



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN**  
**CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**



**“Seguimiento de la producción de ácido carmínico de la Grana Cochinilla (*Dactylopius coccus*) para la detección de la etapa de mayor rendimiento y propuestas de hospederos alternativos”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LETICIA FLORES ALATORRE HERNÁNDEZ**

TUTOR:

**DR. FERNANDO ALBA HURTADO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

COMITÉ TUTORAL:

**DRA. MARÍA TERESA QUINTERO MARTÍNEZ, FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DR. JORGE ALBERTO REYES ESPARZA, PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**México, D. F. Febrero 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A MIS AMADOS HIJOS

ILSE Y YAIR

A MI AMADO ESPOSO

ANTONIO

QUE LA RESECA MUERTE

NO ME ENCUENTRE

VACÍA Y SOLA

SIN HABER HECHO LO SUFICIENTE

## **AGRADECIMIENTOS.**

UNAM. Por recibirme en sus aulas y laboratorios permitiendo desarrollarme como Médico Veterinario e Investigadora.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN. Mi *Alma Mater*, mi amada Facultad, justo ahora que cumple 40 años, festejo con ella culminando mis estudios de Doctorado.

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL. Por las facilidades para la realización de ésta tesis.

PROMEP-SEP. Gracias al otorgamiento de Beca para Estudios de Posgrado de Calidad ya que me brindó los medios económicos y permisos en mi Institución para poder realizar mis estudios de Posgrado.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE TECÁMAC. Por el apoyo otorgado en descarga y gestiones ante PROMEP.

ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES DE GRANA COCHINILLA DE NOPALTEPEC. Por la donación de la grana cochinilla.

DR. FERNANDO ALBA HURTADO. Por su apoyo, asesoría, dirección y amistad, gracias.

DRA. TERESA CLEMENTINA QUINTERO MARTÍNEZ. Por su apoyo desinteresado y por compartir conocimientos incondicionalmente.

DR. JORGE ALBERTO REYES ESPARZA. Por compartir sus conocimientos y dar guía a la realización de éste trabajo.

DR. ENRIQUE ÁNGELES ANGUIANO. Por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Química medicinal y por formar parte del Jurado para examen de grado.

C a DR. VÍCTOR HUGO ABREGO REYES. Por brindarme sus conocimientos y guiarme en el uso del equipo de electroforesis capilar, y sobre todo por su gran paciencia.

MVZ YOLANDA ROMERO SÁNCHEZ. Por su apoyo en la elaboración de laminillas y por ser una gran amiga.

DRA. CELINA LLANDERAL CÁCERES. Por su invaluable ayuda durante la realización del trabajo de investigación y por su incondicional apoyo en el examen de candidatura, así como formar parte de mi Jurado para el examen de grado.

DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ. Por su apoyo para el examen de candidatura y por formar parte de mi Jurado para el examen de grado.

DR. ALBERTO TECANTE. Por su apoyo en la revisión del escrito y por formar parte de mi Jurado para el examen de grado.

DR. FERNANDO GARCÍA, Dpto. de Microscopía, Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su apoyo en la elaboración de muestras para microscopía electrónica.

MAYOR MC SAÚL OMAR VILLALOBOS HERNÁNDEZ. Amado hermano, gracias por tus palabras de apoyo.

CAP 1º ENFRA MARÍA DEL SOCORRO HERNÁNDEZ BÁRCENAS, MI MADRE. Gracias por darme la vida y la oportunidad de llegar a este momento.

CAP. 1º CD MARÍA EUGENIA FLORES ALATORRE HERNÁNDEZ. Hermana, tu ejemplo inspira y aquí vamos.

TTE. CORONEL RAÚL FLORES ALATORRE HERNÁNDEZ. Espero que desde donde te encuentres logres escucharme, gracias hermano.

MANUEL VILLALOBOS Y REYES. Aquí un sencillo reconocimiento a tu apoyo. Gracias.

DRA. MARÍA GUADALUPE PRADO OCHOA. Desde el principio y para siempre, una gran amiga, gracias por compartir tus conocimientos.

M en C MARÍA DEL SOCORRO RUIZ PALMA. Por compartir sus conocimientos de química y por ser mi amiga, comadre, confidente, y una gran mujer.

M en PA LORENA ELIZABETH CHÁVEZ GÜITRÓN. Amiga, compañera y colega, gracias por tu ayuda y consejos.

M en C. FLORENCIA DEL CARMEN SALINAS PÉREZ. Gracias por sus consejos y sí, somos “guerreras”.

Y a todos los que de forma directa o indirecta apoyaron la realización del presente trabajo y a la culminación de una etapa más en mi vida, de corazón: G R A C I A S.

## INDICE

Resumen . . . . .	1
Abstract. . . . .	2
Introducción. . . . .	3
Grana Cochinilla	
Historia. . . . .	3
Clasificación taxonómica . . . . .	5
Morfología. . . . .	5
Ciclo Biológico. . . . .	7
Producción de grana cochinilla	
Nopal. . . . .	9
<i>Opuntia ficus indica</i> . . . . .	10
Métodos de siembra de <i>Opuntia ficus Indica</i> . . . . .	11
Formas de explotación. . . . .	11
Selección del pie de cría . . . . .	12
Selección de cladodios. . . . .	12
Infestación de cladodios. . . . .	13
Cosecha. . . . .	14
Secado. . . . .	14
Clasificación de la calidad. . . . .	15
Ácido carmínico	
Química del ácido carmínico. . . . .	16
Clasificación internacional. . . . .	16
Indicador de pH. . . . .	17
Fluorescencia. . . . .	17
Glóbulos de ácido carmínico. . . . .	17
Electroforesis capilar	
Antecedentes. . . . .	18
Concepto. . . . .	19
Fundamento. . . . .	19
Ventajas de la electroforesis capilar. . . . .	20
Detectores de absorbancia UV Visible . . . . .	21
Solución amortiguadora . . . . .	21
Aplicaciones de la electroforesis capilar . . . . .	21
Citometría de flujo	
Historia. . . . .	22
Fundamento. . . . .	22
Sorting o clasificador. . . . .	25
Rayo láser. . . . .	25
Marcaje con fluorocromos. . . . .	25
Análisis multicolor. . . . .	26
Cultivo de grana cochinilla en hospederos alternos. . . . .	27
Cactáceas predominantes en el altiplano mexicano. . . . .	27
Hipótesis. . . . .	29
Objetivos. . . . .	29
Justificación. . . . .	30
Material y métodos.	
Módulo de crianza . . . . .	32
Porta-pencas. . . . .	33
Material biológico. . . . .	33
Pie de cría. . . . .	33
Cultivo de grana cochinilla. . . . .	33
Fases de la grana cochinilla. . . . .	33
Adultas no fertilizadas. . . . .	34
Nopalera. . . . .	36

Invernadero de cactáceas. . . . .	37
Hospederos alternativos . . . . .	38
Infestación de hospederos alternativos . . . . .	39
Metodología para la determinación de la concentración de ácido carmínico por electroforesis capilar. . . . .	40
Estándar. . . . .	40
Parámetros de ensayo. . . . .	41
Extractos. . . . .	41
Validación del método. . . . .	41
Desengrasado . . . . .	42
Molido y diluciones. . . . .	43
Muestras. . . . .	44
Metodología para la lectura de muestras de hemolinfa de grana cochinilla por Citometría de flujo. . . . .	45
Metodología para el procesamiento de las muestras para histología . . . . .	46
Efecto de la formalina sobre el ácido carmínico. . . . .	46
Ablandado de muestras. . . . .	46
Procesamiento de muestras. . . . .	46
Metodología para el procesamiento de muestras de grana cochinilla para Microscopía Electrónica. . . . .	47
Análisis estadístico. . . . .	48
Resultados.	
Determinación de la concentración de ácido carminico por electroforesis capilar. . . . .	49
Estándar. . . . .	49
Extractos. . . . .	51
Desengrasado. . . . .	52
Concentración de ácido carminico por electroforesis capilar. . . . .	53
Efecto de la fertilización sobre la concentración de ácido carminico. . . . .	54
Validación del método. . . . .	55
Determinación de fluorescencia en glóbulos de ác. carmínico por citometría de flujo. . . . .	56
Histología. . . . .	60
Efecto de la formalina sobre el ác. carminico. . . . .	60
Huevo. . . . .	62
Hembra. . . . .	66
Identificación de órganos y tejidos. . . . .	67
Microscopía electrónica. . . . .	70
Huevo. . . . .	70
Ninfa I. . . . .	71
Ninfa II. . . . .	72
Hembra adulta. . . . .	72
Capullo y pupa. . . . .	73
Macho. . . . .	74
Estructuras tegumentarias. . . . .	76
Sedas y túbulos. . . . .	76
Poros quinqueloculares. . . . .	78
Aparato bucal y estiletes. . . . .	79
Antenas. . . . .	79
Patas. . . . .	80
Espiráculos. . . . .	81
Infestación de hospederos alternativos por D. coccus y rendimiento de la producción de ác. carmínico. . . . .	81
Discusión. . . . .	84
Conclusiones. . . . .	90
Bibliografía. . . . .	91
Artículo científico. . . . .	96

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos morfológicos de algunas fases de la grana cochinilla ( <i>Dactylopius coccus</i> ) . . . . .	6
Figura 2. Etapas del ciclo biológico de <i>Dactylopius coccus</i> Costa . . . . .	8
Figura 3. Algunas especies hospedadoras de la grana cochinilla . . . . .	10
Figura 4. Tipos de explotación de grana cochinilla. . . . .	12
Figura 5. Formas de infestación de cladodios. . . . .	13
Figura 6. Fórmula química del ácido carminico. . . . .	17
Figura 7. Glóbulos de ácido carminico de la grana cochinilla. . . . .	18
Figura 8. Esquema simplificado de un citómetro de flujo. . . . .	24
Figura 9. Módulo de crianza de grana cochinilla "EZTLI" . . . . .	32
Figura 10. Portapencas. . . . .	33
Figura 11. Forma en que se cubrieron hembras adultas para evitar apareamiento . . . . .	35
Figura 12. Hembras en oviposición. . . . .	35
Figura 13. Nopalera. . . . .	37
Figura 14. Módulo para cactáceas. . . . .	37
Figura 15. Manejo de los hospederos alternativos de grana cochinilla. . . . .	38
Figura 16. Infestación de hospederos alternativos con <i>D. coccus</i> . . . . .	39
Figura 17. Métodos de desengrasado de grana cochinilla seca. . . . .	42
Figura 18. Tamiz con 3 diferentes tamaños de malla . . . . .	44
Figura 19. Electroferograma del estándar de ácido carminico concentrado a 150 ppm y constantes de trabajo del cuadro 7 . . . . .	49
Figura 20. Electroferograma de las diferentes concentraciones de estándar de ácido carminico . . . . .	50
Figura 21. Curva estándar de ácido carminico. . . . .	51
Figura 22. Extractos seriados de ácido carminico en muestras de grana cochinilla seca y tamizada . . . . .	51
Figura 23. Absorbancia promedio de muestras de grana cochinilla molida y tamizada a 495 nm por espectrofotometría . . . . .	52
Figura 24. Porcentaje de ácido carminico en hembras adultas fertilizadas y no fertilizadas por electroforesis capilar. . . . .	54
Figura 25. Fluorescencia total de glóbulos de ácido carminico de las diferentes fases de grana cochinilla medidas por citometría de flujo. . . . .	57
Figura 26. Porcentaje de glóbulos de ácido carminico presentes en grana cochinilla según la intensidad de fluorescencia . . . . .	58
Figura 27. Porcentaje de glóbulos de ácido carminico de grana cochinilla Clasificados por tamaño. . . . .	59
Figura 28. Correlación positiva entre peso seco y el porcentaje de ácido carminico de hembras de grana cochinilla en proceso de oviposición. . . . .	60
Figura 29. Efecto de la formalina bufferada al 10% sobre el ácido carminico determinado por espectrofotometría . . . . .	61
Figura 30. Micrografía de cortes histológicos de huevos de grana cochinilla. . . . .	62
Figura 31. Comparación de cortes histológicos de huevo de grana cochinilla sin teñir. . . . .	63
Figura 32. Cortes histológicos de huevos de grana cochinilla teñidos con técnica HE y vistos con luz UV. . . . .	64
Figura 33. Cortes histológicos de hembra adulta de grana cochinilla . . . . .	65
Figura 34. Cortes histológicos de hembra adulta de grana cochinilla, observados bajo luz UV . . . . .	65
Figura 35. Preparaciones histológicas de Hemíptero. . . . .	66
Figura 36. Corte histológico de grana cochinilla teñido sólo con hematoxilina. . . . .	67
Figura 37. Estructuras internas de la grana cochinilla. . . . .	68



Figura 38. Corte histológico de grana cochinilla, sin teñir. . . . .	.68
Figura 39. Corte histológico de grana cochinilla, teñido con HE. . . . .	.69
Figura 40. Ovariolos y huevo dentro de hembras adultas de grana cochinilla en etapa de oviposición por microscopía electrónica. . . . .	.70
Figura 41. Ninfa I de grana cochinilla por microscopía electrónica. . . . .	.71
Figura 42. Electromicrografía de Ninfa II de grana cochinilla . . . . .	.72
Figura 43. Esquema de hembra adulta de grana cochinilla. . . . .	.72
Figura 44. Hembra adulta de grana cochinilla por microscopía electrónica. . . . .	.73
Figura 45. Electromicrografías de la fase de capullo y pupa de grana cochinilla. . . . .	.74
Figura 46. Electromicrografía de pupa de grana cochinilla. . . . .	.74
Figura 47. Esquema de macho de grana cochinilla. . . . .	.75
Figura 48. Electromicrografías de macho de grana cochinilla. . . . .	.76
Figura 49. Esquema de los tipos de estructuras tegumentarias reportadas en la grana cochinilla. . . . .	.76
Figura 50. Electromicrografías de los tipos de accesorios tegumentarios de grana cochinilla. . . . .	.77
Figura 51. Poros quinqueloculares. . . . .	.78
Figura 52. Electromicrografías de aparato bucal con estiletes de grana cochinilla. . . . .	.79
Figura 53. Electromicrografía de antenas de grana cochinilla . . . . .	.79
Figura 54. Electromicrografías de patas de grana cochinilla. . . . .	.80
Figura 55. Electromicrografías del espiráculo de grana cochinilla. . . . .	.81
Figura 56. Panorámica del proceso de infestación de hospederos alternativos . . . . .	.82
Figura 57. Comparación de cladodios de <i>Opuntia ficus</i> y <i>Opuntia robusta</i> infestados con grana cochinilla. . . . .	.83

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros para determinar la calidad de la grana cochinilla seca. ....	15
Cuadro 2. Identificación Internacional del ácido carmínico .....	16
Cuadro 3. Principales fluorocromos utilizados para citometría de flujo. ....	26
Cuadro 4. Cactáceas más comunes del Estado de México. ....	27
Cuadro 5. Clasificación de las muestras de grana adulta por peso fresco. ....	34
Cuadro 6. Relación de ejemplares de cactáceas utilizadas como hospederos alternativos para infestación con grana cochinilla ( <i>Dactylopius coccus</i> ). ....	38
Cuadro 7. Parámetros de corrida para la determinación de la concentración de ácido carmínico por electroforesis capilar en muestras de grana cochinilla. ....	41
Cuadro 8. Equivalencias del número de malla de tamiz a micrómetros. ....	43
Cuadro 9. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica. ....	48
Cuadro 10. Áreas reportadas por electroforesis capilar de la corrida del estándar del ácido carminico. ....	49
Cuadro 11. Concentración promedio en porcentaje de ácido carminico de diferentes fases de grana cochinilla determinado por electroforesis capilar. ....	53
Cuadro 12. Concentración en porcentaje de ácido carminico en hembras fertilizadas y no fertilizadas .....	54
Cuadro 13. Parámetros de validación del método de determinación de la concentración de ácido carminico por electroforesis capilar. ....	55
Cuadro 14. Fluorescencia de glóbulos de ácido carminico de la grana cochinilla. ....	56
Cuadro 15. Reporte del porcentaje de ácido carminico por electroforesis capilar y fluorescencia total por citometría de flujo de muestras de grana cochinilla. ....	59
Cuadro 16 Resultados de absorbancia por espectrofotometría de extractos de grana cochinilla al 1% adicionados con formalina bufferada al 10%. ....	61

## RESUMEN

La grana cochinilla (*Dactylopius coccus*) es un insecto parásito del nopal de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*. El insecto produce ácido carminico, un colorante natural que, por su inocuidad, no necesita certificación de la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica y además se utiliza en la industria textil. En México se conoce desde la época prehispánica, pero luego de la invención de los colorantes artificiales cayó en desuso quedando sólo como elemento artesanal. Actualmente ha retomado importancia por no dañar al consumidor e inclusive se le atribuyen beneficios medicinales como antioxidante, antibiótico y antitumoral. La concentración de ácido carmínico varía según el tamaño y la etapa del ciclo biológico de *Dactylopius coccus*, se midió la concentración de ácido carmínico por electroforesis capilar y se obtuvo, por citometría de flujo, la fluorescencia total de los glóbulos de ácido carmínico de las fases de huevo, ninfa I, ninfa II, adultas fertilizadas, adultas en proceso de oviposición y adultas no fertilizadas. También se hicieron cortes histológicos y se procesaron muestras para microscopía electrónica como parte complementaria del conocimiento del insecto y se infectaron cactáceas de géneros presentes en el Estado de México para probar su capacidad de propagación. Las hembras adultas no fertilizadas más pequeñas presentaron mayor porcentaje de ácido carmínico en relación a su peso (26.27%;  $p < 0.001$ ) que las hembras adultas de los grupos restantes. En general, las hembras en proceso de oviposición presentaron mayor porcentaje de ácido carmínico que el resto de las hembras. La fase que presentó menor porcentaje de ácido carmínico fue la ninfa II. Por citometría se demostró que los grupos de hembras en proceso de oviposición presentaron una mayor fluorescencia total que el resto de los grupos muestreados ( $p < 0.05$ ). Se demostró una correlación positiva ( $r^2 = 0.68$ ,  $p < 0.05$ ) entre el porcentaje de ácido carmínico y la fluorescencia total de los glóbulos de ácido carmínico. La microscopía demostró que el colorante está presente en todas las fases del insecto y se distribuye en todo el cuerpo del mismo. *Dactylopius coccus* no es capaz de infestar cactáceas que no sean del género *Opuntia* o *Nopalea*, y aun en estos géneros, presentan ciertas dificultades para infestarlos. Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con otros estudios que involucren los procesos industriales, deben servir para mejorar los actuales criterios de clasificación de las calidades comerciales de las granas secas.

## ABSTRACT

The cochineal insect (*Dactylopius coccus*) is a parasite of prickly pear cacti of the genus *Opuntia* and *Nopalea*. The insect produces carminic acid, a natural dye, which does not need FDA certification for use in the food, cosmetic or pharmaceutical industries because it is considered safe and is used in the textile industry as well.

In Mexico it is known since pre-Hispanic times, but after the invention of synthetic dyes fell into disuse remaining only as a handmade item. Currently it has regained importance because it is not harmful to the consumer and even because of attributed medicinal benefits as an antioxidant, antibiotic and antitumor agent. The concentration of carminic acid varies with the size and life-stage of *Dactylopius coccus*; the concentration of this acid was measured by capillary electrophoresis and the total fluorescence of carminic acid globules in the egg, nymph I, nymph II, fertilized adult, adult, egg-laying adults and fertilized adults phases, was obtained by flow cytometry. Histological sections were also made and samples for electron microscopy were prepared to complement the knowledge on the insect. Cacti of genera growing in the Estado de México, were infected to test their ability for propagation. Smaller unfertilized adult females had a higher percentage of carminic acid in relation to their weight (26.27%;  $p < 0.001$ ) than adult females of the other groups. In general, the egg-laying females had greater carminic acid percentage than other females. The nymph II phase showed the lowest percentage of carminic acid. . Cytometry showed the groups of egg-laying females to have the higher total fluorescence than all the rest of sampled groups ( $p < 0.05$ ). A positive correlation ( $r^2 = 0.68$ ,  $p < 0.05$ ) between carminic acid percentage and total fluorescence of the carminic acid globules was obtained. Microscopy showed the colorant to be present in all life-stages of the insect and distributed throughout its body. *Dactylopius coccus* is not able to infested cacti other than *Opuntia* or *Nopalea*, and even in both of them certain difficulties to be infested are present. The results obtained in this work, together with other studies involving industrial processes, should serve to improve the current criteria for the classification of commercial grades of dry scarlet.

## INTRODUCCIÓN

La Grana Cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa), también llamada grana carmín, grana del nopal o nocheztli (en lengua Náhuatl), es un insecto hemíptero parásito de los nopales principalmente de los géneros *Opuntia* y *Nopalea* (Portillo y Viguera 2006); es apreciado por la capacidad de producir un pigmento rojo denominado ácido carmínico.

### HISTORIA DE LA GRANA COCHINILLA

Este insecto y su colorante han sido utilizados por los mexicanos desde la época precolombina en la producción de textiles, como colorante en alimentos e incluso en la elaboración de pigmentos para las pinturas murales. Consta en los anales de Tlatelolco que existía una especial vigilancia en la comercialización del colorante para evitar adulteraciones. Durante la época colonial, después del oro y la plata, los embarques de grana seca eran los más importantes, y eran llevados a Europa donde tenía un alto valor para las industrias textiles por el intenso color rojo que imprimía y se utilizaba principalmente para las vestimentas reales (Dalghen, 1990).

La Grana Cochinilla es originaria de México y en su momento fue el principal productor de grana en el mundo (Dahlgren, 1990); actualmente se ha reducido a una producción familiar o en pequeñas cooperativas y asociaciones interesadas en no perder este legado indígena. En diferentes Instituciones Académicas y de Investigación, este insecto ha retomado importancia en México (Llenderal y Campos, 2001).

Perú es el mayor productor de carmín de cochinilla, contribuyendo con el 80% de la producción mundial. El precio en los últimos años es fluctuante debido a la especulación, a la falta de calidad y a la presencia de sustancias extrañas resultado del inadecuado proceso de sacrificio, y por la adulteración con semillas, piedras etc. Este colorante tiene un precio variable, pero en promedio se cotiza hasta \$120 dólares americanos por kg de cochinilla. La baja del precio se debe además a la fuerte competencia que tiene el carmín con respecto a otros colorantes naturales como la bixina, cúrcuma, antoxianinas, etc, así como de los colorantes sintéticos y la recesión mundial que afecta a la industria. Los principales países compradores son: Francia, Inglaterra, Italia, Japón, USA y Argentina; Japón prefiere adquirir cochinilla y con su propia tecnología producir carmín (<http://sisbib.com>, 2009).

En 1974 se anunciaron sus posibles efectos toxicológicos. La comisión de Expertos de la Food and Agriculture Organization (FAO) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), exigió pruebas de inocuidad y redujo el espectro de uso del carmín en alimentos. En 1976 se permitió el uso del carmín sólo en bebidas alcohólicas, lo que provocó la caída en los precios de la cochinilla y del carmín. Perú fue el país más afectado y contrató a los laboratorios BIBRA (British Industrial Biological Research Association) de Inglaterra, para demostrar la inocuidad del carmín en alimentos y cosméticos, objetivo que se alcanzó en 1981. Basado en estos resultados, en 1982 la comisión FAO/OMS autorizó nuevamente el uso del carmín y derivados, es a partir de ese momento que el precio y volumen de la exportaciones se incrementó (Monografías.com, 2009).

Este colorante se utiliza para alimentos en su mayoría en forma de tintes hidrosolubles, lacas, emulsiones en seco y en soluciones con características, tonalidades y aplicaciones diversas. El carmín de cochinilla en combinación con aluminio y calcio forma la laca aluminico cálcica al 52% generalmente insoluble en agua, y únicamente soluble en medios alcalinos a pH no superior a 9.0. Tiene su principal uso en la industria láctea como la del yogurt y los helados. Se utiliza en algunos alimentos, especialmente en Japón para colorear el sustituto de carne de cangrejo (surimi). Se usa en la industria cárnica principalmente en la de cerdo para darle a la carne de éste animal un color rojo rosáceo y a las hamburguesas una tonalidad anaranjada (Matadamas, 2006).

Otros productos que utilizan la cochinilla y sus derivados son los dulces, goma de mascar, frutas, gelatinas, mermeladas, sopas y salsas; productos de la panificación; bebidas alcohólicas con bajo pH que requieren tonos rojos o naranjas, aperitivos, jugos, etc. En la industria cosmética se utiliza para los productos que se aplican a la zona de boca y ojos como sombras, lápices de labios y también para rubores (Marrone, 2008).

En la industria farmacéutica se utiliza como parte del vehículo en la elaboración de jarabes, enjuagues bucales, ungüentos, cubiertas de tabletas, cápsulas, etc. (Marrone, 2008).

La industria textil recurre a este colorante para el teñido de telas, ropa de cama y alfombras. Ambos ramos utilizan la laca, pero ésta tiene el inconveniente de su mayor costo con respecto los colorantes sintéticos (Flores, 2008).

## CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:

REINO: [Animalia](#)  
PHYLUM: [Arthropoda](#)  
CLASE: [Insecta](#)  
ORDEN: [Hemiptera](#)  
FAMILIA: [Dactylopiidae](#)  
GENERO: [Dactylopius](#)  
ESPECIE: [Dactylopius coccus](#)

Fuente: [Monografias.com](#)

## MORFOLOGÍA.

**HUEVO.** Es ovalado con los bordes redondeados, de color rojo claro cuando está recién depositado y después cambia a color rojo intenso, la superficie es lisa y brillante. En promedio mide 0.7mm de longitud y 0.3mm de ancho, como se puede apreciar en la Figura 1 (Llanderal y Nieto, 2001).

**NINFA I.** Presenta cuerpo alargado de color rojo. Recién emergida mide en promedio 0.85 mm x 0.35 mm. Las antenas tienen seis segmentos y sobresalen del límite del cuerpo. Sus ojos se encuentran en posición lateral, son ovalados y convexos, cercanos a las antenas. El aparato bucal está formado por cuatro estiletes largos que se enrollan en el interior del cuerpo. Posee tres pares de patas largas y delgadas con tarso de un segmento, que a su vez posee una uña. El meso y el metatórax presenta cada uno un par de espiráculos. El abdomen está formado por ocho segmentos bien definidos, que se van angostando hacia el final del abdomen. El cuerpo de las ninfas presenta setas y túbulos; según Montiel (1995) el número y la longitud de los túbulos y la presencia o ausencia de setas cefálicas permiten distinguir hembras de machos después de 6 días de haber emergido, ya que la hembra tiene 20 túbulos filamentosos largos y dirigidos hacia delante, lo que le da una apariencia algodonosa y también presenta setas apicales, mientras que el macho tiene 27 túbulos, la mayoría de ellos cortos y solo cuatro bien desarrollados como podemos ver en la Figura 1 (Llanderal y Nieto, 2001).

**NINFA II.** Presenta cuerpo ovoide, de color rojo oscuro. Mide en promedio 2.2 mm de longitud y 1.2 mm de ancho. Al principio tiene una apariencia algodonosa similar a la ninfa de primer estadio, pero después los filamentos desaparecen y se cubren de cera fina denominada coccerina, las antenas sobresalen poco del cuerpo (Llanderal y Nieto, 2001).

HEMBRA. El cuerpo es ovoide, de color rojo, similar al de la ninfa II. Después de madurar es aplanada, pero como transcurre el tiempo adquiere una forma oval, con el vientre plano y el dorso convexo. Las antenas y las patas no sobresalen de los márgenes laterales del cuerpo. La cutícula es delgada y flexible, presenta poros, túbulos y setas. La superficie del cuerpo está cubierta con abundante coccerina. Después de la muda mide en promedio 2.8 mm de longitud por 1.9 mm de ancho y cuando está completamente madura, esas medidas aumentan a 4.5mm x 3.0mm, Figura 1 (Pérez y Kosztarab, 1992; Llanderal y Nieto, 2001).

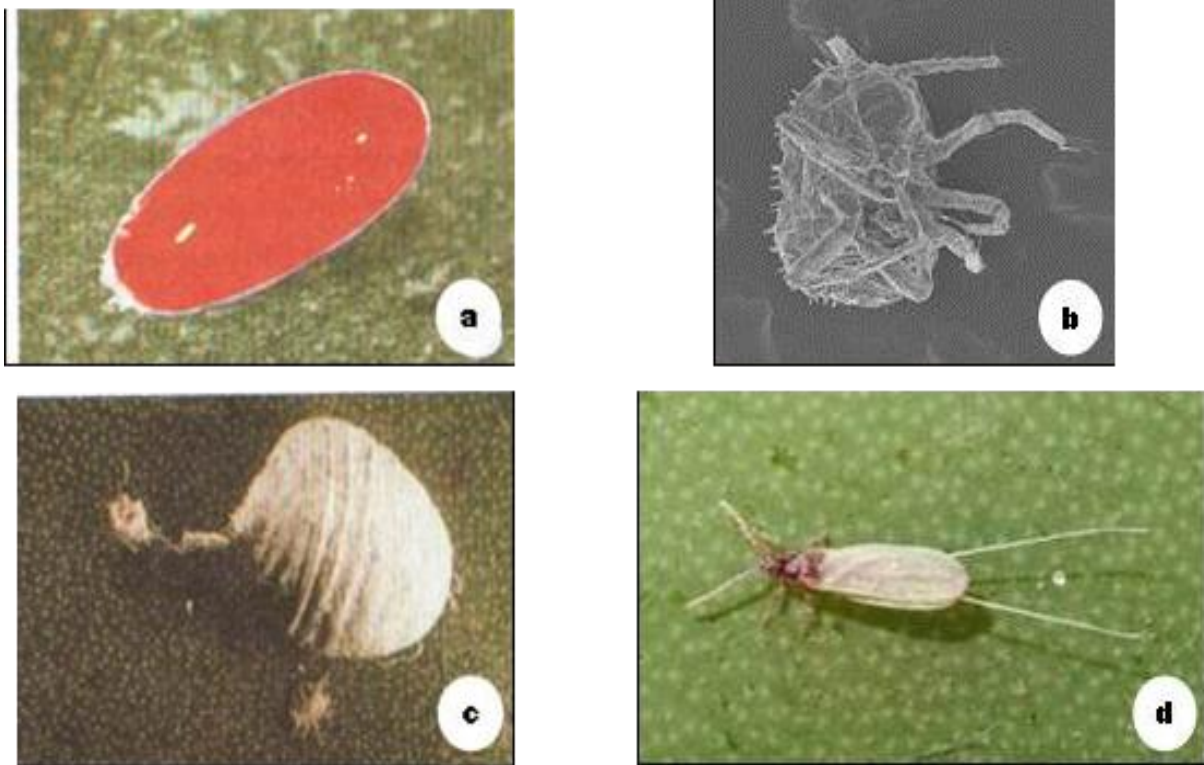


Figura 1. Aspectos morfológicos de algunas fases de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus*) a) Huevo, microscopio estereoscópico, 10x. b) Ninfa I, microscopio electrónico, 100x, c) Hembra adulta, vista dorsal, microscopio estereoscópico 10x. d) Macho sobre cladodio, microscopio estereoscópico, 10x. Fuente: Llanderal y Campos, 2001.

MACHO. El cuerpo del macho adulto es de color rojo, con los segmentos bien diferenciados. Antenas de 10 segmentos muy sobresalientes. Presentan ojos y ocelos. El aparato bucal está atrofiado. Tiene un par de alas de color blanco bien desarrolladas y de bordes redondeados. Las patas son largas y delgadas. Tarso de un segmento con una uña, abdomen de 9 segmentos de consistencia membranosa. Del final del abdomen salen



dos filamentos caudales de color blanco, Figura 1 (Pérez y Kosztarab, 1992; Llanderal y Nieto, 2001).

## CICLO BIOLÓGICO

Las hembras sufren una metamorfosis incompleta, presentando las fases de huevo, ninfa con 2 etapas (Ninfa I y Ninfa II) y fase adulta (la cual se puede dividir en 3 etapas, juvenil, oviplena y en oviposición). El macho, sufre una metamorfosis completa, presenta las fases de huevo, ninfa I, ninfa II, prepupa, pupa y adulto (Flores, 2006). El ciclo biológico dura aproximadamente 90 días y dependerá de las condiciones ambientales de temperatura, humedad, incidencia de luz, lluvia, viento y de la presencia de los diferentes depredadores de la cochinilla, Figura 2 (Aldama, *et. al.* 2005).

