no son consistentes en los resultados, en una misma muestra, debido a factores no controlables (Deveoglu *et al.*, 2011), generando conflictos entre productores y empresas formuladoras. Considerando que la extracción del AC ha sido objetivo de numerosos estudios y que muy poco se ha investigado para validar y optimizar los métodos de cuantificación, el estudio tuvo por objetivo evaluar tres métodos de cuantificación de ácido carmínico basados en espectrofotometría, utilizados comúnmente

en México y proponer una metodología confiable y económica para determinar la concentración de AC en *D. coccus*.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1. Ubicación de sitio experimental

La investigación se desarrolló durante el periodo de marzo a julio de 2018, en el Laboratorio Agua, Suelo y Planta del Colegio de Postgraduados *Campus* San Luis Potosí, ubicado en Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México (22°37'55.66" N, 101°42'42.96" O) a una altitud de 2,078 m.

1.4.2. Obtención de muestra biológica

Se adquirió una muestra de 200 g de hembras grávidas *D. coccus* y 30 cladodios *O. ficus-indica* L. Mill cv Esmeralda de ocho meses de edad, sanos y turgentes. Previo a la infestación, los cladodios se limpiaron cuidadosamente, para remover polvo, residuos, depredadores de la cochinilla, así como evitar la incidencia de cochinilla silvestre (*D. opuntiae*).

1.4.2.1 Infestación

Los cladodios limpios se colocaron horizontalmente a manera de "cama" sobre una base metálica y encima de éstos, se colocó un tamiz con marco de madera de 40 x 40 cm, en el cual se dispusieron las hembras ovíparas. Las ninfas neonatas (única fase móvil del insecto) descendieron por el tamiz hasta llegar a los cladodios, donde se establecieron. Los cladodios ya infestados se retiraron y se colocaron en el sistema de cría; cada 48 h se colocaron nuevos cladodios, hasta lograr la infestación de todos.

1.4.2.2 Sistema de cría

La cría del insecto se estableció en un cajón de madera (1.0 m de ancho, 2.0 m de largo y 0.40 m de profundidad), con divisiones cada 5 cm de hilo plástico, a fin de permitir el acomodo y separación de los cladodios, durante todo el ciclo de desarrollo del insecto (**Figura 1**).



Figura 1. Sistema de cría de *D. coccus* utilizado durante el experimento.

La estructura de crianza se mantuvo en un invernadero con cubierta de cristal a dos aguas, con orientación norte-sur, bajo condiciones semicontroladas. Para el registro de temperatura y humedad relativa se utilizó un sensor HOB0 Pro v2 temp/RH onset, USA. La cría de cochinilla se mantuvo a temperatura promedio de 24.6° C y humedad relativa de 30.8 % (**Figura 2**).

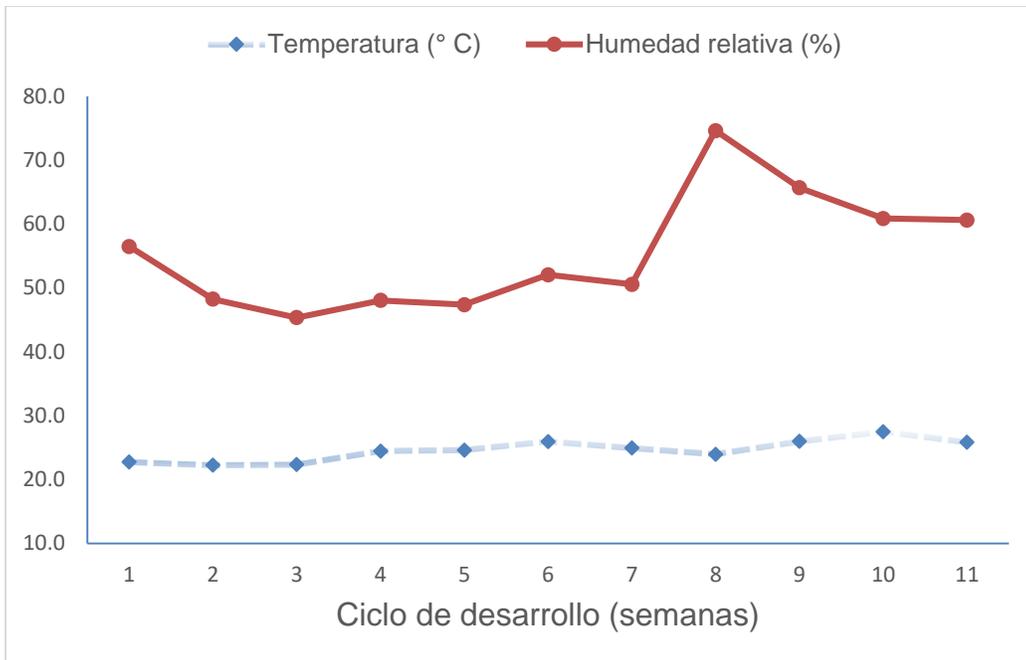


Figura 2. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) mantenidas para la cría de *D. coccus* durante el estudio.

1.4.2.3. Colecta y postcosecha de *D. coccus*

Las hembras adultas se desprendieron del cladodio con un pincel suave, a los 71 d luego de la infestación, antes de que ovipositaran (**Figura 3**). Los insectos recolectados se mantuvieron en una caja Petri.



Figura 3. Método de recolección de las hembras de *D. coccus* utilizado.

Luego de la cosecha, los insectos se sacrificaron a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 d en un congelador Maytag®; posteriormente, se extendieron sobre un tamiz de 40 x 40 cm por un periodo de 10 d a temperatura ambiente ($23.9\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta llegar a peso constante. El tamiz se removió dos veces al día para evitar grumos y uniformizar el secado, así como evitar la aparición de microorganismos. Finalmente, la muestra se pulverizó en un molino *Wiley Mini Mill*® (3383-L10 115 V, 60 Hz, Thomas Scientific Swedesboro, NJ 08085-0099-U.S.A.), reduciéndolas a un tamaño de partícula tamiz de malla 40. La muestra compuesta se dividió a su vez en tres submuestras, las cuales se emplearon en los análisis posteriores, para la cuantificación del ácido carmínico.

1.4.3. Criterios para la selección de métodos para cuantificar la concentración de ácido carmínico

Para seleccionar los métodos se realizó, inicialmente, una búsqueda bibliográfica sobre las técnicas y metodologías comúnmente utilizadas para cuantificar la CAC. Luego se seleccionaron tres métodos considerando la sencillez que implicara cada método,

confiabilidad, costos, infraestructura y equipo disponibles en el Laboratorio Agua-Suelo-Planta, del *Campus* San Luis Potosí. Los métodos seleccionados para su evaluación fueron:

1. Empresa formuladora de colorantes (EFC)
2. Propuesta de Briseño-Garzón y Llanderal (2008), y
3. Procedimiento recomendado por Viguera y Portillo (2014).

1.4.3.1 Metodología EFC

Este método consistió en pesar 0.26 g (Wg, peso de cochinilla molida) en un vaso de precipitado, se adicionaron 30 mL de ácido clorhídrico 2N; posteriormente, se sometió a ebullición por 5 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C) la solución y se aforó a 1000 mL con agua destilada, después la dilución se filtró (con papel filtro Whatman No. 1). Se desecharon los primeros 250 mL de la dilución y los 750 mL restantes se filtraron; con esta cantidad se tomó la absorbancia a 494 nm (espectro de máxima absorción del ácido carmínico) en un espectrofotómetro GENESYS 10S VIS Thermo Scientific®; utilizando agua destilada como blanco. La concentración de ácido carmínico se cuantificó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ácido carmínico} = \frac{A * 100}{13.9 * Wg}$$

Dónde:

A= Absorbancia.

Wg= Peso de la muestra (g).

13.9= Coeficiente de absorción.

1.4.3.2 Metodología propuesta por Briseño-Garzón y Llanderal (2008)

Se pesaron 10 mg de muestra en un vaso de precipitado; posteriormente se agregaron 3 mL de ácido clorhídrico (HCl 2N) y se mezclaron hasta conseguir una muestra homogénea; después, se sometió a ebullición (97 °C) por 10 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C) y se aforó a 100 mL con agua destilada, se filtró con papel filtro Whatman No. 1 y se desecharon los primeros 20 mL. Se utilizó el resto de la solución para leer la absorbancia a 494 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S VIS Thermo Scientific®, utilizando como blanco ácido clorhídrico (HCl 2N).

La determinación del contenido de ácido carmínico se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ácido carmínico} = \frac{\text{Abs} * 100}{1.39}$$

Dónde:

Abs: Absorbancia de la solución final.

1.39: Absorbancia de una solución de ácido carmínico puro (100 mg L⁻¹).

1.4.3.3 Metodología de Viguera y Portillo (2014)

Este procedimiento consistió en pesar 0.025 g de muestra, luego esta cantidad se colocó en un tubo de ensayo y se agregaron 7.5 mL de HCl 2N, después se calentó a baño María (97 °C) por 30 min, y se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, se aforó a 250 mL con agua desionizada y se filtró con papel filtro Whatman No. 1; se desecharon los primeros 50 mL y se tomaron 25 mL para leer su absorbancia a 494 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S VIS Thermo Scientific®, utilizando como blanco agua destilada.

La concentración de ácido carmínico, en la muestra analizada, se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ácido carmínico} = \frac{\text{Abs} * 100}{1.39}$$

Dónde:

Abs: absorbancia de la muestra analizada.

1.39: Absorbancia de una solución de ácido carmínico puro (100 mg L⁻¹).

En cada uno de los métodos evaluados se realizaron tres repeticiones y en cada repetición se tomaron 10 lecturas de absorbancia (con un total de 30 lecturas de absorbancia por muestra y método). Después de la evaluación de los tres métodos seleccionados, se seleccionó el método que registró los mayores valores de AC.

1.4.4 Modificaciones a la metodología de Briseño-Garzón y Llanderal (2008)

Considerando que con la metodología propuesta por Briseño-Garzón y Llanderal (2008) la CAC resultó ser mayor, y dado que adicionalmente en las tres técnicas evaluadas el tiempo de ebullición fue el factor que más varió, se examinó la posibilidad de maximizar dicha variable. Tomando en cuenta que el método original propone 10 min de tiempo de ebullición, se evaluaron los siguientes tiempos: 15, 20, 25 y 30 min (97 °C) teniendo en consideración que la muestra de cochinilla fuera la misma. Cada uno de los tiempos evaluados, se repitió tres veces y se tomaron 10 lecturas de absorbancia de cada repetición, con un espectrofotómetro GENESYS 10S VIS Thermo Scientific®.

En adición, con la finalidad de valorar la linealidad de la respuesta del equipo estableciendo los límites de detección, se construyó una curva de calibración, utilizando ácido carmínico 90 % (SIGMA®) como estándar de referencia y se prepararon seis soluciones en concentraciones de: 90.0 ppm, 81.0 ppm, 67.5 ppm, 54.0 ppm, 40.5 ppm, 27.0 ppm y 13.5 ppm de ácido carmínico. En cada una de las soluciones se tomaron cinco replicas, de las cuales se leyó la absorbancia y se promediaron los valores de cada

muestra. Con los promedios obtenidos se elaboró la curva de calibración, la cual registró un valor de $R^2= 0.9993$.

1.4.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para determinar la diferencia entre los métodos de cuantificación de ácido carmínico empleados en el estudio. Se utilizaron como tratamientos los métodos y como variable de respuesta la concentración de ácido carmínico (%). Similar procedimiento se realizó para determinar la diferencia entre los tiempos de ebullición a los que fueron sometidas las muestras, sobre la concentración de ácido carmínico (%). En cada proceso estadístico se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), para determinar la diferencia entre medias de las concentraciones de ácido carmínico. El análisis estadístico se realizó con el sistema R Versión 3.5.1 (R Core Team, 2018).

1.5 RESULTADOS

1.5.1. Comparación de tres métodos para la cuantificación de la concentración de ácido carmínico

El análisis estadístico mostró que la concentración de ácido carmínico (CAC) de una muestra homogénea de cochinilla, es influenciado significativamente por el método utilizado para su cuantificación ($p < 0.0001$). Los valores en el contenido de ácido carmínico oscilaron entre 12.91 y 17.54 %, obteniéndose la CAC más alta cuando se empleó el método propuesto por Briseño-Garzón y Llanderal (2008), el cual resultó estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) al registrado con las otras dos metodologías (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Concentración de ácido carmínico (%) en *D. coccus* obtenida por tres métodos de cuantificación.

| Métodos empleados | Ácido carmínico (%) |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Briseño-Garzón y Llanderal (2008) | 17.54 a |
| Vigueras y Portillo (2014) | 16.25 b |
| EFC | 12.91 c |

ab: Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)

1.5.2. Determinación del tiempo de ebullición sobre la concentración de ácido carmínico

El análisis de varianza realizado demostró que el contenido de ácido carmínico de una muestra común de cochinilla, es influenciado significativamente por el tiempo en que la muestra es sometida a ebullición ($p < 0.0001$). La concentración de ácido carmínico más alta, se registró cuando la muestra se sometió a un periodo de 15 min de ebullición, con 18.42 %. Los valores promedio tienden a incrementarse entre los 10 y 15 min, para posteriormente descender a los 20 y a los 25 min y contrariamente a lo esperado se vuelve a incrementar a los 30 min. Los valores de concentración de ácido carmínico resultaron similares estadísticamente ($p \leq 0.05$) con los tiempos de ebullición de 10, 15 y 30 min y diferentes a los obtenidos a 20 y 25 min; sin embargo, a 15 min los valores de ácido carmínico fueron mayores (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Concentración de ácido carmínico (%) en *D. coccus* obtenida en diferentes tiempos de ebullición.

| Tiempos de ebullición (min) | Concentración de ácido carmínico (%) |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| 10 min | 17.53 a |
| 15 min | 18.42 a |
| 20 min | 15.86 b |
| 25 min | 15.87 b |
| 30 min | 18.29 a |

ab: Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)

1.5.2.1 Curva de calibración

El contenido de ácido carmínico en la muestra de *D. coccus* obtenido a diferentes tiempos de ebullición, se sustituyó en la ecuación derivada de la curva de calibración (**Figura 4**). Los valores promedio de la concentración de ácido carmínico incrementaron en aproximadamente 2 %.

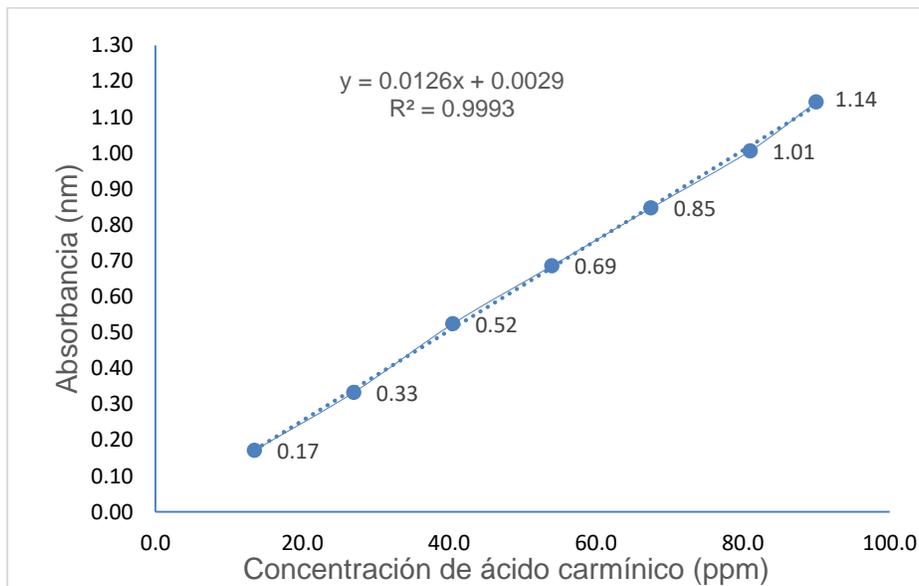


Figura 4. Curva de calibración que confirma la linealidad de la respuesta del equipo.

1.5.2.2 Metodología de Briseño-Garzón y Llanderal (2008) con las modificaciones realizadas

Considerando que el método que permitió estimar las concentraciones más altas de ácido carmínico fue el método de Briseño-Garzón y Llanderal (2008) y que, aunado a ello, aumentar el tiempo de ebullición de 15 min, y la curva de calibración maximizaron el resultado, se propuso el siguiente procedimiento para cuantificar la CAC en *D. coccus*.

Materiales y equipo

- Ácido carmínico pureza de 90 % a 100 % (estándar de referencia)
- Cochinilla seca y limpia
- Vaso de precipitado
- HCl 2N
- Agua destilada
- Matraz de 1000 mL
- Papel filtro Whatman No. 1
- Molino *Wiley Mini Mill*® (3383-L10 115 V, 60 Hz, Thomas Scientific Swedesboro, NJ 08085-0099-U.S.A.)
- Tamiz de malla 40
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica (d=1/0.1 mg)

Procedimiento utilizado para la preparación del patrón de la curva de calibración

1. Preparar seis soluciones utilizando el estándar de referencia (ácido carmínico pureza 90 %) en proporciones de: 81.0 ppm, 67.5 ppm, 54.0 ppm, 40.5 ppm, 27.0 ppm y 13.5 ppm de ácido carmínico.
2. Realizar cinco repeticiones por solución
3. Leer la absorbancia de cada repetición en el espectrofotómetro a 494 nm
4. Obtener los valores promedio de las repeticiones por solución

5. Elaborar la curva calibración con valores los promedios de las soluciones realizadas.

Procedimiento (cuantificación del ácido carmínico)

1. Moler la cochinilla a un tamaño de partícula a malla 40.
2. Pesar 10 mg de muestra.
3. Adicionar la muestra en un vaso de precipitado de 150 mL.
4. Agregar 3 mL de ácido clorhídrico (HCl 2N) y mezclar hasta conseguir una muestra homogénea.
5. Someter a ebullición (97 °C) por 15 min.
6. Enfriar a temperatura ambiente (25 °C).
7. Aforar a 100 mL con agua destilada.
8. Filtrar con papel filtro Whatman No. 1 toda la solución.
9. Desechar los primeros 20 mL.
10. Utilizar el resto de la solución para tomar la lectura a una absorbancia a 494 nm (espectro de máxima absorción del ácido carmínico) en un espectrofotómetro utilizando como blanco ácido clorhídrico (HCl 2N).
11. Calcular la concentración de ácido carmínico sustituyendo los valores de la absorbancia en la ecuación de la curva de calibración generada.

1.6 DISCUSIÓN

Entre las limitantes que enfrenta la cría comercial de *D. coccus* destaca conocer cuál es la calidad del producto final; ya que el productor se preocupa más por el volumen obtenido que por el contenido de ácido carmínico (AC) del producto final, lo cual reduce notablemente su competitividad al complicar su comercialización. Además, se debe considerar que la materia prima usada en el proceso de extracción no presenta las mismas características generando variaciones cuantitativas durante la producción de los derivados y una baja eficiencia (Begazo y Bendita, 2018). Derivado de lo anterior, una de

las necesidades en la industria de los colorantes y de los propios productores es el desarrollo e implementación de métodos analíticos simples, rápidos y confiables para obtener una adecuada valoración de la calidad y autenticidad del pigmento que produce *D. coccus*, haciendo necesaria la validación de un método analítico (Beaz, 2007).

De acuerdo con Mamani y Huamani (2015) en la determinación de AC se debe considerar previamente lo siguiente: La capacidad para extraerlo desde los tejidos del insecto, generando soluciones homogéneas que conduzcan a valores reproducibles de absorbancia, así como el efecto sobre su estabilidad una vez solubilizado o todavía contenido en el insecto muerto. Existen varias técnicas para la cuantificación del AC en *D. coccus*; sin embargo, la información que existe sobre éstas es escasa y contradictoria y en ocasiones poco práctica y eficaz; pero todos los métodos analíticos normalmente utilizados emplean un medio acuoso, tanto para la hidrólisis de la muestra como para el aforado a un volumen (Centeno, 2003). La National Research Council (1981), el Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas (ITINTEC, 1984) y Marmion (1984) recomendaron un método basado en espectrofotometría del cual han derivado múltiples adecuaciones y modificaciones; por ello, los resultados obtenidos no son consistentes. Esta metodología se basa en la extracción bajo ebullición del extractante y éste podría ser, al igual que el tiempo de ebullición, factores clave en la cuantificación (Centeno, 2003). Para ejemplificar lo anterior, en el presente estudio el aumento en el tiempo de ebullición significó un incremento de alrededor de 2 % en los valores de AC obtenidos. Sin embargo, un aspecto a considerar es que las altas temperaturas podrían afectar a la estabilidad del colorante, ya que el AC se degrada a temperaturas por encima de 80°C, sobre todo, cuando es sometido a largos periodos de tiempo (González *et al.*, 2002).

Ante la ausencia de una técnica analítica estandarizada o normalizada que garantice la determinación del AC, de los tres métodos analizados, la propuesta de Briseño-Garzón y Llanderal (2008) permitió extraer niveles mayores del colorante. Sin embargo, en su implementación y validación se requiere cumplir los protocolos de precisión, repetitividad (pruebas en mismo día), exactitud, reproducibilidad (pruebas en diferentes días) y

linealidad (curva de calibración). Dadas las limitaciones de tiempo y recursos sólo se cubrió el último aspecto, por lo que no fue posible realizar una validación completa. Este método tampoco considera aspectos importantes que afectan la certidumbre del mismo como son: la eliminación de la cera que recubre a los insectos, ya que parte de la pérdida de la calidad está relacionada a su presencia, la humedad contenida en el cuerpo del insecto, la granulometría y el pH del extractante, entre otras. Otro aspecto importante de resaltar es el uso del blanco, previo a la lectura de la muestra, ya que no existe consistencia en los procedimientos, mientras algunos recomiendan el uso de agua destilada, otros emplean la solución extractante (HCl 2N). Finalmente, es necesario destacar que el pigmento que se obtiene de la cochinilla no es en su totalidad AC, sino una mezcla de ácido carmínico, ácido laccaico y ácido kermésico. Estos dos últimos derivados de la síntesis incompleta del AC debido a diversos factores bióticos y abióticos, por lo que las determinaciones espectrofotométricas sólo cuantifican la mezcla de estos tres pigmentos y no hay una cuantificación real de ácido carmínico (Beaz, 2007).

Los resultados obtenidos en esta investigación permitirán que los productores puedan monitorear la calidad de la cochinilla e incrementarla a través de la optimización de los factores bióticos y abióticos que ejercen influencia en ella. Lo anterior podría coadyuvar a impulsar la competitividad y rentabilidad de la cadena agroindustrial de la cochinilla en México y en el resto de los países productores, así como facilitar el cumplimiento de los estándares de calidad exigidos en el mercado internacional y generar un mayor valor agregado.

1.7 CONCLUSIONES

La metodología propuesta por Briseño-Grazón y Llanderal (2008) con las modificaciones realizadas extrajo los valores promedio más altos de ácido carmínico. Asimismo, el incremento a 15 min en el tiempo de ebullición mejoró la eficiencia del método. Sin embargo, se requiere la validación completa del método.

1.8 LITERATURA CITADA

- Allevi, P., S. Anastasia., P. Ciuffreda., A. Fiecchi., A. Scala., S. Bingham., M. Muir., and J. Tyman. 1991. The first total synthesis of carminic acid. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1 (24): 2473-2670.
- Beaz, R. J. A. 2007. Validación para la cuantificación de ácido carmínico en cochinilla de nopal (*Dactylopius coccus* Costa) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Tesis Profesional de Química en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D. F. 77 p.
- Begazo, C. M. L. y J. J. Bendita. 2018. Determinación de los parámetros óptimos en la extracción del colorante rojo carmín mediante el empleo de EDTA como estabilizante. Tesis Profesional de Licenciatura en Química. Universidad Nacional de San Agustín, Facultad de Ciencias Naturales y Formales, Escuela Profesional de Química Determinación. Arequipa, Perú. 90 p.
- Borges, M. E., R. L. Tejera., L. Díaz., P. Esparza., and E. Ibáñez. 2012. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. *Food Chemistry* 132(4):1855-1860.
- Briseño-Garzón, A. y C. C. Llanderal. 2008. Contenido de ácido carmínico en hembras de grana cochinilla de diferentes edades. *In: Llanderal C., D. H. Zetina, A. L. Viguera y L. Portillo (eds). Grana Cochinilla y Colorantes Naturales. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México. México. pp:16-20. ISBN:978-607-7533-10-8.*
- Centeno, A. M. M. 2003. Extracción, estabilización y evaluaciones analíticas del carmín. Tesis de Maestría en Ciencias en Tecnología Avanzada. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Área de Alimentos. Instituto Politécnico Nacional. México. 115 p.
- Dapson, R. W., M. Frank., D. P. Penney., and J. A. Kiernan. 2007. Revised procedures for the certification of carmine (C.I. 75470, Natural red 4) as a biological stain. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission* 82(1):13-15.
- Deveoglu, O., R. Karadag., and T. Yurdun. 2011. Qualitative HPLC determination of main anthraquinone and lake pigment contents from *Dactylopius coccus* dye insect. *Chemistry of Natural Compounds* 47(1):103-104.
- Dufossé, L. 2014. Anthraquinones, the Dr Jekyll and Mr Hyde of the food pigment family. *Food Research International* 65(2014): 132–136.