Los huevos al ser depositados por las hembras oviplenas, quedan distribuidos alrededor de ella, pero casi de inmediato, de estos huevos emerge la ninfa I, a la que se le denomina migrante por tener la capacidad de caminar sobre la superficie del nopal en busca de una zona más adecuada para insertar su estilete y comenzar a alimentarse. La ninfa I produce unos filamentos en la parte dorsal de su cuerpo que la recubren y la protegen de los fenómenos ambientales como aire y lluvia, así como de la desecación. Luego de 30 a 35 días, se presenta la primera muda, quedando como ninfa II, la cual presenta también filamentos de protección y es más grande que la fase anterior, ésta etapa dura de 15 a 20 días. Al presentarse la segunda muda, los machos comienzan a formar su capullo dentro del cual sufrirán una metamorfosis que pasa por las etapas de prepupa y pupa, emergiendo como insecto alado luego de 15 a 20 días. En el caso de las hembras, luego de la segunda muda, el insecto queda como hembra adulta juvenil. La cópula tiene lugar aproximadamente a los 57 días y después de la fecundación el volumen del cuerpo aumenta debido al desarrollo de los huevos en su interior. El dorso se torna convexo, quedando como un saco abultado. Figura 2 (Llanderal y Nieto, 2001).

## Ciclo Biológico de la Grana del Carmín (*Dactylopius coccus* Costa)

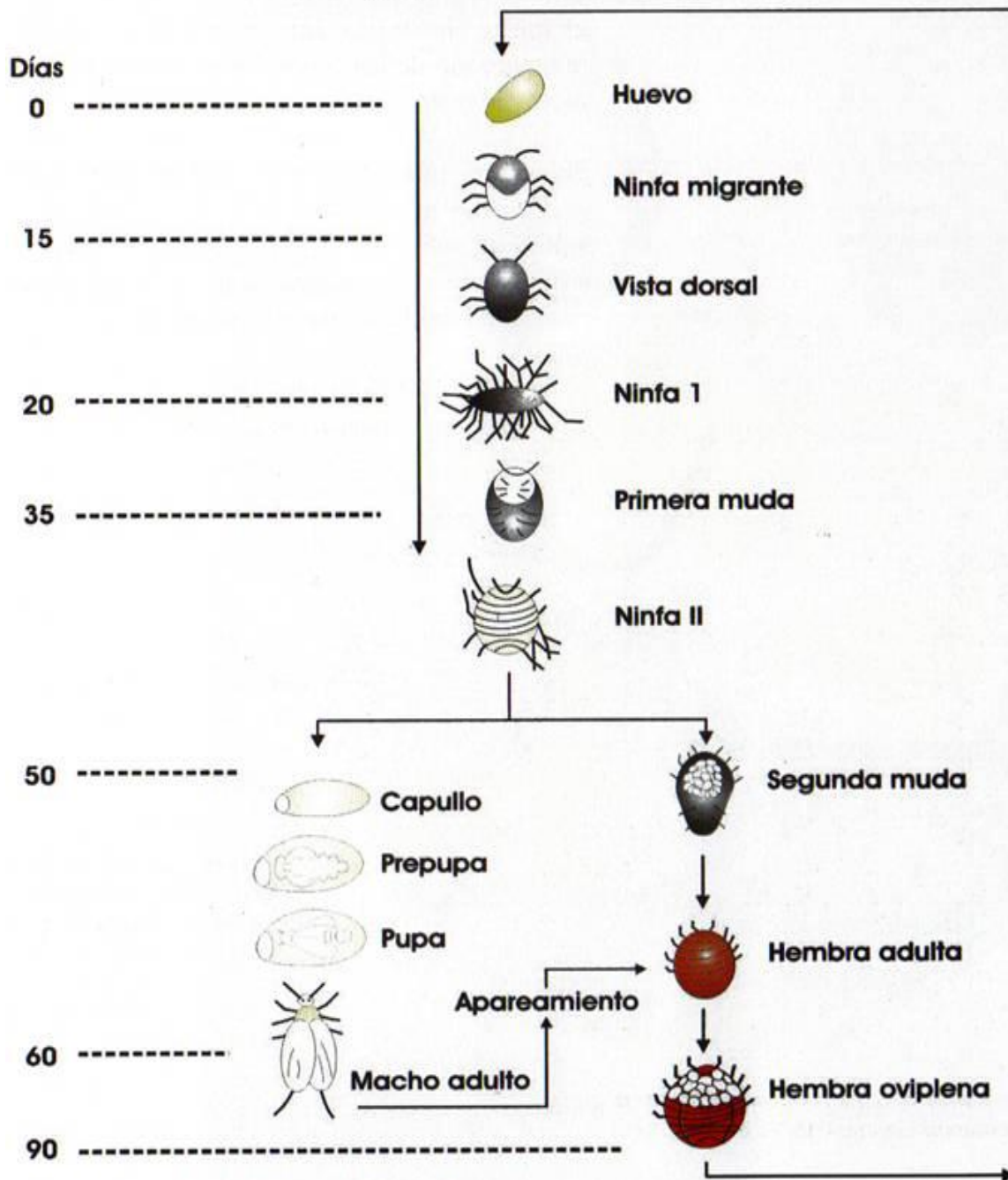


Figura 2. Etapas del ciclo biológico de *Dactylopius coccus* Costa (Fuente: Del Río, 2005)

## PRODUCCIÓN DE GRANA COCHINILLA

### NOPAL

Para la producción de grana cochinilla se requiere de nopales sanos y que brinden al insecto las condiciones adecuadas para su buen desarrollo.

En México el término nopal se aplica a diversas especies de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, de la familia Cactaceae, oriunda del Continente Americano; estas plantas se distribuyen ampliamente en regiones áridas y semiáridas de nuestro país, donde han adquirido una importancia relevante debido a su resistencia a la sequía, brindando innumerables opciones de desarrollo y protección de las zonas áridas y semiáridas que están ligadas a la marginación y a la pobreza de sus habitantes, ya que actúan como fijadoras y protectoras del suelo controlando la erosión. Además de su utilidad como seto vivo para delimitar terrenos, también se usan como verdura (nopalitos) cuando el cladodio está tierno, cuando el cladodio es adulto se consume en forma de sopas, principalmente la parte central de la penca o corazón.

El fruto o tuna presenta un alto contenido de agua y fibra. Se usa como forraje para ganado o para consumo humano, así como materia prima para la elaboración de mermeladas, medicamentos, cosméticos y artesanías. Aunque no todas las especies de nopal se pueden utilizar para el cultivo de grana, en las que sí logra hospedarse este insecto, son de fácil cultivo y de todas ellas, se prefiere *Opuntia ficus indica* que es el más apropiado para la explotación de la grana, dada la succulencia de las pencas, así como su fácil manejo en la infestación y cosecha del insecto por la ausencia de espinas y facilidad de cultivo (Vigueras y Portillo, 2001).

Portillo y Vigueras (2001) indicaron que algunas de las especies conocidas como hospederas para la cría son: *Opuntia atropes*, *O. ficus-indica* (L) Millers, *O. jaliscana* Bravo, *O. megacantha* Salm-dyck, *O. pilífera* Weber, *O. streptacantha* Lem., *O. sarca* Griff. Ex Scheinv., *O. tomentosa* Salm-dyck, *O. undulata* Griffiths y *Nopalea cochenillifera* (L) Salm-Dyck, Figura 3 (Vigueras y Portillo, 2001).



Figura 3. Algunas especies hospedadoras de grana cochinilla. a) *Opuntia cochenillifera*, b) *Opuntia tomentosa*, c) *Opuntia ficus indica*

### ***Opuntia ficus indica*** (Bravo y Sánchez, 1978)

Es una especie arborescente que mide de 3 a 5 m de alto, de tronco leñoso bien definido de 60 cm a 1.50 m de altura y 20 a 30 cm de diámetro. Artículos oblongos 30 a 60 cm de largo y 20 a 40 cm de ancho, con 1.9 a 2.8 cm de grueso, color verde opaco; integran ramas de varios artículos que forman una copa muy ramosa. Requiere de temperatura cálida y precipitaciones pluviales superiores a los 200 mm anuales para poder desarrollarse, son bastante tolerantes a la sequía, debido a su fuerte y extenso sistema radicular, son poco exigente en la calidad de suelo, desarrollándose en terrenos arcillosos cuyo pH esté entre 6 y 8.5, y en presencia de materia orgánica. Su anatomía y morfología está adaptada a condiciones de fuerte estrés ambiental (Figura 3).

Los tallos o cladodios también llamados pencas o raquetas, son suculentos, de forma elíptica, por lo general son de color verde pálido a oscuro, con 6 a 19 series de aréolas espirales, con una distancia entre series de 2.7 a 5 cm. En pencas de 2 a 3 años de edad la longitud es de 27 a 63 cm, el ancho de 14 a 32 cm y el grosor de 1 a 3.

Las espinas usualmente están ausentes, pero a veces hay cladodios con una espina generalmente acicular hundida y blanca de 3 a 10 mm de longitud. Las flores son de anthesis diurna, hasta 10 por cladodio, generalmente se encuentran en la parte apical del margen del cladodio. Las plantas de esta especie muestran pericarpelo cilíndrico, algunas veces ovoide o cónico de 3.8 a 7.5 cm de longitud y de 1.9 a 3.8 cm de diámetro. El fruto es esférico, cilíndrico o elíptico, frecuentemente amarillo brillante y de amarillo pálido a

rojo púrpura, de 5 a 10 cm de largo y de 4 a 7 cm de ancho, con un peso de 45 a 223 g, la pulpa del mismo color que la cáscara o de color contrastante y jugosa.

### **Métodos de siembra de *Opuntia ficus Indica***

En las diferentes regiones productoras del país se llevan a cabo diversos métodos de plantación, cuya adopción se debe a factores tales como: pendiente del terreno, tipo de suelo, disponibilidad de maquinaria o de recursos económicos. No obstante, donde se han observado los mejores resultados es mediante camas o melgas en 3 ó 4 hileras. Al proceder al establecimiento de los cladodios, se cubre una tercera parte con tierra, a dos metros de distancia uno de otro, en suelo enriquecido con una capa de materia orgánica y una de piedra volcánica (tezontle) como vía de drenado (Méndez-Gallegos, 2001)

### **FORMAS DE EXPLOTACIÓN**

La grana cochinilla puede explotarse de varias maneras, en México se utiliza el sistema de invernadero, debido a las condiciones ambientales que prevalecen en nuestro país, se protege de las inclemencias del clima como son el aire, la lluvia y la excesiva desecación. Cuando se cultiva a cielo abierto, el cultivo corre riesgo por la presencia de depredadores. Todos estos factores llegan a mermar de forma importante la producción. Los principales países productores de grana cochinilla utilizan la planta de nopal en pie para la cría del insecto, lo cual es posible porque la especie está bien adaptada a las condiciones ambientales de esos lugares, además de que no existen otras especies silvestres de cochinilla ni enemigos naturales que la afecten. (Llanderal y Campos, 2001).

Ya en el invernadero, la forma en que se cultiva la grana cochinilla es variada y depende del capital que se desea invertir en infraestructura, de las formas más económicas que existen son el microtúnel, donde se tienen las plantas de nopal sembradas, se van podando para permitir un crecimiento controlado de los cladodios, se arman arcos de acero cubiertos de plástico, se coloca un plástico de invernadero sobre las plantas de nopal y así se protege del clima. Otra forma económica es la de tener las raquetas cortadas y colgadas en tapescos (pequeñas chozas de plástico). Hay quienes tienen grandes invernaderos con infraestructura automatizada de ventilación, temperatura y humedad, figura 4 (Matadamas, 2006).



Figura 4. Tipos de explotación de grana cochinilla. a) Explotación a cielo abierto. b) Explotación en invernadero con control de temperatura, humedad, depredadores.

## SELECCIÓN DEL PIE DE CRÍA

Para llevar a cabo esta práctica, es necesario hacer una selección rigurosa de las hembras que hayan iniciado la ovoposición, ya que es posible que a pesar de contar con buen volumen no hayan sido fecundadas. Cuando este proceso se realiza en forma adecuada y oportuna se llega a obtener hasta una proporción de 50% de las crías que nacen durante los primeros 5 días, después de la oviposición (Méndez-Gallegos y Gallegos, 2001)

## SELECCIÓN DE CLADODIOS

Deben tomarse en cuenta los siguientes aspectos para la selección de cladodios que se utilizarán para infestación y propagación de la grana cochinilla: La cutícula no debe ser muy gruesa ya que el insecto no podrá insertar su estilete para alimentarse, por lo que las pencas de nopal no debieron de haberse expuesto a factores ambientales extremos como falta de agua y temperaturas extremas, la turgencia de la penca debe ser moderada, ya que si es muy tierna la penca y se mantendrá colgada, ésta se deforma por efecto de la deshidratación, pero si es muy turgente, la presión de los líquidos internos no permitirá a la grana alimentarse adecuadamente (Méndez-Gallegos y Gallegos, 2001).



Un aspecto más a tomar en cuenta para la selección del cladodio es la edad, se recomiendan cladodios de 1 a dos años si será un cultivo en penca colgada, en caso de plantas para cultivo a cielo abierto a partir de los dos años se pueden ya utilizar para propagación de grana cochinilla (Méndez-Gallegos y Gallegos, 2001).

## INFESTACIÓN DE CLADODIOS

La forma de infestar los cladodios o raquetas del nopal es también variada, puede ser clavando o colgando un tenate (tubo de palma) o bolsa de tul donde se colocan las hembras quienes comenzarán la oviposición, luego, las ninfas migrantes emergen del huevo y salen por los orificios de la palma o el tul, distribuyéndose en la raqueta. Otra forma de infestación es haciendo una horadación a la raqueta y colocar en ella la bolsa de tul para que se distribuyan las ninfas; en otros casos, se coloca una penca infectada con granas oviplenas junto a raquetas limpias y a partir de ahí se espera la distribución de las ninfas a los nuevos cladodios y otros casos más sencillos, simplemente se espera que haya presencia de ninfas migrantes, se sopla sobre la penca y las ninfas no establecidas caerán sobre las nuevas raquetas, se dejan un tiempo para permitir el establecimiento de las ninfas y posteriormente se podrán colgar como el resto de las pencas, figura 5 (Matadamas, 2006).



Figura 5. Formas de infestación de cladodios. a) Tenate b) Bolsa de tul.

## COSECHA

De acuerdo con la zona productora, la cosecha se puede llevar a cabo de dos maneras, en forma manual (mediante brochas, pinceles, espátulas y cucharas, entre otras) y mecanizada (mediante aire comprimido, succión y vibraciones, entre otras). La recolección debe dirigirse hacia aquellas hembras que presentan un abultamiento en la parte posterior del abdomen, o también cuando se vea que algunas hembras ya hayan iniciado la ovoposición; normalmente se espera de uno a tres días, para que exista una mayor uniformidad en la reproducción, entonces se efectúa la cosecha. El producto cosechado debe ser depositado en un recipiente ancho y poco hondo, en capas no mayores de 5 cm, para evitar el sobrecalentamiento del insecto y su asfixia (Méndez-Gallegos, 2001).

Existen discrepancias entre los productores sobre el mejor momento de la cosecha, ya que a decir de algunos, se obtiene mayor cantidad de colorante si es cosechada antes de la oviposición (Ortuño, 1991), ya que gran parte del colorante está contenido en los huevos, Briseño y Llanderal (2001), mencionan que aunque el colorante se pierde durante la oviposición, se recupera de forma paulatina en concentraciones incluso mayores a los detectados previos a la postura (Briseño y Llanderal, 2008).

## SECADO

Antes de secado es necesario dar muerte al insecto, existen diversos métodos, entre los cuales destacan calor, frío y asfixia. Según Méndez (2001) el dar muerte natural a la sombra luego de la oviposición es el método que permite mantener el mayor porcentaje de ácido carminico (Méndez-Gallegos y Gallegos, 2001).

Luego de la muerte se procede al secado, que es una de las etapas que ejerce mayor influencia sobre la calidad del producto final; el secado a la sombra sin otro método físico o mecánico, permite tener una buena calidad del producto final, aunque implica mucho tiempo, ya que puede tardar hasta 25 días (Méndez-Gallegos, 2001).



## CLASIFICACIÓN DE LA CALIDAD

El proceso de cosecha de la cochinilla involucra otros materiales que son recolectados al mismo tiempo que la cochinilla, tales como espinas, hojas secas, capullos del insecto, tierra, cera, etcétera. Estas impurezas deben ser eliminadas con la finalidad de evitar contaminación, así como para mejorar la calidad de la cochinilla (Méndez-Gallegos, 2001).

Una vez limpia se procede a la selección y clasificación de acuerdo al tamaño de la misma. El método más utilizado es el del tamizado, para el que se utilizan tres zarandas de 2 mm, 1 mm y 0.2 mm de apertura de malla para obtener cochinilla de primera, segunda y tercera clase respectivamente. Cuando la producción es buena, en la clasificación de la cochinilla seca se obtienen los siguientes porcentajes: 73.58% de cochinilla de primera, 10.45% de segunda, 7.96 de tercera y 8.01% de polvillo y otras impurezas (Méndez-Gallegos, 2001).

Méndez-Gallegos (2001) menciona que la limpieza de la cochinilla se realiza en zarandas o con aire comprimido, luego se clasifica de la siguiente manera: La grana mayor de 2 mm es considerada como de primera, de segunda aquellas granas de 1 a 2 mm y las de menor tamaño se les denomina granilla o grana de tercera. Es conveniente aclarar que existen algunas contradicciones en relación a la calidad y tamaño del insecto, ya que mientras algunos productores-investigadores señalan que la granilla es la que presenta el porcentaje más alto de ácido carminico, otros señalan que es precisamente ésta la de menor calidad y por tanto la de menor precio, cuadro 1 (Méndez-Gallegos y Gallegos, 2001).

Cuadro 1. Parámetros para determinar la calidad de la grana cochinilla seca.

CONCEPTO	PRIMERA CALIDAD	SEGUNDA CALIDAD
HUMEDAD (máx)	11%	11%
CENIZAS (máx)	5%	12%
ÁCIDO CARMÍNICO	20%	15%
IMPUREZAS (máx)	5%	8%

Fuente: Méndez-Gallegos (2001)

Por último, la grana se envasa en recipientes de entre 20 a 50 kg, en costales o tambos, hechos con materiales que impidan la absorción de humedad, puede ser polipropileno o rafia. Se recomienda almacenar en lugares ventilados y secos para mantener la calidad del producto hasta por cinco años (Méndez-Gallegos, 2001).

## **ACIDO CARMINICO**

### **QUÍMICA DEL ÁCIDO CARMINICO**

El ácido carmínico es un glucósido de antraquinona, (ácido antraquinon-7-glucopiranosil-3,5,6,8 -tetrahidroxil-1-metil-2-carboxílico), la fórmula molecular es:  $C_{22}H_{20}O_{13}$ , peso molecular de 492.32 Daltons, y pertenece al grupo de las antraquinonas. Es usado como colorante natural en alimentos, fármacos, cosméticos y textiles, además de ser un colorante que no requiere certificación para su uso según la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América, Figura 6, Cuadro 2 (FDA, 2005).

Todas las fases de la grana cochinilla contienen colorante, pero del que se obtiene mayor producción es la hembra adulta. Cuando es cosechada se somete a diferentes procesos de extracción, obteniendo así las diferentes presentaciones del colorante (Méndez-Gallegos, 2001).

El colorante se conoce desde la época prehispánica y fue muy cotizado por los tintoreros europeos durante la época Colonial debido al color rojo escarlata de las telas teñidas con éste (Dahlgren,1990). En la actualidad, el ácido carmínico, por ser un colorante natural y aprobado por la FDA, se perfila como la opción saludable para dar color a fármacos, alimentos y cosméticos por su inocuidad y seguridad a la ingestión o aplicación.

### **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

Cuadro 2. Identificación Internacional del ácido carmínico

<b>Código índice</b>	75470 Rojo Natural 4
<b>Nº FDA</b>	21 CFR sección 73100 / 73.1100 / 73.2087.
<b>Código E.</b>	E120

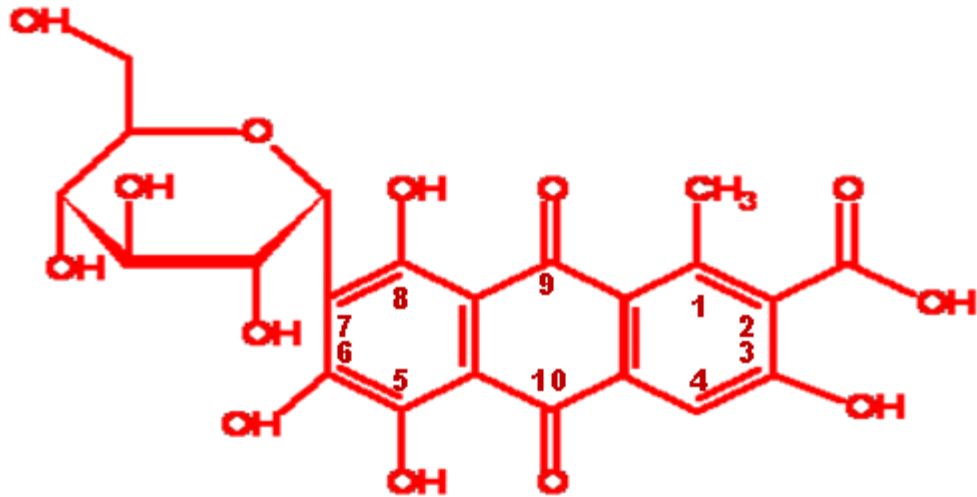


Figura 6. Fórmula química del ácido carminico. Tomado de: <http://www.monografias.com>

## INDICADOR DE PH

El grupo carboxilo  $\text{-COOH}$  y los cuatro grupos  $\text{-OH}$  de las posiciones C-3, C-5, C-6 y C-8 desprotonables contribuyen a los cambios de color, el ácido carmínico se torna a un tono naranja a pH de 3, rojo a pH de 5.5 y púrpura a pH de 7 (Matadamas, 2006).

## FLUORESCENCIA

Las moléculas de antraquinonas del tipo del ácido carminico presentan fluorescencia, la luz visible es absorbida por la molécula de antraquinona y produce un estado de excitación de tipo  $\pi$  (Jorgensen y Skibsted, 1991).

Stapeifeidt menciona que el ácido carminico es un 3-C-glycosyl derivado de las antraquinonas y que es débilmente fluorescente en solución acuosa (Stapeifeidt *et al.*, 1993).

## GLÓBULOS DE ÁCIDO CARMINICO

El ácido carmínico, se encuentra en la hemolinfa del insecto, dentro de unas estructuras membranosas llamadas glóbulos de ácido carmínico, que se presentan aislados o formando grupos de diferentes tamaños. Aquino (2002) llamó a estas estructuras cromatocitos. Aunque no se conoce el sitio exacto de la producción del colorante, se

menciona el tejido adiposo como probable lugar de síntesis y posterior formación de los glóbulos (Caselín, 2008) y se produce como parte del sistema de defensa del insecto hacia la invasión microbiana, ya que aglutina a los microorganismos evitando la ulterior infestación (Hernández *et. al.*, 2003).

Todos los estados de desarrollo de la grana cochinilla, incluyendo el huevo, son de color rojo, lo que indica la presencia de ácido carminico. Varios investigadores han intentado definir el lugar preciso del cuerpo en el que se encuentra el colorante y así, Chapman (1982) indicó que éste se encuentra en el tejido adiposo y en la hemolinfa, mientras que Montiel (1995) reportó su presencia en los huevos y en la hemolinfa de ninfas y adultos. Sin embargo, Maza en 1999, identificó al tejido adiposo como el principal órgano involucrado en la síntesis del ácido carminico y descartó su presencia en las células de la hemolinfa o hemocitos, Figura 7 (Llanderal y Nieto, 2001).

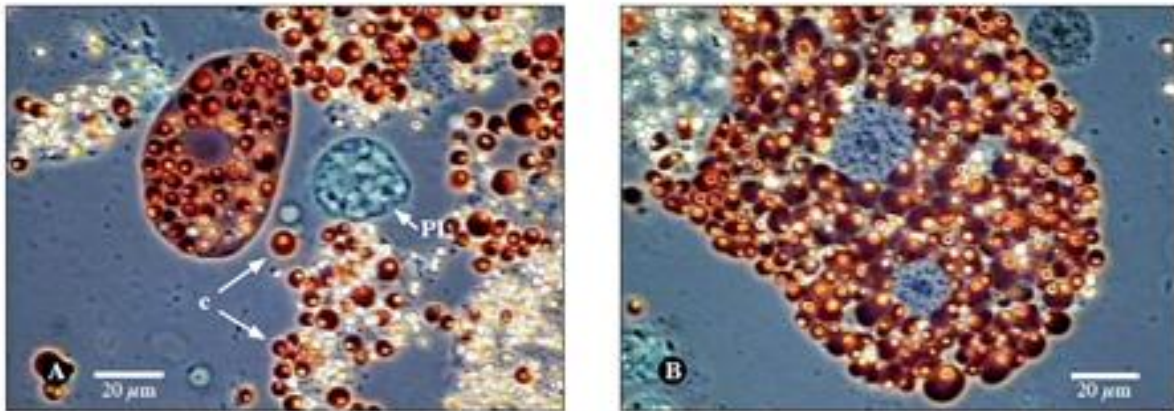


Figura 7. Glóbulos de ácido carminico de la grana cochinilla. A) Conglomerado de glóbulos de ácido carminico (c) y un plasmotocito (PL), B) Conglomerado de glóbulos de ácido carminico alrededor de dos granulocitos. (Fuente: Caselin *et al.* 2008).

## ELECTROFORESIS CAPILAR

### ANTECEDENTES

El antecedente más cercano sobre la electroforesis capilar (EC) fue introducido por Hertein cuando en un primer experimento utilizó un capilar de cuarzo de 1 a 3 mm en su diámetro interno, luego fue reduciendo el mismo hasta llegar a 0.2 mm, sin embargo, el avance más importante en la tecnología de la EC fue el trabajo de Jorgenson y Lukas,

publicado en 1981, donde utilizaron un capilar de vidrio de 75  $\mu\text{m}$  y un campo eléctrico de 30 kv, lo cual fue una llave para el uso de esta nueva tecnología (Castillo, 2005).

## CONCEPTO

La electroforesis capilar es una técnica de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas, en el seno de una disolución amortiguadora a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante (Castillo, 2005, Skoog *et al.*, 2001).

## FUNDAMENTO

La EC es una adaptación de la electroforesis en gel, la cual es una técnica de separación que se basa en hacer migrar las especies que componen la muestra en disolución, y que pueden tener una carga eléctrica global bajo efecto de un campo eléctrico y se encuentran a la vez en contacto con un soporte adecuado (Castillo, 2005).

La movilidad electroforética es inversamente proporcional a los factores de retardo y el campo eléctrico sólo tiene efecto sobre los iones, y si dos especies difieren ya sea en la carga o bien en la fuerza de rozamiento, éstas se mueven y por consiguiente se separan, sin embargo, todas aquellas especies neutras no pueden separarse, para lo cual se dispone de otros mecanismos de separación como la cromatografía micelar electrocinética (Skoog *et al.*, 2001).

La fuerza de retardo provocada por el rozamiento entre las moléculas se determinará con un analito cargado, a partir de la forma del ión y la viscosidad del medio en el cual se dará la migración, así para aquellos iones que sean del mismo tamaño, la fuerza impulsora es mayor en aquel que tenga una mayor carga, y tendrá una velocidad de migración mucho más rápida. En aquellos iones que presenten la misma carga, la fuerza de retardo provocada por el rozamiento de las moléculas será más pequeña en el ión más pequeño y tendrá una velocidad de migración más rápida (Castillo, 2005).

## VENTAJAS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR (Castillo, 2005)

La simplicidad del equipo y el poder de separación de la EC representan grandes ventajas en la detección de los analitos y ha acortado los tiempos de separación, teniendo las siguientes ventajas:

- a) Alta resolución de los picos observados en los electroferogramas producida por la rápida disipación del calor, inclusive al aplicar voltajes hasta de 30 kV, ayudando también reducir los tiempos de análisis.
- b) Uso de pequeños volúmenes de muestra.
- c) Rápida separación (1 a 45 min).
- d) Puede aplicarse a todo tipo de sustancias (proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, iones inorgánicos, bases y ácidos orgánicos).
- e) Es un método automatizado.
- f) Permite cuantificación lineal.
- g) Tiene reproducibilidad gracias a la disipación de calor en los capilares haciendo que el cambio en la temperatura sean pequeños.
- h) Permite acoplarse a un espectrómetro de masas.
- i) Logra separar moléculas cargadas positivamente, negativamente o neutras.
- j) Utiliza en su mayoría soluciones acuosas con una baja concentración iónica, evitando así toxicidad por el uso de solventes, dejando pocos desechos y siendo amigable con el ambiente.
- k) La separación de los analitos se logra en pocos minutos, obteniendo de manera simultánea los resultados cuantitativos, en comparación con los procedimientos tradicionales, los cuales utilizan horas o hasta días para obtener los mismos resultados.

## DETECTORES DE ABSORBANCIA UV VISIBLE

El detector que se emplea en la EC es el más sencillo, aunque tiene la desventaja de ser poco sensible. La mayor parte del capilar está cubierto por una capa de poliamida, sin embargo hay una pequeña parte del capilar que se encuentra expuesta y es a través de la cual la lámpara deja pasar la radiación UV. La baja sensibilidad en cuanto a la detección de los analitos por este tipo de detectores se debe principalmente a:

- a) La longitud del paso óptico, ya que la absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la longitud del paso óptico y como la detección de los analitos se realiza dentro del capilar, esta no se hace correctamente ya que el paso óptico de estos capilares desde 20 a 100  $\mu\text{m}$ .
- b) La forma circular del capilar hace que la reflexión de la radiación incida sobre él, lo que provoca un diseño óptico bajo.

Para mejorar los capilares se les ha diseñado con una burbuja en su interior o capilares en forma de Z o con una sección rectangular que ayuda a mejorar el paso óptico y disminuir la reflexión de la radiación.

## SOLUCIÓN AMORTIGUADORA

La selección para el buffer es el punto más importante de la EC, ya que la sensibilidad en la movilidad electroforética en cuanto a las cargas de las especies depende del pH el cual debe mantenerse constante. De los buffer más utilizados para la EC podemos encontrar el de fosfatos, citratos, acetatos, Tris, boratos, entre otros (Chankvetadze, 1997; Castillo, 2005).

## APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

Dentro de los avances de la EC podemos decir que este método ha alcanzado áreas como la biomedicina para la separación de proteínas, péptidos, ADN e inclusive se utiliza para análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de drogas, algunos marcadores genéticos tumorales, etc. En el área farmacéutica se ha utilizado en el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, calidad y concentración de quimioterapéuticos, etc. En el área de alimentos se utiliza para la cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes. En cuanto

a control y monitoreo ambiental también tiene un uso muy importante, contaminación por plaguicidas, metales pesados e hidrocarburos (Castillo, 2005).

Diversos autores han trabajado la técnica de electroforesis capilar para determinar la presencia y concentración de ácido carmínico en muestras tan variadas como pinturas y mapas antiguos, alimentos, productos lácteos, fármacos, textiles, etc.(Hsi.Ya, *et al.*, 2002; Puchalska, *et al.*, 2003; Maguregui, *et al.*, 2007).

## **CITOMETRÍA DE FLUJO**

### **HISTORIA**

La industria de la citometría de flujo data de 1972, el Dr. Len Herzenberg de la Universidad de Stanford, inventó y patentó un citómetro de Flujo. La compañía Becton Dickinson compró los derechos a la Universidad e introdujo de manera comercial el citómetro de flujo llamado FACS-1 y en el año de 1977, la compañía Ortho Diagnostics introduce el SYSTEM 50. ([www.Citomation.History](http://www.Citomation.History)).

De alguna manera se puede considerar a los citómetros de flujo como un tipo de microscopio de fluorescencia ([www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry](http://www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry)).