- Dupey, É. G. 2017. The materiality of color in pre-columbian codices: insights from cultural history. *Ancient Mesoamerica* 28(1):21-40.
- Fain, V. Y., B. E. Zaitsev., and M. A. Ryabov. 2007. Tautomerism and ionization of carminic acid. *Russian Journal of General Chemistry* 77(10): 1769-1774.
- Flores-Alatorre, H. L., V. Abrego-Reyes., J. A. Reyes-Esparza., E. Angeles., and F. Alba-Hurtado. 2014. Variation in the concentration of carminic acid produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopidae) at various maturation stages. *Journal of Economic Entomology* 107(4): 1700-1705.
- Gamboa, N., and W. Leidinger. 1988. La química del ácido carmínico. *Revista de Química* 2(2):127-135.
- González, M. G., N. M. B. Ortega., G. A. Pérez., J. M. V. Carrasco., M. L. O. Delgado., y I. R. Ramírez. 2002. Cultivo *in vitro* de células embrionarias de cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) a diferentes pH. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(2), 209-212.
- Guillermin, D., T. Debroise., P. Trigueiro., L. de Viguerie., B. Rigaud., F. Morlet-Savary., S. Balme., J. Janot., F. Tielens., L. Michot., J. Lalevee., P. Walter., and M. Jaber. 2018. New pigments based on carminic acid and smectites: A molecular investigation. *Dyes and Pigments* 30(40):1-12.
- Guzmán, E., C. Gómez., J. García., A. González., K. Guerra., y K. Calavay. 2011. Saturación del esmalte dental respecto a la adsorción de ácido carmínico y tartrazina. *Revista Estomatológica Herediana* 21(1):1-5.
- Harp, B. P., and J. N. Barrows. 2015. Chapter 4. US regulation of color additives in foods. *In: Scotter, M. J. (ed.). Colour Additives for Foods and Beverages. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. pp: 75-88.*
- Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas (ITINTEC). 1984. Estudio técnico carmín de cochinilla. Lima, Perú. 77 p.
- Kannangara, R., L. Siukstaite., J. Borch-Jensen., B. Madsen., K. T. Kongstad., D. Staerk., M. Bennedsen., F. Okkels., S. A. Rasmussen., T. O. Larsen., R. J. N. Frandsen., and B. L. Møller. 2017. Characterization of a membrane-bound C-glucosyltransferase responsible for carminic acid biosynthesis in *Dactylopius coccus* Costa. *Nature Communications* 8(1): 1-12.
- Kramell, A. E., M. García-Altare., M. Pötsch., R. Kluge., A. Rother., G. Hause., C. Hertweck., and R. Csuk. 2019. Mapping Natural Dyes in Archeological Textiles by Imaging Mass Spectrometry. *Scientific Reports* 9(1): 2331.

- Kumara, N. T. R. N., A. Lim., C. M. Lim., M. I. Petra., and P. Ekanayake. 2017. Recent progress and utilization of natural pigments in dye sensitized solar cells: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 78(1): 301-317.
- Luo, Y., M. Li., and J. Du. 2017. Esterification of Cochineal Carmine Used for Dyeing Cationic Modified Cotton with High Color Fastness. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 12(2): 60-66.
- Mamani, M. G. Y., y Z. I. E. Huamani. 2015. Evaluación comparativa de los métodos Thorpe y Francés para la obtención de carmín a partir de la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en el distrito de la Joya. Tesis Profesional de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de San Agustín, Facultad de Ingeniería de Procesos, Escuela Profesional de Ingeniería Química. Arequipa, Perú. 87 p.
- Marmion, M. D. 1984. Handbook of U. S. colorants for foods, drugs and cosmetics. 2nd edition. Michigan University. 466 p.
- Müller-Maatsch, J., and C. Gras. 2016. The “carmine problem” and potential alternatives. *In: Carle, R. and R. Schweiggert. (eds). Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages, Industrial Applications for Improving Food Color.* Woodhead Publishing. pp: 385-428. eBook ISBN:9780081003923
- Mokhtari, A., M. Keyvanfard., and I. Emami. 2015. Chemiluminescence Determination of Carminic Acid in Foodstuffs and Human Plasma Using Ru(phen)₃²⁺-Acidic Ce(IV) System. *Food Analytical Methods*, 8(10): 2457-2464.
- Nakayama, N., Y. Ohtsu., D. Maezawa-Kase., and K. I. Sano. 2015. Development of a Rapid and Simple Method for Detection of Protein Contaminants in Carmine. *International Journal of Analytical Chemistry* 2015(1):1-5.
- National Research Council. 1981. Food Chemicals Codex: Third Edition. Washington, DC: The National Academies Press. 738 p.
- Ohgiya, Y., F. Arakawa., H. Akiyama., Y. Yoshioka., Y. Hayashi., S. Sakai., and R. Teshima. 2009. Molecular cloning, expression, and characterization of a major 38-kd cochineal allergen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(5):1157-1162.
- Pankewitz, F., and M. Hilker. 2008. Polyketides in insects: Ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83(2):209-226.
- Park, K. H., T. Y. Kim., S. Han., H. S. Ko., S. H. Lee., Y. M. Song., J. H. Kim., and J. W. Lee. 2014. Light harvesting over a wide range of wavelength using natural dyes of gardenia and cochineal for dye-sensitized solar cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 128:868-873.

- Rasmussen, S. A., K. T. Kongstad., P. Khorsand-Jamal., R. M. Kannangara., M. Nafisi., A. Van Dam., M. Bennedsen., B. Madsen., F. Okkels., C. H. Gotfresen., D. Staerk., U. Thrane., U. H. Mortensen., T. O. Larsen., and R. J. N. Frandsen. 2018. On the biosynthetic origin of carminic acid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 96(1): 51-61.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rojas, B. K., y T. E. Pérez. 2018. Aplicación de los colorantes *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Dactylopius coccus* (cochinilla) en la tinción de pared celular presente en un frotis bacteriano. Tesis Profesional de Químico farmacéutico y Bioquímico. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Universidad Inca Garcilaso De La Vega, Lima, Perú. 124 p.
- Roslan, N., M. E. Ya'acob., M. A. M. Radzi., Y. Hashimoto., D. Jamaludin., and G. Chen. 2018. Dye Sensitized Solar Cell (DSSC) greenhouse shading: New insights for solar radiation manipulation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92:171-186.
- Sabatino, L., M. Scordino., M. Gargano., F. Lazzaro., M. A. Borzì., P. Traulo., and G. Gagliano. 2012. Aminocarminic acid in E120-labelled food additives and beverages. *Food Additives & Contaminants. Part B, Surveillance* 5(4):295-300.
- Şahinbaşkan, B. Y., R. Karadag., and E. Torgan. 2018. Dyeing of silk fabric with natural dyes extracted from cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) and gall oak (*Quercus infectoria* Olivier). *Journal of Natural Fibers* 15(4):559-574.
- Schlüter, O., B. Rumpold., T. Holzhauser., A. Roth., R. F. Vogel., W. Quasigroch., S. Vogel., V. Heinz., H. Jäger., N. Bandick., S. Kulling., D. Knorr., P. Steinberg., and K. H. Engel. 2017. Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. *Molecular Nutrition & Food Research* 61(6). doi.org/10.1002/mnfr.201600520
- Shamim, G., S. K. Ranjan. D. M. Pandey., and R. Ramani. 2014. Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. *European Journal of Entomology*, 111(2):149-164.
- Solymosi, K., N. Latruffe., A. Morant-Manceau., and B. Schoefs. 2015. Chapter 1 - Food colour additives of natural origin. *In: M. J. Scotter (ed). Colour Additives for Foods and Beverages. Oxford: Woodhead Publishing. pp:3-34.*
- Tomasini, E. P., J. Cárcamo., R. D. M. Castellanos., V. Careaga., S. Gutiérrez., L. C. Rúa., M. Sepúlveda., F. Guzman., M. Pereira., M. Siracusano., and M. S. Maier. 2018. Characterization of pigments and binders in a mural painting from the

Andean church of San Andrés de Pachama (northernmost of Chile). *Heritage Science* 6(61): 1-12.

Viguera, A. L. y L. Portillo. 2014. Control de cochinilla silvestre y cría de grana cochinilla. Consejo de Ciencia y Tecnología de Jalisco y Universidad de Guadalajara. 66 p.

Yamada, S., N. Noda., E. Mikami., and J. Hayakawa. 1993. Analysis of natural coloring matters in food. 4. Methylation of cochineal color with diazomethane for the analysis of food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41(7):1071-1075.

Zheng, H., Li-ying. Tang., Yan-min. LU., and H. Zhang. 2008. Determination of main chemical constituents in dried body of cochineal. *Chinese Journal Food Science* 16(11): 12-16.

CAPITULO II. PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE *Dactylopius coccus* COSTA, EN UNA NOPALOTECA, EN DOS ESTACIONES CRIANZA

2.1. RESUMEN

Para la cría comercial de la cochinilla (*D. coccus*) en cautiverio, se ha impulsado en diversos países, el sistema denominado “nopaloteca”; sin embargo, se desconoce el impacto de temperatura, humedad relativa y luz que incide en cada nivel, sobre su rendimiento y calidad. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar la concentración de ácido carmínico (CAC, %) y peso fresco (PF, g) de *D. coccus*, en dos fases de desarrollo, criada en cuatro niveles altitudinales y en dos estaciones contrastantes de producción (primavera-verano y otoño-invierno). El estudio se desarrolló en un invernadero de cristal y para la cría del insecto se estableció una “nopaloteca” de madera, con cuatro niveles de altura (0.5 m, 1.0 m, 1.5 m y 2.0 m); en cada nivel se colocaron cinco líneas, donde se suspendieron los cladodios infestados de manera invertida. Las hembras se colectaron en dos fases de desarrollo: pre y postoviposición. Se llevó un registro diario de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa. Este procedimiento se siguió para ambas estaciones (primavera-verano y otoño-invierno). El PF de la cochinilla por cladodio y la CAC se sometieron a un análisis de varianza, empleándose la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para determinar las diferencias en promedios y se realizó un análisis de correlación. El sistema de producción en “nopalotecas” permitió obtener en promedio 5.5. g de cochinilla fresca por cladodio con 18% de CAC. No obstante, los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticas en las estaciones de producción resultando más eficiente la de otoño-invierno, al registrar mayor rendimiento y calidad. Se obtuvieron resultados contrastantes respecto a los niveles de altura, en función de la estación de crianza, ya que mientras en primavera-verano, se obtuvo un mejor comportamiento en el Nivel 2 (1 m) con una CAC de 19.2%, aunque el mayor rendimiento en peso fresco se presentó en el Nivel 3 (1.5 m) con 4.9 g por cladodio;

por el contrario, en otoño-invierno se presentó la CAC mayor (18.6 %) en el Nivel 4 (2.0 m), y el Nivel 2 (1.0) presentó el mayor rendimiento con 6.4 g por cladodio. Se demostró que la recolección de cochinilla en la fase de postoviposición registró una CAC mayor en ambas estaciones. La luz total recibida y la temperatura mínima son los factores que influyen en la calidad y rendimiento de *D. coccus*, aunque de manera diferencial sobre ambas variables.

Palabras clave: rendimiento, nopaloteca, cría, cochinilla.

2.2 ABSTRACT

For the commercial breeding of cochineal (*D. coccus*) in captivity, the system called “nopaloteca” has been promoted in several countries; However, the impact of temperature, relative humidity and light that affects each level on its performance and quality is unknown. Therefore, the objective of the study was to determine the concentration of carminic acid (CAC, %) and fresh weight (PF, g) of *D. coccus*, in two stages of development, raised in four altitude levels and in two contrasting seasons of production (spring-summer and autumn-winter). The study was carried out in a glass greenhouse and for the breeding of the insect a wooden “nopaloteca” was established, with four levels of height (0.5 m, 1.0 m, 1.5 m and 2.0 m); In each level five lines were placed, where the infested cladodes were suspended in an inverted manner. Females were collected in two stages of development: pre and post-oviposition. A daily record of temperature, relative humidity and light intensity was kept. This procedure was followed for both seasons (spring-summer and autumn-winter). The cochineal PF per cladode and the CAC were subjected to an analysis of variance, using the Tukey test ($p \leq 0.05$) to determine the differences in averages and a correlation analysis was performed. The results obtained revealed significant differences between levels and stages of development in PF and CAC. Level two, established at 1.0 m high, reached the highest CAC with 19.2% for spring-summer; although the highest yield in fresh weight was obtained in Level 3 (1.5 m) with 4.9 g per cladode. Conversely, in autumn-winter the highest CAC (18.6%) was obtained in Level 4 (2.0 m), and Level 2 (1.0) presented the highest yield with 6.4 g per cladode. It was shown that the cochineal harvest in the post-oviposition phase registered a higher CAC in both seasons. The total light received and the minimum temperature are the factors that affect the quality and yield of *D. coccus*, although differentially on both variables.