### **FUNDAMENTO**

La citometría de flujo es una parte importante de la Ciencia que se encarga de examinar las propiedades físicas y químicas de las células vivas, microorganismos u otras partículas biológicas, las cuales viajan en suspensión en una solución salina, caen por el medio de una nariz la cual vibra de tal forma que provoca que se formen pequeñas gotas que contienen una sola célula, la que pasa frente a una fuente luminosa. La fuente luminosa consiste de un rayo láser que detecta varios parámetros como son:

- Análisis fenotípico
- Clasificación de esterilidad
- Análisis de ADN
- Análisis cromosómico y clasificación
- Estudios funcionales
- Receptores de superficie
- Actividad enzimática
- Permeabilidad de la membrana



- Flujo de calcio

El rayo de luz que ha pasado ya a través de las células es captado por una serie de sistemas ópticos, filtros, transductores electrónicos de señales y un equipo de cómputo que colecta la luz emitida a una longitud de onda específica, estos sensores se encuentran enfocados a diferentes ángulos conforme al origen de la fuente de luz ([www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry](http://www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry)).

En el momento en que una célula cae de la nariz del citómetro, y al pasar por el rayo láser, este le imprime una carga positiva o negativa, luego al llegar a una serie de placas con cargas positivas o negativas, estas placas atraen a las células según su carga y provocan que las células caigan en recipientes diferentes según el desvío que sufren, las células que no reciben ninguna carga durante su paso por el rayo láser, son colocadas en un receptáculo para desechos.

# ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UN CITÓMETRO DE FLUJO

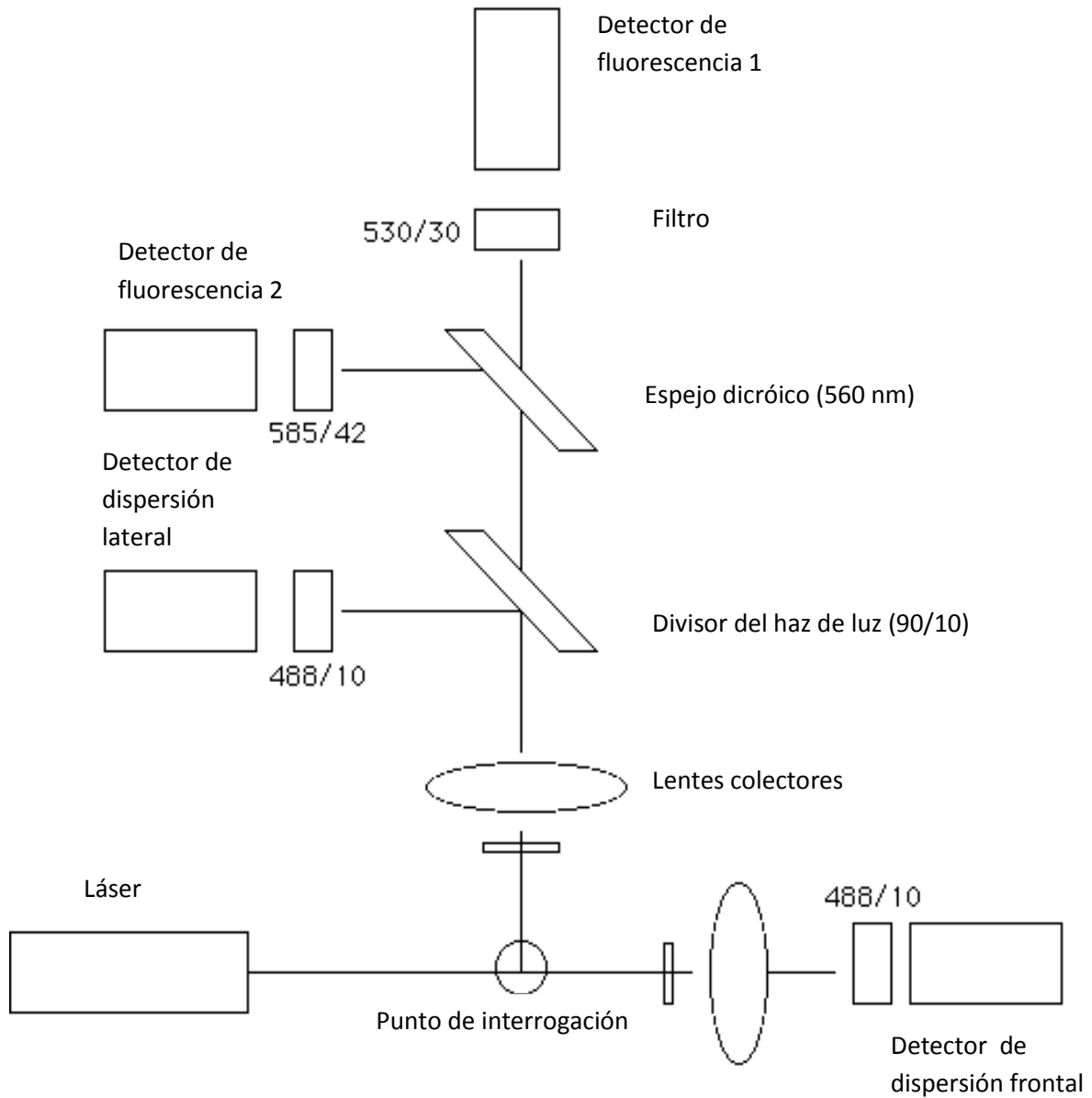


Figura 8. Esquema simplificado de un citómetro de flujo. Fuente: [www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry](http://www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry).

## SORTING O CLASIFICADOR

Algunos citómetros están equipados con un clasificador que separa y colecta las células o partículas de interés del resto de la muestra ([www.Citomation.Flowcytometry](http://www.Citomation.Flowcytometry)).

La ventaja que representa esta tecnología es que los científicos ahora pueden medir varios parámetros en una célula viva individual, pueden identificarse células extremadamente raras de entre muchas que existan en una muestra, además de que se pueden coleccionar separadamente para realizar mayores estudios, y todo ello a una velocidad tal que no compromete la viabilidad de las células ([www.Citomation.Flowcytometry](http://www.Citomation.Flowcytometry)).

## RAYO LÁSER

Existen varios tipos de rayo láser que pueden ser utilizados en los sistemas de citometría de flujo, pero los tipos más comunes son los iones de argón, helio-neón, kriptón y láser teñido.

## MARCAJE CON FLUOROCROMOS

Una herramienta muy importante para distinguir las células que serán leídas por el citómetro de flujo son los marcajes con fluorocromos, que nos ayudan a diferenciar los tipos celulares por el color que reflejan debido al fluorocromo con el que han sido identificadas.

Para permitir la unión del fluorocromo a las células es necesario tener un conjugado de anticuerpos y colorantes, donde el anticuerpo se dirige a una molécula específica que se encuentra en la superficie celular, al unirse la inmunoglobulina marcada, consecuentemente, la célula queda teñida, y esta diferencia de color es detectada por el rayo láser del citómetro de flujo.

En el Cuadro 3 se muestra una lista de los principales fluorocromos, junto con las longitudes de onda a la que son excitados junto con la longitud de onda de la fluorescencia que emiten, se menciona también las aplicaciones más comunes para los fluorocromos ([www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry](http://www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry)).

## ANÁLISIS MULTICOLOR

Existen ocasiones donde es importante conocer si un antígeno coexiste en una misma célula, por lo que se ha desarrollado la técnica del análisis multicolor, la cual nos puede ayudar a determinar si sucede o no la convivencia del antígeno. Combinando la electrónica con la óptica, se han creado variantes de los análisis de una o dos fluorescencias, donde por una compensación que llevan a cabo los elementos del aparato, nos es posible diferenciar entre varios colores de fluorescencia ([www.FACSLaboratory.Equipment](http://www.FACSLaboratory.Equipment))

Cuadro 3. Principales fluorocromos utilizados para citometría de flujo.

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Tipo de Laser	Aplicaciones
Fluoresceína	495	520	Argon	Análisis Fenotípico
Ficoeritrina	495	575	Argon	Análisis Fenotípico
Tricolor	488	650	Argon	Análisis Fenotípico
PerCP	488	670	Argon	Análisis Fenotípico
TRITC (Rhodamina)	488	580	Argon	Análisis Fenotípico
Coumarina	357	460	Argon	Análisis Fenotípico
Alofocianina (APC)	630	660	Helio-Neon	Análisis Fenotípico
APC-Cy7	630	760	Helio-Neon	Análisis Fenotípico
Azul Cascada	350	480	Argon	Análisis Fenotípico
Rojo 613	480	613	Argon	Análisis Fenotípico
Rojo 670	480	670	Argon	Análisis Fenotípico
Rojo Quantum	480	670	Argon	Análisis Fenotípico
Hoechst 33342	350	470	Argon	Análisis de DNA / Apoptosis
Hoechst 33258	350	475	Argon	Análisis de DNA / Tinción de cromosomas
DAPI	372	456	Argon	DNA
Cromomicina A3	457	600	Argon	Análisis de DNA / Tinción de cromosomas
Ioduro de Propidio	495	637	Argon	Análisis Fenotípico
Bromuro de etidio	493	620	Argon	Análisis Fenotípico
TO-PRO-3	642	661	Helio-Neon	Análisis Fenotípico
Naranja de Acridina	503	530/640	Argon	DNA, RNA
Sytox Green	488	530	Argon	DNA
Fluoresceína diacetato	488	530	Argon	Diferenciación de células vivas y muertas
SNARF-1	488	530-640	Argon	Determinación de pH
Indo-1	349	425/490	Argon	Determinación de flujo de calcio
Fluo-3	488	530	Argon	Determinación de flujo de calcio
Rhodamina 123	515	525	Argon	Mitocondrias
Monochlorobimane	380	461	Argon	Prueba específica para Glutación

Fuente: [www.FACSLaboratory.Equipment](http://www.FACSLaboratory.Equipment).

## CULTIVO DE GRANA COCHINILLA EN HOSPEDEROS ALTERNOS

Como parte de los programas sociales para el desarrollo de las comunidades, es importante buscar alternativas de ingreso para las personas de bajos recursos, la grana cochinilla por el bajo presupuesto que implica su cultivo es una alternativa idónea para estos programas, ya que por el clima semi-árido que predomina en el Estado de México, en muchos hogares tienen en sus terrenos éste tipo de plantas, ya sea como ornato o formando parte de sus bardas vivas o simplemente son parte de la biodiversidad presente en el lugar.

## CACTÁCEAS PERDOMINANTES EN EL ALTIPLANO MEXICANO

Cuadro 4. Cactáceas más comunes del Estado de México.

NOMBRE COMÚN	TAXA	DISTRIBUCIÓN EN EL ESTADO DE MÉXICO
Sin nombre	<i>Coryphantha ottonis</i>	Norte del Estado
Sin nombre	<i>Coryphantha pycnacantha</i>	Norte del Estado
Cardenche	<i>Cylindropuntia imbricata</i>	Norte del Estado
Cardón	<i>Cylindropuntia rosea</i>	Norte del Estado
Abrojo	<i>Cylindropuntia tunicata</i>	Amplia distribución
Pitayitas	<i>Echinocereus cinerascens</i>	Norte del Estado
Biznaga ganchuda	<i>Ferocactus latispinus</i>	Otumba, Zumpango
Nopalillo	<i>Heliocereus speciosus</i>	Temascaltepec
Pitahaya	<i>Hylocereus undatus</i>	Cultivada ampliamente
Biznaguita	<i>Mammillaria discolor</i>	Norte del Estado
Volcanes	<i>Mammillaria magnimamma</i>	Norte del Estado
Sin nombre	<i>Mammillaria rhodantha</i>	Otumba, Sierra de Guadalupe
Sin nombre	<i>Mammillaria sempervivi</i>	Amplia distribución
Sin nombre	<i>Mammillaria uncinata</i>	Norte del Estado
Sin nombre	<i>Mammillaria wiesingeri</i>	Cerro Gordo y Otumba
Cactus	<i>Marginocereus marginatus</i>	Cultivado ampliamente
Garambullo	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Norte del Estado
Órgano	<i>Pachycereus grandis</i>	Norte del Estado
Sin nombre	<i>Stenocactus crispatus</i>	Norte del Estado
Sin nombre	<i>Stenocactus obvallatus</i>	Norte del Estado
Pitayo	<i>Stenocereus queretaroensis</i>	Todo el Estado

Fuente: Bravo y Sánchez, 1978.

Las cactáceas y suculentas representan un amplio grupo de especies y en nuestro país crecen a todo lo largo y ancho del mismo. En el Estado de México por su situación geográfica y climática existen una gran variedad de dichas plantas.

En el Cuadro 4 se presentan las especies más comunes para el Estado de México (Bravo y Sánchez, 1978; Ceballos y Sánchez, 2009).

## HIPÓTESIS

**La concentración de ácido carminico de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus*) varía según la etapa de maduración y fertilización. El colorante se encuentra distribuido en todo el cuerpo del insecto y puede infectar cactáceas no pertenecientes a los géneros *Opuntia* y *Nopalea*.**

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

**Determinar la fase de la grana cochinilla en la cual se produce mayor concentración de ácido carminico, distribución del colorante en el cuerpo del insecto y la capacidad de infestación de cactáceas diferentes a los géneros *Opuntia* y *Nopalea*.**

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la concentración de ácido carmínico en las diferentes fases del ciclo biológico de la grana cochinilla por electroforesis capilar.
- Analizar los glóbulos de ácido carmínico en la hemolinfa de las diferentes fases de la grana cochinilla por citometría de flujo.
- Localizar el ácido carmínico dentro del cuerpo de la grana cochinilla en diferentes fases de maduración por técnicas histológicas.
- Realizar observaciones al microscopio electrónico de las diferentes fases de la grana cochinilla.
- Evaluar la concentración de ácido carmínico durante la oviposición en hembras fertilizadas y no fertilizadas.
- Evaluar la infestación con grana cochinilla de cactáceas de géneros diferentes a *Opuntia* y *Nopalea* predominantes en el Estado de México y la producción de ácido carmínico.

## JUSTIFICACIÓN

El empleo de colorantes tiene gran importancia debido a que influye en la apariencia, sabor y olor de diversos productos. El uso de colorantes en alimentos se justifica por el hecho de que sirve para proporcionar un aspecto apetitoso, mejorar su apariencia y restablecer su color original después de los diferentes procesos a que son sometidos (Méndez-Gallegos, 2001).

En la actualidad existe la necesidad de producir una mayor cantidad de alimentos con la finalidad de satisfacer la cada vez más creciente demanda, aunado a lo anterior, también es más evidente la búsqueda de alimentos saludables y con un alto nivel nutrimental. Por ello, las Instituciones de salud de varios países realizan múltiples esfuerzos para hacer llegar alimentos a los consumidores, que no pongan en riesgo su salud. Entre los compuestos que causan graves trastornos a la salud, destacan los aditivos alimentarios como los colorantes sintéticos, por lo que los colorantes naturales han retomado importancia en los mercados nacionales e internacionales aumentando su consumo y con ello su cotización. Una de las opciones que actualmente se emplean, como fuente de colorante natural es la grana cochinilla (Méndez-Gallegos y Gallegos, 2001; Viguera y Portillo, 2001).

El efecto nocivo para el hombre, que se ha demostrado tienen los colorantes sintéticos, ha motivado a que se inicien investigaciones y restricciones sobre su uso, por ejemplo, Estados Unidos prohibió en 1976 el uso del rojo No. 2 conocido como amaranth, Suecia dejó de utilizar la eritrosina (E-121) y la canthaxanthine (E-161), Recientemente la FDA ha prohibido la utilización del rojo No. 3 después de varios años de debates, sin embargo, las industrias relacionadas con la elaboración de estos colorantes establecen que las cantidades utilizadas al ser consumidas por el ser humano no ocasionan ningún tipo de cáncer, por lo que la FDA se apoyó en la ley que indica que cualquier aditivo que tenga la menor posibilidad de ser cancerígeno debe ser restringido (Viguera y Portillo, 2001).

El colorante obtenido de la grana cochinilla se perfila como óptimo para su uso en diversos productos ya que puede ser utilizado sin restricción alguna debido a sus cualidades como excelente coloración, ductibilidad y fundamentalmente su inocuidad para el ser humano, además a diferencia de muchos colorantes sintéticos, no es tóxico ni actúa como agente cancerígeno, Recientes investigaciones “*in vitro*” han demostrado que el



carmín utilizado como componente de lápiz labial es anticancerígeno (Vigueras y Portillo, 2001).

Existen algunas contradicciones en relación a la cantidad y tamaño del insecto, ya que mientras algunos productores-investigadores señalan que la granilla es la que presenta el porcentaje más alto de ácido carminico, otros señalan que es precisamente ésta la de menor calidad y por tanto la de menor precio (Méndez-Gallegos, 2001).

La cosecha de la grana se da en etapa adulta, pero algunos autores (Briseño y Llanderal, 2008) mencionan que se debe cosechar antes de la oviposición ya que los huevos por ser de color rojo y llevar el colorante, merman la concentración. Otros autores comentan que es mejor dejar que el proceso de oviposición se presente y que efectivamente la concentración del colorante disminuye los primeros días del proceso, pero se recupera luego de tres a cuatro días (Méndez-Gallegos, 2001).

La grana cochinilla se comercializa de diferentes formas, la principal es la grana seca, llamada también grana plateada, cuyo precio varía según la oferta y demanda del producto, pero fluctúa de 19 a 40 dólares americanos por kilo, además existe la tendencia de valorar la grana por su contenido porcentual de ácido carmínico (Portillo y Vigueras, 2013). En cuanto al carmín (complejo calcio-alumínico insoluble), que es la formulación del colorante para su uso en la industria, su costo fluctúa alrededor de \$2,400 pesos mexicanos por litro que equivale a 185 dólares (Portillo y Vigueras, 2013).

Así, es de suma importancia determinar la fase donde se obtendrá el mayor beneficio del cultivo, conocer la distribución del colorante dentro del cuerpo del insecto, determinar la influencia de la fertilización y del proceso de oviposición sobre la concentración del colorante y por último, conocer la capacidad del insecto para infectar cactáceas de otros géneros presentes en el altiplano mexicano, principalmente en el Estado de México.

## MATERIAL Y METODOS

### MÓDULO DE CRIANZA

Para disponer de material biológico adecuado para las investigaciones en la Universidad Tecnológica de Tecámac se ha acondicionado un área especial para tener un cultivo controlado y poder obtener así muestras adecuadas del insecto para los estudios a realizar.

El módulo acondicionado para la cría de grana lleva por nombre “EZTLI, Módulo de investigación para el conocimiento y difusión de la grana cochinilla” y consiste de una construcción de 5 m X 5 m construido de tabicón ligero, con cimientos y castillos de concreto, al interior aplanado fino con bordes sanitarios, muros pintados con pintura vinílica resistente al lavado, piso pintado con pintura epóxica, todo en color blanco. El exterior pintado al color oficial de la Universidad, beige 720. Ventanería de zintro con lámina de fibra de vidrio, ventanas corredizas alternadas cubiertas de malla mosquitero, puerta de zintro con vidrio en las ventanas y guardapolvo para evitar entrada de insectos o roedores. El techo es de lámina galvanizada alternada con lámina de fibra de vidrio translúcida para permitir la entrada de luz y garantizar la salud de las pencas de nopal para el cultivo. Se sellaron los huecos con periódico y cemento entre las láminas y la ventanería evitando entrada de insectos nocivos para el estudio, como se puede ver en la Figura 9.



Figura 9. Módulo de crianza de grana cochinilla “EZTLI”. a) Panorámica, b) Detalle del interior, c) Detalle de ventanería y techo.

PORTA- PENCAS: Para la colocación de las pencas se diseñaron “porta pencas”, elaborados con tubo galvanizado de ½ pulgada con ruedas para su mejor traslado, pintados con esmalte blanco para permitir la limpieza y desinfección adecuados, Figura. 10).



Figura 10. Portapencas. a) Diseño general. b) Forma en que se colocaron los cladodios. c) Detalle de colocación de cladodios.

## MATERIAL BIOLÓGICO

### PIE DE CRIA DE GRANA COCHINILLA

El cultivo se inició con pie de cría donado por la Asociación de Productores Rurales de Nopaltepec, Estado de México, la colonia se reprodujo hasta tener material suficiente para comenzar a separar la grana para continuar el cultivo y la grana de experimentación.

### CULTIVO DE LA GRANA COCHINILLA

El sistema de cultivo utilizado fue el de penca colgada. Las hembras de grana cochinilla donadas se colocaron sobre las pencas horizontales dentro de bolsas de tul, de ésta manera se mantuvieron durante 15 días, posteriormente se levantaron y con un alambre atravesado a nivel de la base del cladodio, se colgaron en los porta-pencas, Figura 10-c, luego de la primera infestación, aproximadamente cada 90 días se procedió a cosechar e infestar nuevas pencas, las granas que no se utilizaron para experimentación, luego del proceso de oviposición se secaron, además, no se utilizaron pencas en más de un ciclo.

## FASES DE LA GRANA

**HUEVO.** Los huevos (H) se obtuvieron a partir de una incisión con bisturí a nivel del abdomen en hembras de 90 días posteriores a la infestación (PI), se lavaron en solución salina fisiológica para retirar el exceso de colorante presente en la hemolinfa del insecto que sale junto con los huevos al hacer los cortes.

**NINFAS.** La fase de ninfa I (NI) y ninfa II (NII), se obtuvieron con un pincel directo de la superficie de los cladodios en cajas Petri limpias. Los criterios de clasificación se basan en las características descritas por De Haro y Claps (1995).

**ADULTAS FÉRTILES.** Las hembras adultas, igual que las ninfas, se barrieron de la superficie de los cladodios a los 90 días PI. Debido a que no todas las hembras fértiles presentaban el mismo tamaño a pesar de tener la misma edad, se procedió a pesarlas y clasificarlas según el Cuadro 5.

Cuadro 5. Clasificación de las muestras de grana adulta por peso fresco.

PESO DE LA GRANA (Gramos)	IDENTIFICACIÓN	ETIQUETA
0.005 A 0.015	Adulta I	AI
0.016 A 0.030	Adulta II	AII
0.031 A 0.045	Adulta III	AIII
0.046 o más	Adulta IV	AIV

## ADULTAS NO FERTILIZADAS

Para garantizar que las hembras no estuvieran fertilizadas se les colocaron vasos de plástico adheridos al cladodio por medio de cera de Campeche sobre las ninfas II que recién sufrieron muda a adulta como se muestra en la Figura 11, al cumplir los tres meses del periodo de desarrollo, se procedió a cosechar, pesar y clasificar según los criterios antes mencionados, Cuadro 5.



Figura 11. Forma en que se cubrieron las hembras adultas para evitar el apareamiento.

**ADULTAS EN OVIPOSICIÓN.** Las hembras en etapa de oviposición se cosecharon de cladodios convencionales a los 90 días cumplidos, lo que garantiza su madurez y oviplenitud. Se dividieron en grupos de diez, tomando el peso de cada una de ellas, se colocaron sobre pencas sanas con quince días de haber sido cortadas para comprobar la cicatrización de la zona de corte y se colocaron sobre una mesa de forma horizontal como puede observarse en la Figura 12.



Figura 12. Hembras en oviposición. Se colocaron 10 hembras oviplenas sobre cladodios cicatrizados y por día se recolectaron las hembras de un cladodio.

Se recolectaron las hembras de un cladodio por día, los análisis de citometría de flujo se realizaron en fresco y se trabajaron el mismo día; para los análisis de electroforesis, las muestras se llevaron a la estufa a 50 °C para sacrificarlas y evitar que continuara la

ovoposición. Los resultados de los días 1, 2 y 3 se conjuntaron en un solo grupo denominado AOVI, los días 4, 5 y 6 se conjuntaron en otro grupo denominado AOVII y las hembras en proceso de oviposición recolectadas los días 7, 8, 9 y 10 se conjuntaron en un último grupo denominado AOVIII.

MACHOS. Los machos fueron colectados atrapándolos de forma manual inmediatamente después de que emergían del capullo para evitar que escaparan, se colocaron en cajas Petri y se prepararon para procesamiento como el resto de las fases.

## NOPALERA

Se sembraron 60 cladodios de nopal *Opuntia ficus indica* adquiridas a productores de nopal verdura de la zona de San Martín de las Pirámides en el Estado de México y otras fueron donadas amablemente por la Secretaría de Ecología del Estado de México.

Todas las pencas fueron sometidas a un proceso de selección para evitar utilizar pencas infectadas o deterioradas a tal punto que evitara el adecuado desarrollo del insecto. El sustrato se preparó con una capa de tierra negra de 10 cm y otra superior de tezontle de 15 cm, las pencas se sembraron según recomienda Méndez-Gallegos y se regaron una vez cada 15 días, no se fertilizó en ningún momento la nopalera. Para la conservación y adecuada propagación se llevaron a cabo actividades de deshierbe y poda de plantas para evitar que crecieran tanto que obstruyeran el libre paso entre los nopales para su mejor manejo según Méndez, y como se puede apreciar en la Figura 13 (Méndez-Gallegos y Gallegos, 2001).

Como actividades preventivas se aplicó encalado a la base de las pencas para evitar ataque de hormigas y caracoles, muy comunes en ésta zona en época de lluvia, como se muestra en la Figura 13.

Con los cuidados brindados, la nopalera comenzó a crecer y a dar pencas adecuadas para el proceso de reproducción de la grana cochinilla y comenzar los experimentos, Figura 13-b.





Figura 13. Nopalera. a) Plantado y encalado. b) Nopalera con cladodios para grana cochinilla.

### INVERNADERO PARA CACTÁCEAS

Para la evaluación de la infestación de otras cactáceas diferentes a los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, se adaptó un área con malla ciclónica cubierta de hule para invernadero, con malla mosquitero en la parte superior que permite la adecuada ventilación, con techo de lámina translúcida para permitir la entrada de luz para la adecuada conservación de los ejemplares de cactáceas a utilizar (Figura 14). El invernadero, se lavó, encaló y desinfectó con jabón y cloro antes de introducir los ejemplares.



Figura 14. Módulo para cactáceas. a) Vista panorámica, b) Vista interior.

## HOSPEDEROS ALTERNATIVOS

Algunos de los ejemplares a utilizar fueron obtenidos de los jardines alrededor de la Universidad Tecnológica de Tecámac (UTTEC), los cuales se dejaron cicatrizar durante 15 días previos a plantarse (Figura 15), otros ejemplares fueron donados por el Jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4 (Cuadro 6), los que sólo se mantuvieron en observación como parte de la cuarentena a la que se sometieron, ya que éstos estaban ya plantados.

Cuadro 6. Relación de ejemplares de cactáceas utilizadas como hospederos alternativos para infestación con grana cochinilla (*Dactylopius coccus*).

NOMBRE COMÚN	TAXONOMÍA	NO. DE EJEMPLARES	ORIGEN
Tasajo	<i>Cylindropuntia imbricata</i>	10	Univ Tec Tecámac
Tasajo	<i>Cylindropuntia rodea</i>	10	Univ Tec Tecámac
Tasajo	<i>Cylindropuntia tunicata</i>	10	Univ Tec Tecámac
Bisnaga ganchuda	<i>Ferocactus latispinus</i>	10	Jardín Botánico de FESC C-4
Nopalillo	<i>Helyocereus undatus</i>	10	Univ Tec Tecámac
Volcan	<i>Mamillaria magnimamma</i>	10	Jardín Botánico de FESC C-4
Bisnaguilla	<i>Mamillaria rodantha</i>	10	Jardín Botánico de FESC C-4
Órgano	<i>Marginatocereus marginatus</i>	10	Univ Tec Tecámac
Nopal verdura	<i>Opuntia ficus</i>	10	Univ Tec Tecámac



Figura 15. Manejo de los hospederos alternativos de grana cochinilla . a) Detalle del sembrado de esquejes y b) Estado de salud previo a la infestación



Las macetas para el plantado de los ejemplares de la UTTEC se lavaron y desinfectaron con jabonadura y cloro al 3%, la tierra se preparó con 50% de tezontle rojo y 50% de tierra negra, ambos previamente secados al sol por dos semanas para evitar crecimiento de hongos patógenos, se agregó enraizador comercial (Radix) al 1% al sustrato. Ya plantados, todos los ejemplares se regaron semanalmente y se tuvieron en observación por tres semanas para detectar problemas de desecación, pudrición o enfermedad, los que se notaron con alteraciones fueron desechados. Se mantuvieron a una temperatura de 27°C y 65% de humedad relativa promedio.

Cuando las plantas lograron enraizar y comenzaron a crecer se determinó que estaban listos para ser inoculados (Figura 15-b).

### INFESTACIÓN DE HOSPEDEROS ALTERNATIVOS

Se cosechó grana cochinilla oviplena de pencas infectadas del Módulo de Grana, se pesó cada una y se colocaron 10 de ellas en bolsas de tul, se colgaron sobre las cactáceas por medio de un alambre sin perforar la cutícula de la planta y procurando que la bolsa de tul estuviera en su mayoría en contacto con la planta para garantizar que las Ninfas migrantes pasen de la bolsa a la planta. Como control positivo se infectaron 10 cladodios de *Opuntia ficus* (Figura 16).

Se monitoreó la salud de las plantas por observación diaria, se regaron semanalmente y trascurridos 90 días se recolectaron las granas que se localizaron en la superficie.



Figura 16. Infestación de hospederos alternativos con *Dactylopius coccus*. a) Por el método de la bolsa de tul, con ejemplares de *Opuntia ficus* como control. b) Detalle de la superficie de contacto del tul con la planta.

## **Metodología para la determinación de la concentración de ácido carmínico por electroforesis capilar**

Previo al análisis de muestras en el equipo de electroforesis capilar se desarrolló una curva patrón y se hicieron los análisis de validación del método. El equipo utilizado es marca Beckman Coulter con el programa 32 Karat para el análisis y registro de datos.

### **ESTANDAR**

Se desarrolló una curva patrón preparando diluciones de 250, 200, 150, 100 y 50 ppm del estándar comercial (ácido carminico SIGMA C3522 Natural Red 4, Sigma – Adrich, Chemical Co., St. Lous, MO, USA), se realizaron las lecturas y los resultados se utilizaron en la siguiente operación:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = área del pico analizado

x = concentración

m = pendiente

b = ordenada al origen

Sustituyendo según los resultados del estándar bajo los parámetros de corrida (Cuadro 7):

$$y = 325.19x + 2090.3$$

$$R^2 = 0.9927$$

Así, al despejar **x**, que es la concentración en mg/L de la muestra, obtenemos que para cada muestra se sustituye en la siguiente fórmula:

$$x = (y - 2090.3) / 325.19$$

Donde **y** es el promedio de área del pico.

Para determinar la masa (mg) de ácido carmínico que existen en la muestra se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{masa (mg) en la muestra} = x * 0.05$$

Donde 0.05 es el factor de dilución de la muestra.

Simplificando, a cada reporte de área bajo la curva que se obtuvo, se le aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración de ácido carminico en porcentaje:

$$\% \text{ AC} = (x - 2090.3 / 325.19) 0.5$$

#### PARÁMETROS DE ENSAYO

Los parámetros utilizados durante las corridas en el equipo de electroforesis se determinaron luego de realizar diversas pruebas con variación de los parámetros y de la estandarización de la prueba, quedando como se indica en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Parámetros de corrida para la determinación de la concentración de ácido carminico por electroforesis capilar en muestras de grana cochinilla.

PARAMETRO	CONSTANTE
CAPILAR	30cm, 75 $\mu$ diámetro
BUFFER	Ácido bórico 40mM, pH 9.2
POLARIDAD	NORMAL
VOLTAJE	15Kv
TIEMPO DE CORRIDA	5 min
INYECCIÓN	7 seg, 0.5 psi
LONGITUD DE ONDA	254 nm

#### EXTRACTOS

Las muestras de grana molida se tamizaron y se procedió a la obtención del extracto, luego se probó cuál de los extractos era el que contenía la mayor cantidad del colorante.

#### VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Se realizaron estudios de precisión, adecuabilidad, linealidad, especificidad, exactitud y repetitividad del método en base a los requisitos de la Guía de validación de métodos

analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C. (Guía, 2002).