Keywords: yield, nopaloteca, breeding, cochineal

2.3 INTRODUCCIÓN

La cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) es un insecto originario de regiones tropicales y subtropicales de América (Müller-Maatsch y Gras, 2016), particularmente, de México y Perú, y es parásito específico de diversas especies de *Nopalea* Salm-Dyck y *Opuntia* Mill (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). Su importancia radica en ser fuente de un glucósido antraquinónico denominado Ácido Carmínico (AC), generado como un mecanismo para su defensa (Eisner *et al.*, 1980; Dettner, 2015); por su estabilidad y poder colorante, actualmente, se emplea en cosméticos, pinturas, biomedicina, alimentos y bebidas (Müller-Maatsch y Gras, 2016), entre otros usos. El uso del AC y sus derivados, está autorizado por la mayoría de los organismos reguladores responsables de evaluar la inocuidad tales como: la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los EE. UU., como Natural Red 5, y la Unión Europea, bajo el código E120 (EFSA, 2015).

Actualmente, *D. coccus*, está distribuida en 15 países, ya sea introducida o naturalizada (Chávez-Moreno *et al.*, 2009); aunque su sistema de cultivo varía en cada país y región (Müller-Maatsch y Gras, 2016) se puede realizar, comúnmente, bajo dos modalidades: a campo abierto y en condiciones semicontroladas (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). Sólo, España, Chile, Bolivia, Etiopía y Perú la cultivan a cielo abierto (Anculle *et al.*, 2017), al disponer de condiciones agroecológicas para su óptimo desarrollo. En México, la ocurrencia de altas precipitaciones, temperaturas extremas, vientos y alta radiación, así como la presencia de enemigos naturales, entre otros factores, impiden su cultivo a campo abierto (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). Derivado de lo anterior, se han desarrollado e implementado alternativas para su cría masiva, las cuales incluyen, desde estructuras rústicas, hasta invernaderos de vidrio o plástico (Méndez-Gallegos *et al.*, 2010).

Uno de los sistemas de producción que se ha probado con éxito son las denominadas “nopalotecas”, las cuales permiten reducir el impacto de los factores físicos y biológicos

que limitan el desarrollo al insecto; éste sistema se está probando en Argentina (Alonso *et al.*, 2013) y en Perú (Hernández *et al.*, 2017), y se encuentra protegido, desde el 2011, por la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM, 2019) con Registro 2 351 752. A pesar de la viabilidad del sistema, poca investigación se ha realizado para verificar si la CAC y el rendimiento es homogéneo durante el año en los diferentes niveles de altura que constituyen la “nopaloteca”, debido a que el impacto de la temperatura, humedad relativa y la cantidad de luz es diferente en cada estación; lo anterior, está asociado a que su distribución espacial es diferente en cada nivel. Diversos estudios han demostrado que existen factores que influyen en la CAC y el rendimiento de *D. coccus*, entre éstos destacan: estación de crianza del insecto (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005), la edad, estado nutricional y especie o cultivar del nopal utilizado como hospedante (Méndez-Gallegos *et al.*, 2010); cantidad y calidad de luz (Tello y Vargas, 2015), así como la temperatura, humedad relativa, y densidad de población en el cladodio (Rodríguez *et al.*, 2005) y la altura del nivel de la “nopaloteca” (Alonso *et al.*, 2013), entre otros. Aunque el AC está presente en todas las fases de desarrollo (Briseño-Garzón y Llanderal, 2008) existen contradicciones, respecto al índice de cosecha que permita obtener una mayor CAC; Müller-Maatsch y Gras (2016) recomiendan cosechar cuando las hembras son oviplenas (previo a la oviposición), mientras que Flores-Alatorre *et al.* (2014) afirman se debe realizar después del periodo de oviposición.

Considerando que a nivel internacional el precio de la cochinilla fluctúa constantemente y que está directamente relacionado a la CAC (Flores-Alatorre *et al.*, 2014), resulta importante incrementar su calidad, a fin de hacer más eficiente el sistema de cría. El objetivo del estudio fue determinar la influencia de la estación de crianza, la altura del nivel en la “nopaloteca” y el índice de cosecha sobre la concentración de ácido carmínico y el rendimiento de *D. coccus*, con fines de optimización de su manejo en cautiverio.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Ubicación del sitio de estudio

La investigación se realizó de mayo de 2018 a mayo de 2019 en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, *Campus* San Luis Potosí (22° 37' 55.66" N, 101° 42' 42.96" O, y altitud de 2078 m) en un invernadero de cristal con orientación norte-sur; para un mejor manejo del microclima, se sombreó con cal (hidróxido de calcio y agua 2:1 v:v), a fin de reducir la radiación solar sobre la "nopaloteca" durante el día y conservar el calor durante la noche.

2.4.2 Simiente y hospedante utilizado

Se utilizaron 300 g de hembras ovíparas, en cada estación de crianza, como material biológico para la multiplicación de la cohorte, proporcionado por la empresa GranaZac S.P.R.R.L. (Villanueva Zacatecas, México). Como sustrato alimenticio se emplearon 120 cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cv Villanueva, de entre 10 y 12 meses de edad. Estos se cepillaron cuidadosamente, previo a la infestación, para remover polvo y residuos, así como prevenir la incidencia de inmaduros de cochinilla silvestre (*D. opuntiae*).

2.4.3 Técnica de propagación artificial

Para la infestación, los cladodios se distribuyeron horizontalmente en el piso y sobre éstos se colocaron dos tamices (40 x 40 cm); en cada uno de éstos se dispusieron, aproximadamente, 150 g de adultas grávidas (**Figura 5A**). A fin de obtener una densidad de población adecuada, una distribución inicial homogénea de la progenie y disponer de cohortes con la misma edad, los cladodios conteniendo las ninfas neonatas, se sustituyeron cada dos días por nuevos cladodios. Posteriormente, éstos se colgaron de manera invertida (acropétala), en el nivel respectivo dentro de la "nopaloteca" (**Figura**

5B). Los cladodios se mantuvieron colgados de la base, mediante un gancho de alambre galvanizado calibre12, para facilitar y asegurar la suspensión.



Figura 5. A: Técnica de infestación artificial de *D. coccus* empleada. **B:** Acomodo de los cladodios infestados en la estructura de la “nopaloteca”.

2.4.4 Características del sistema de cría

El sistema de crianza empleado fue el de “nopaloteca”. Esta es una estructura de madera (9 m²) dividida en cuatro niveles de altura, con una separación de 0.50 m; en cada uno de éstos se colocaron cinco líneas horizontales, cada 0.20 m, de alambre galvanizado calibre 12. En cada línea se suspendieron seis cladodios infestados, separados 0.05 m, entre ellos. La estructura se ubicó en el centro del invernadero, a fin de asegurar que recibiera las mismas condiciones.

2.4.5. Influencia de la estación de crianza, altura del nivel y del índice de cosecha, sobre la concentración de ácido carmínico y el peso fresco de *D. coccus*

2.4.5.1. Factores en estudio

Para definir la influencia de la época de producción en *D. coccus*, se evaluaron dos estaciones de crianza contrastantes en cuanto a características climáticas. El primer ciclo correspondió a primavera-verano, con inició el 11 de mayo y conclusión el 19 de septiembre del 2018 (la fase de previposición terminó el 23 de julio, con una duración de 73 d; la fase de postoviposición finalizó a los 132 d); el segundo ciclo otoño-invierno se estableció el 21 de noviembre de 2018 y culminó el 8 de mayo de 2019 (la fase de previposición terminó el 12 de marzo, con una duración de 112 d y la fase de postoviposición finalizó a los 169 d). Se probaron cuatro niveles de altura de la “nopaloteca”, comúnmente empleados en los sistemas productivos en México (N1=0.5 m, N2=1.0 m, N3=1.5 m y N4= 2.0 m).

Para determinar si la incidencia de las variables climáticas de temperatura, humedad relativa y cantidad de luz influyen en la CAC y rendimiento de *D. coccus*, se colocó en la parte central de cada nivel de la “nopaloteca” un sensor HOBO Pro v2 temp/RH onset, USA® (**Figura 6**), mediante el cual se llevó un registro de temperatura (°C) máxima, promedio y mínima (TMAX, TPROM, TMIN) y de la humedad relativa (%) máxima, promedio y mínima (HRMAX, HRPROM, HRMIN). Las lecturas se tomaron cada hora durante todo el ciclo biológico de *D. coccus*, en ambas estaciones de crianza.



Figura 6. Ubicación del sensor de temperatura y humedad relativa empleado.

La iluminación (lux) se cuantificó con un fotómetro EXTECH Instruments (Nashua, EEUU) ® a las 9:00 h, 15:00 h y 18:00 h (primavera-verano) y a las 8:00 h, 14:00 h y 17:00 h (otoño-invierno) un día por semana; la cantidad de luz se acumuló durante todo el ciclo de desarrollo en ambas estaciones de cría y se registró como iluminación total recibida en cada nivel (ILTOTAL). Para ello, se tomaron lecturas de referencia en un punto despejado en el exterior del invernadero y en cada uno de los niveles de cría de la “nopaloteca”, teniendo especial cuidado, de realizarse siempre en el mismo punto (**Cuadro 3**). Asimismo, la luz del exterior se consideró como la iluminación total de cada día y con ella se obtuvo la proporción (%) de la iluminación (%IL) que incidió en cada nivel (**Cuadro 3**). Para definir el índice de cosecha con mayor CAC y rendimiento de *D. coccus*, se seleccionaron dos fases de desarrollo: preoviposición y postoviposición. En la primera fase se tomaron tres cladodios provenientes de cada línea de los cuatro niveles (60 cladodios en total); éstos se cosecharon manualmente, con un pincel suave, a los 73 d después de la infestación, para el ciclo de primavera-verano, y para la estación de

otoño-invierno, la colecta de las hembras grávidas u oviplenas, se realizó a los 112 d luego de la infestación.

Cuadro 3. Valores promedio de temperatura (°C) máxima (TMX), promedio (TPROM), mínima (TMIN), humedad relativa (%) máxima (HRMAX), promedio (HRPROM) y mínima (HRMIN), iluminación (lux) total (ILTOTAL) y proporción de iluminación (%IL) registrados en dos estaciones de crianza, dos fases de desarrollo y en cuatro niveles de altura de una “nopaloteca”.

| Estación de crianza | Fase de desarrollo | Nivel y altura (m) | TMAX (°C) | TPROM (°C) | TMIN (°C) | HRMAX (%) | HRPROM (%) | HRMIN (%) | ILTOTAL (lux), (%IL) |
|---------------------|--------------------|--------------------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|----------------------|
| Primavera-Verano | Preoviposición | 1(0.5) | 36.73 | 26.58 | 18.71 | 66.5 | 43.5 | 20.28 | 82120 (8.01%) |
| | | 2(1.0) | 34.94 | 25.73 | 18.36 | 66.02 | 44.38 | 22.63 | 36300 (3.56 %) |
| | | 3(1.5) | 36.15 | 26.43 | 18.51 | 65.63 | 42.79 | 20.73 | 87960 (8.58 %) |
| | | 4(2.0) | 36.89 | 26.3 | 17.63 | 70.56 | 44.48 | 20.14 | 211520 (20.64%) |
| | Postoviposición | 1(0.5) | 37.9 | 26.82 | 18.97 | 66.56 | 44.33 | 20.31 | 293960 (16.74%) |
| | | 2(1.0) | 37.01 | 26.37 | 18.68 | 66.04 | 44.7 | 21.85 | 203460 (11.59%) |
| | | 3(1.5) | 37.86 | 26.78 | 18.59 | 66.44 | 43.67 | 20.13 | 308970 (17.6 %) |
| | | 4(2.0) | 38.98 | 26.84 | 17.97 | 70.09 | 44.83 | 19.22 | 524980 (29.9 %) |
| Otoño-Invierno | Preoviposición | 1(0.5) | 24.33 | 16.63 | 10.07 | 60.48 | 42.85 | 24.85 | 151990 (9.45 %) |
| | | 2(1.0) | 25.66 | 17.07 | 9.89 | 61.86 | 42.27 | 22.91 | 137820 (8.57 %) |
| | | 3(1.5) | 26.24 | 17.03 | 9.3 | 63.32 | 42.58 | 22.15 | 130640 (8.12 %) |
| | | 4(2.0) | 26.77 | 17.32 | 9.31 | 63.88 | 42.4 | 21.85 | 159010 (9.89 %) |
| | Postoviposición | 1(0.5) | 27.19 | 18.6 | 11.24 | 56.98 | 38.56 | 21.13 | 233890 (8.85 %) |
| | | 2(1.0) | 28.49 | 19.07 | 11.11 | 58.25 | 37.97 | 19.32 | 270320 (10.23%) |
| | | 3(1.5) | 29.06 | 18.88 | 10.45 | 59.67 | 38.32 | 18.65 | 272340 (10.31%) |
| | | 4(2.0) | 29.79 | 19.25 | 10.43 | 60.61 | 38.2 | 18.29 | 262010 (9.92 %) |

Para la segunda fase evaluada (postoviposición) se recolectaron las hembras contenidas en los tres cladodios restantes, correspondientes a cada nivel y línea (60 cladodios). El índice de cosecha considerado fue la finalización del periodo reproductivo (132 d después de la infestación, en el ciclo primavera-verano y 169 d después de la infestación, en el ciclo otoño-invierno). En ambas estaciones evaluadas, se consideró como unidad experimental un cladodio por lo que se tuvieron 15 repeticiones para cada nivel en cada fase de desarrollo por estación.

2.4.5.2. Determinación de la concentración de ácido carmínico y peso fresco de *D. coccus*

Para cada estación evaluada, los insectos secos de los cladodios pertenecientes al mismo nivel y misma fase de desarrollo se conjuntaron en una muestra compuesta. Con base en los resultados previos obtenidos, la CAC se determinó por el método propuesto por Briseño-Garzón y Llanderal (2008), siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación: en un vaso de precipitado se colocaron 100 mg de cochinilla molida, se agregaron 30 mL de ácido clorhídrico (HCl 2N) y se mezclaron; luego se sometió a ebullición por 15 min, se aforó a 1000 mL con agua destilada y filtró toda la muestra para desechar los primeros 200 mL, los 800 mL restantes se utilizaron para determinar la absorbancia a 494 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S VIS Thermo Scientific®. Para cada muestra de *D. coccus*, la cuantificación se realizó por triplicado y se tomaron 10 lecturas de cada una. Aunque la metodología original no lo contempla, para brindar mayor certidumbre, la CAC se calculó al sustituir los valores de absorbancia en la ecuación de una curva de calibración realizada con ácido carmínico al 90 % de pureza (SIGMA®). Otra modificación realizada al procedimiento fue un incremento al tiempo de ebullición de 10 a 15 min, debido a que se comprobó, previamente, que se maximiza con la CAC. También, se emplearon cantidades de muestra más altas (en proporción de todos los reactivos) al comprobarse que estas cantidades no afectan las lecturas finales y facilitan el proceso.

Para la determinación del rendimiento de *D. coccus*, las hembras provenientes de cada cladodio se colectaron en un tamiz y se registró su peso fresco (PF, g) en una balanza analítica Explorer Pro (NJ, USA®) d=1/0.1 mg. Posteriormente, se colocaron en recipientes de vidrio de 14 x 3.5 cm, previamente identificados y se introdujeron en un congelador Maytag® a -10 °C, por 3 d, para su sacrificio. Finalmente, los insectos se sometieron a un proceso de secado natural, dentro del invernadero, durante 10 d (27.9 °C, de temperatura promedio, en la estación de primavera-verano y 21.1 °C, de temperatura promedio, en el ciclo de otoño-invierno), removiendo los contenedores dos veces por día para evitar su aglomeración. Vale la pena resaltar que este proceso también se siguió para las hembras colectadas en fase de postcosecha en el ciclo de otoño-invierno, dado que algunas hembras aún permanecían reproduciéndose, al no existir un factor letal de contención. Finalmente, la muestra se pulverizó en un molino Wiley Mini Mill® (3383-L10 115 V, 60 Hz, Thomas Scientific Swedesboro, NJ 08085-0099-U.S.A.), reduciéndolo a partículas de tamiz malla 40, para su análisis posterior.

2.4.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para determinar la diferencia de los factores principales en estudio (Estaciones de crianza, fases de desarrollo y altura de los niveles) empleando como covariables, la temperatura, humedad relativa (HR) y luz, sobre la CAC (%) y el peso fresco (g), utilizando un diseño completamente al azar, con 15 repeticiones y se consideró como unidad experimental un cladodio. Para determinar diferencia estadística entre medias, se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). También, se realizó un análisis de correlación simple (coeficiente de correlación r de Pearson) entre tratamientos, variables de respuesta y covariables. El análisis estadístico se realizó con el sistema R Versión 3.5.1 (R Core Team, 2018).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Concentración de ácido carmínico en dos estaciones de crianza de *D. coccus*

La concentración de ácido carmínico (CAC) en *D. coccus*, criada bajo el sistema de “nopaloteca” en condiciones semicontroladas, es influenciada significativamente ($p < 0.0001$) por la estación del año en la que se cría, fase de desarrollo en que es recolectada, altura del nivel dentro de la “nopaloteca”, temperatura promedio, humedad relativa máxima, humedad relativa promedio y por la iluminación; así como por la interacción estación*fase y estación*nivel. De las dos estaciones comparadas, en el ciclo otoño-invierno registró la CAC más alta con 18.0 % en promedio, mientras que en el ciclo primavera-verano se registró 17.5 %; ambas estaciones resultaron diferentes estadísticamente ($p < 0.0001$). En ambos ciclos de crianza, la recolecta de hembras en postoviposición produjo una CAC más alta con un promedio de 19.6 %, resultando estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) al valor promedio obtenido en la fase de preoviposición (15.9 %) (**Figura 7**).

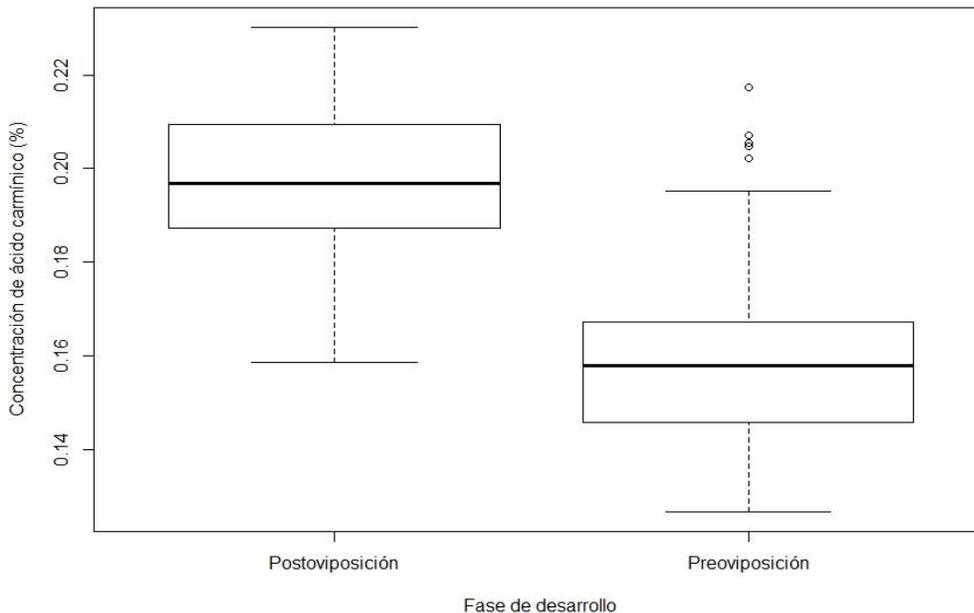


Figura 7. Concentración de ácido carmínico en dos fases de desarrollo de *D. coccus* criada en “nopaloteca”.

En el análisis de la CAC por niveles también resultaron diferencias en ambos ciclos de crianza, el nivel ubicado a 1 m de altura (Nivel 2) produjo la CAC más alta; este valor promedio resultó estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) a los obtenidos en los tres niveles restantes (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Concentración de ácido carmínico (%) de *D. coccus* criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”, en dos estaciones de crianza.

| Niveles y altura (m) | Concentración de ácido carmínico (%) |
|-----------------------------|---|
| 1 (0.5) | 17.30 c |
| 2 (1.0) | 18.61 a |
| 3 (1.5) | 17.66 b |
| 4 (2.0) | 17.70 b |

ab: Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)

En la **Figura 8** se aprecia la concentración de ácido carmínico en los cuatro niveles de crianza de las dos fases de desarrollo durante el ciclo primavera-verano. La CAC más alta en la estación de crianza de primavera-verano, se presentó en la fase de postoviposición con 18.8 %; mientras que cuando las hembras se recolectaron en preoviposición obtuvieron un valor promedio de 16.2 % mostrando diferencia estadística ($p \leq 0.05$). Con respecto a la CAC en los niveles de altura evaluados durante todo el ciclo de primavera-verano, la CAC mayor (19.3 %) se registró en el Nivel 2 [1.0 m de altura, 26.4 °C, 44.7 % de humedad relativa y 11.6 % de la iluminación total (203, 460 lux)] el cual resultó superior estadísticamente ($p \leq 0.05$) a los valores promedio obtenidos en los otros tres niveles; en contraste la CAC más baja (16.7 %) se produjo en el Nivel 4 [2.0 m, 26.9 °C, 44.8 % HR y 29.9 % de la iluminación total (524, 980 lux)] (**Cuadro 5**).

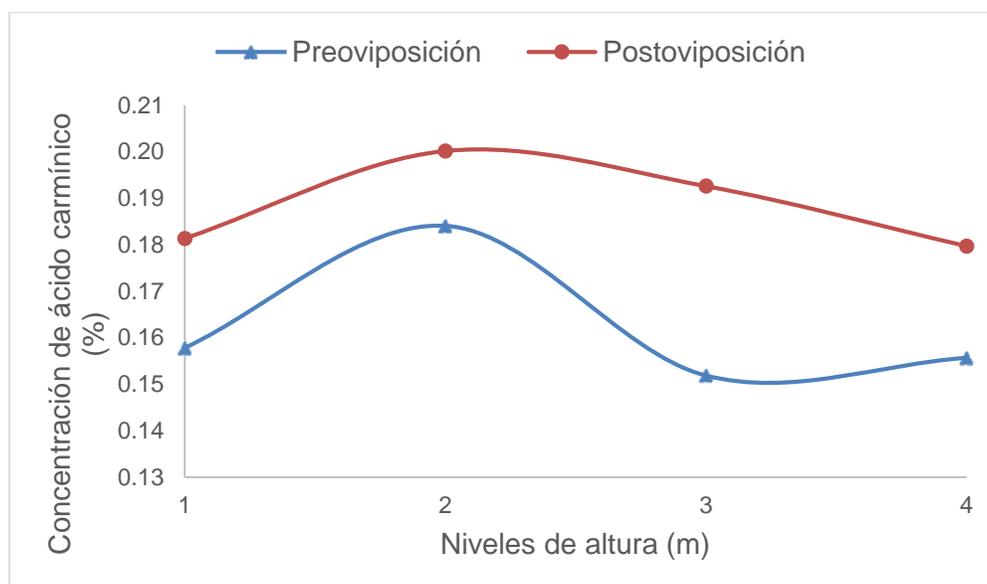


Figura 8 . Concentración de ácido carnínico obtenida en cuatro niveles y dos fases de desarrollo de *D. coccus* criada en “nopaloteca”, en el ciclo de primavera-verano.

Durante el ciclo de cultivo otoño-invierno, la colecta realizada en fase de postoviposición, obtuvo valores estadísticamente ($p \leq 0.05$) más altos de CAC con 20.4 %, mientras que la fase de preoviposición sólo alcanzó 15.7 %. Consistentemente, en cada nivel de altura y en las dos fases, las CAC resultaron superiores durante la fase de postoviposición (**Figura 9**).