## DESENGRASADO

La grana cochinilla fina produce un polvo blanco de naturaleza lipídica llamado coccerina, con el cual se cubre por completo como una forma de protección. Para determinar la posible interferencia de la coccerina en los procesos de determinación de la concentración de ácido carminico por electroforesis capilar y por citometría de flujo, se procedió al desengrasado de las muestras con diversos solventes.



Figura 17. Métodos de desengrasado de grana cochinilla seca. a) Frascos con solvente (Éter etílico, Éter de petróleo y Xileno) y muestras de hembras adultas de grana cochinilla seca. b) Detalle sobre la dificultad de sumergir la muestra de grana en el frasco con éter de petróleo. c) Grana cochinilla desengrasada y seca sobre papel filtro. d) Residuos de los solventes luego del proceso de desengrasado de grana, nótese el color rojo del ácido carminico extraído por el éter de petróleo.

En frascos de vidrio con tapón de goma se depositaron 10 ml de éter etílico, éter de petróleo y xileno, dos frascos con cada tipo de solvente, se agregó 1g de granas hembras adultas en 3 frascos conteniendo los diferentes solventes (frasco 1, 2 y 3) y 0.5g de la misma grana a los frascos restantes (frascos 4, 5 y 6), se homogenizaron manualmente

durante 7 minutos a temperatura ambiente y se retiró el solvente. Las muestras de éter etílico y xileno se sometieron a un segundo lavado para garantizar el desengrasado. Se vació el contenido de cada frasco sobre papel filtro y se dejaron secar y el solvente se reservó en frascos de vidrio aparte para determinar la cantidad de colorante que se pierde por el proceso de desengrasado y su posible efecto sobre los procesos de electroforesis capilar y citometría de flujo, Figura 17.

## MOLIDO Y DILUCIONES

Para determinar el tamaño de partícula y la dilución adecuada para obtener el extracto de ácido carminico, se hizo un estudio previo, donde cada muestra se molió en mortero con pistilo cerámico y se tamizaron con mallas de calibre 40, 60 y 80, Marca Digger, para homogenizar el tamaño de partícula de grana y también para evitar la formación de lodos.

Cuadro 8. Equivalencias del número de malla de tamiz a micrómetros.

<b>MEDIDAS DE MALLA Y SUS EQUIVALENCIAS</b>		
NO. MALLA	MICRÓMETROS	PULGADAS
20	850	0.0337
40	425	0.0166
60	250	0.0098
80	180	0.007
125	125	0.0049
140	106	0.0041

De cada calibre de tamiz (Cuadro 8), se tomó 1 g de muestra seca, se diluyó en tres diferentes volúmenes (20, 40 y 60 ml) de agua destilada y se calentó a 50 °C en agitación continua durante 24 horas (Lloyd, 1980), luego se centrifugó a 500 rpm durante 15 minutos, tomando el sobrenadante y guardándolo en congelación a -20°C, el sedimento se resuspendió en la misma proporción sólido-líquido y se dejó en las mismas condiciones de extracción, éste proceso se repitió ocho veces hasta la obtención total del colorante.

Para determinar la presencia de colorante en cada extracto, se llevaron al espectrofotómetro (Marca Genesis) para la determinación de la absorbancia a 495nm, de cada extracto con seis repeticiones.



Figura 18. Tamiz con tres diferentes tamaños de malla.

## MUESTRAS

Las muestras se secaron por separado en cajas Petri en estufa bacteriológica a 50°C durante cinco días, posteriormente las muestras se pulverizaron en un mortero de cerámica y se tamizaron en malla 40, se pesaron 10 mg de cada fase y se aforaron a 50 ml con agua desionizada y dejaron en baño maría durante 20 minutos a 50 °C en constante homogenización. Pasado el tiempo de extracción se procedió a filtrar dos veces en papel filtro de poro de 50  $\mu\text{m}$ , luego se pasó cada solución por un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  para proceder a la lectura en el equipo de electroforesis. De todas las fases se hicieron cuatro repeticiones, de la fase de huevo sólo se realizaron dos repeticiones, cada lectura se realizó por triplicado.

## **Metodología para la lectura de muestras de hemolinfa de grana cochinilla por Citometría de flujo**

De cada fase de grana cochinilla recién colectada se pesó 1 g, se disgregó sobre una malla metálica de 450  $\mu\text{m}$  de poro dentro de una caja Petri con 10 ml de buffer de fosfatos (PBS) a pH de 7.2, luego se vació en un matraz aforado de 200 ml y se agregó PBS hasta el aforo, se homogenizó y con esta solución se llenaron los tubos para citómetro. Se utilizó un equipo FACScalibur de Beckton Dickinson, el análisis se realizó con el software CELLQuest, la fluorescencia se registró a 640nm.

De cada fase se leyeron 100,000 eventos, se obtuvo el tamaño en base al forward scatter (FSC) y la intensidad en base a la fluorescencia del ácido carmínico dentro de los glóbulos (Stapfield *et al.*, 1993).

Los datos se organizaron para formar grupos que en base al tamaño de los glóbulos se agruparon en pequeños, medianos y grandes. Por la intensidad de fluorescencia se dividieron en tres grupos, los de baja, mediana y alta intensidad de fluorescencia.

De cada lectura se obtuvo el porcentaje de glóbulos de cada tamaño y el valor promedio de la intensidad de fluorescencia.

Se calculó un factor de fluorescencia (FF) para cada grupo de intensidad, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$FF = \left( \frac{\text{Promedio de intensidad de fluorescencia}}{\text{Promedio de tamaño de glóbulos}} \right) \% \text{ de glóbulos}$$

La fluorescencia total del grupo se calculó sumando los factores de fluorescencia de los tres grupos de intensidad.

De las muestras de Ninfa I (NI), Ninfa II (NII), Adulta I (AI), Adulta II (AII), Adulta III (AIII) y Adulta IV (AIV) se realizaron diez repeticiones, de las muestras de Adulta en oviposición I (AOVI), Adulta en oviposición II (AOVII), Adulta en oviposición III (AOVIII), Adultas no fertilizada I (ANFI), Adulta no fertilizada II (ANFII), Adulta no fertilizada III (ANFIII) y Adulta no fertilizada IV (ANFIV) se realizaron tres repeticiones.

## **Metodología para el procesamiento de las muestras para histología**

### **EFFECTO DEL FORMOL SOBRE EL ÁCIDO CARMINICO**

Previo al proceso de fijado en formol de las muestras de insectos, se realizó un estudio para evaluar el efecto del formol sobre el colorante: a extractos acuosos de ácido carmínico al 0.25 y al 0.5% se les agregó formalina bufferada al 10%, que es la concentración que se utiliza para fijar tejidos animales en procesos histológicos, se hizo un escaneo desde los 400 hasta los 700 nm en un espectrofotómetro marca Thermo spectronicas (modelo Genesys, USA) para determinar el efecto de la adición del formol.

### **ABLANDADO DE MUESTRAS**

Las muestras fueron sometidas a proceso de ablandado de la cutícula con fenol con base en la técnica de procesamiento de muestras de grana cochinilla reportada por Ramírez en el 2010.

### **PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

Se procesaron las muestras en parafina en un histoquinet, formando los cubos que se cortaron en un Microtomo marca Leica (modelo RM2125, China), los cortes fueron de 5  $\mu$ m teniendo cuidado de mantener en baño de hielo los cubos de parafina para tener cortes más limpios.

Los cortes fueron seriados, en caso de los huevos y ninfas (I y II), se tomaron todos los cortes para preparar laminillas que se numeraron de forma consecutiva hasta terminar la muestra. Las laminillas se dividieron en dos grupos, las de número par se sometieron al proceso de tinción con técnica Hematoxilina – Eosina (HE) y posterior montaje; las laminillas impares se dejaron sin teñir, colocándolos sobre una platina para fundir la parafina y proceder al montaje de los cubreobjetos con resina.

A las hembras adultas se les realizaron cortes seriados, dejando para proceso un corte y dejando pasar 10 cortes. En cada portaobjetos se dejaron 6 u 8 cortes y conforme fueron llenándose, se numeraron de forma consecutiva y siguiendo el criterio de las muestras de huevos, los portaobjetos con número par se tiñeron con técnica HE y los impares se dejaron sin teñir, también se procedió al montaje de forma convencional con resina.



La observación de los cortes se realizó en un microscopio de fluorescencia marca Carl Zeiss, utilizando tanto con luz visible como con luz ultravioleta para observar la fluorescencia del ácido carmínico y se utilizó también un microscopio marca Olympus (modelo BX43, USA), con el analizador de imágenes Image Pro-plus.

El proceso histológico descrito se aplicó a otras especies de insectos, esto para determinar si el origen de la fluorescencia observada está dada por la quitina o por el ácido carminico. Se procesaron muestras de chapulín (Suborden Caelifera), brujita (Hemíptero) y cochinilla de jardín (*Armadillum granulatum*), dos especímenes de cada insecto se fijaron en formalina bufferada al 10% y dos en alcohol al 70%. Para realizar el ablandado, una muestra de cada tipo de fijador (formalina y alcohol), se dejó 24 horas ablandando en fenol y la otra se dejó 48 horas; los cortes se realizaron bajo los mismos criterios descritos para la grana cochinilla.

### **Metodología para el procesamiento de muestras de grana cochinilla para Microscopía Electrónica**

Se procesaron muestras de grana cochinilla de todas las fases estudiadas, se fijaron en alcohol etílico al 70% durante 8 días, posteriormente se les enjuagó tres veces con PBS y se siguió el protocolo descrito por García (2012), descrito en el Cuadro 9.

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido marca Jeol, (modelo JSM 5410 LV, Alemania) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Cuadro 9. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica.

PROCESO	REACTIVO	TIEMPO	ESPECIFICACIÓN
FIJADO	Paraformaldehído al 1% o gluteraldehído al 2.5% diluidos en PBS.	90 minutos	Agitar suavemente
LAVADO	PBS	5 a 10 minutos	5 veces
POST-FIJADO	Teróxido de osmio al 1% en PBS	1 Hora	Uso de guantes, uso de campana de extracción, neutralizar con aceite de cocina.
LAVADO	PBS	5 A 10 minutos	5 veces. Pausa del proceso
DESHIDRATADO	Etanol al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%	5 minutos c/u	
	Etanol 100%	10 minutos	2 veces
MICROSCOPIO DE TRANSMISIÓN			
INFILTRADO	Óxido de propileno	10 minutos	2 veces
	EPON-óxido de propileno 1:1	24 horas	En rotor El EPON se prepara y almacena en el congelador, sacar 30 min antes de su uso. El óxido de propileno se mantiene en el refrigerador. Usar guantes. Usar la campana de extracción.
	LR-White Etanol 100% 1:1	24 horas	En rotor Se prepara sólo lo necesario,
INCLUSIÓN	EPON	2 horas	En rotor
	EPON	24 horas	En moldes. Cuidar que el molde sea adecuado a la muestra.
	LR-White	6 horas	En rotor
	LR-White	24 horas	En cápsula de gelatina. Usar guantes. Usar campana de extracción.
<b>MICROSCOPIO DE BARRIDO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Colocar en cápsulas de polipropileno, siempre impregnados en alcohol.</li> <li>✓ Llevar al equipo de secado a punto crítico.</li> <li>✓ Montar en barriles de platino preparadas con cinta de carbono.</li> <li>✓ Llevar al ionizador, dejar 4 a 5 minutos.</li> </ul>			

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto los resultados del porcentaje de ácido carmínico de las diferentes fases de grana cochinilla, como los resultados de la fluorescencia total obtenida por citometría de flujo, se analizaron por medio de ANOVA de una vía y posteriormente se realizó la prueba TUKEY para determinar las diferencias entre medias. Para evaluar el efecto del peso de las hembras adultas y el efecto de la fertilización sobre el porcentaje de ácido carmínico se realizó la prueba de ANOVA multifactorial y posteriormente la prueba de TUKEY para determinar diferencias entre medias. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia del 95% y con el programa STATISTICA 7.

## RESULTADOS

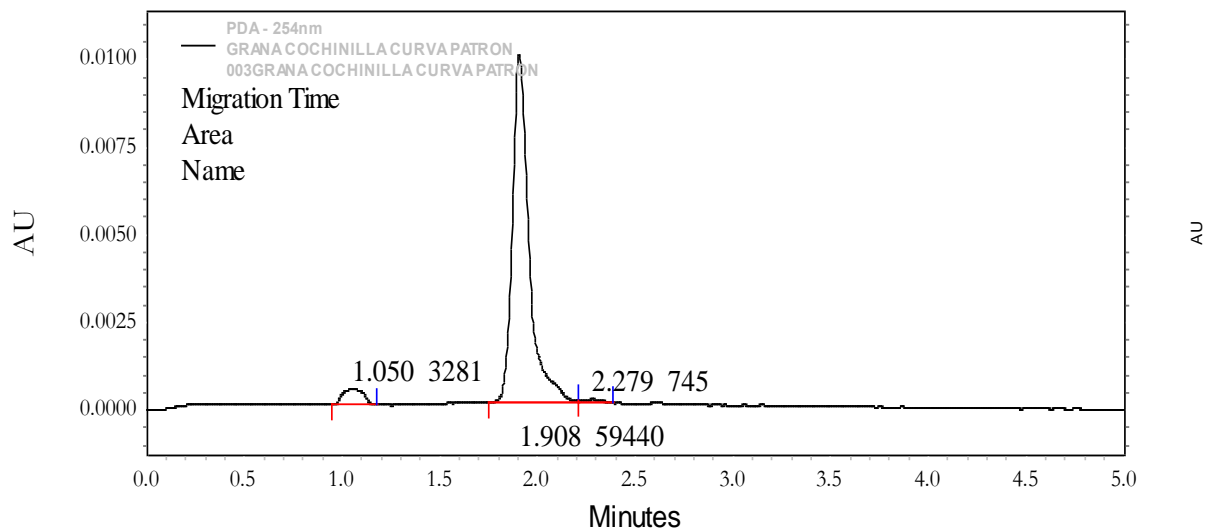
### Determinación de la concentración de ácido carmínico por electroforesis capilar

#### ESTÁNDAR

El estándar de ácido carmínico se corrió bajo las condiciones definidas para la determinación de ácido carmínico, obteniendo los resultados reportados en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Áreas reportadas por electroforesis capilar de la corrida del estándar del ácido carmínico.

CONCENTRACIÓN (ppm)	AREA					
	1	2	3	PROMEDIO	DES ST	CV



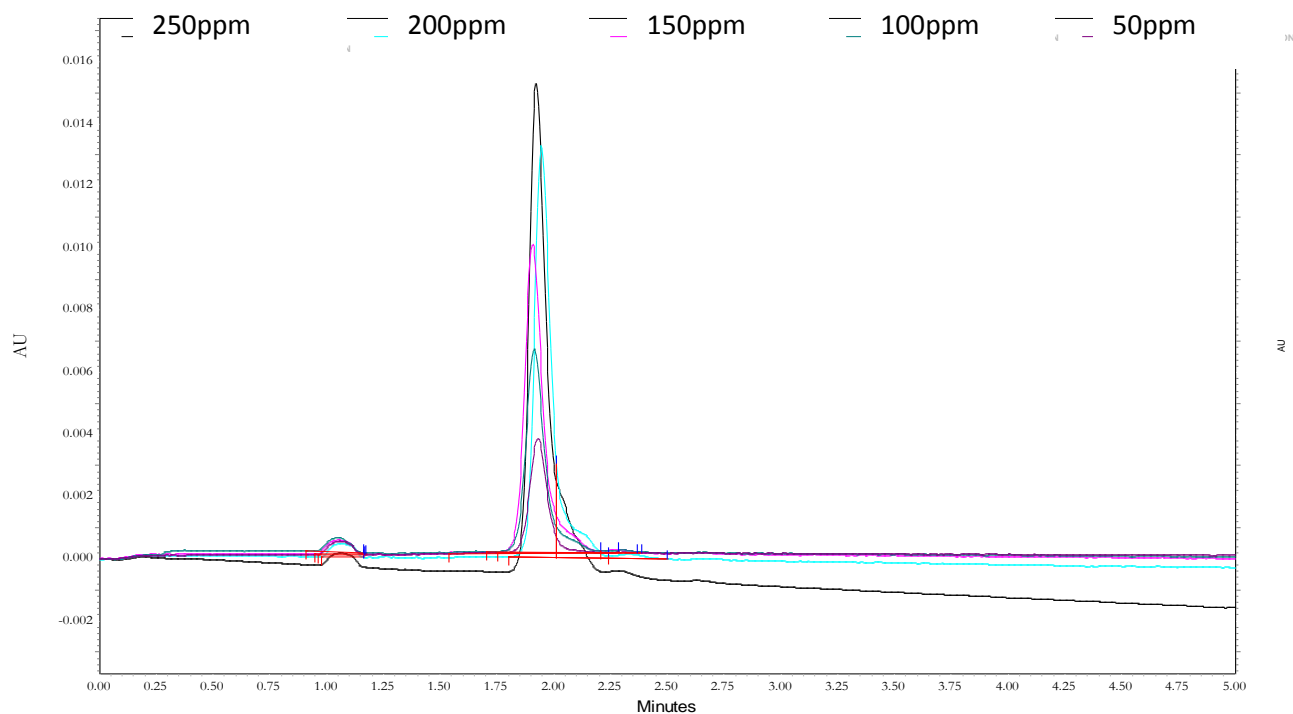


Figura 20. Electroferograma de las diferentes concentraciones de estándar de ácido carmínico. Se muestran los picos sobrepuestos del estándar a diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200 y 250 ppm), se puede observar el tiempo constante de aparición del pico y la proporcionalidad de la diferencia del tamaño, dado por las diferentes concentraciones del estándar.

En el electroferograma de la Figura 19, se aprecia el pico del estándar de ácido carminico a una concentración de 150 ppm, donde se puede ver el tiempo de aparición del pico y el área bajo la curva que se obtiene. En la Figura 20, se sobrepusieron los picos obtenidos de la corrida de las diferentes concentraciones del estándar, se observa que estos picos aparecen al mismo tiempo, pero la altura es diferente, ya que ésta depende de la concentración de la muestra.

Para la obtención de la concentración de ácido carminico, y aplicando el método de Pearson o mínimos cuadrados, se obtuvo la siguiente curva patrón, donde se determinó la tendencia, ordenada al origen y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), Figura 21.

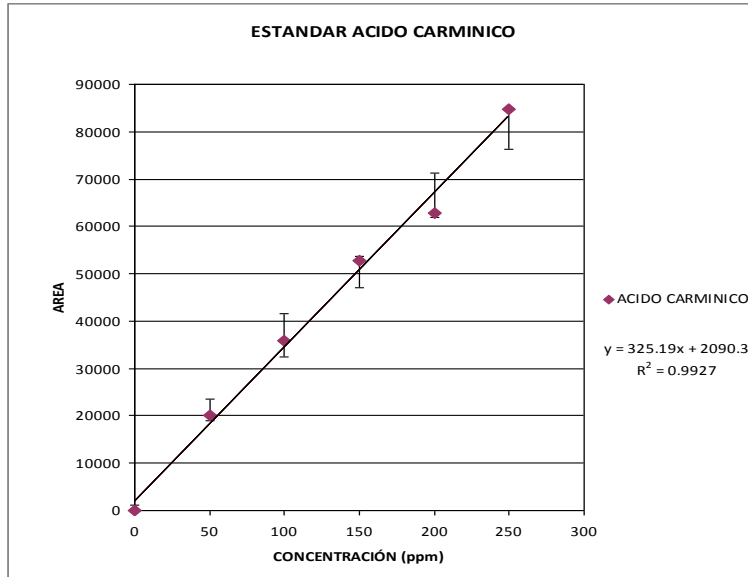


Figura 21. Curva estándar de ácido carmínico. Se reportan las áreas de pico obtenidas por electroforesis capilar, mostrando la línea de tendencia y el resultado del coeficiente de determinación.

## EXTRACTOS

Se pudo observar que el primer extracto es donde se obtiene la mayor concentración de colorante como se observa en la Figura 22, y al probar los extractos de los tamices 20 y 40, se observa que el tamiz 40 es el que permite una mejor extracción del colorante (Figura 23).



Figura 22. Extractos seriados de ácido carmínico en muestras de grana cochinilla seca y tamizada. Nótese cómo va disminuyendo la intensidad de color conforme avanza el proceso de extracción.

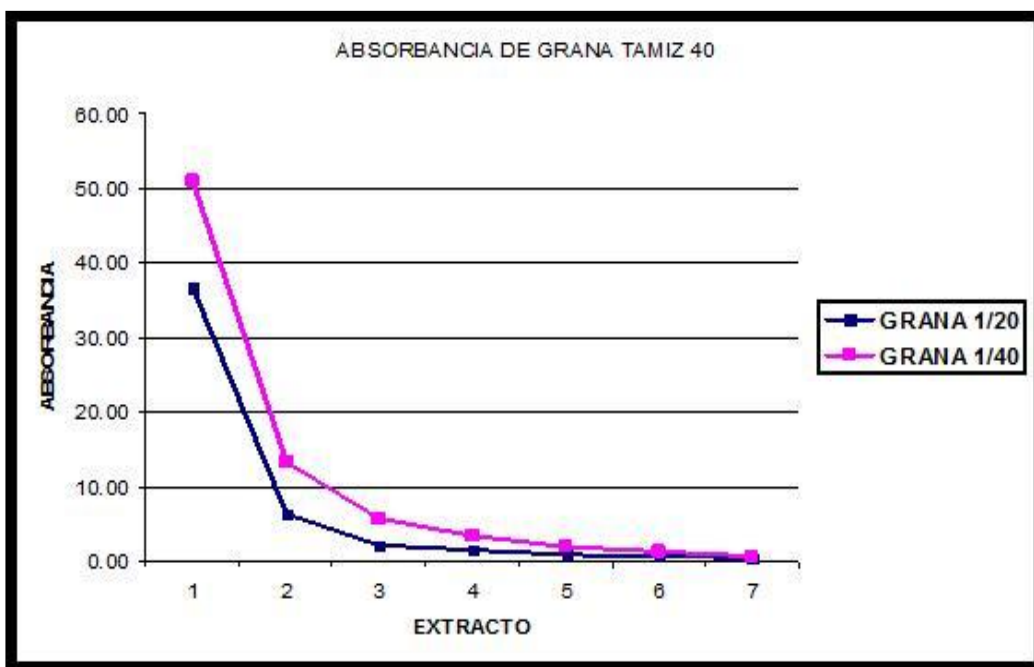


Figura 23. Absorbancia promedio de muestras de grana cochinilla molidas y tamizadas en malla 20 y 40, leídas a 495nm por espectrometría. Puede notarse que la mayor parte del colorante se obtiene en el primer extracto.

Por lo tanto, se determinó que el primer extracto del polvo de grana, tamizado en malla 40, es el que contiene la mayoría del colorante y no es necesario realizar la determinación en el resto de los extractos, que contienen una mínima cantidad del mismo; la grana cochinilla debe ser cribada y tomar las muestras de la malla 40, ya que mallas de mayor o menor tamaño no permiten una extracción adecuada del colorante.

## DESENGRASADO

Durante el proceso se pudo notar que las muestras sometidas al éter etílico y al xileno presentaron menos residuo blanco (coccerina) que las tratadas con éter de petróleo, inclusive éstas últimas no pudieron sumergirse en el solvente (Fig. 17-b). Las muestras tratadas con éter de petróleo mostraron dificultad para sumergirse en el solvente, además de que este mostró un color rojo debido al ácido carminico de las muestras.

## CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CARMINICO POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Las fases que se estudiaron fueron huevo (H), ninfa I (NI), ninfa II (NII), hembra adulta (con sus 4 grupos determinados por peso: AI, AII, AIII y AIV), hembras adultas no fertilizadas (con sus cuatro grupos determinados por peso: ANFI, ANFII, ANFIII y ANFIV) y hembras en oviposición (AOVI, AOVII y AOVIII). La concentración de ácido carminico de cada fase estudiada se muestra en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Concentración promedio en porcentaje de ácido carmínico de diferentes fases de grana cochinilla determinado por electroforesis capilar.

ETAPA DE MADURACIÓN	% ÁCIDO CARMINICO
H	5.5 ± 0.06
NI	6.9 ± 0.85
NII	2.69 ± 0.66
AI	20.77 ± 1.08
AII	17.97 ± 0.85
AIII	16.82 ± 1.01
AIV	14.10 ± 1.50
AOVI	22.08 ± 1.48
AOVII	20.38 ± 1.53
AOVIII	23.16 ± 2.78
ANFI	26.27 ± 1.67
ANFII	17.66 ± 0.42
ANFIII	16.10 ± 0.20
ANFIV	17.27 ± 0.16

Nota: No se muestra la diferencia significativa debido a que las condiciones de lectura y repeticiones no son homogéneas.

## EFFECTO DE LA FERTILIZACIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CARMINICO

Las hembras fertilizadas de los cuatro grupos (AI, AII, AIII, AIV) y las no fertilizadas de los cuatro grupos estudiados (ANFI, ANFII, ANFIII y ANFIV), presentan una diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) en cuanto a su contenido de ácido carminico, destacando que las hembras de menor peso de ambos grupos son las que presentan la concentración más alta de ácido carminico (AI y ANFI) (Cuadro 12, Figura 24).

Cuadro 12. Concentración en porcentaje de ácido carínico en hembras fertilizadas y no fertilizadas.

FASE	CONCENTRACIÓN ÁCIDO CARMINICO (%)
AI	20.77 ± 1.08 b
ANFI	26.27 ± 1.67 b,c
AII	17.97 ± 0.85 b,c
ANFII	17.66 ± 0.42 c
AIII	16.82 ± 1.01 a
ANFIII	16.10 ± 0.20 b,c
AIV	14.10 ± 1.50 b,c
ANFIV	17.27 ± 0.16 b

Letras iguales indican que no existe diferencia, letras diferentes existe indican que sí existe diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) entre los grupos, se realizaron cuatro repeticiones de cada determinación.

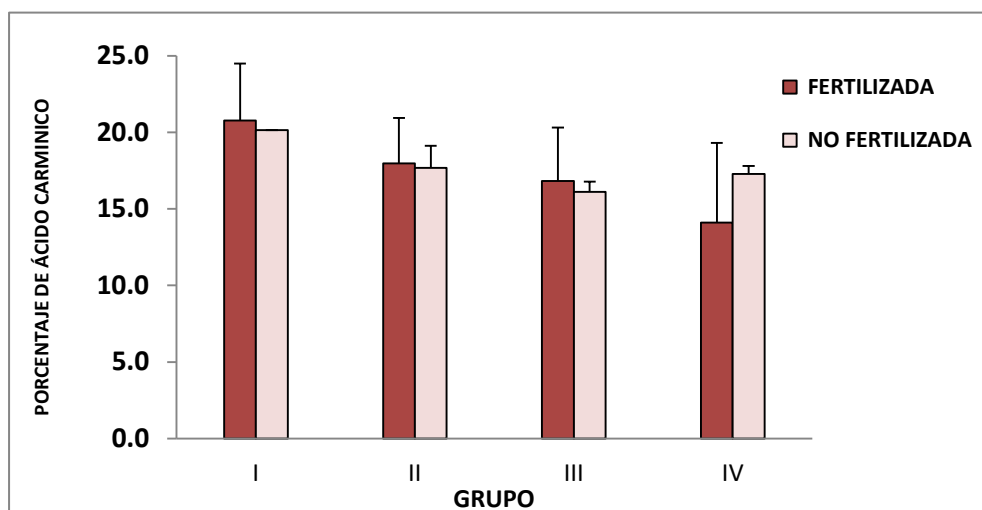


Figura 24. Porcentaje de ácido carminico en hembras adultas fertilizadas y no fertilizadas de los cuatro grupos, determinado por electroforesis capilar. Las barras superiores representan el error estándar, se realizaron cuatro repeticiones de cada determinación.



## VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En general, se obtuvieron resultados satisfactorios en el análisis de validación del método para determinar la concentración de ácido carminico en muestras de grana cochinilla por electroforesis capilar, ya que los resultados obtenidos están, en su mayoría, dentro de los parámetros de aceptación (Cuadro 13).

Cuadro 13. Parámetros de validación del método de determinación de la concentración de ácido carmínico por electroforesis capilar.

PARAMETRO	ACEPTACIÓN	OBTENIDO	
PRECISIÓN SISTEMA	CV < ó = 3.0%	700ppm	3.03
		350ppm	1.04
		175ppm	2.7
		87.5ppm	2.14
		43.75ppm	1.08
LINEALIDAD	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.98$	
	IC( $\beta_1$ ): no debe incluir el cero	IC( $\beta_1$ ): No incluye el cero	
ESPECIFICIDAD	Es específico si demuestra ser preciso y lineal	Demostró ser preciso y lineal, por lo tanto es específico	
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	Promedio: 97-100% de recobro	Recobro de 85%	
	CV: No mayor a 3%	CV: 2.98	
	IC( $\mu$ ): Debe incluir 100%	No incluye 100%	

Los valores de referencia se encuentran en la Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C. (Guía, 2002).

## Determinación de la fluorescencia de glóbulos de ácido carmínico por citometría de flujo

Las fases que se estudiaron fueron las mismas que para electroforesis capilar, es decir: ninfa I (NI), ninfa II (NII), hembra adulta (con sus 4 grupos determinados por peso: AI, AII, AIII y AIV), hembras adultas no fertilizadas (ANFII, ANFIII y ANFIV) y hembras en oviposición (AOVI, AOVII y AOVIII). En el caso de huevo (H) y adulta no fertilizada I (ANFI) sólo se realizó una repetición, por lo que no se incluye en el análisis estadístico por no tener el número de repeticiones mínimo.

Se obtuvo el porcentaje promedio de glóbulos de ácido carminico que pertenecen a cada grupo determinado por el tamaño (pequeño, mediano y grande), así como el promedio de intensidad de fluorescencia (baja, mediana y alta intensidad).

Aplicando la fórmula para la obtención de la fluorescencia total por grupo y el factor de fluorescencia (ver metodología), se obtuvieron los resultados reportados en el cuadro 14.

Cuadro 14. Fluorescencia de glóbulos de ácido carminico de la grana cochinilla.

FASE	INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA						FLUORESCENCIA TOTAL
	BAJA		MEDIANA		ALTA		
	FLUORESCENCIA INDIVIDUAL	FACTOR DE FLUORESCENCIA	FLUORESCENCIA INDIVIDUAL	FACTOR DE FLUORESCENCIA	FLUORESCENCIA INDIVIDUAL	FACTOR DE FLUORESCENCIA	
NI	0.06	4.10	0.18	5.52	0.84	4.77	14.39
NII	0.07	4.46	0.21	5.99	0.80	4.71	15.15
AI	0.09	4.13	0.26	11.25	0.74	7.97	23.35
AII	0.08	4.25	0.24	9.26	0.79	5.96	19.47
AIII	0.08	4.39	0.23	8.48	0.68	3.95	16.83
AIV	0.07	4.03	0.21	7.26	1.44	8.78	20.07
AOVI	0.04	1.10	0.37	12.97	2.46	97.61	111.68
AOVII	0.05	1.05	0.44	15.42	2.51	106.45	122.92
AOVIII	0.04	0.89	0.51	21.39	2.20	85.19	107.46
ANFI	0.05	0.79	0.75	36.01	2.61	98.18	134.99
ANFII	0.04	2.18	0.20	6.06	1.98	27.31	35.55
ANFIII	0.04	2.12	0.20	6.28	0.88	11.29	19.68
ANFIV	0.06	2.23	0.26	10.24	3.05	71.81	84.28

Se presenta la fluorescencia individual, la fluorescencia por grupo y el factor de fluorescencia resultante de cada grupo estudiado.

En la Figura 25 podemos apreciar los resultados del análisis de la fluorescencia presente en los glóbulos de ácido carminico de las fases de grana cochinilla estudiados. Las fases que presentan una fluorescencia total mayor son las fases que se encuentran en etapa de oviposición, mostrando diferencia estadística ( $p < 0.05\%$ ) con el resto de las etapas estudiadas.