Cuadro 5. Concentración de ácido carnínico (%) en *D. coccus* criada en cuatro niveles de “nopaloteca”, durante el ciclo primavera-verano.

| Niveles y altura (m) | Concentración de Ácido Carnínico (%) |
|----------------------|--------------------------------------|
| 1 (0.5 m) | 16.9 b |
| 2 (1.0 m) | 19.3 a |
| 3 (1.5 m) | 17.2 b |
| 4 (2.0 m) | 16.7 b |

ab: Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

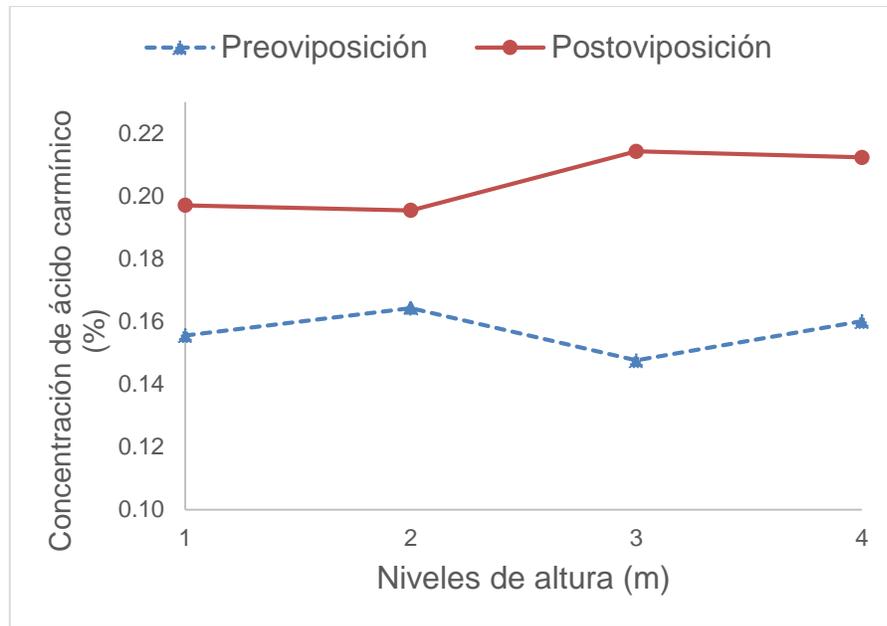


Figura 9. Concentración de ácido carmínico en dos fases de desarrollo de *D. coccus* criada en cuatro niveles de “nopaloteca”, en la estación otoño-invierno.

Durante la cría realizada en el ciclo otoño-invierno se registró una tendencia a incrementar la CAC conforme se eleva el nivel de altura al piso; en contraste con el ciclo de primavera-verano, en otoño-invierno la CAC más alta (18.6 %) se obtuvo en aquella cochinilla proveniente del Nivel 4 [2.0 m de altura, 19.2 °C, 38.2 % de humedad relativa, 9.9 % (262, 010 lux) de la iluminación total]. El Nivel 1 registró la CAC más baja (17.6 %) [0.5 m de altura, 18.6 °C, 38.6 % de humedad relativa, 8.8 % (233, 890 lux) de la iluminación total], ambos niveles resultaron diferentes estadísticamente y éstos también mostraron diferencia con respecto a los Niveles 2 y 3 ($p \leq 0.05$) (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Concentración de ácido carmínico (%) de *D. coccus* criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”, durante el ciclo de cultivo otoño-invierno.

| Niveles y altura (m) | Concentración de Ácido Carmínico (%) |
|-----------------------------|---|
| 1 (0.5 m) | 17.6 c |
| 2 (1.0 m) | 17.9 b |
| 3 (1.5 m) | 18.1 b |
| 4 (2.0 m) | 18.6 a |

ab: Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

2.5.2 Peso fresco (PF) en dos estaciones de crianza de *D. coccus*

El peso fresco (PF) de *D. coccus* criada en el sistema de “nopaloteca” es influenciado estadísticamente ($p < 0.0001$) por la estación de crianza, niveles de altura, temperatura máxima, temperatura promedio y humedad relativa mínima. Así como, por la interacción de la estación*fase y estación*nivel. Los valores promedio estadísticamente ($p \leq 0.05$) más altos de PF por cladodio (6.1 g) se obtuvieron, en general, durante el ciclo de otoño-invierno en los cuatro niveles de crianza de la “nopaloteca”, mientras que la cochinilla criada en primavera-verano produjo casi 2 g menos por cladodio (**Figura 10**). Con respecto a las fases de desarrollo, las hembras colectadas en la etapa de preoviposición registraron valores promedio de PF más altos con 5.4 g por cladodio, aunque no hubo diferencia estadística a los valores promedio registrados en las hembras colectadas en postoviposición.

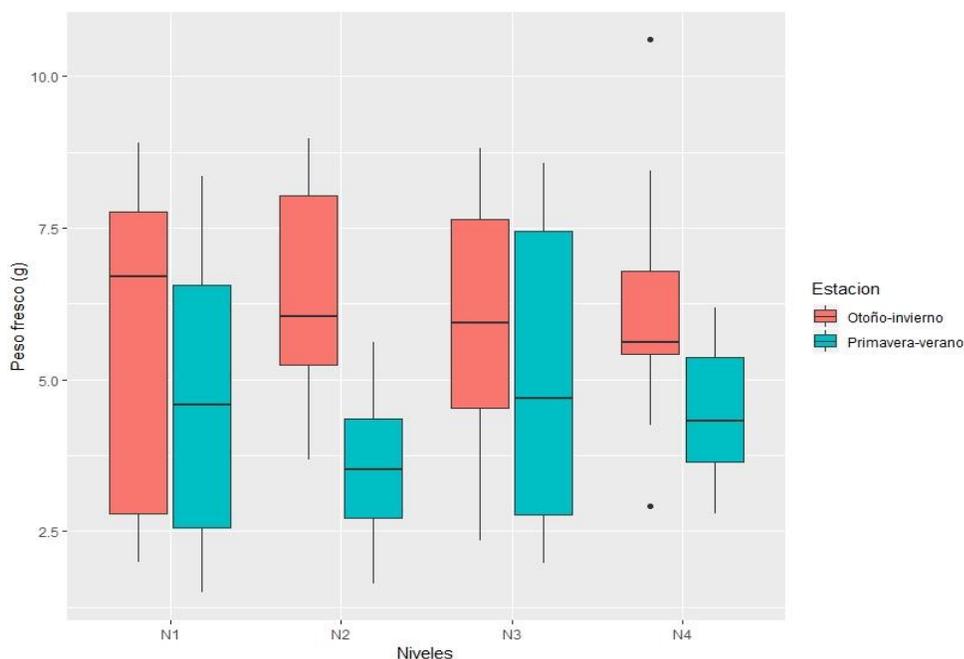


Figura 10 . Peso fresco (g) de *D. coccus* criada en “nopaloteca” en cuatro niveles de altura en dos estaciones de crianza.

En relación a los valores promedio de PF por cladodio obtenidos en cada uno de los niveles de altura de la “nopaloteca”, se registraron diferencias de sólo 0.58 g entre el Nivel 2 y el Nivel 3, 4.94 y 5.52 g, respetivamente (**Cuadro 7**). Los valores promedio de PF producidos por cladodio en el nivel inferior y superior, resultaron estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$).

Cuadro 7. Valores promedio de peso fresco (g) de *D. coccus* criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”, en dos estaciones de crianza.

| Niveles y altura (m) | Peso Fresco (g) |
|----------------------|-----------------|
| 1 (0.5) | 5.3 ab |
| 2 (1.0) | 4.9 b |
| 3 (1.5) | 5.5 a |
| 4 (2.0) | 5.3 ab |

ab: Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Durante la crianza de cochinilla desarrollada en el ciclo primavera-verano los valores más altos de PF se registraron en la fase de preoviposición con 4.9 g por cladodio, esta fase resultó estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) a aquellas cosechadas en postoviposición, que obtuvieron solamente 3.9 g por cladodio, lo que implica la pérdida de 1 g de peso corporal como resultado de la reproducción. Las cantidades de PF de preoviposición y postoviposición se representan en la **Figura 11**. Con respecto a los valores de PF en cada uno de los niveles de altura probados de forma general durante todo el ciclo de primavera-verano, el Nivel 2 [(1.0 m de altura, 26.4 °C, 44.7 % de humedad relativa y 11.6 % (203, 460 lux) de la iluminación total)] registró el valor más bajo de PF con 3.4 g por cladodio. Todos los niveles restantes presentaron valores superiores a 4 g por cladodio, estos promedios resultaron estadísticamente diferentes al obtenido en el Nivel 2. El valor de PF más alto se produjo en el Nivel 3 (1.5 m de altura, 26.8 °C, 43.7 % de humedad relativa y 17.6 % (308, 970 lux) de la iluminación total) con 4.9 g por cladodio (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Valores promedio de peso fresco (g) de *D. coccus* criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”, durante la estación de crianza primavera-verano.

| Niveles y altura (m) | Peso Fresco (g) |
|----------------------|-----------------|
| 1 (0.5 m) | 4.8 a |
| 2 (1.0 m) | 3.4 b |
| 3 (1.5 m) | 4.9 a |
| 4 (2.0 m) | 4.4 a |

ab: Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)

En el ciclo de cría realizado en otoño-invierno las hembras colectadas en la fase de postoviposición registraron los valores de PF más altos con un promedio de 6.4 g, resultando estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) al valor promedio de aquellas cosechadas en la fase de preoviposición, ya que produjeron un promedio de 5.9 g de PF.

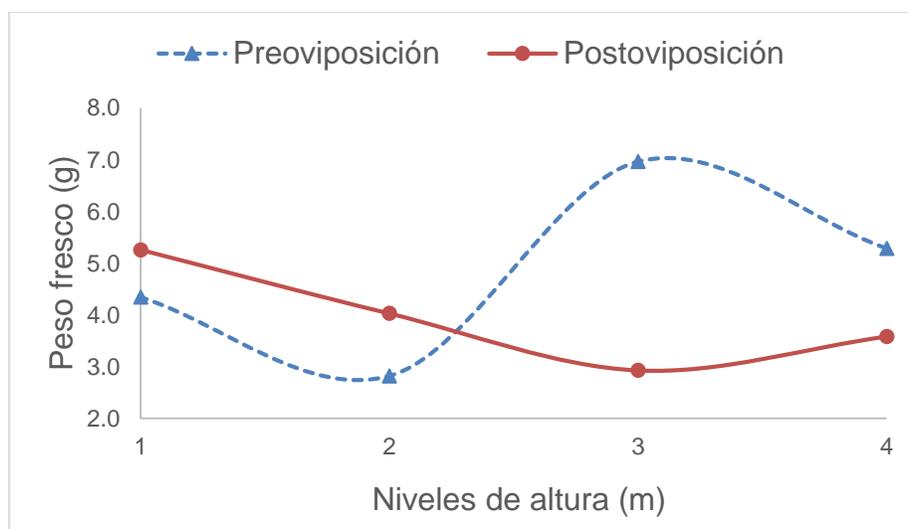


Figura 11. Peso fresco (g) en dos fases de desarrollo de *D. coccus* criada durante el ciclo de cultivo primavera-verano.

El PF más alto durante el ciclo de cultivo otoño-invierno se registró en el Nivel 2 [(1.0 m de altura, 19.0 °C, 37.9 % de humedad relativa y 10.2 % (270, 320 lux) de la iluminación total)] en contraste, los valores de PF más bajos (**Cuadro 9**) se produjeron en el Nivel 1 [0.5 m de altura, 18.6 °C, 38.6 % de humedad relativa, 8.8 % (233, 890 lux) de la iluminación total]; sin embargo, no se registró diferencia estadística ($p \leq 0.05$). En la **Figura 12** se muestran los valores de PF por nivel de preoviposición y postoviposición durante todo el ciclo de crianza de otoño-invierno.