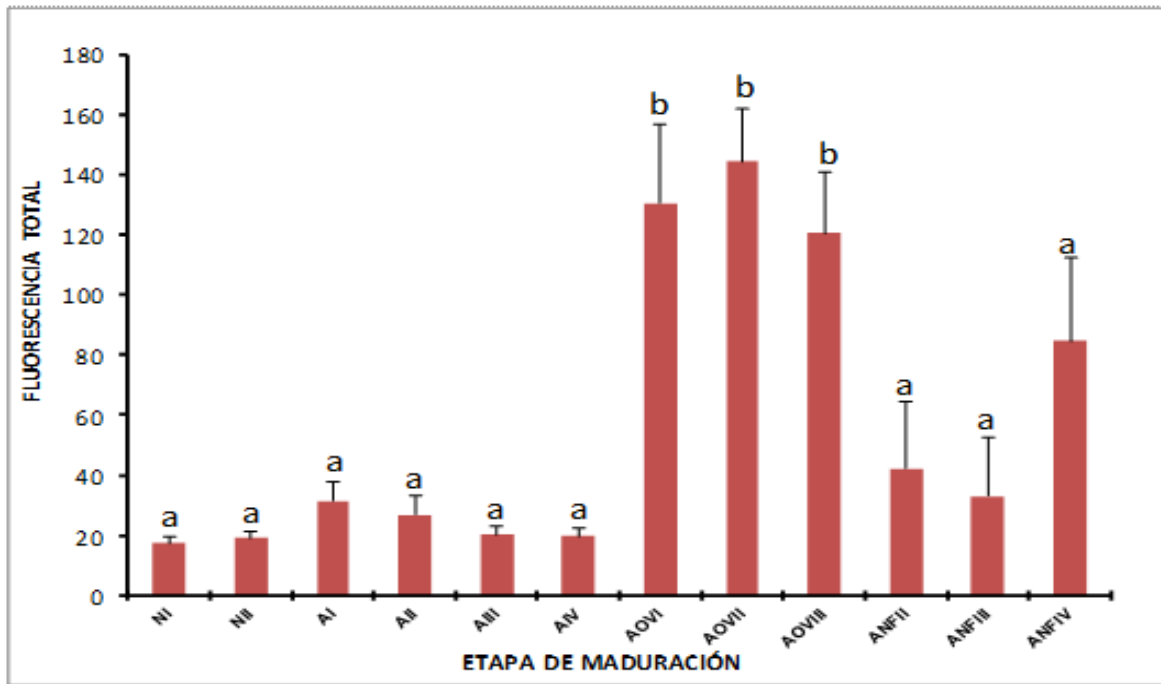


Figura 25. Fluorescencia total de glóbulos de ácido carminico de las diferentes fases de grana cochinilla medidas por citometría de flujo. Letras iguales no existen diferencias, letras diferentes existe diferencia estadística ( $p > 0.05$ ), se realizaron 10 repeticiones.

Al realizar el análisis de la fluorescencia de los glóbulos de ácido carminico presentes en la hemolinfa, cada fase de grana cochinilla presentó diferencia en el porcentaje de las tres intensidades estudiadas y los porcentajes fueron variando según la fase de maduración conforme al tiempo. En la Figura 26 se aprecian estas variaciones y puede notarse que en todas las fases se mantienen casi constantes los porcentajes de cada intensidad, presentándose los de alta intensidad como los de mayor porcentaje, seguido de los glóbulos de mediana intensidad y en menor porcentaje los de baja intensidad de fluorescencia, pero este porcentaje, aumenta de forma importante en las fases de hembras no fertilizadas de los grupos ANFII y ANFIV.

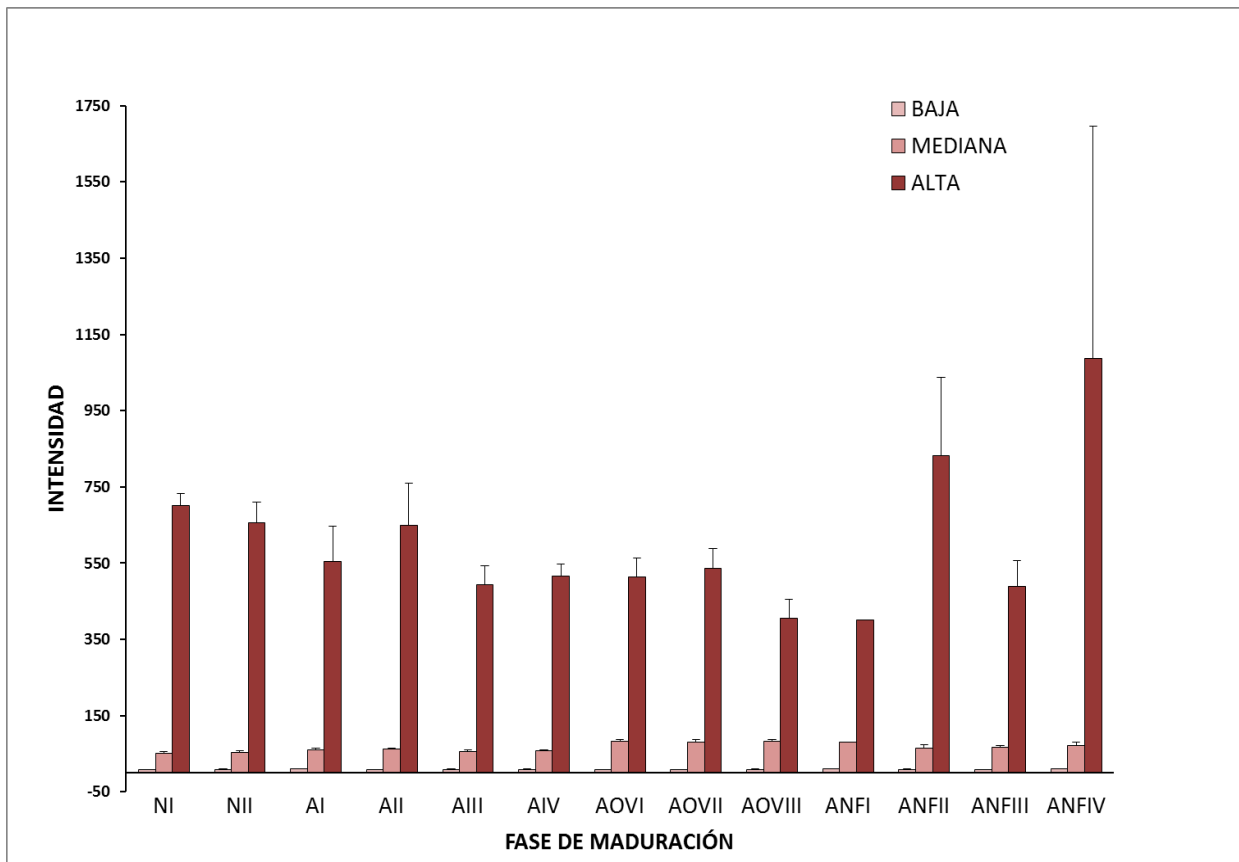


Figura 26. Porcentaje de glóbulos de ácido carminico presentes en grana cochinilla según la intensidad de fluorescencia, las barras superiores muestran el error estándar. Cada análisis se repitió diez veces.

Los glóbulos se dividieron en tres grupos por tamaños: pequeños (P), medianos (M) y grandes (G). Se puede apreciar que los glóbulos de ácido carminico estudiados por tamaño, muestran variaciones en el porcentaje de presentación en las diferentes etapas, en las fases anteriores y posteriores a la oviposición los glóbulos que predominan son los de tamaño pequeño y durante el proceso de oviposición los glóbulos predominantes son los de mayor tamaño, en especial a los cuatro días de iniciada la oviposición, los resultados se pueden observar en la Figura 27.

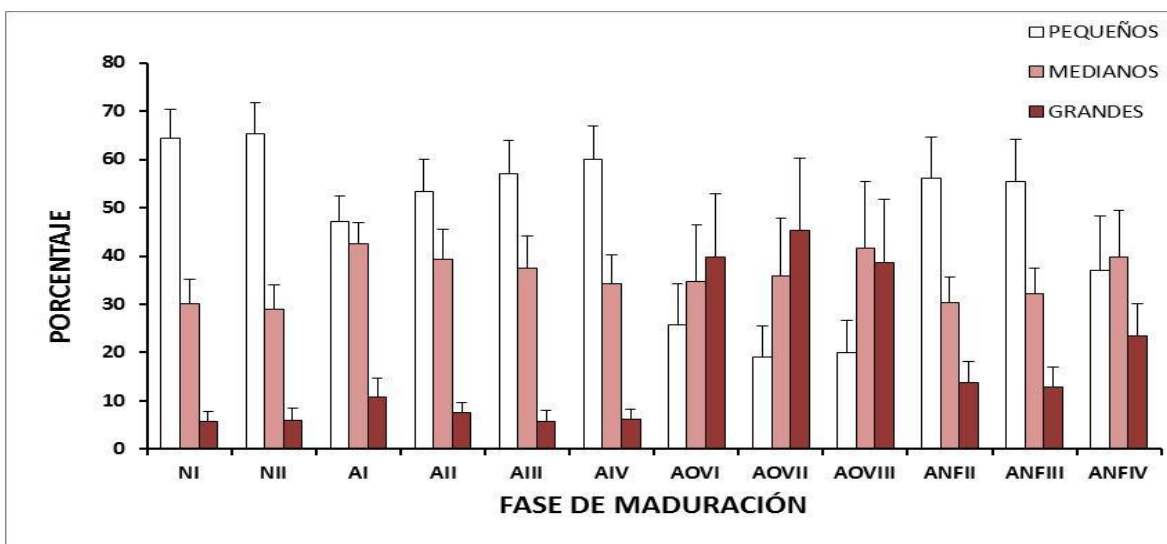


Figura 27. Porcentaje de glóbulos de ácido carminico de grana cochinilla clasificados por tamaño reportados por citometría de flujo.

Cuadro 15. Reporte del porcentaje de ácido carminico por electroforesis capilar y fluorescencia total por citometría de flujo de muestras de grana cochinilla.

FASE	% ÁCIDO CARMINICO	FLUORESCENCIA TOTAL
NI	6.9 ± 0.85	14.39
NII	2.69 ± 0.66	15.15
AI	20.77 ± 1.08	23.35
AII	17.97 ± 0.85	19.47
AIII	16.82 ± 1.01	16.83
AIV	14.10 ± 1.50	20.07
AOVII	22.08 ± 1.48	111.68
AOVIII	20.38 ± 1.53	122.92
AOVIII	23.16 ± 2.78	107.46
ANFI	26.27 ± 1.67	134.99
ANFII	17.66 ± 0.42	35.55
ANFIII	16.10 ± 0.20	19.68
ANFIV	17.27 ± 0.16	84.28

En el Cuadro 15 se tienen los porcentajes de ácido carminico determinados por electroforesis capilar y el factor de fluorescencia obtenido por citometría de flujo. Se puede observar que existe una correlación positiva entre ambas determinaciones.

Se realizó un análisis de correlación entre el porcentaje de ácido carminico de las granas ovoposición y el peso seco de estas mismas, obteniendo un resultado positivo, lo que nos indica que el porcentaje de ácido carminico de la grana luego de la oviposición varía conforme el peso seco de la misma (Figura 28).

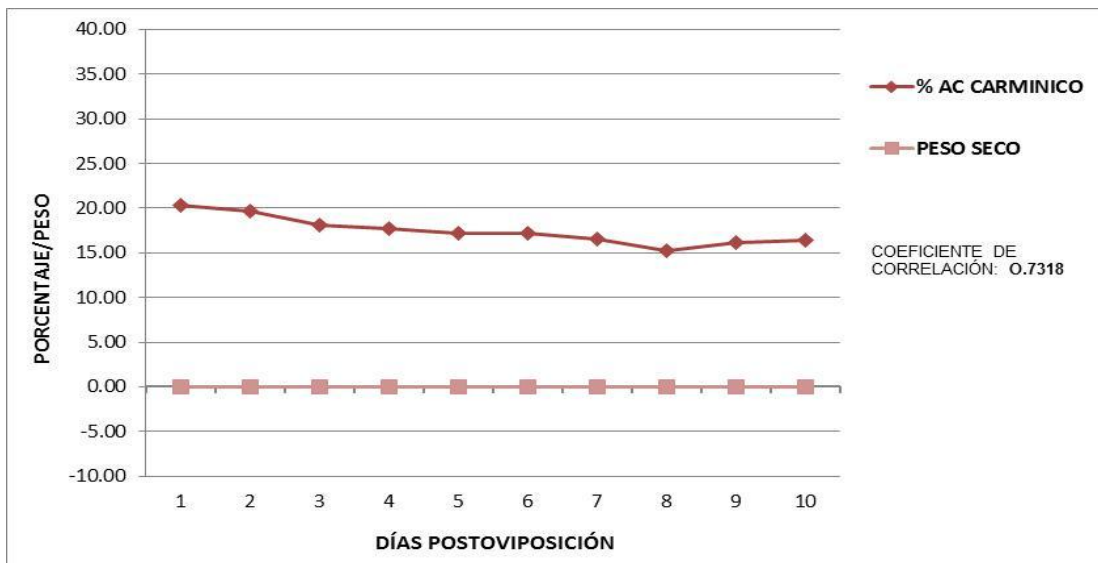


Figura 28. Correlación positiva entre el peso seco y el porcentaje de ácido carminico de hembras de grana cochinilla en proceso de oviposición.

## HISTOLOGÍA

### EFFECTO DE LA FORMALINA SOBRE EL ÁCIDO CARMÍNICO

Los resultados de la evaluación del efecto del formol sobre el colorante, que se realizó por espectrofotometría se encuentran en el cuadro 16, y se puede notar que no existe ningún efecto del tratamiento con formol sobre el colorante.

En la Figura 29 se encuentran graficados las absorbancias obtenidas de las muestras tratadas con formalina bufferada.

Cuadro 16. Resultados de absorbancia por espectrofotometría de extractos de grana cochinilla al 1% adicionados con formalina bufferada al 10%.

Escaneo 400-700nm							
Grana al 0.25%,				Grana al 0.5%			
Sin formol		Con formol		Sin formol		Con formol	
nm	A	nm	A	nm	A	nm	A
398	2.5	398	1.23	411	2.4	399	2.26
419	3	419	1.5	482	3.6	413	2.54
495	3.8	498	2.9	500	3.6	416	2.62
512	3.9	558	1.2	530	3.6	419	2.69
558	2.3	583	2.8	550	2.8	462	3.58
570	2.1	587	0.7	570	1.6	467	3.5
629	0.52	610	0.338	600	0.69	495	3.8
666	0.44	616	0.28	625	0.37	576	1.4
683	0.43	629	0.24	640	0.3	644	0.28
700	0.42	683	0.19	669	0.25	689	0.24

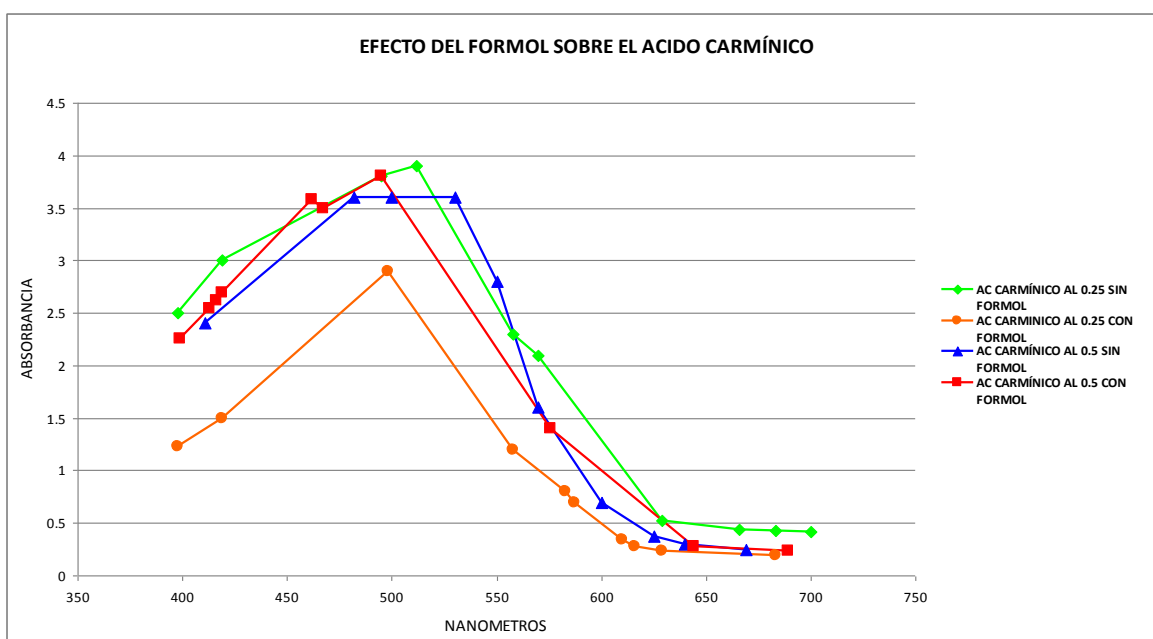


Figura. 29. Efecto de la formalina bufferada al 10% sobre el ácido carminico determinado por espectrofotometría. Se muestra el escaneo de absorbancia del ácido carminico en rango de 350 a 700nm, nótese que el pico de absorbancia no se modifica.

Partiendo de los resultados de éste experimento previo, donde pudimos observar que no hay efecto del formol sobre el ácido carminico, procedimos al fijado de muestras en formalina bufferada al 10% para el procesamiento histológico (Prophet, 1995).

## HUEVO

Por microscopía óptica se pudo apreciar que todas las fases del insecto presentan el colorante, al observar cortes del insecto teñidos o no, todos presentaron coloración, a continuación se observan micrografías de huevo en cortes teñidos y sin teñir (Figura 30).

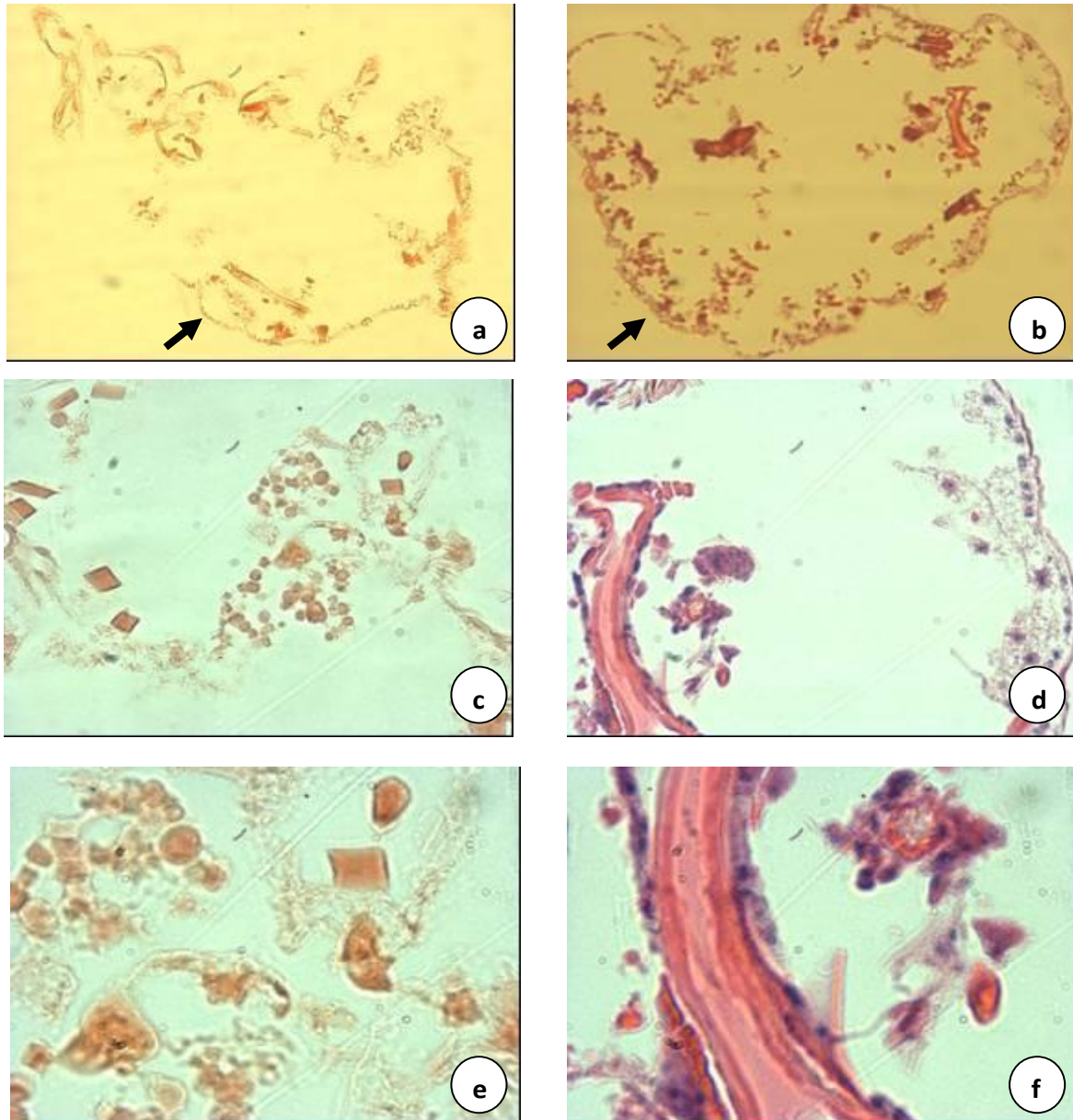


Figura 30. Micrografías de cortes histológicos de huevo de grana cochinilla, a) Huevo, sin teñir, 10x. b) Huevo tinción HE, 10x. c) Huevo sin teñir, 40x. d) Huevo tinción HE, 40x. e) Huevo sin teñir 100x. f) Huevo tinción HE, 100x. En las imágenes se puede apreciar que tanto en los cortes sin teñir (a, c y e) como en los cortes teñidos (b, d, f) se pueden notar las estructuras internas. Las flechas indican el corion del huevo, nótese que presenta color en los cortes sin teñir.



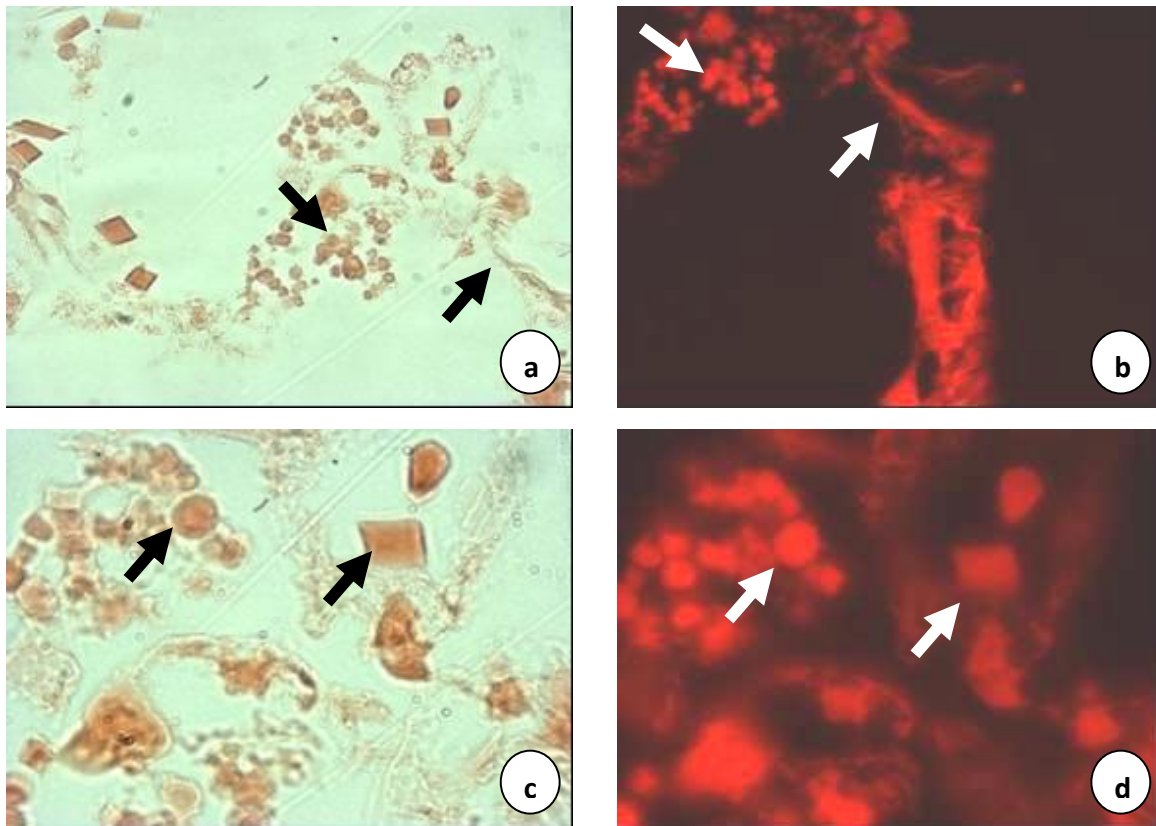


Figura 31. Comparación de cortes histológicos de huevos de grana cochinilla sin teñir vistos al microscopio compuesto (columna izquierda) y vistos al microscopio de luz ultravioleta (columna derecha). a) Huevo sin teñir, 40X. b) Huevo sin teñir visto con luz UV, 40X. c) Huevo sin teñir, 100X. d) Huevo sin teñir, visto bajo luz UV, 100X. Las flechas indican estructuras coincidentes que tienen mayor fluorescencia al ser vistas bajo luz UV.

Los cortes histológicos sin teñir permiten notar las principales estructuras y conformación interna de las muestras, que aunado a los cortes teñidos con técnica HE permiten tener mejor identificación de dichas estructuras como en la Figura 31, donde se presentan cortes de huevo, evidenciando el corion o cascarón y algunas estructuras internas que forman parte de los embriones en formación. Los cortes teñidos ayudan a distinguir los núcleos celulares contrastando mejor la imagen, ayudando así a la identificación óptima de algunas estructuras (Figura 31).

Al hacer el comparativo de los cortes sin teñir con luz visible y con luz UV se puede notar que el ácido carminico presenta fluorescencia, dando una imagen casi idéntica en ambos tipos de luz, ya que el colorante se distribuye en todos los tejidos de las diferentes fases de la grana. Es importante mencionar que al intentar la observación de las muestras en objetivo panorámico y seco débil, la fluorescencia no es muy notoria, por tanto, sólo presentamos imágenes de seco fuerte e inmersión (Figura 31).

En la Figura 32 se muestran las imágenes de los cortes histológicos teñidos con HE y observados con luz UV, para ver el efecto del proceso de tinción sobre la fluorescencia.

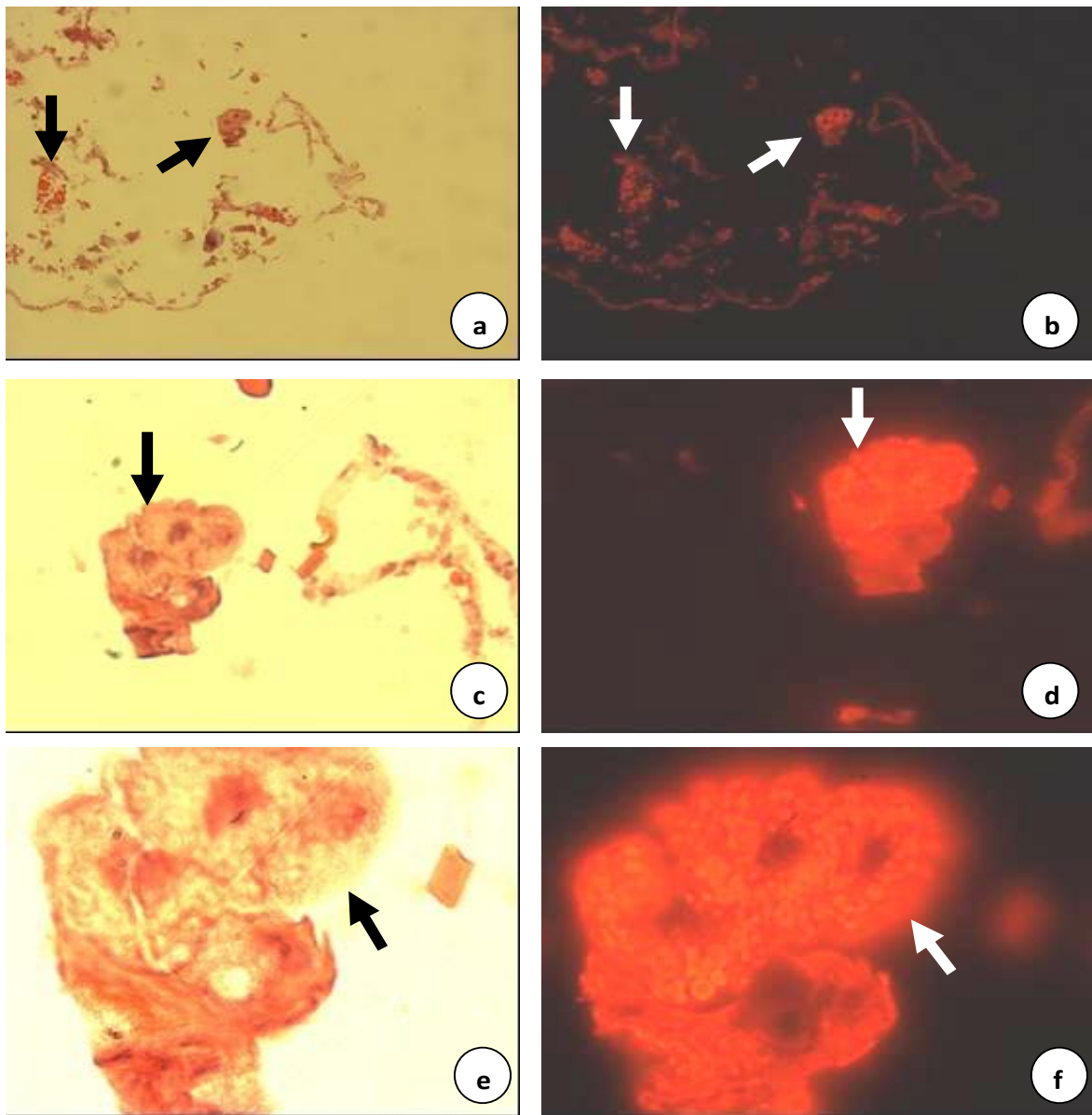


Figura 32. Cortes histológicos de huevos de grana cochinilla teñidos con técnica HE. a) Huevo, tinción HE, 10X. b) Huevo, tinción HE, visto con luz UV, 10X. c) Huevo, tinción HE, 40X. d) Huevo, tinción HE visto con luz UV, 40X. e) Huevo, tinción HE, 100X. f) Huevo, tinción HE visto con luz UV, 100X. Las flechas comparan el tejido embrionario que sin teñir y la imagen fluorescente bajo luz UV y es observable desde el objetivo seco débil.

## HEMBRA

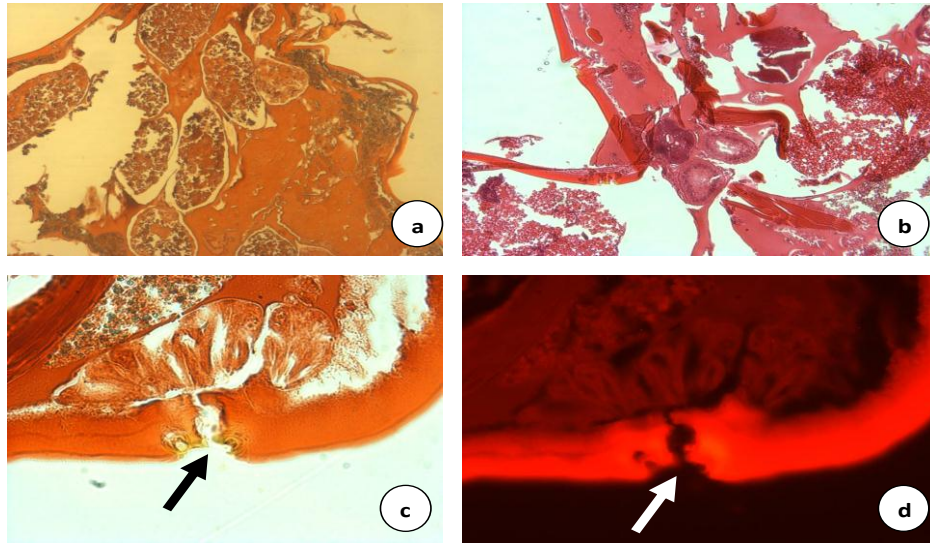


Figura 33. Cortes histológicos de hembra adulta de grana cochinilla, a) Hembra adulta, sin tinción, 10X. b) Hembra adulta, tinción HE, 10X. c) Hembra adulta, sin tinción, 40X. d) Hembra adulta, sin teñir, visto con luz UV, 40X. En la primera fila se hace la comparación de un corte sin teñir y un corte con tinción HE. En la segunda fila se hace un comparativo de cortes histológicos de hembra adulta de grana cochinilla sin teñir y la imagen del mismo corte bajo luz UV, 40X. Las flechas señalan un poro quinquelocular. Nótese la fluorescencia aumentada de la cutícula.

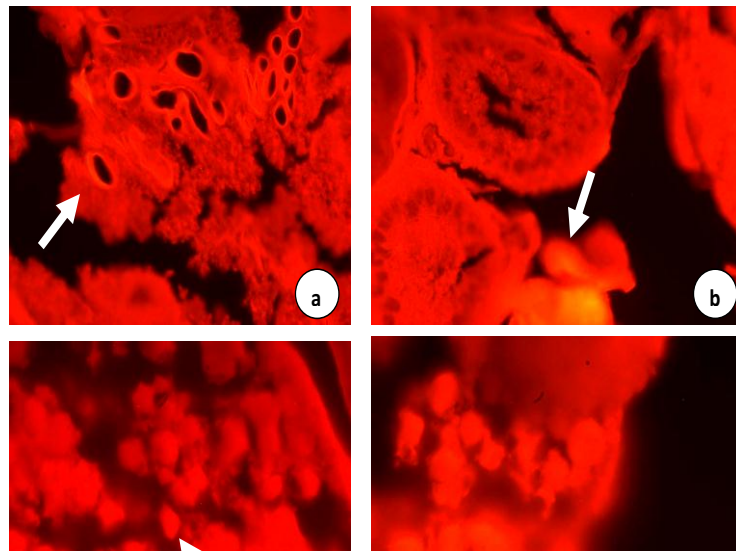


Figura 34. Cortes histológicos de hembra adulta de grana cochinilla observados con luz UV. a) Hembra, sin tinción, 40X. b) Hembra, sin tinción 40X. c) Hembra, sin tinción 100X. d) Hembra, sin tinción, 100X. Las flechas destacan la fluorescencia en estructuras internas de la grana cochinilla.

En el caso de los cortes de las hembras de grana cochinilla adulta, se puede observar gran cantidad de estructuras internas, predominando la presencia de ovariolas con huevos en diferentes estados de maduración (Figura 34). Se observa también el intestino y algunas partes del tejido graso.

Se hicieron cortes histológicos de insectos diferentes a la grana cochinilla y bajo los mismos criterios, para comparar la fluorescencia de la quitina (Figura 35).

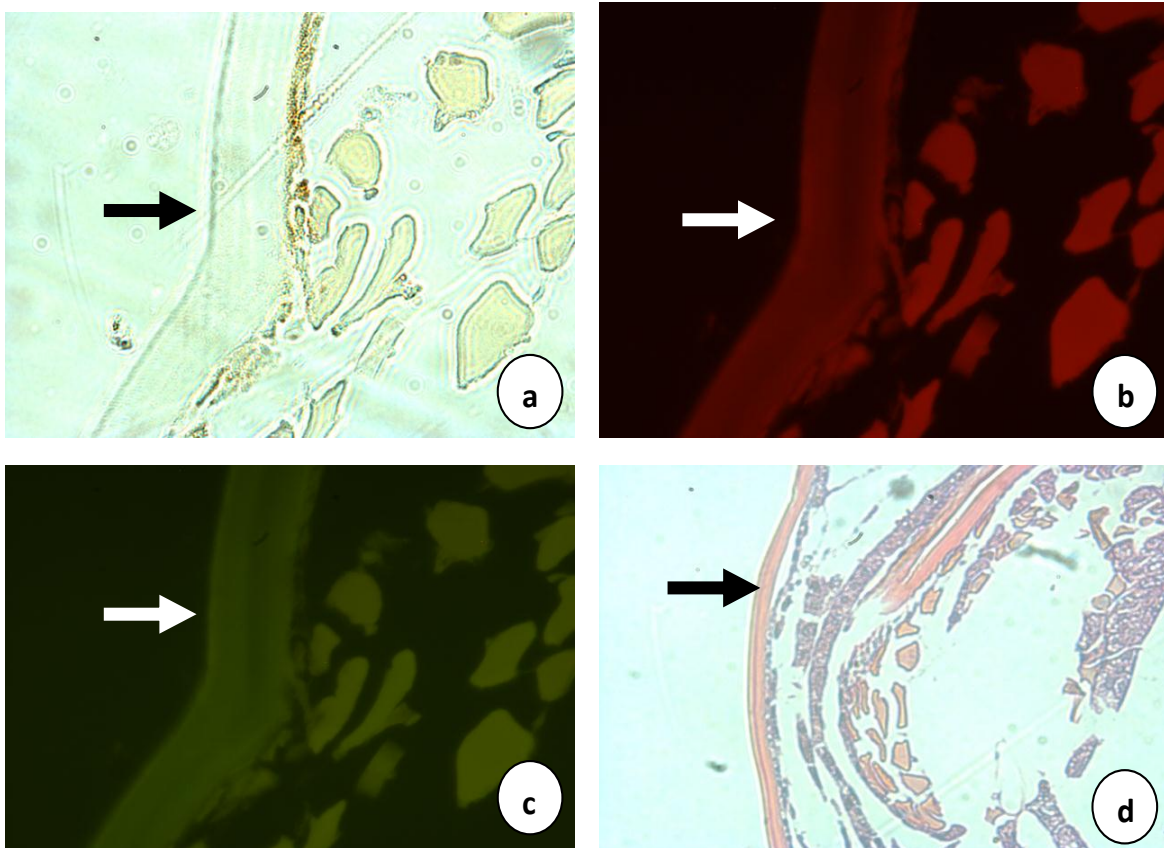


Figura 35. Preparaciones histológicas de Hemíptero. a) Hemíptero, sin teñir, 40x. b) Hemíptero, sin teñir, visto con luz UV, 40X, filtro verde. c) Hemíptero, sin teñir, visto con luz UV, filtro azul, 40X. d) Hemíptero, tinción HE, 10X. Las flechas indican la zona del exoesqueleto, mostrando la fluorescencia propia de la quitina bajo luz UV.

Del análisis de la pérdida de fluorescencia por el uso de tinción alcalina, donde las laminillas se tiñeron sólo con hematoxilina, se obtuvieron las imágenes de la Figura 36. Se puede observar que la fluorescencia no disminuyó en ninguno de los casos.



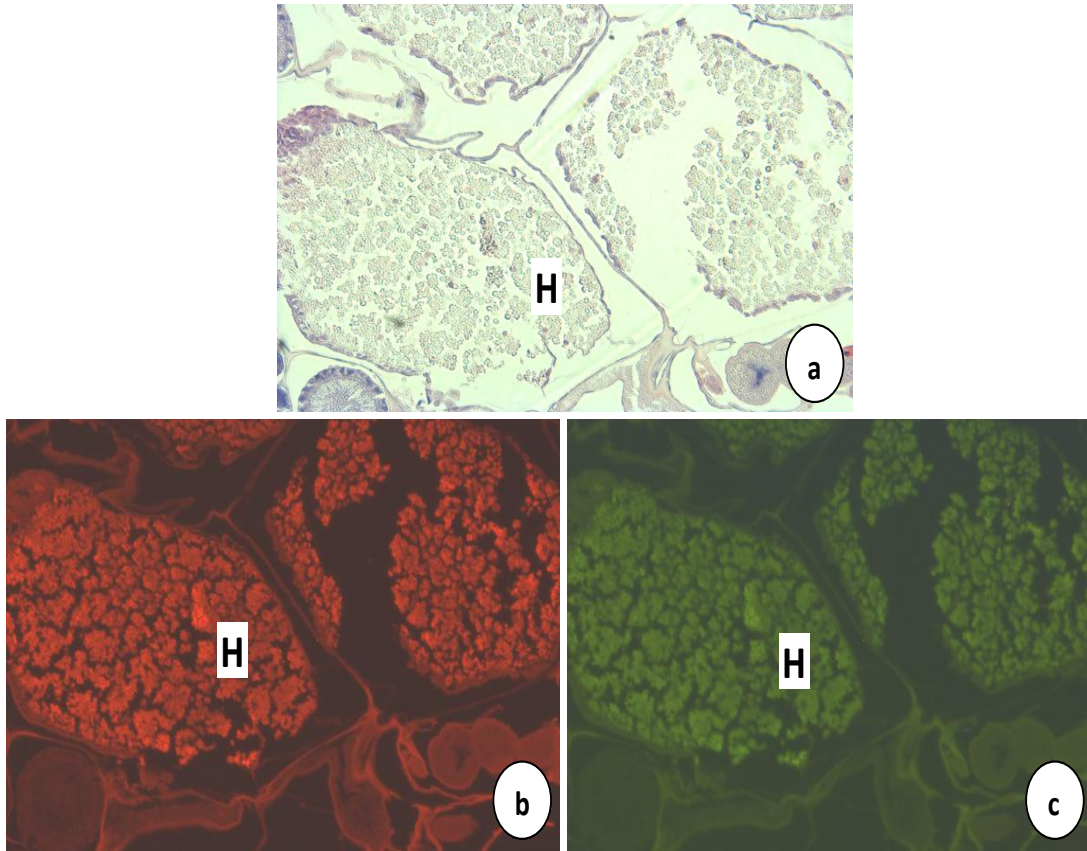


Figura 36. Corte histológico de grana cochinilla teñido sólo con hematoxilina a) Corte teñido con hematoxilina, 10X. b) Mismo corte visto con luz UV, filtro verde. c) Mismo corte visto con luz UV, filtro azul. Se pueden apreciar los huevos (H) dentro del cuerpo de la grana adulta.

## IDENTIFICACIÓN DE ORGANOS Y TEJIDOS

Los cortes histológicos obtenidos nos permiten identificar algunos órganos internos de la grana cochinilla, principalmente las ovariolas, los huevos ya formados y los embriones que en muchos casos se perciben dentro de los huevos como células basófilas centrales, se pueden notar huevos en diferentes fases de maduración como lo reportado por Ramírez (2010) y la presencia de ovariolas con germario y vitelarío evidentemente en crecimiento (Figuras 37, 38 y 39).

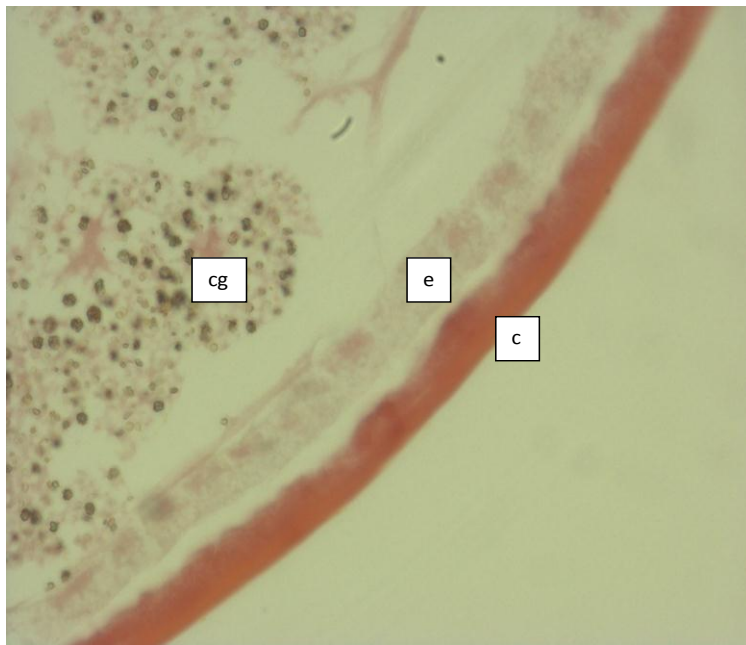


Figura 37. Estructuras internas de la grana cochinilla. Detalle de cutícula (c), epidermis (e) y cuerpo graso (cg) de grana cochinilla adulta, nótese cómo se conservó la estructura del insecto. Hembra adulta, tinción HE, 100X.

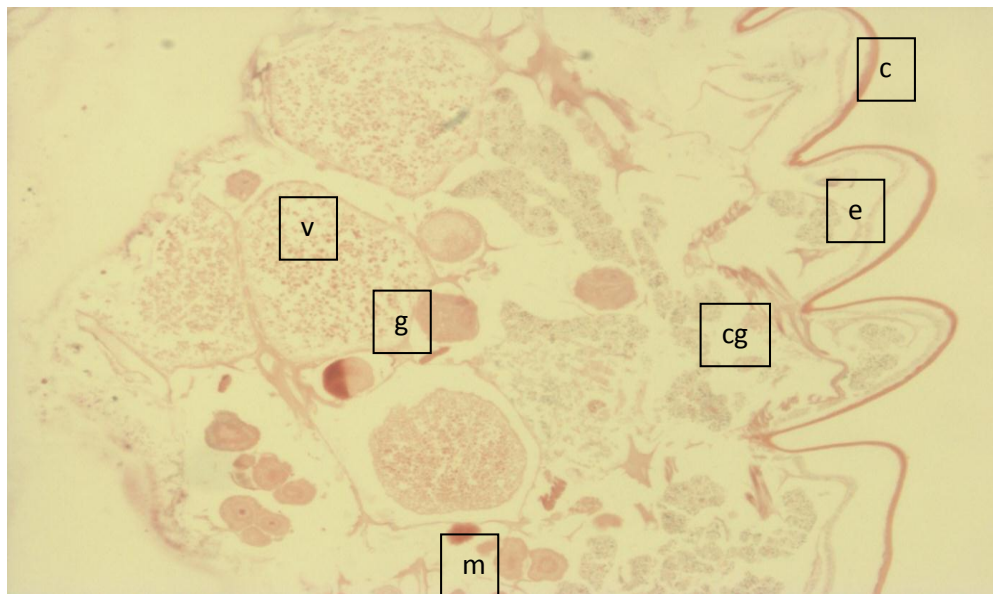


Figura 38. Corte histológico de grana cochinilla, sin teñir, nótese la distribución del color carmín en todo el cuerpo, incluyendo los ovocitos y huevos en desarrollo dentro del cuerpo de la grana, que se presentan en diferentes etapas de maduración. Cutícula (c), epidermis (e), cuerpo graso (cg), germario (g), vitelario (v), Órgano de Malpigi (m).

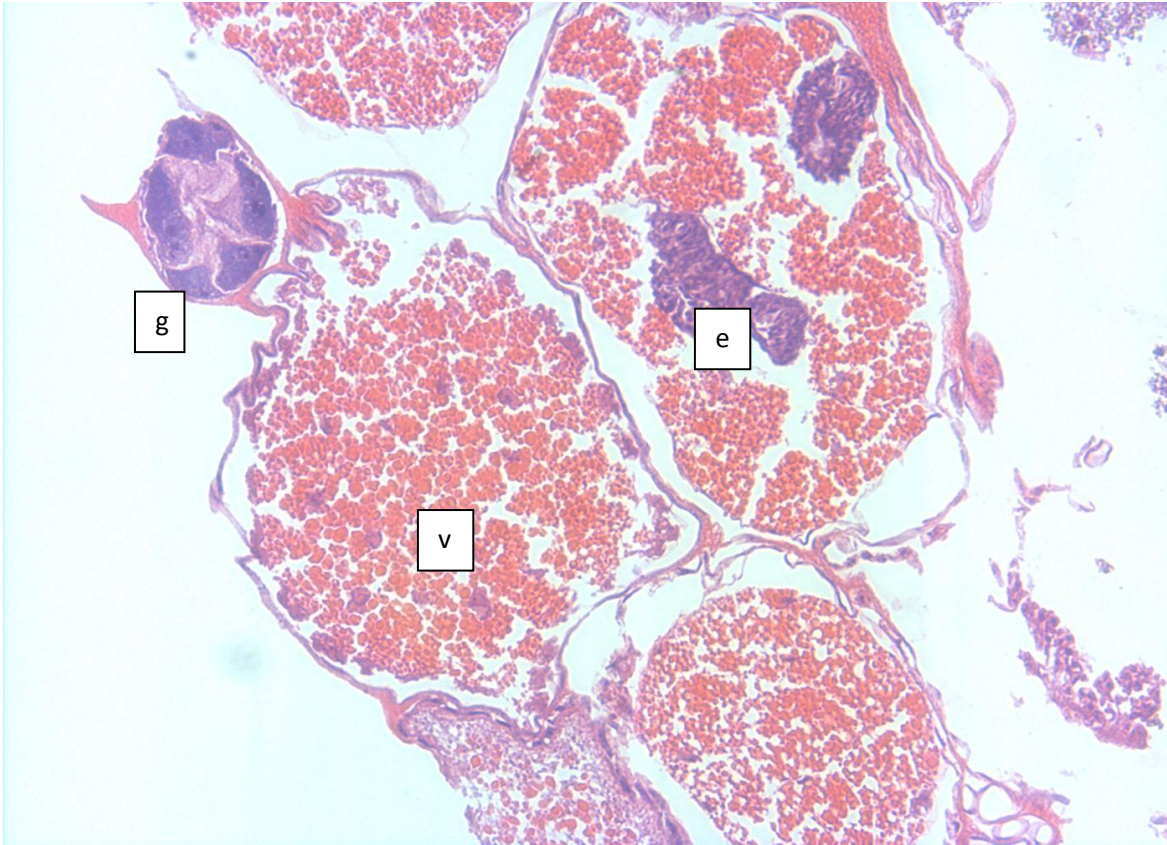


Figura 39. Corte histológico de grana cochinilla, teñido con HE, donde se muestran huevos en diferentes fases de maduración, algunos con presencia de un embrión interno (e), así como germario (g) y vitelario (v).

## Microscopio electrónico

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica han dado detalles de algunas estructuras de la grana cochinilla. Se presentan a continuación los esquemas que han sido publicados por otros autores y las imágenes comparativas que fueron obtenidas por nuestro grupo de trabajo.

### HUEVO

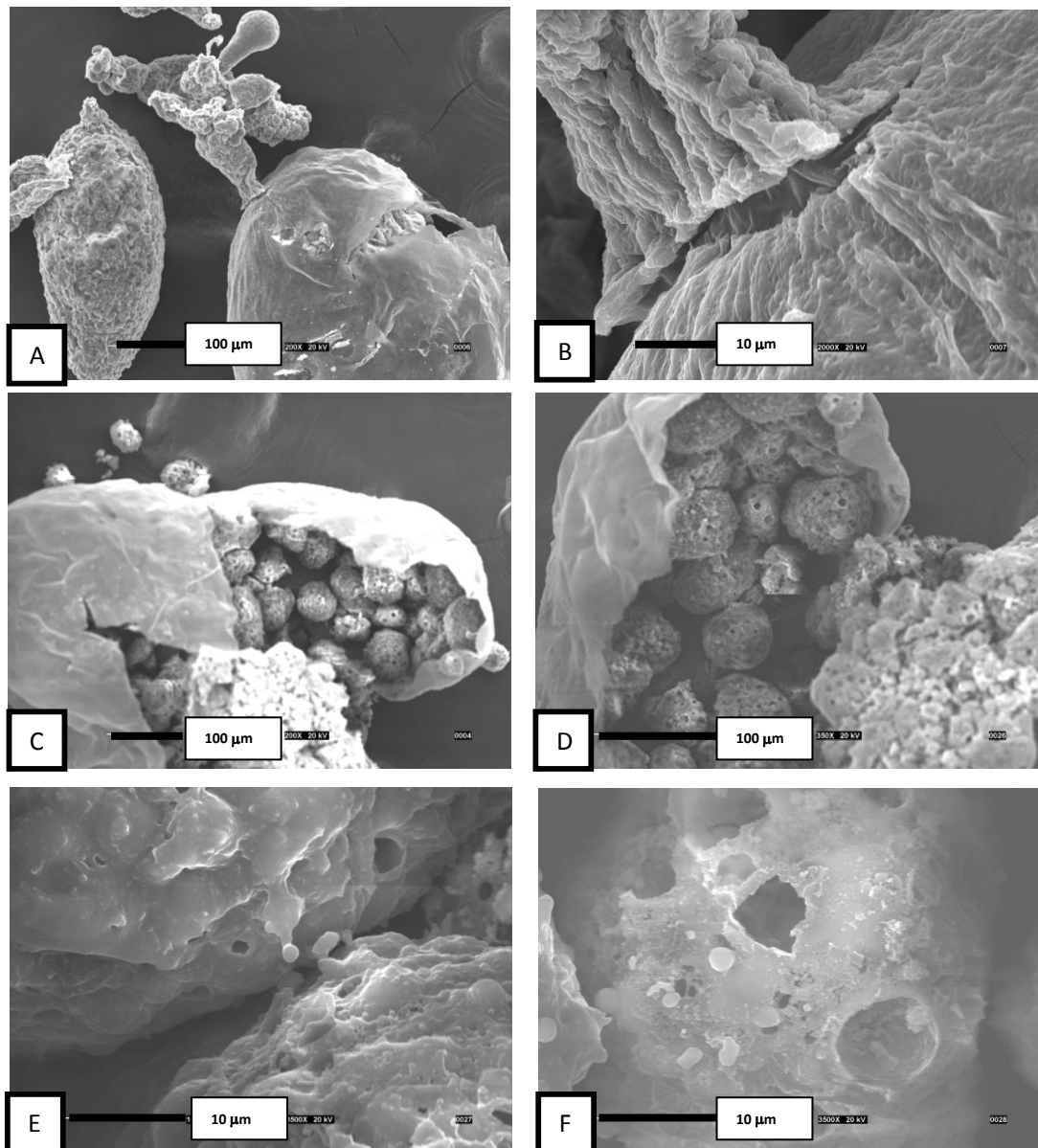


Figura 40. Ovariolas y huevo dentro de hembras adultas de grana cochinilla en etapa de oviposición por microscopía electrónica. A) Electromicrografía de ovariola, 200x. B) Ovariola, 2000x. C) Huevo, 200x. D) Huevo, 350x, se muestran las esferas de yema. E y F) Esfera de yema, 3500x

### NINFA I



La etapa de ninfa I o ninfa migrante emerge inmediatamente después de la oviposición, rompiendo el corion con sus patas, las cuales también le permiten migrar desde el sitio donde nacen para buscar un espacio adecuado sobre el nopal, Figura 41.

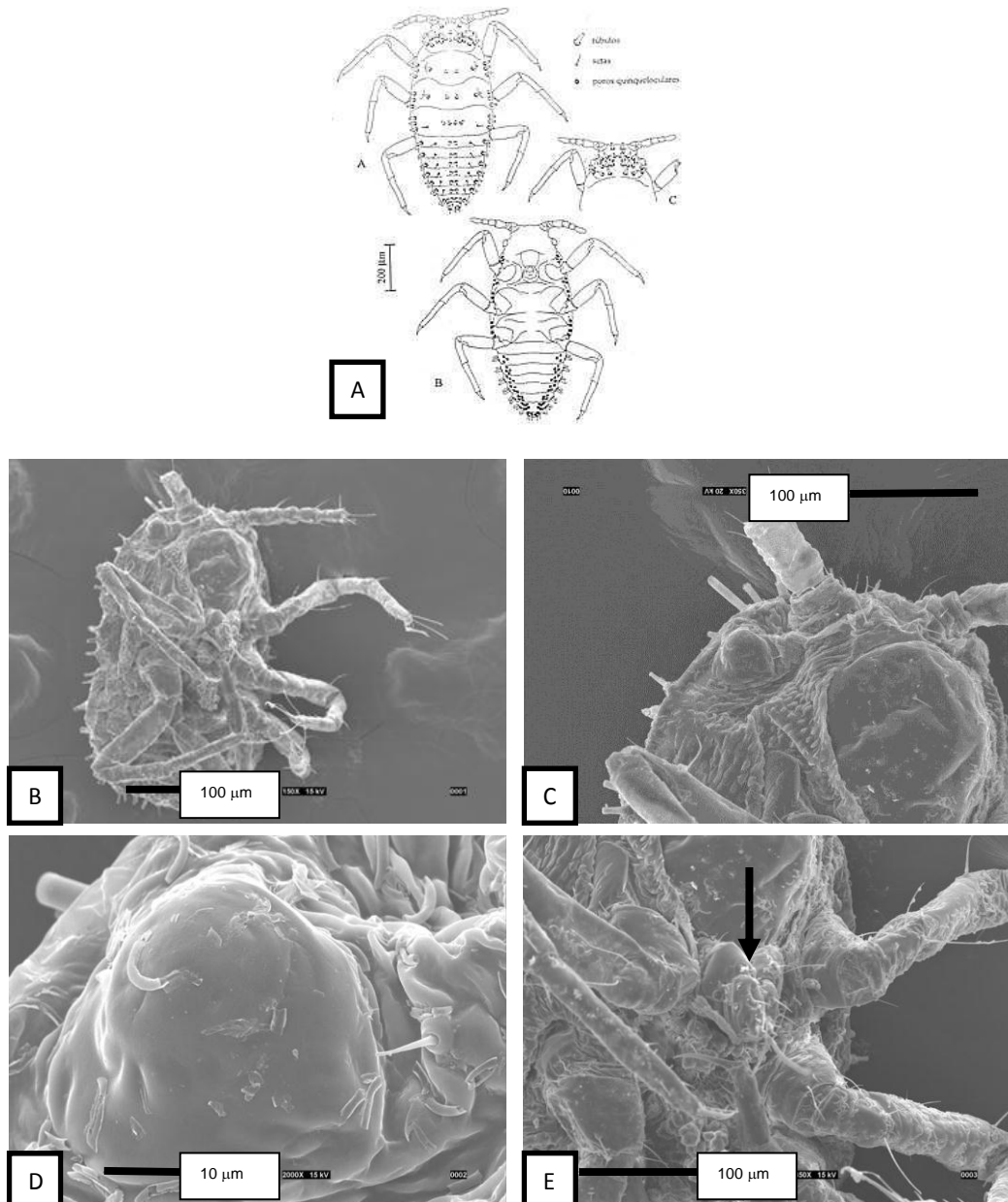


Figura 41. Micrografía electrónica de Ninfa I de grana cochinilla por microscopía electrónica. A) Esquema (tomado de Montiel, 1995), Electromicrografías de ninfa I de grana cochinilla: B) Insecto completo, 100x. C) Acercamiento de B, 350x. D) Ojo, 2000x. E) Aparato bucal (flecha), 350x.

## NINFA II

La ninfa II es una fase estacionaria, ya que no se mueve del sitio donde insertó su estilete a pesar de tener las patas desarrolladas y tener posibilidad de moverse. Su cuerpo es más ovalado, presenta una serie de filamentos largos sobre su superficie, junto con sedas y poros quinqueloculares productores de coccerina (Figura 42)

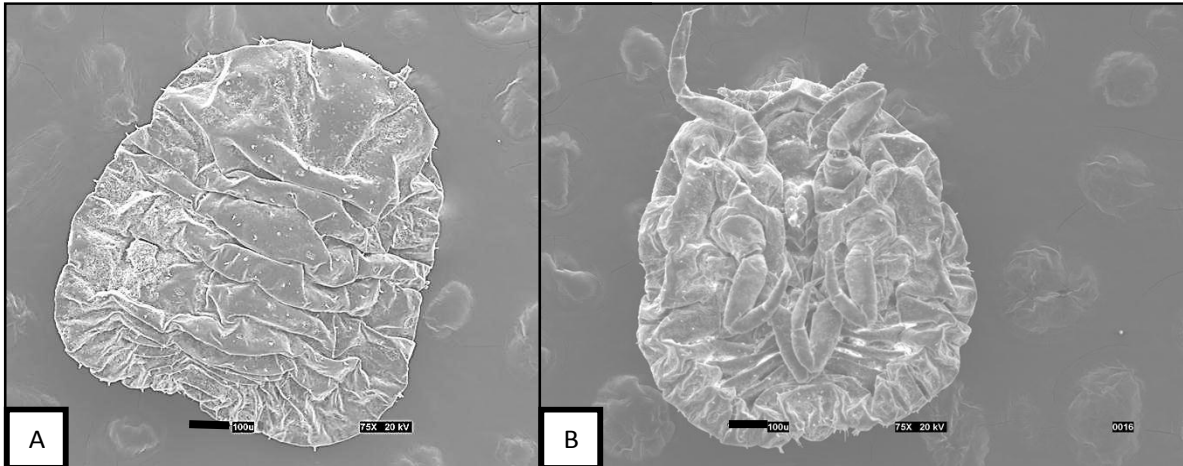


Figura 42. Electromicrografía de Ninfa II de grana cochinilla. A) Vista dorsal, 75x. B) Vista ventral, 75x.

## HEMBRA ADULTA

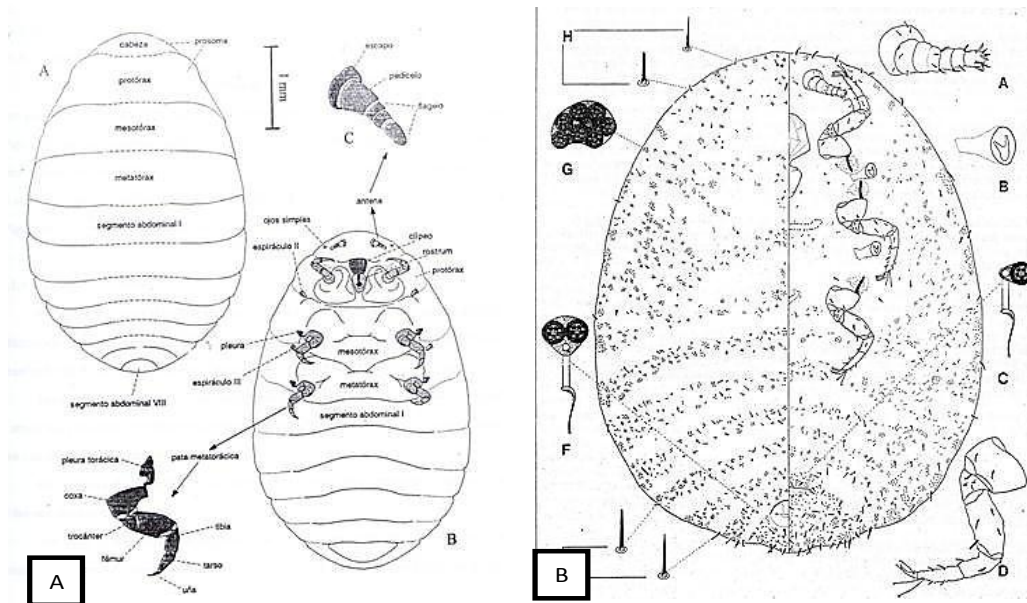


Figura 43. Esquemas de hembra adulta de grana cochinilla. A, tomado de Montiel, 1995. B, tomado de Pérez y Kosztarab, 1992.