Cuadro 9 . Valores promedio de peso fresco (g) en *D. coccus* criada en cuatro niveles altura en “nopaloteca”, durante el ciclo otoño-invierno.

| Niveles y altura (m) | Peso Fresco (g) |
|----------------------|-----------------|
| 1 (0.5) | 5.9 a |
| 2 (1.0) | 6.4 a |
| 3 (1.5) | 6.1 a |
| 4 (2.0) | 6.2 a |

ab: Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

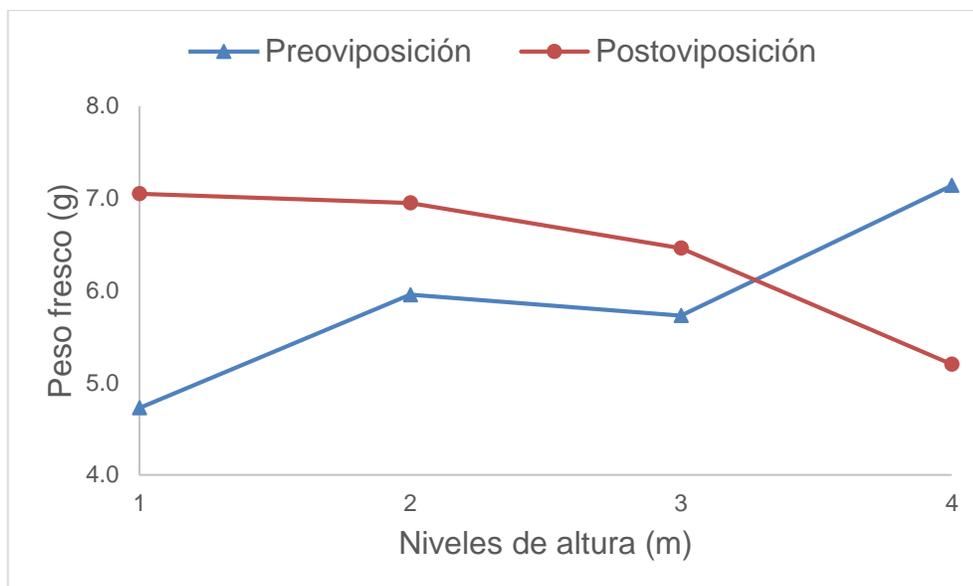


Figura 12. Peso fresco (g) en dos fases de desarrollo de *D. coccus* durante el ciclo de otoño-invierno.

2.6.3 Análisis de correlación (primavera-verano y otoño-invierno)

Para la estación de primavera-verano el análisis de correlación realizado (coeficiente de correlación Pearson r) mostró significancia solo para PF y CAC, que indica que a menor PF del insecto la CAC será mayor; asimismo, vale destacar algunas tendencias interesantes. Existe correlación positiva entre iluminación total (ILTOTAL), temperatura mínima promedio (TMIN), humedad relativa promedio (HRPROM) y la CAC (AC), que indican que al incrementarse alguna de ellas la CAC también aumenta proporcionalmente. Una tendencia semejante se registró respecto a temperatura máxima (TMAX) e iluminación (ILTOTAL) y el PF de *D. coccus*. Es importante destacar que *D. coccus* presenta límites, dentro de los cuales se desarrolla de manera óptima (**Figura 13**).

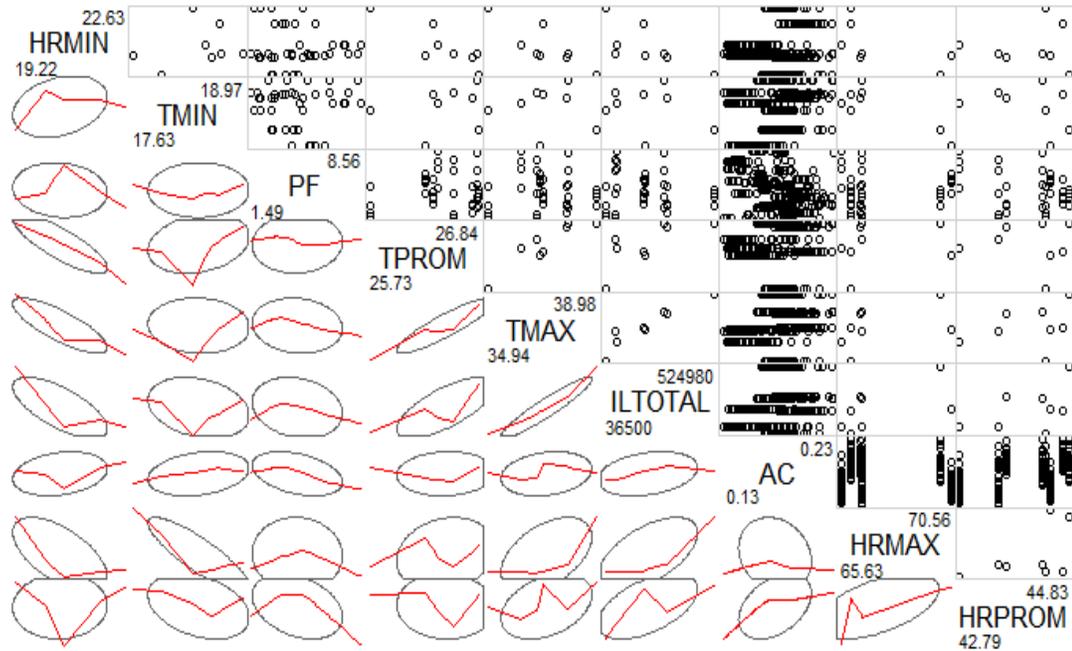


Figura 13. Correlación entre peso fresco (PF) y concentración de ácido carmínico (AC) de *D. coccus* en la estación de primavera-verano y humedad relativa mínima (HRM), humedad relativa promedio (HRPROM), humedad relativa máxima (HRMAX), temperatura mínima (TMIN), temperatura promedio (TPROM), temperatura máxima (TMAX) e iluminación total (ILTOTAL).

En la estación de otoño-invierno el análisis de correlación registró significancia para PF y CAC, que sugiere que a mayor PF del insecto la CAC es mayor, y ésta se mantiene hasta cierto punto y después declina. También se destaca que existe correlación positiva entre iluminación total (ILTOTAL), temperatura máxima (TMAX), temperatura promedio (TPROM) con CAC (AC), que indican que al incrementarse alguna de ellas la CAC aumenta proporcionalmente. Asimismo, se puede resaltar que la temperatura mínima (TMIN) influye positivamente en la CAC hasta cierto punto para luego disminuir. Con respecto al PF, éste se correlacionó positivamente con temperatura promedio (TPROM), temperatura mínima (TMIN) y con la iluminación total (ILTOTAL); no obstante, esta tendencia se mantiene de forma proporcional hasta cierto límite, para posteriormente decrecer (**Figura 14**).

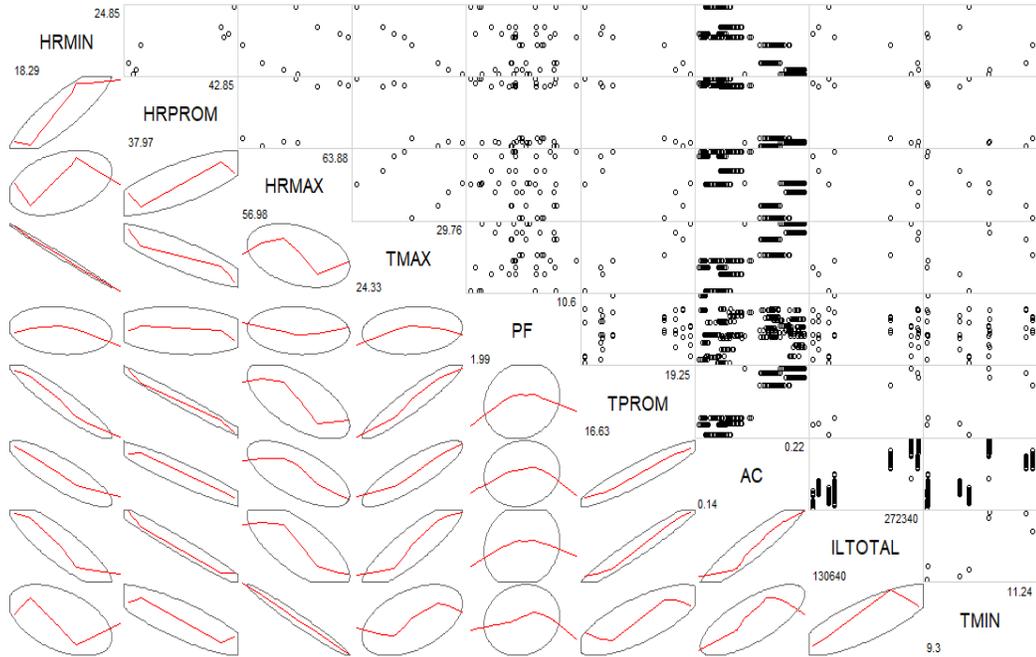


Figura 14. Correlación entre peso fresco (PF) y concentración de ácido carmínico (AC) de *D. coccus* en la estación de otoño-invierno y humedad relativa mínima (HRMIN), humedad relativa promedio (HRPROM), humedad relativa máxima (HRMAX), temperatura mínima (TMIN), temperatura promedio (TPROM), temperatura máxima (TMAX) e iluminación total (ILTOTAL).

2.7 DISCUSIÓN

Dactylopius coccus es un insecto de importancia social y económica, debido a la presencia del ácido carmínico contenido en su hemolinfa, el cual es empleado en diversas industrias (EFSA, 2015); sin embargo, existen factores que influyen en la concentración de ácido carmínico (CAC). En la presente investigación realizada en condiciones semicontroladas en una “nopaloteca”, los valores promedio de CAC resultaron superiores en la cochinilla cultivada en el ciclo otoño-invierno (18.0%). En condiciones similares en Chile, Rodríguez *et al.* (2005) registraron valores promedio de entre 19.1 % en otoño y 16.9 % en primavera; aunque la diferencia entre los resultados podría estar asociado a que en la presente investigación cada ciclo de crianza comprendió parte de dos estaciones a la vez, mientras que, en la investigación de Rodríguez *et al.* (2005) las

crianzas se realizaron durante una estación. Por su parte, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) obtuvieron 22.9 % en microtúnel con plástico transparente, durante el periodo de diciembre-abril, aunque en el periodo de agosto-diciembre éste disminuyó a 19.4 %.

Durante el ciclo de primavera-verano el Nivel 2 (1.0 m de altura) se obtuvieron los valores más altos de AC en ambas fases de desarrollo, con 18.4 y 20 % para pre y postoviposición, respectivamente y en promedio se logró obtener 19.2 %. Considerando que en ambas etapas la temperatura media fue de entre 25 y 26 °C coincide con las observaciones de De Lotto (1974) que afirma que la mejor temperatura para el ciclo de vida de *D. coccus* es de 25 °C. En esta misma estación no se registró una tendencia definida, respecto a la ubicación de la altura de los niveles, dado que hubo alta oscilación entre los niveles. Dicha tendencia registrada no concuerda con los resultados obtenidos por Alonso *et al.* (2013) al evaluar tres niveles de altura en el mismo sistema, ya que ellos detectaron un incremento de la CAC conforme se incrementa la altura del nivel (16.6 % a 0.50 m a 17.5 % a 1.5 m). Los valores de CAC resultaron similares a los registrados en otros sistemas de producción probados. Por ejemplo, Méndez-Gallegos *et al.* (2010) determinaron que la CAC osciló entre 15 y 19 %, en condiciones de invernadero. Contrariamente, para la estación de otoño-invierno la CAC más alta en promedio (18.6 %) se registró en el Nivel 4 (2.0 m). Aunque, en este caso particular durante la fase de preoviposición la CAC más alta se obtuvo en el Nivel 2 (1 m), mientras que en la fase de postoviposición se presentó en el Nivel 3 (1.5 m).

En ambos ciclos de crianza los valores más altos en CAC se produjeron en la fase de postoviposición, con 18.8 % en primavera-verano y 20.4 % en otoño-invierno. Sobre este aspecto, Rodríguez *et al.* (2005) encontraron que aquellas hembras recolectadas en preoviposición, presentaron una CAC promedio de 18.0 %; pero, Flores-Alatorre *et al.* (2014) determinaron que las hembras recolectadas en fase postreproductiva contenían mayor CAC; observando, además, que las hembras adultas estériles más pequeñas obtuvieron mayores valores de CAC (26.27 %). Resultados similares obtuvieron, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) quienes determinaron que la cochinilla recolectada 15 d después

de iniciada la reproducción, presentaron CAC, y cuyos valores oscilaron entre 19.4 y 22.9 %. Asimismo, en hembras recolectadas, cuando el 50 % inició la oviposición, se registraron valores de CAC de hasta 23.6 % (Tello y Vargas, 2015).

La cochinilla de fase postreproductiva cultivada en el ciclo otoño-invierno fueron las que produjeron en promedio mayor CAC (20.4 %); éstas podrían ser consideradas como un producto de primera calidad de acuerdo a ITINTEC (1986). Bajo este mismo criterio, en la estación primavera-verano la cochinilla producida en el Nivel 2 correspondiente a la fase de postoviposición (20 %) podría también ser considerada como de primera calidad; aunque de acuerdo con Molero y Herrera (2013) la calidad de la cochinilla de este nivel podría ser considerada de mediana calidad (20 a 20.75 %), al igual que la cochinilla de postoviposición, obtenida en el ciclo otoño-invierno.

No obstante, aunque las hembras recolectadas en fase de postoviposición del ciclo otoño-invierno podrían ser consideradas de mediana o alta calidad, su ciclo de vida se prolongó, hasta los 169 d después de la infestación, e incluso algunas de ellas continuaban aun reproduciéndose, al momento de la recolecta. Lo anterior concuerda con lo descrito por Hernández *et al.* (2017) y Méndez (2001), quienes explican que a temperaturas bajas el ciclo de vida de *D. coccus* se prolonga.

Cada uno de los niveles dentro de la “nopaloteca” brinda condiciones particulares de temperatura, luz (iluminación) y humedad relativa, las cuales influyen en el desarrollo, rendimiento y calidad *D. coccus*. Con relación a esto, Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares (2003) no observaron diferencias, respecto a peso fresco, entre los tres niveles que probaron; aunque obtuvieron rendimientos más altos de PF (7.8 g por cladodio). De igual manera, Aldama-Aguilera y Llanderal-Cázares (2003) registraron promedios de 8.6 g por cladodio; sin embargo, los valores obtenidos en este estudio resultaron mayores a los registrados por Tovar *et al.* (2005) de 2.5 g. De acuerdo con Rodríguez *et al.* (2005) la densidad de cochinilla en el cladodio aumentó la CAC, sugiriendo que al incrementarse el grado de infestación ocurren respuestas denso dependientes, que se traducen en insectos con menor tamaño corporal y menor potencial reproductivo, resultado de la competencia interior; aunque el menor tamaño corporal estuvo asociado a una mayor

CAC. Una tendencia similar registraron, Méndez-Gallegos *et al.* (2010) al determinar que la cohorte con los valores de crecimiento poblacional más altos, produjo la CAC más baja; también Coronado-Flores *et al.* (2015) determinaron una correlación positiva significativa entre el contenido de nitrógeno en el cladodio y el número de hembras. De acuerdo con lo anterior, las diferencias en el PF de *D. coccus* podrían ser atribuidas a la influencia de los factores abióticos en los niveles evaluados en la “nopaloteca”, principalmente la temperatura y la luz.

Los valores de PF (4.9 g por cladodio) obtenidos durante el ciclo de primavera-verano de las hembras grávidas (fase preoviposición) resultaron superiores a los de la fase postreproductiva (3.9 g por cladodio); esta tendencia podría estar relacionada a que las cochinillas grávidas registraron un mayor volumen corporal por no haber ovipositado. Lo anterior, implica que se puede aprovechar el proceso de reproducción para obtener prole para una generación sucesiva de *D. coccus* y generar una CAC mayor. Contrariamente a lo esperado, en el ciclo otoño-invierno el PF de cochinilla por cladodio en la fase de postoviposición, resultó superior al de aquellas hembras de la fase preoviposición, esto puede estar relacionado a que las hembras en postoviposición no murieron, al contrario, prolongaron su ciclo e incrementaron su volumen. Los valores promedio obtenidos en este estudio en el ciclo primavera-verano, resultaron similares a los registrados en otras investigaciones; por ejemplo, Diodato *et al.* (2009) obtuvieron entre 2.8 a 4.7 g de cochinilla fresca oviplena por cladodio en la época estival (verano), aunque para otoño-invierno se presentaron valores entre 3.1 y 3.5 g de cochinilla fresca por cladodio, lo cual no coincide con lo obtenido en el ciclo de otoño- invierno del presente estudio.

2.8 CONCLUSIONES

La estación de crianza, la ubicación de altura del nivel en la “nopaloteca” y la etapa en que se recolecta, influyen en la calidad y el rendimiento de *D. coccus*. El ciclo de cultivo realizado en otoño-invierno resultó más favorable para obtener una CAC mayor, al igual que para peso fresco. El Nivel 2 (1 m) genera la CAC promedio más alta durante la

estación de primavera-verano; sin embargo, en el ciclo otoño-invierno la CAC se registró en el Nivel 4 (2 m); respecto a peso fresco hubo diferencias no significativas entre los niveles. Las hembras recolectadas en postoviposición presentaron la CAC más alta. En cuanto a peso fresco no se observó el mismo comportamiento, dado que las hembras recolectadas en esa fase, durante el ciclo primavera-verano, obtuvieron un peso fresco más bajo.

2.9 LITERATURA CITADA

- Aldama-Aguilera, C., C. Llanderal-Cázares., M. Soto-Hernández., y L. E. Castillo-Márquez. 2005. Producción de grana-cochinilla (*Dactylopius coccus costa*) en plantas de nopal a la intemperie y en microtúneles. *Agrociencia*, 39(2): 161-171.
- Alonso, M., G. Palacios., S. P. Ortín., A. Talamo., R. Rojas., L. B. Lozano., M. E. Toncovich., and E. E. A. Cerrillos. 2013. Evaluation of carminic acid obtained from cochineal (*Dactylopius coccus Costa*) produced under protected conditions. *Acta Hortic.* 995: 401-404.
- Anculle, A. A., C. V. Castro., y O. A. Julca. 2017. Caracterización de fincas productoras de tuna (*Opuntia ficus-indica*) para la producción de cochinilla del carmín (*Dactylopius coccus*) en La Joya (Arequipa, Perú). *Aporte Santiaguino* 10(2): 245-258.
- Briseño-Garzón, A. y C. Llanderal. 2008. Contenido de ácido carmínico en hembras de grana cochinilla de diferentes edades. *In: Llanderal C., D. H. Zetina, A. L. Viguera y L. Portillo (eds). Grana Cochinilla y Colorantes Naturales. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México. México. 121 p. pp:16-20*
- Campos-Figueroa, M. C., y C. Llanderal-Cázares. 2003. Producción de grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. *Agrociencia* 37(2): 149-155.
- Chávez-Moreno, C. K., A. Tecante., and A. Casas. 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodiversity and Conservation* 18: 3337-3355.
- Coronado-Flores, V., M. A. Tornero-Campante., R. Núñez-Tovar., J. L. Jaramillo-Villanueva., and S. de J. Méndez-Gallegos. 2015. Productividad de cochinilla *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae) en cladodios de *Opuntia ficus-indica* (Cactacea) con diferentes tratamientos de fertilización. *Acta Zoológica Mexicana*. 31(2): 183-189.
- De Lotto, D. 1974. On the status and identity of the cochineal insects (Homoptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*. 37 (1): 167-193.
- Dettner, K. 2015. Toxins, Defensive Compounds and Drugs from Insects. *In: Hoffmann, K. (ed). Insect Molecular Biology and Ecology. Boca Raton: CRC Press. pp: 40-93*
- Diodato, L., A. Fuster. and M. J. de Galindez. 2009. Infestaciones inducidas de grana-cochinilla *Dactylopius coccus Costa* (Homoptera, Dactylopiidae), en la provincia de Santiago del Estero, Argentina. *Quebracho - Revista de Ciencias Forestales*, 17(1,2):52-57.

- EFSA, Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. 2015. Scientific opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. *EFSA Journal*. 13(11): 1-65.
- Eisner, T. S., S. Nowicki, M. Goetz, and J. J. Meinwald. 1980. Red cochineal dye (carminic acid): its role in nature. *Science* 208: 1039–1042.
- Flores-Alatorre, H. L., V. Abrego-Reyes., J. A. Reyes-Esparza., E. Angeles., and F. Alba-Hurtado. 2014. Variation in the concentration of carminic acid produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopidae) at various maturation stages. *Journal of Economic Entomology* 107(4): 1700-1705.
- Hernández, A. A. D., L. L. A. Matos., C. J. A. Rojas., V. A. P. Santa Cruz., L. A. A. Cortez., y D. L. A. Huayna. 2017. Utilización de la técnica nopaloteca para la crianza de *Dactylopius coccus* Costa bajo condiciones controladas. *Revista Infinitum*. 7(2):1-8.
- Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas (ITINTEC). 1984. Estudio técnico carmín de cochinilla. Lima, Perú. 77 p.
- Méndez, S. 2001. Cultivo y manejo de la grana cochinilla. *In: Llanderal C., C. y R. Nieto H. (eds). Cría de la grana cochinilla del nopal para la producción de su pigmento. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México. pp: 69-77.*
- Méndez-Gallegos, S. de J., L. A. Tarango-Arambula., A. Carnero., R. Tiberi., y O. Díaz-Gómez. 2010. Crecimiento poblacional de la cochinilla *Dactylopius coccus* Costa criada en cinco cultivares de nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. *Agrociencia* 44(2): 225-234.
- Molero, S. y A. Herrera. 2013. Tres calidades de cochinilla: *Dactylopius coccus* Costa en el Perú (2008-2011). *In: Nazareno, M. M. A., Ochoa, M. J. y J. C. Dubeaux Jr. (eds). CACTUSNET NEWSLETTER. Actas de la Segunda Reunión para el Aprovechamiento Integral de la Tuna y otras Cactáceas y I Reunión Sudamericana CACTUSNET FAO-ICARDA. 13(1):127-136.*
- Müller-Maatsch, J., and C. Gras. 2016. The “carmine problem” and potential alternatives. *In: Carle, R. and R. Schweiggert (eds). Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages, Industrial Applications for Improving Food Color. 1st edition. Woodhead Publishing. pp: 385-428.*
- Oficina Española de Patentes de Patentes y Marcas (OEPM). 2019. Proceso industrial de producción de cochinilla del carmín. (s.f.). <https://patentados.com/2011/proceso-industrial-de-produccion>. (Consulta: abril 2019).

- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rodríguez, L. C., E. Faúndez., J. Seymour., C. A. Escobar., L. Espinoza., M. Petroutsa., A. Ayres., y H. M. Niemeyer. 2005. Factores bióticos y concentración de ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: Dactylopiidae). *Agricultura Técnica* 65(3):323-329.
- Tello, V., y J. Vargas. 2015. Efecto de la luz artificial a diferentes fotoperiodos sobre dos variables productivas de la grana cochinilla, *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) para su cultivo bajo condiciones controladas. *Idesia (Arica)* 33(3):23-30.
- Tovar A., M. Pando-Moreno., and C. Garza. 2005. Evaluation of three varieties of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as hosts of the cochineal insect *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) in a semiarid area of northeastern Mexico. *Economic Botany* 59(1): 3-7.

CONCLUSIONES GENERALES

La selección y modificación del método propuesto por Briseño-Garzón y Llanderal (2008), que permitió la determinación de una mayor cantidad de ácido carmínico, sienta las bases para su validación en función de la linealidad, repetibilidad y reproducibilidad, lo que facilitaría su normalización; y representa, además, una técnica simple y confiable y económica para ser empleada por los propios productores o bien por instituciones de enseñanza o investigación, y permitiría establecer la calidad de las muestras de cochinilla con mayor certidumbre y la obtención de resultados rápidos.

La estación de crianza, altura del nivel dentro de la nopaloteca y el momento de recolecta de la cochinilla influyen en su calidad y rendimiento. Tanto la estación como el nivel dentro de la “nopaloteca”, tienen un impacto diferencial por la temperatura, humedad relativa y la intensidad luminosa que afectan ambos parámetros, aunque es más acentuado en la concentración del ácido carmínico que en el peso fresco de la cochinilla.

Bajo las condiciones en que se realizó la investigación, no fue posible encontrar un punto intermedio en ambos ciclos de cría y en los cuatro niveles de altura probados, que permitieran obtener valores promedio altos de ambas variables, sin embargo, en términos generales el sistema de cría empleado permite obtener rendimientos constantes de 5.5 g de cochinilla fresca por cladodio y una concentración promedio de 18 % de ácido carmínico.

Los resultados obtenidos comprobaron que el índice de cosecha más adecuado (momento de la recolecta) es al finalizar el periodo reproductivo. Esto se puede aprovechar por parte de los productores al emplear las hembras adultas como pie de cría y dejarla completar su ciclo de desarrollo en el mismo cladodio y desprenderse hasta que el insecto muera por sí mismo, implicando eliminar del proceso productivo su sacrificio por medios artificiales, evitando o reduciendo la crueldad e impulsando nuevas opciones de aprovechamiento.

ANEXO 1. Imágenes del ciclo biológico de *Dactylopius coccus* durante el estudio realizado.



Figura 15. Hembras adultas de *D. coccus* y ninfas con minutos de haber nacido.



Figura 16 . Proceso de muda de las ninfas de la primera fase de desarrollo de *D. coccus* a la segunda fase de desarrollo (puntos rojos).



Figura 17. Hembras adultas de *D. coccus* establecidas en los cladodios.



Figura 18. Macho adulto de *D. coccus* en fase reproductiva.



Figura 19. Muestra de *D. coccus* antes de cuantificar su concentración del ácido carmínico.



Figura 20. Dosis de una misma muestra de *D. coccus* analizadas con diferentes métodos.