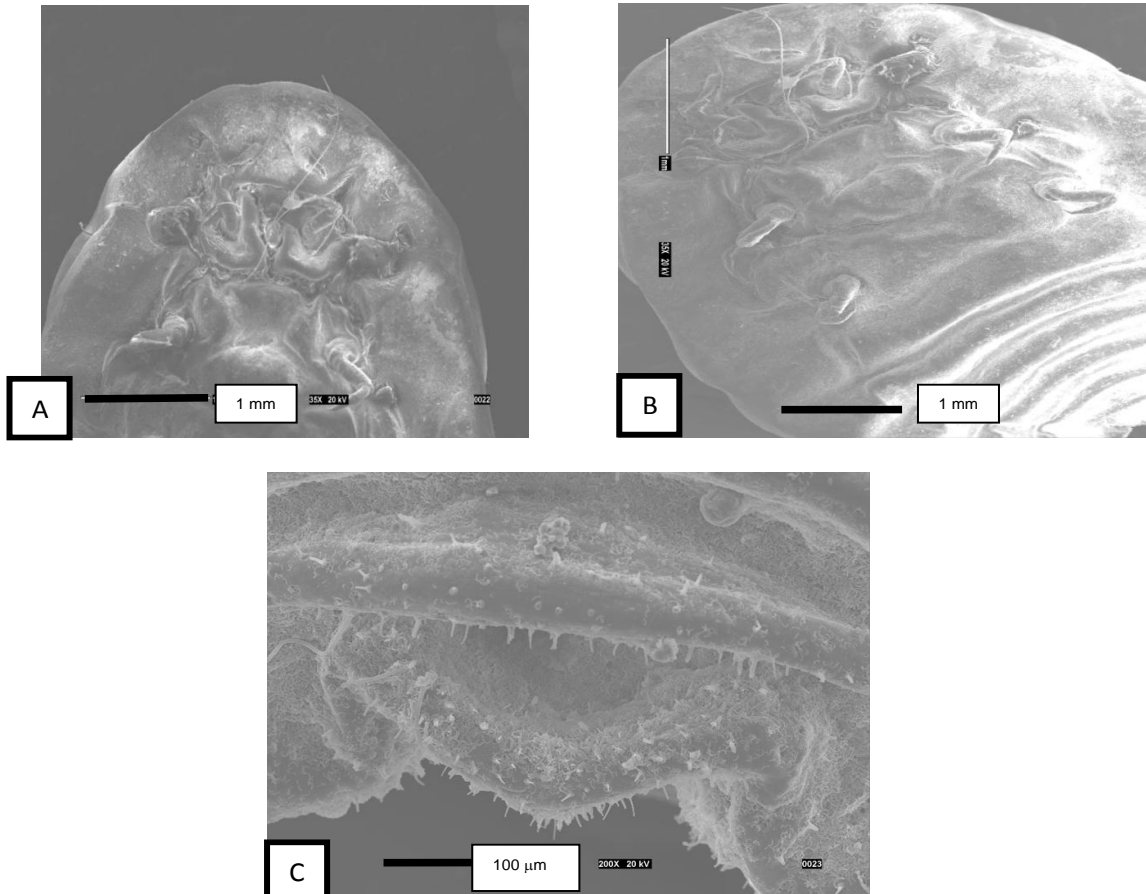


Figura 44. Hembra adulta de grana cochinilla por microscopía electrónica. A y B) Electromicrografías de hembra adulta de grana cochinilla, 35x. C) Electromicrografía de región anal de hembra adulta, 200x.

En la Figura 43 se puede observar de forma esquemática la anatomía de la grana, en vista tanto dorsal como ventral. En la Figura 44 podemos apreciar por microscopía electrónica algunos detalles de su anatomía, como son las patas atrofiadas y muy pequeñas, comparadas con el volumen del resto del cuerpo.

#### CAPULLO Y PUPA.

El macho pasa por la fase de pre-pupa y pupa y lo hace dentro de un capullo filamentososo de color blanco. Se muestran micrografías de ésta etapa, donde podemos observar el opérculo que permite la respiración al insecto en ésta etapa (Figura 45-B), además se muestra la fase de pupa fuera del capullo, Figura 45-A. El macho emerge como insecto alado, ya se pueden apreciar las alas en formación durante la etapa de pupa, Figura 46-A.

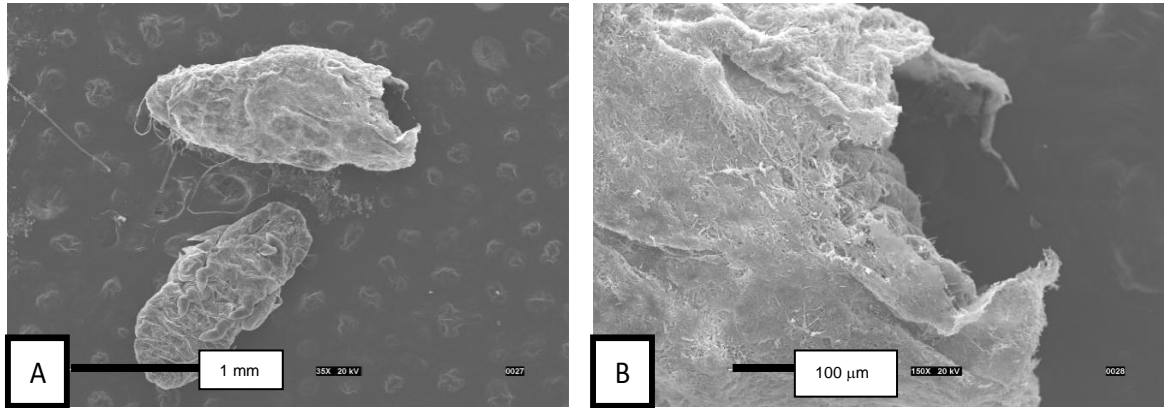


Figura 45. Electromicrografías de la fase de capullo y pupa de grana cochinilla. A) capullo (arriba) y pupa (abajo), 35x. B) Opérculo del capullo, 150x.

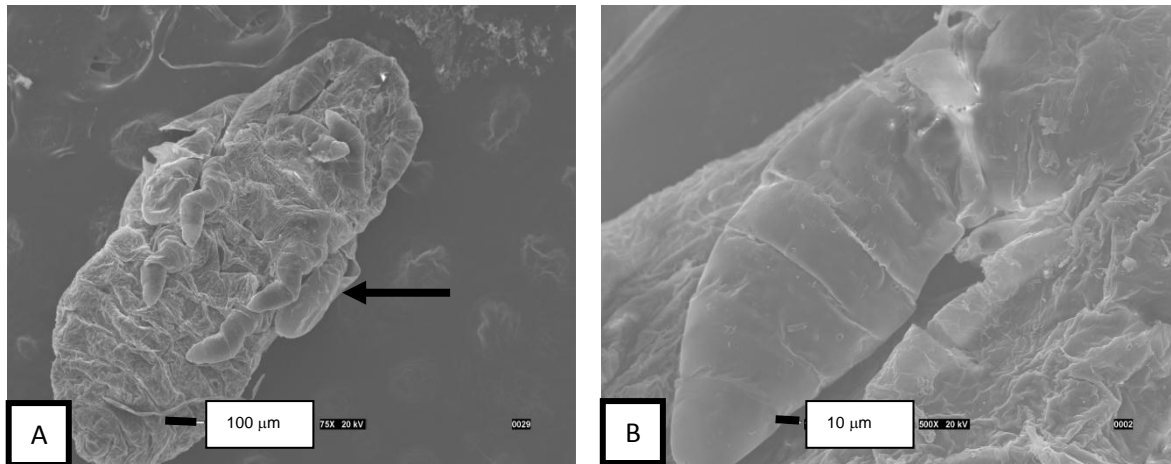


Figura 46. Electromicrografía de pupa de grana cochinilla. A) Pupa, 75x, presenta desarrollo de alas (flecha). B) Detalle de la antena con sus respectivos segmentos, 500x.

## MACHO

Luego de emerger del capullo, el macho volará hacia las hembras para aparearse, fertilizará a varias de ellas y morirá en poco tiempo debido a la falta de alimentación por presentar un aparato bucal atrofiado. En la Figura 47 se muestran esquemas del macho, en la Figura 48 podemos observar micrografías electrónicas de varios aspectos importantes de la anatomía del macho de grana cochinilla, en especial la presencia de alas.

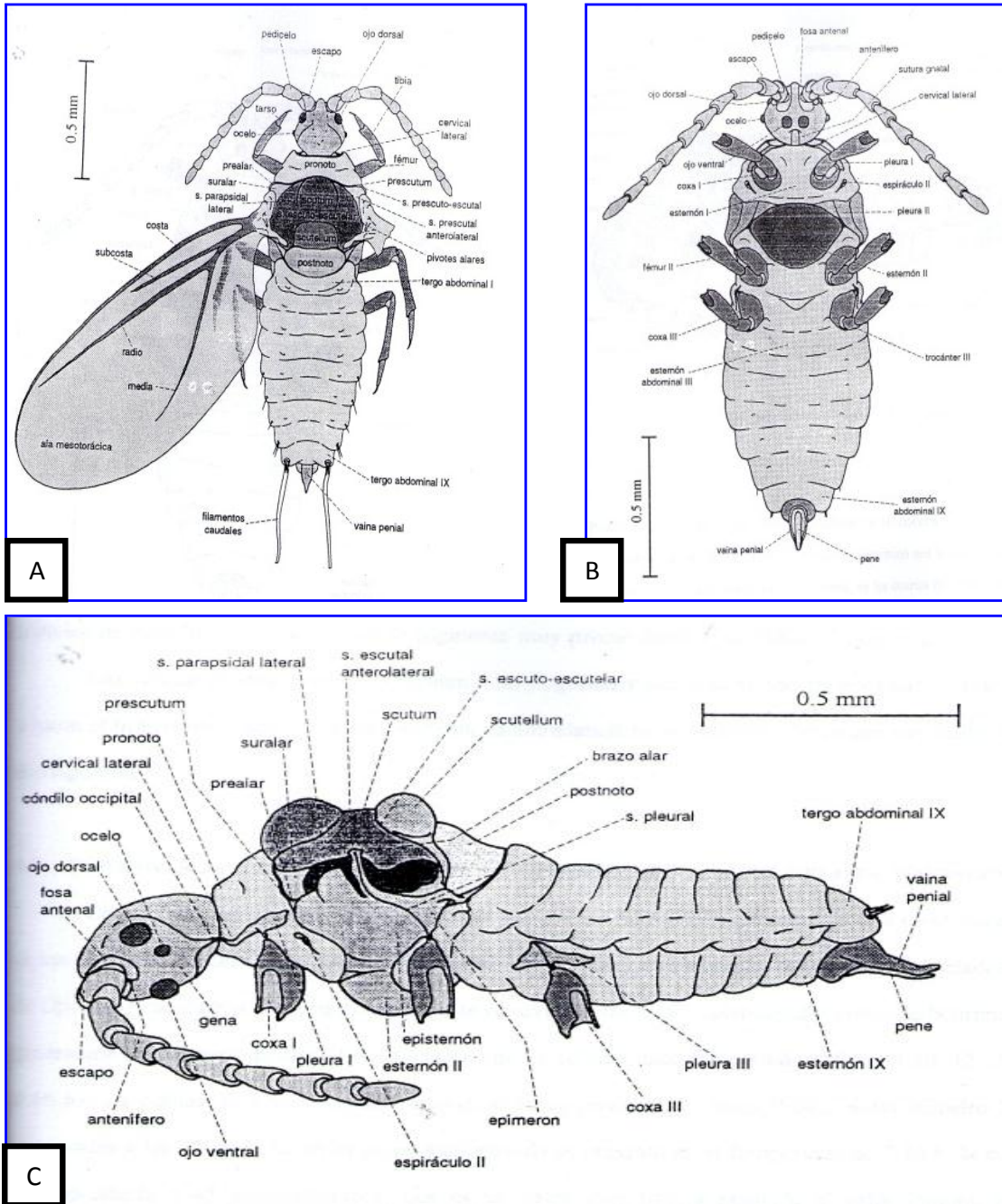


Figura 47. Esquema de macho de grana cochinilla, A. Vista dorsal, B. Vista ventral, C. Vista lateral. (Tomado de Montiel, 1995)



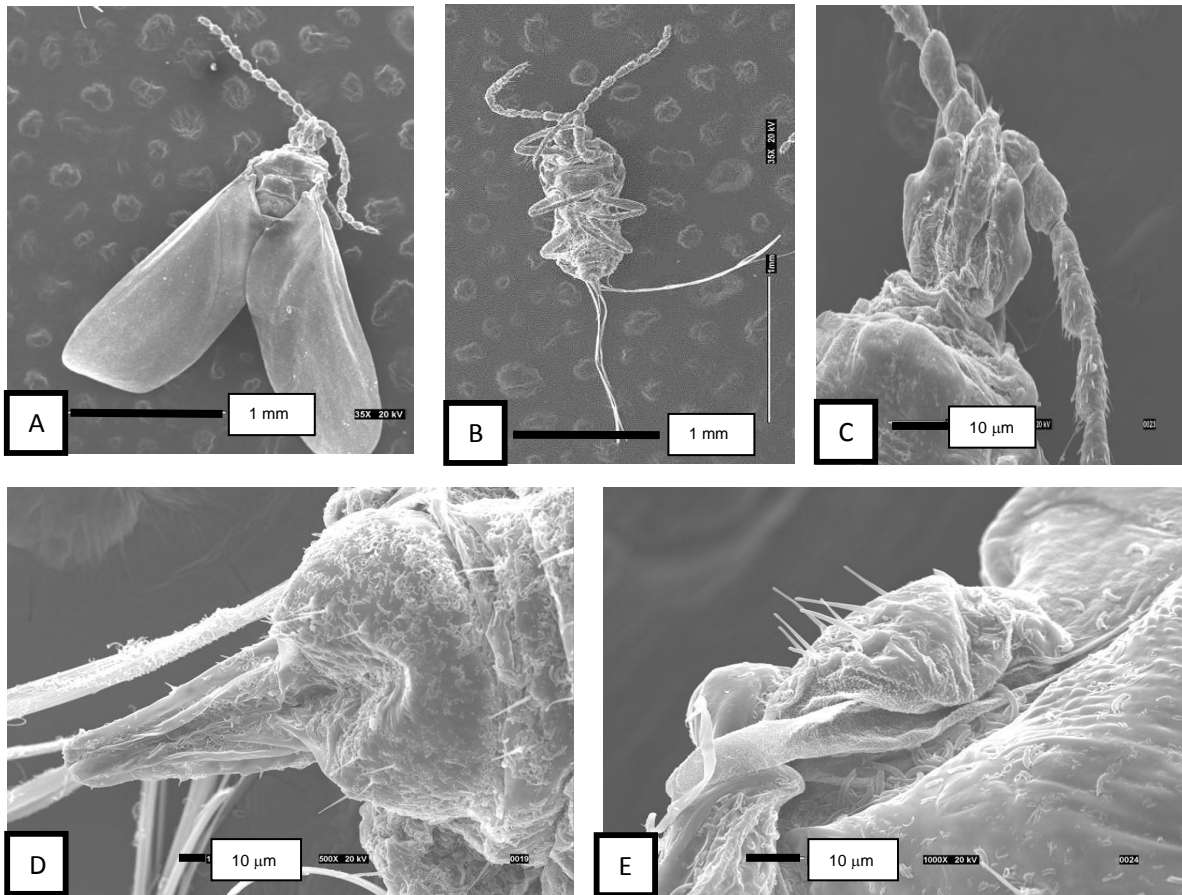


Figura 48. Electromicrografías de macho de grana cochinilla. A, vista dorsal, 35x. B, vista ventral sin alas, 35x. C, región de la cabeza, 200x. D, acercamiento a la región anal, 500x. E, base del ala, 1000x.

## ESTRUCTURAS TEGUMENTARIAS

Sobre su cutícula, la grana cochinilla presenta diversas estructuras quitinosas llamadas sedas y túbulos (Figuras 49 y 50), poros quinqueloculares (Figura 51) por medio de los cuales se produce la coccerina y en especial el aparato bucal (Figura 52) que permite a la grana cochinilla la penetración de la cutícula del hospedero y su alimentación.

### SEDAS Y TÚBULOS



Figura 49. Esquema de los tipos de estructuras tegumentarias reportadas en la grana cochinilla. (Tomado de Pérez y Kosztarab, 1992).

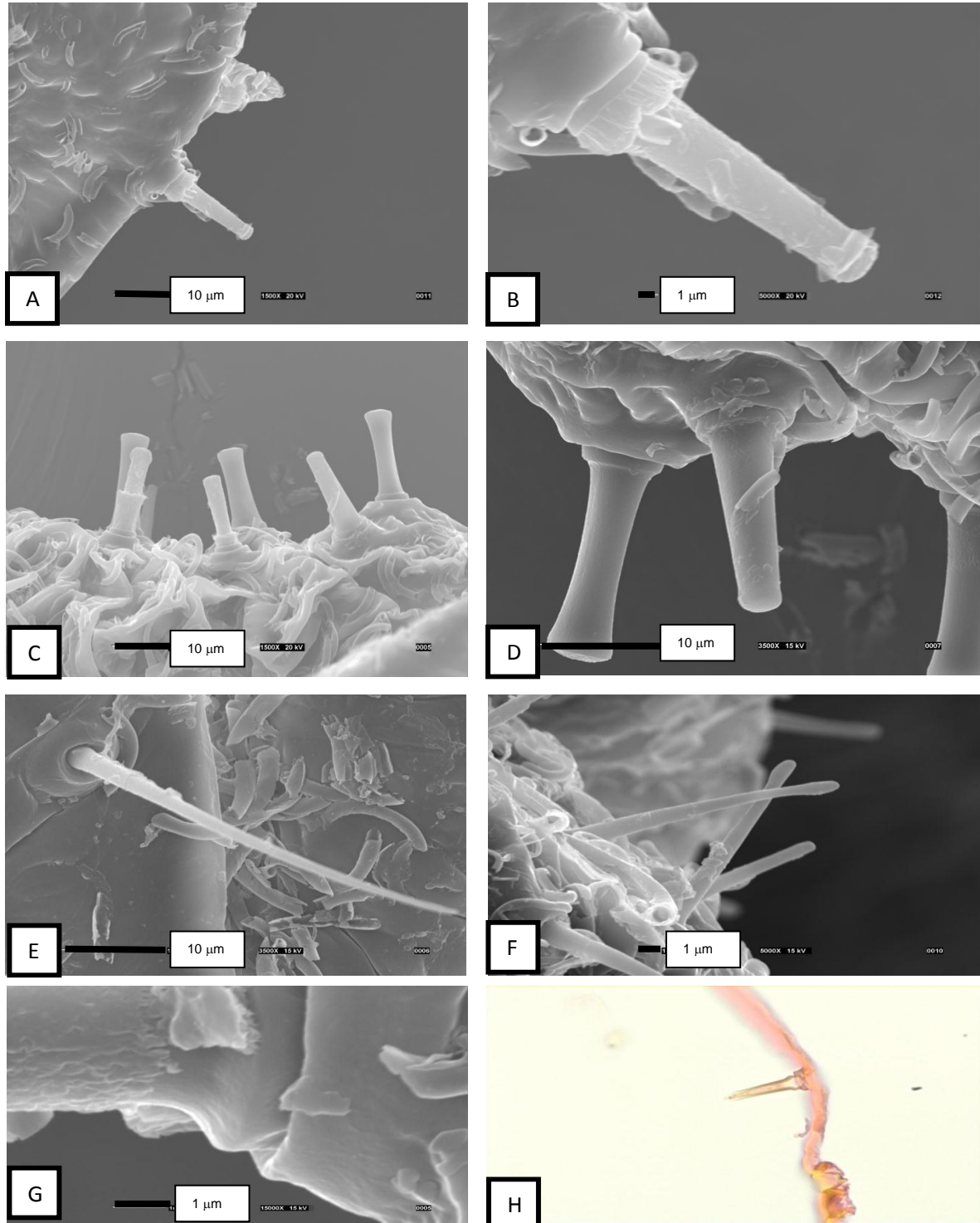


Figura 50. Electromicrografías de los tipos de accesorios tegumentarios de grana cochinilla. A) Túbulo en ninfa I, 1500x. B) Túbulo en ninfa I, 5000x. C) Túbulo en ninfa I, 1500x. D) Túbulo en ninfa I, 3500x. E) Seda en ninfa I, 3500x. F) Sedas en macho, 5000x. G) Detalle de la base de un túbulo en ninfa I, 15000x. H) Túbulo en ninfa II, 100x, tinción HE.

## POROS QUINQUELOCULARES

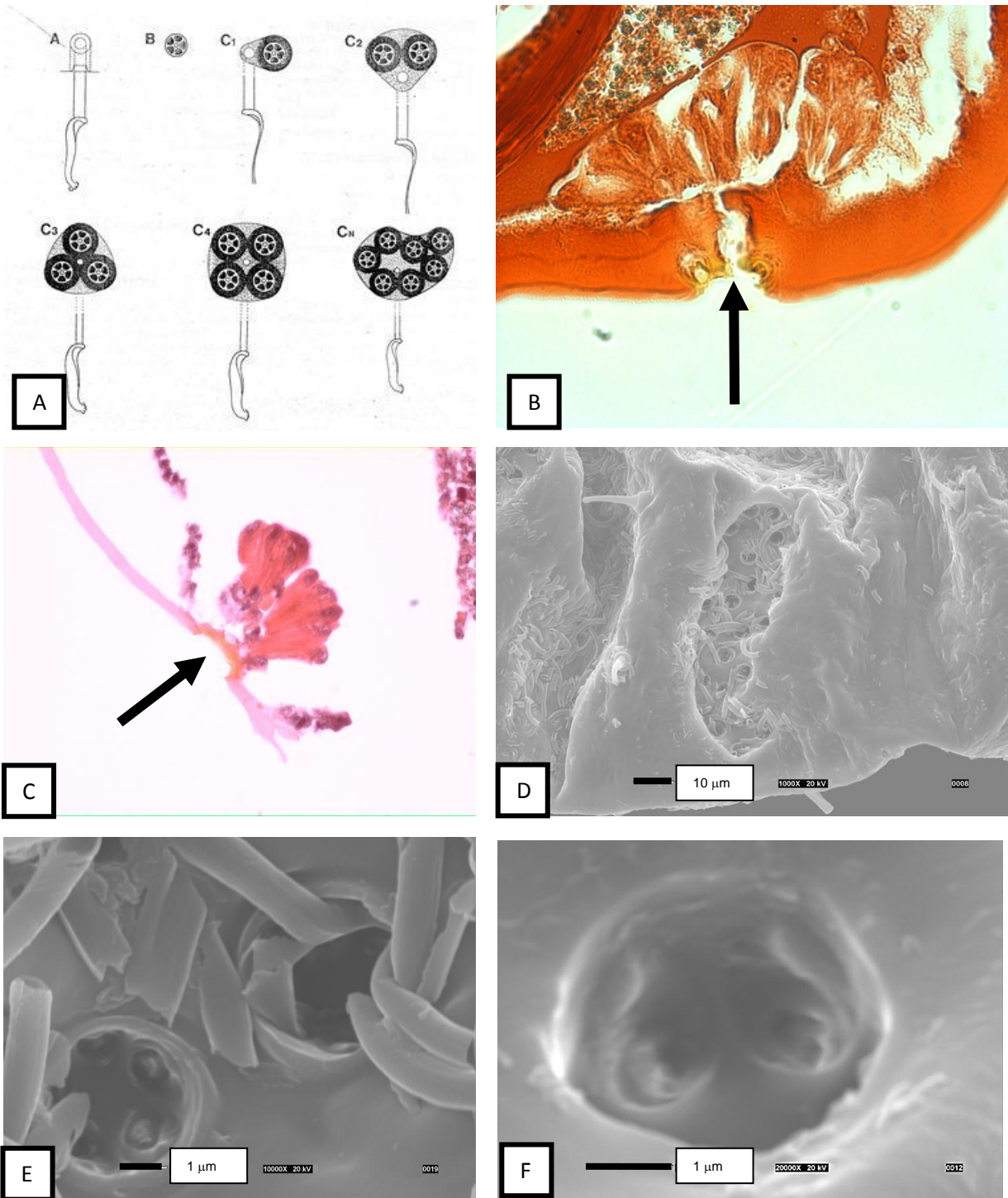


Figura 51. Poros quinqueloculares, A) Diferentes tipos de poros reportados en grana cochinilla (Tomado de Pérez y Kosztarab, 1992). B) Poro quinquelocular en hembra adulta (flecha), microscopio compuesto, 40x, tinción HE. C) Poro quinquelocular en ninfa II (flecha), microscopio compuesto, 40x, tinción HE. D) Electromicrografía de agrupación de poros en parte ventral de ninfa II, 1000x. E) Electromicrografía de poro quinquelocular, 10000x, F) Detalle de poro quinquelocular, 20000x.



## APARATO BUCAL Y ESTILETES.

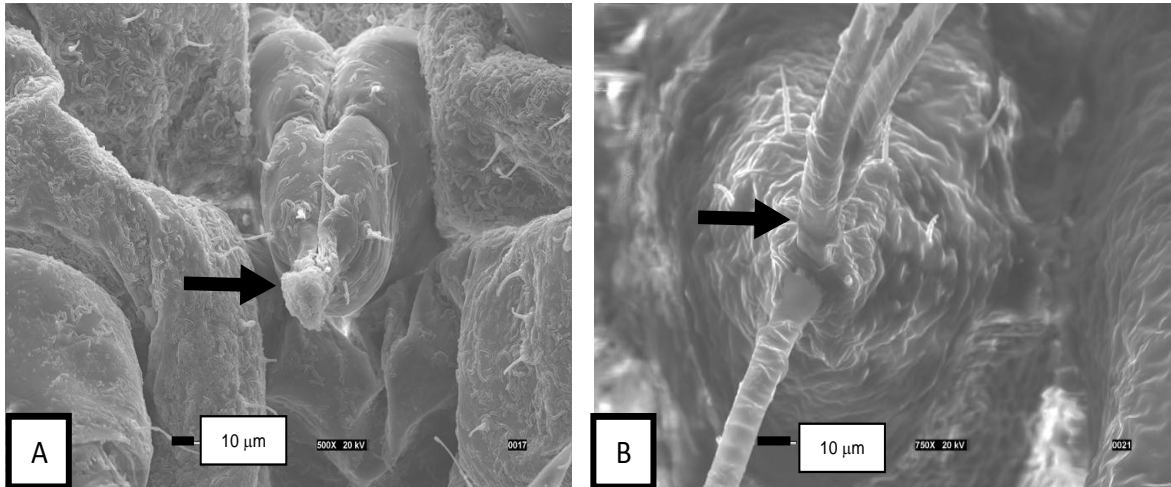
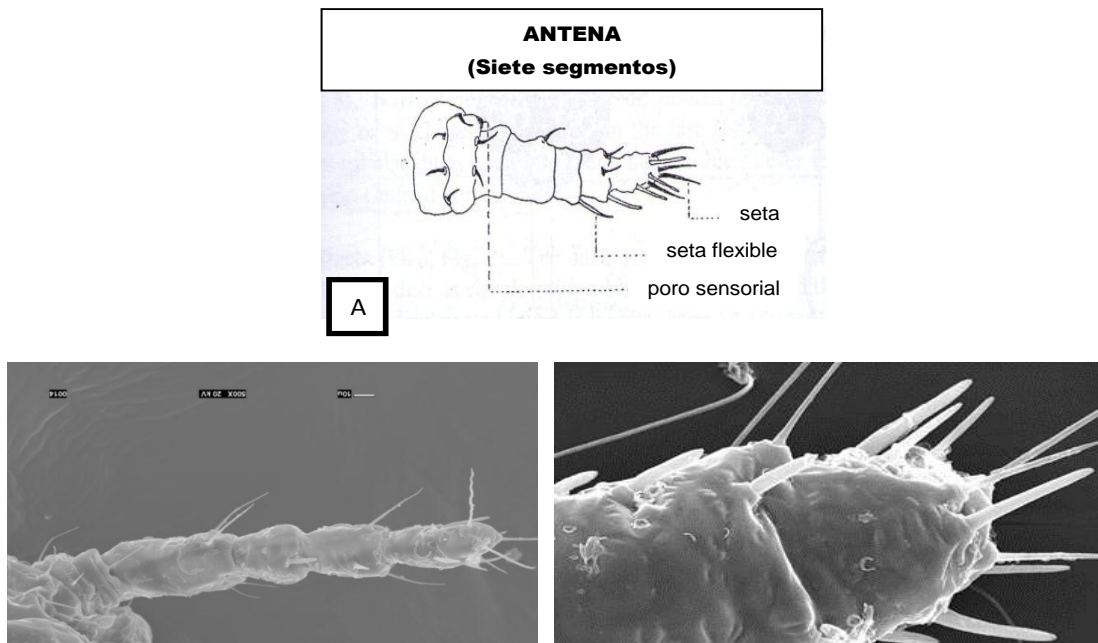


Figura 52. Electromicrografías de aparato bucal con estiletes de grana cochinilla. A) Ninfa II, 500x. B) Hembra adulta, 750x.

## ANTENAS

Son prolongaciones quitinosas especializadas, presentan en general 7 segmentos y una serie de prolongaciones que sirven como aparatos sensoriales al insecto. (Figura 53).



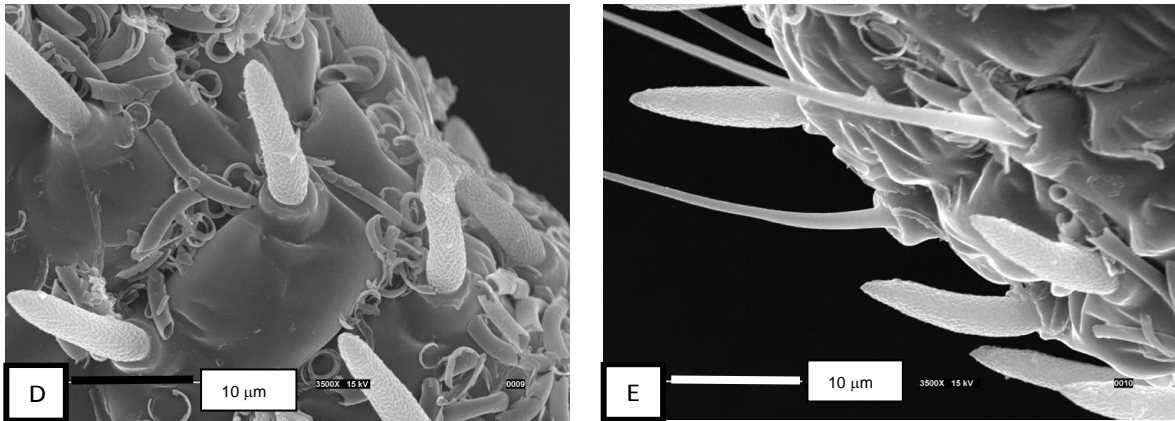


Figura 53. Electromicrografías de antenas de grana cochinilla. A) Esquema de una antena de Hembra de grana cochinilla (Tomado de Pérez, 1992). Electromicrografías de antena de grana cochinilla. B) Antena de macho, 500x. C) Antena de macho, 1500x. D y E) Antena de macho, 3500x.

## PATAS

Son el medio de locomoción de la grana cochinilla, pero sólo las utiliza en la fase de ninfa, ya que en la fase adulta quedan atrofiadas (Fig. 54)

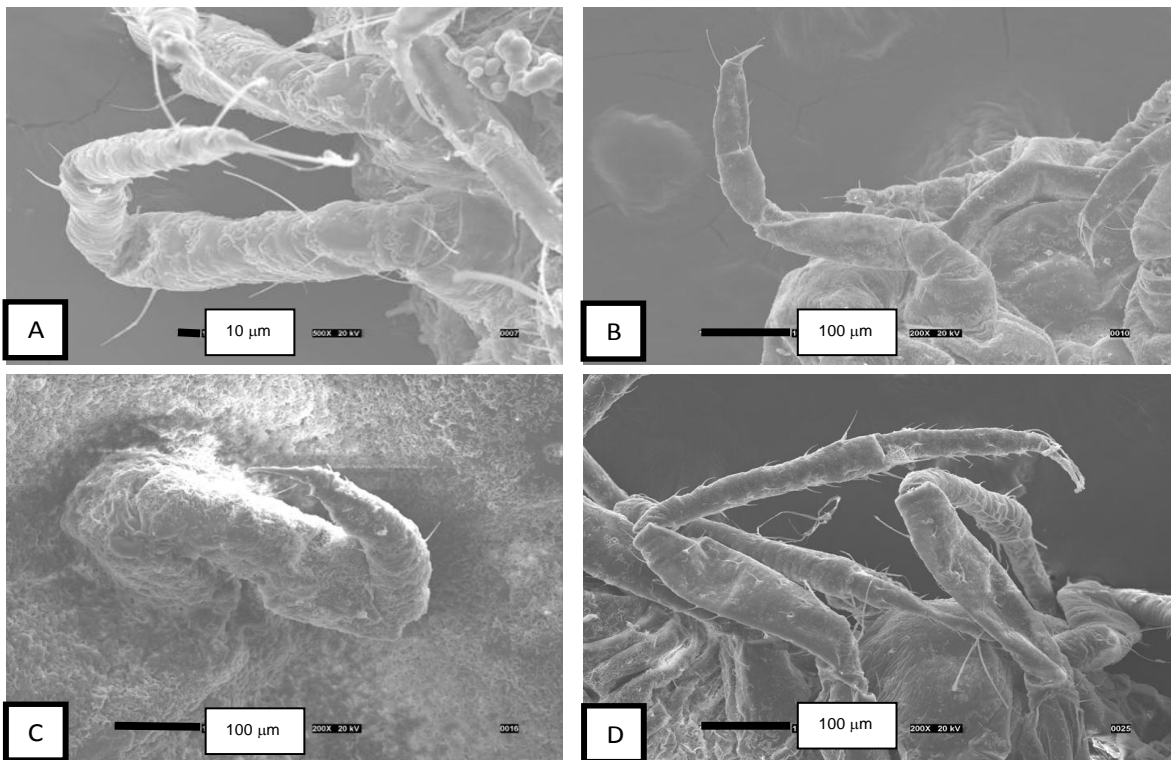


Figura 54. Electromicrografías de patas de grana cochinilla. A) ninfa I, 500x. B) ninfa II, 200x. C) hembra. D) macho.

## ESPIRÁCULO

Es la estructura que le permite a la grana cochinilla respirar, se encuentran principalmente en posición ventro-lateral del insecto (Figura 56).

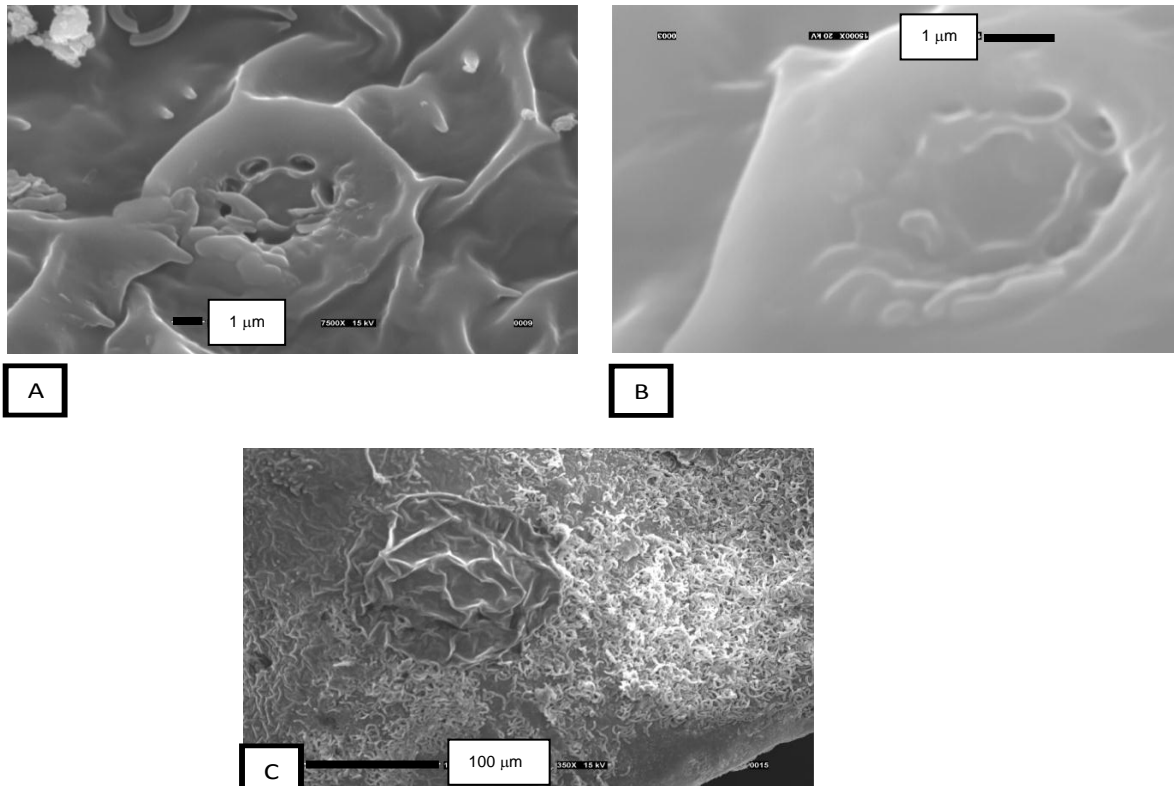


Figura 55. Electromicrografías del espiráculo de grana cochinilla. A, ninfa I, 7500x. B, ninfa II, 15000x. C, hembra adulta, 350x.

### **Infestación de hospederos alternativos por *D. coccus* y el rendimiento en la producción de ácido carmínico**

La grana cochinilla no logró instalarse en ninguna de las especies de hospederos alternativos que fueron infestados, sólo se pudo observar la muda a estadio de ninfa II, luego de ello, el insecto desapareció de la superficie de las especies en estudio, dando por hecho que no logró alimentarse y murió.





Figura 56. Panorámica del proceso de infestación de hospederos alternativos. A) Plantas control infestadas y el resto de cactáceas sin presencia de grana. B) Detalle de nopal control a los 90 días post-infestación. C) *Clindropuntia tunicata* a los 30 días post-infestación. D) *Clindropuntia tunicata* a los 30 días post-infestación, muestran las ninfas I que no lograron establecerse. E). *Helyocerus* a los 30 días post-infestación, F) *Marginatocereus* a los 30 días post-infestación.



Figura 57. Comparación de cladodios de *Opuntia ficus* y *Opuntia robusta* infestados con grana cochinilla. La infestación se realizó en la misma fecha y los cladodios fueron mantenidos bajo las mismas condiciones, Se puede observar la dificultad de la grana para su desarrollo sobre éstas últimas.

## DISCUSIÓN

La concentración de ácido carminico presente en la grana cochinilla es muy importante para determinar la cantidad de colorante que se obtendrá durante los procesos industriales de extracción (Briseño y Llanderal, 2008). En el presente trabajo se determinó que la concentración de ácido carminico varía según el tamaño y la etapa de desarrollo del insecto.

La coccerina es una cera con la que la grana cochinilla se recubre como una protección a las inclemencias ambientales, como el calor y la radiación solar. Esta grasa es retirada por los industriales para tener extractos más puros, pero en realidad no se sabe si la presencia de dicha coccerina tiene efecto sobre el rendimiento de los procesos de extracción. Se estudiaron tres procesos de desengrasado con tres solventes diferentes, y se determinó que no existe interferencia en cuanto a la concentración de ácido carminico en granas desengrasadas y no desengrasadas. Por tanto, las muestras de grana cochinilla no se desengrasaron, ya que el proceso no demostró ser necesario ni para las determinaciones por electroforesis ni para los estudios de citometría de flujo, permitiendo ahorrar en tiempo y gasto de reactivos, además, como se pudo apreciar al obtener los solventes, suelen extraer colorante por lo que no es conveniente su uso, ya que puede causar una lectura errónea al hacer la determinación de la concentración de ácido carminico.

La única técnica actual utilizada para medir la concentración de ácido carminico en muestras de grana cochinilla es por espectrofotometría con una lectura a 494 nm (NOM-119-SSA1-1994). No existe un protocolo establecido para la determinación de la concentración de ácido carminico por electroforesis capilar en muestras de grana cochinilla seca. Huang *et al.* (2002, 2003 y 2005) y Jaworska *et al.* (2005) utilizaron la electroforesis capilar para medir la cantidad de ácido carminico en alimentos y bebidas; todos han coincidido en el uso de capilar de sílica fundida de 65 cm de longitud y 50  $\mu$  de diámetro, así como un buffer de corrida alcalino, con un pH de 9.2, aunque la mayoría utilizan Tetraborato de sodio o ácido bórico a 40 mM. El voltaje, presión, tiempo de inyección y la longitud de onda para la lectura son variables. (Berzas.1999; Huang, 2003; Puchalska, 2003; Huang, 2005; Jaworzka, 2005; López, 2007 y Maguregui, 2007). En este trabajo se desarrolló y se validó un nuevo método para la determinación de la concentración de ácido carminico por electroforesis capilar, demostrando ser un método

sensible, específico y reproducible según los parámetros de la Guía de validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (Guía, 2002). Por lo anterior, se modificó y optimizó esta técnica para medir la concentración de ácido carminico en las diferentes etapas del ciclo biológico de grana cochinilla. En este contexto, considerando las características de la electroforesis capilar, se considera que esta técnica podría ser una alternativa para la medición oficial de ácido carmínico en muestras de grana cochinilla en México y a nivel internacional.

Comercialmente existen diferentes calidades de la cochinilla seca. La principal característica para diferenciar la calidad de la grana es el tamaño. La más grande (mayor de 2 mm) es de primera calidad, las medianas (entre 1-2 mm) son de segunda calidad y las más pequeña (menos de 1 mm) es de tercera calidad (Méndez, 2001). Aunque el precio internacional sufre variaciones continuas, este siempre va de acuerdo a la calidad de la grana seca (Méndez, 2001; Portillo y Vigueras, 2013). En este estudio se encontró que las hembras más pequeñas (AI y ANFI con peso vivo de 0.005 a 0.015g) presentaron mayor concentración de ácido carmínico que las hembras de mayor tamaño. Nuestras observaciones concuerdan con la realizadas por Rodríguez *et al.* (2005) que observó que las granas de mayor peso poseen menor concentración de ácido carmínico que las de menor peso.

Por análisis estadístico ANOVA, se determinó que sí existe diferencia significativa ( $p > 0.05\%$ ) de la concentración de ácido carminico entre algunas fases y al aplicar la prueba de Tukey, mostró diferencia entre las fases de ninfa I y ninfa II con respecto a todas las demás fases estudiadas; también indica que la fase de adulta I tiene la mayor concentración de ácido carminico de todas las fases estudiadas. Por lo tanto, concluimos que la concentración de ácido carmínico de la grana cochinilla clasificada según Méndez-Gallegos como de primera calidad, es menor que la que se obtiene de las de segunda y tercera calidad. Por esto, la etapa de hembra adulta de menor tamaño, es de donde se obtiene la mayor concentración de ácido carminico y no la de mayor tamaño como piensan los productores e industriales. Se deben tomar en cuenta estos hallazgos para reconsiderar la clasificación actual de las calidades de grana, así como el precio de las mismas en el mercado.

El color de los huevos de la grana cochinilla es rojo, lo que ha llevado a muchos productores y autores a creer que las hembras adultas que han ovipositado tienen menor

cantidad de ácido carmínico que aquellas que no han ovipositado (Berrilla, 1998; Flores, 1996; Ventura, 1996). Otros autores como Tekelenburg (1995) recomiendan que las hembras se dejen ovipositar por 12 días antes de ser cosechadas. Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos afirmar que las hembras que han ovipositado presentan un mayor porcentaje de ácido carmínico que las hembras que no han ovipositado, en especial, las hembras que llevan entre 4 a 7 días posteriores al inicio del periodo de oviposición. Aunque las hembras que han ovipositado disminuyen su peso y por lo tanto tendrían menor valor en el mercado, de acuerdo a los parámetros actuales de clasificación, se tiene por un lado el valor de la recría y por el otro una mayor concentración de ácido carminico.

Entre la fase adulta IV y la fase de postoviposición I (AOVI), no existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05\%$ ) en la concentración de ácido carmínico, además, no existe una diferencia significativa ( $p > 0.05\%$ ) entre ninguno de los días posteriores a la ovoposición, por lo que podemos concluir que las fases de grana adulta pueden dejarse en proceso de ovoposición y que no importa en qué momento de ésta última etapa se sacrifiquen, el colorante no varía en concentración dentro del cuerpo del insecto.

La hemolinfa de la grana cochinilla presenta varios tipos de células y corpúsculos (Caselín *et al.* 2008), entre ellos los llamados glóbulos de ácido carmínico, los cuales contienen en su interior el pigmento de interés. La citometría de flujo permite contar y caracterizar células en suspensión, además de que la fuente de láser que utiliza el equipo puede estimular al ácido carminico haciéndolo fluorescer. No existen antecedentes del uso de la citometría de flujo para la lectura de muestras de hemolifa de grana cochinilla, por lo que en el presente estudio se desarrolló y utilizó esta metodología de forma innovadora para calcular el tamaño y la fluorescencia de los glóbulos presentes en la hemolinfa de diferentes fases de grana cochinilla. Los glóbulos de ácido carmínico demostraron tener diferente tamaño y diferente intensidad de fluorescencia, así como que el porcentaje de presentación de los glóbulos varía según la etapa del insecto que se esté estudiando.

La evaluación por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia que alcanzan los glóbulos de ácido carmínico de las fases estudiadas, se nota en el gran aumento de intensidad que se presenta en las fases posteriores a la oviposición, que aunado al aumento del número de glóbulos de tamaño mediano y grande, evidencia que el tamaño del glóbulo y la cantidad de colorante dentro de ellos están relacionados



Al hacer un estudio comparativo, se encontró una correlación positiva entre la concentración de ácido carmínico obtenida por electroforesis capilar y la fluorescencia total presente en los glóbulos de las diferentes fases de grana medida por citometría de flujo. Lo anterior confirma que el ácido carmínico se encuentra concentrado dentro de glóbulos presentes en la hemolinfa, aunque todavía es desconocido su lugar específico de síntesis.

Se hizo una comparación entre hembras fertilizadas y hembras no fertilizadas para determinar si existe diferencia en la concentración de ácido carminico y si hay diferencia en el porcentaje de glóbulos de ácido carminico en la hemolinfa de estas hembras, así, se realizó el estudio tanto en electroforesis capilar como por citometría de flujo y se pudo determinar que no existe diferencia significativa entre las concentraciones del colorante en ambos grupos, aunque sí hubo diferencia en los porcentajes de glóbulos de las diferentes intensidades y tamaños estudiados. Se puede concluir por tanto que no sería rentable evitar el apareamiento de las hembras, ya que implica gasto de material y mano de obra, lo mejor es permitir la fertilización y nuevamente, al igual que en el caso del proceso de ovoposición, tener el beneficio del colorante y la obtención de insectos para nuevas infestaciones.

Gracias a los cortes histológicos realizados a las diferentes fases de la grana cochinilla pudimos evidenciar que el colorante se encuentra presente en todas las fases (huevo, ninfa I, ninfa II, hembra y macho adultos), y que en todas ellas está distribuido por todo el cuerpo del insecto, incluyendo apéndices y cutícula. La coloración propia permite distinguir diferentes estructuras internas del insecto, y éstas mismas estructuras presentan mejor contraste en los cortes teñidos con técnica HE. Se logró evidenciar que los huevos dentro de las hembras adultas tienen diferentes fases de desarrollo, observación reportada por Ramírez (2010).

Los cortes histológicos se observaron bajo microscopio de luz ultravioleta para observar la fluorescencia propia del ácido carminico, encontrando que efectivamente, el colorante se distribuye por todo el insecto, y que hay ciertos lugares donde se intensifica la fluorescencia, principalmente en los huevos en desarrollo, lo cual indica que desde las primeras fases de desarrollo de los huevos, se sintetiza y acumula el colorante (Ramírez, 2010).

Los cortes histológicos de la grana cochinilla se sometieron al proceso de tinción con la técnica H-E y aunque se pensó que los colorantes ocultarían el ácido carmínico, cuando los cortes histológicos se observaron bajo el microscopio de luz ultravioleta, al parecer este proceso de tinción tiene cierta influencia sobre las características fluorescentes del ácido carminico, haciéndolo más brillante bajo el microscopio de luz ultravioleta, permitiendo identificar la presencia del colorante en las diferentes estructuras internas del insecto. Como hallazgo curioso se notó que en el caso de los cortes teñidos, la fluorescencia se nota desde el objetivo seco débil, pues en los cortes histológicos sin teñir, la fluorescencia se aprecia sólo con los objetivos de seco fuerte e inmersión.

Cabe destacar que la quitina presentó intensa fluorescencia en los cortes histológicos de grana cochinilla observados bajo luz ultravioleta, por lo que se realizaron cortes histológicos de insectos que no presentan ningún otro tipo de pigmento. Se observó que efectivamente la quitina presenta fluorescencia y que en los órganos internos de los insectos la fluorescencia es mínima, comparativamente con la que se presenta en los órganos internos de la grana cochinilla, que fluorescen por la presencia de ácido carminico en dichos órganos internos.

Según Stapeifeidt (1993) el ácido carminico pierde fluorescencia en presencia de soluciones alcalinas, y la hematoxilina utilizada en el tren de tinción tiene un pH de 9, por lo que unas laminillas de grana cochinilla se tiñeron únicamente en hematoxilina, para comprobar si dicha fluorescencia se perdía. Se pudo observar que los cortes histológicos teñidos sólo con hematoxilina no perdieron la fluorescencia y siguen dando imágenes fluorescentes al ser observados bajo el microscopio de luz ultravioleta.

Aunque se ha reportado que la grana cochinilla puede infestar otras especies de cactáceas (Portillo, 2008 y Portillo y Viguera, 2010) así como diferentes especies de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, en éste estudio se muestra que las especies más comunes del norte del Estado de México (Bravo, 1978), infestadas con hembras adultas ovíparas, no pudieron ser infestadas, lo que demuestra que *Opuntia ficus* es el hospedero ideal para el desarrollo de la grana cochinilla y deberá ser la especie de elección en granjas productoras del insecto.

Existe poca información confiable acerca de la producción de grana a nivel mundial, probablemente debido a que esta se produce principalmente en zonas de bajo nivel socioeconómico y con acceso limitado a nuevas tecnologías. Este trabajo muestra que los

criterios actuales para clasificar la grana cochinilla no son los adecuados, puesto que la grana de tercera clase es la que mayor concentración de ácido carmínico presenta. Futuros estudios que consideren los procesos industriales y los datos obtenidos en este trabajo probablemente servirán de base para modificar los criterios de clasificación y de determinación de la concentración de ácido carminico que existen en la actualidad.

## CONCLUSIONES

- 1.- La concentración de ácido carminico varía según la etapa de maduración del insecto y la etapa de hembra adulta de entre 0.005 y 0.015 g de peso vivo, la que presenta la mayor concentración del colorante.
- 2.- Los glóbulos de ácido carminico varían en tamaño y concentración de colorante en las diferentes etapas de maduración del insecto, siendo las hembras no fertilizadas y de entre 0.005 a 0.015 g de peso vivo, las que presentan mayor cantidad de glóbulos grandes y con un mayor factor de fluorescencia determinados por citometría de flujo.
- 3.- Por medio de cortes histológicos, se observó que el ácido carminico se encuentra en todas las etapas y se distribuye en todo el cuerpo de la grana cochinilla.
- 4.- La microscopía electrónica muestra estructuras del insecto que no han sido fotografiadas con anterioridad.
- 5.- El proceso de oviposición aumenta la concentración de ácido carminico en los primeros 1 a 3 días de iniciado el proceso, disminuye sensiblemente en los días 4 a 7, aumentando nuevamente a partir del día 8 de iniciada la oviposición.
- 6.- *Dactylopius coccus* no es capaz de infectar cactáceas de otros géneros diferentes a *Opuntia* y *Nopalea*. La especie que debe ser utilizada en centros productores de grana cochinilla debe ser *Opuntia ficus*.
- 7.- La electroforesis capilar es una metodología que puede ser utilizada para la determinación de la concentración de ácido carminico, ya que en las pruebas de validación del método así lo demostraron.

## Variation in the Concentration of Carminic Acid Produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopidae) at Various Maturation Stages

H. L. FLORES-ALATORRE,<sup>1,2</sup> V. ABREGO-REYES,<sup>3</sup> J. A. REYES-ESPARZA,<sup>4</sup> E. ANGELES,<sup>3</sup>  
AND F. ALBA-HURTADO<sup>4,5,6</sup>

J. Econ. Entomol. 107(4): 1700–1705 (2014); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EC13475>

**ABSTRACT** The concentration of carminic acid was found to vary based on the size and life cycle stage of the cochineal, *Dactylopius coccus* Costa. The concentration of carminic acid in cochineal eggs, nymph I, nymph II, fertilized adults, ovipositing adults, and sterile adults female was measured using capillary electrophoresis, and the total fluorescence of the carminic acid globules was measured using flow cytometry. The smallest sterile adult females had a greater percentage of carminic acid relative to their weight (26.27%;  $P < 0.001$ ) than adult females in the remaining groups. In general, ovipositing females had a greater percentage of carminic acid than the remainder of the females. Nymph II was the phase that had the smallest percentage of carminic acid. Using flow cytometry, it was demonstrated that ovipositing females had a greater total fluorescence than the other sampled groups ( $P < 0.05$ ). A positive correlation was found between the percentage of carminic acid and the total fluorescence of the carminic acid globules ( $r^2 = 0.68$ ;  $P < 0.05$ ). The results of this study, together with others that involve industrial processes, shall allow an improvement of the current classification criteria of the commercial quality of dry cochineal.

**KEY WORDS** *Dactylopius coccus*, carminic acid, flow cytometry, capillary electrophoresis

*Dactylopius coccus* Costa, commonly known as cochineal, is a parasitic insect of prickly pears. Carminic acid can be extracted from adult females. Carminic acid is a natural coloring that is useful to many industries. According to the U.S. Food and Drug Administration (FDA), it does not require certification for its use (FDA 2005). Because it is an innocuous and safe compound to ingest or apply topically, carminic acid is considered to be a good option for coloring pharmaceuticals, food, cosmetics, and handcrafted textiles (Stapelfeldt et al. 1993, Llanderal and Nieto 2001).

Cochineal is marketed in different forms. The primary type is dry cochineal. This type is also known as silver cochineal because of the silver coloring of the dry form and the presence of coccerin residues that remain on it. The prices vary based on product supply

and demand, with a variation between US\$19–40 per kilo. Recently, it has become more common to value cochineal by the percentage of carminic acid content (Portillo and Viguera 2013). Carmine (insoluble calcium–aluminum complex) is the formulation of the coloring used in the industry (Grant et al. 1987), and the cost is  $\approx 2,400$  Mexican pesos per liter or  $\approx$  US\$185 (Portillo and Viguera 2013).

*D. coccus* has a hemimetabolic type of biological cycle. The female matures through the egg, nymph I (NI), nymph II (NII), and adult phases. In the final phase, it mate and amasses volume. After fertilization, the eggs develop and mature within the mature female; afterwards, the females will lay the eggs over the course of 10–15 d (ovipositing stage). The NI hatch several minutes after the egg has been laid. Males develop from the NII stage, and they form a cocoon to undergo metamorphosis (prepupae and pupae phases). They then emerge as winged insects ready to copulate. As the proboscis in males is atrophied, they do not feed and they will die after a few days. The full cycle lasts an average of 90 d and depends on the environmental conditions, particularly the temperature (Rodríguez et al. 2005).

The hemolymph of the cochineal has a series of cells and corpuscles, including the globules that transport carminic acid, which are also called carminic acid corpuscles (Caselín et al. 2008). Carminic acid is fluorescent (Stapelfeldt et al. 1993). Therefore, the glob-

<sup>1</sup> Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. México.

<sup>2</sup> División de Biotecnología, Universidad Tecnológica de Tecámac, México.

<sup>3</sup> Laboratorio de Química Medicinal, Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México.

<sup>4</sup> Laboratorio de Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

<sup>5</sup> Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México. Km. 2.5 carr. Cuautitlán-Teoloyucan, Col. San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Edo de México. México. CP: 54714.

<sup>6</sup> Corresponding author, e-mail: fealba@hotmail.com.

ules are fluorescent and can be counted and characterized using flow cytometry (Flores-Alatorre et al. 2010).

Farmers and researchers have discussed what cochineal phase has the greatest concentration of carminic acid, and is therefore ideal for harvesting. To help clarify this conversation, this study focused on the concentration of carminic acid that was present at the various stages of the cochineal biological cycle.

#### Materials and Methods

**Cochineal.** The breeding stock that was used to start the production of *D. coccus* was donated by the Rural Cochineal Producers Association of Nopaltepec in the State of Mexico. The cochineal colony was maintained for several years at the Technological University of Tecámac in the State of México.

The cochineals were inoculated in prickly pear cacti (*Opuntia ficus* (L.) Miller) by placing 30 mature females in a tulle bag over horizontal cladodes. Individual NI scrawled through the bag tissue and spread over the surface of the cladodes, where they attached and continued their development. After 15 d, a disinfected, galvanized wire was strung through the base of the cladode, and the cladodes were hung on galvanized pipes. During the entire cycle, the cladodes were kept in a cement room with translucent roof sheets that had washable surfaces. The temperature was kept at 15–30°C, a relative humidity of 65–85%, and natural lighting.

The Atlxco variety of the prickly pear cactus (*O. ficus*) was used for maintenance and infestation by the cochineals. The cladodes were cut 15 d before infestation. The cladodes that were between 6–8 mo, 35–40 cm in length, had homogenous green surfaces, and were without scars or spots were selected.

**Experimental Design.** The cochineal insects that were in the NI phase, identified by their mobility from the tulle bags toward the prickly pear surface, were collected at 3 d postinfestation (p.i.). The cochineal insects that were in the NII phase were gathered from the cladodes at 35 d p.i. through selection of cochineal that had an oval shape and were covered in coccerin (De Haro and Claps, 1995). The fertilized adult females (FF) were collected at 90 d p.i. Even though all of the females were the same age, it was evident that they did not develop homogeneously. Therefore, the females were weighed after their collection and the following groups were formed: fertilized female I (FFI), which weighed between 0.005 and 0.015 g; fertilized female II (FFII), which weighed between 0.016 and 0.030 g; fertilized female III (FFIII), which weighed between 0.031 and 0.045 g; and fertilized female IV (FFIV), which weighed  $\geq 0.046$  g. The separated females were processed immediately by capillary electrophoresis or by flow cytometry.

To evaluate the quantity of carminic acid present in females during ovipositing, 600 mature females weighing between 0.040 and 0.045 g were collected at 90 d p.i. They were then placed in 60 groups ( $n = 10$ ) that were transferred onto clean cladodes. Three groups of

cochineals were collected daily for the following 10 d, and they were processed by capillary electrophoresis. Another three groups of cochineals were collected in a similar manner for processing by flow cytometry. The data were collected and separated into the following groups: ovipositing female I (OFI) females collected at days 1–3 of ovipositing; ovipositing female II (OFII) females collected at days 4–7 of ovipositing; and ovipositing female III (OFIII) females collected at days 8–10 of oviposition. All OF collected were immediately processed by capillary electrophoresis or flow cytometry.

Sterile females were obtained by covering the NII that had adhered to the cladodes with perforated plastic containers to allow for airflow, but to prevent the entrance of adult males. Sterile females were collected at 90 d p.i. Each insect was weighed and grouped in the following manner: sterile female I (SFI), which weighed between 0.005 and 0.015 g; sterile female II (SFII), which weighed between 0.016 and 0.030 g; sterile female III (SFIII), which weighed between 0.031 and 0.045 g; and sterile female IV (SFIV), which weighed  $\geq 0.046$  g. All SF collected were immediately processed by capillary electrophoresis or flow cytometry.

The eggs were obtained by making a dorsal incision in the abdomen of 90-d p.i. mature females. They were then washed with physiological saline solution and immediately processed by capillary electrophoresis.

Capillary electrophoresis experiments were carried out four times, and flow cytometry experiments were carried out three times.

**Capillary Electrophoresis.** The collected cochineal and eggs were dried at 50°C over 5 d, and they were later ground. In total, 10 mg of powder was dissolved in 50 ml (200 ppm) of deionized water. The solution was constantly stirred for 20 min in a hot water bath at a temperature of 50°C. Afterwards, the solution was filtered using a 0.22- $\mu$ m nylon membrane, placed in vials and then read in triplicate with the electrophoresis equipment.

Beckman Coulter capillary electrophoresis equipment was used in conjunction with 32 Karat software (Beckman Coulter, Fullerton, CA) to record the data. The capillary was composed of molten silica that was 65 cm in length and 50  $\mu$ m in diameter. The window was at 56 cm and was used at 0.5 psi pressure and 30 Kv electrical current. A 40 mM boric acid buffer at a pH of 9.27 was injected hydrodynamically to fill the capillary, after the solution of cochineal was injected during 7 s, and the running time was 5 min with the lamp set at a 254 nm wavelength (Jaworzka et al. 2005, López-Montes et al. 2007). The studies of precision, linearity, specificity, and reproducibility were carried out using the methodology detailed in the Analytical Methods Validation Guide of the Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos de México, A.C. (Guía de 2002). A standard carminic acid direct calibration curve was used (Sigma C3522, Natural red 4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 250, 200, 150, 100, and 50 ppm dilutions. Three readings of each sample were carried out, and the curve was repeated two

additional times. The area under the curve was calculated from the observed peaks, and the concentration of carminic acid was determined for each unknown sample by applying a linear regression model. The following formula, which resulted from the standard concentration curve, was applied to each value obtained. The resulting concentration of carminic acid in the samples of cochineal was expressed as a percentage of total sample:

$$\%AC = \left( \frac{x - 2090.3}{325.19} \right) 0.5,$$

where:

%AC = percentage of carminic acid of total sample.

$x$  = area under the curve reported by the capillary electrophoresis equipment.

2090.3 = slope of the straight line (obtained by the linear regression).

325.19 = intercept (obtained by the linear regression).

0.5 = Conversion factor.

**Flow Cytometry.** One gram of live cochineal recently collected was disrupted using a 450- $\mu$ m metallic mesh pore. This extract was dissolved in 200 ml of a 7.2 pH phosphate buffered solution and transferred into cytometer tubes. The FACScalibur equipment from Beckton Dickinson was used to record the fluorescence at 640 nm, and the analysis was done with the CELLQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA). In total, 100,000 events were read for each sample. The size was obtained by calculating the forward scatter, and the intensity was measured by the fluorescence of the carminic acid within the globules (Stapelfeldt 1993). The data were organized to form groups based on the fluorescence intensity (low, medium, and high intensity). The size of the globules was determined by calculating the ratio of the trough to peak in forward scatter, and they were grouped into small, medium, and large sets. Each stage has a percentage of cells in each group according to their size based on which we calculate the average.

The fluorescence factor (FluF) was calculated for each intensity group using the following formula:

$$\text{FluF} = \frac{\text{Average fluorescence intensity}}{\text{Average size of the globule}} \text{A}\%gss,$$

A%gss = average of percentage of globules size sets.

The total fluorescence of the stages of cochineal group was calculated by adding the FluF of the three intensity groups obtained by flow cytometry.

**Statistical Analysis.** The percentage of carminic acid found during each phase was analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-test to determine the differences between means. To assess the effect of weight and fertilization on adult females, a multifactorial ANOVA with Tukey's post-test was performed on the carminic acid percentage to determine the differences between means. All of the analyses were determined to be significant at a 95% confidence level, which was calculated using the Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK) software package.

**Table 1.** The percentage of carminic acid present in several phases of cochineal (*D. coccus*)

Stage	% carminic acid
E	5.5 $\pm$ 0.06
NI	6.4 $\pm$ 0.85
NII	2.11 $\pm$ 0.66
FFI	20.77 $\pm$ 1.08
SFI	26.27 $\pm$ 1.67
FFII	17.97 $\pm$ 0.85
SFII	17.66 $\pm$ 0.42
FFIII	16.82 $\pm$ 1.01
SFIII	16.10 $\pm$ 0.20
FFIV	14.10 $\pm$ 1.50
SFIV	17.27 $\pm$ 0.16
OFI	22.27 $\pm$ 1.48
OFII	20.12 $\pm$ 1.53
OFIII	23.84 $\pm$ 2.78

E, egg; NI, nymph I; NII, nymph II; FFI, fertilized female I; SFI, sterile female I; FFII, fertilized female II; SFII, sterile female II; FFIII, fertilized female III; SFIII, sterile female III; FFIV, fertilized female IV; SFIV, sterile female IV; OFI, ovipositing female I, OFII, ovipositing female II, OFIII, ovipositing female III.

## Results

The carminic acid percentage that was present in eggs, NI, and NII is shown in Table 1. No differences were observed ( $F = 2653.65$ ;  $df = 1,13$ ;  $P > 0.05$ ) in the percentage of carminic acid between these three cochineal stages. Nevertheless, the egg, NI, and NII phases had a lower percentage of carminic acid than the adult females in the remaining groups ( $F = 2653.65$ ;  $df = 1,13$ ;  $P < 0.001$ ).

The percentage of carminic present in FF and NFFI is shown in Table 1. The cochineal from the NFFI group had a greater percentage of carminic acid than the adult females in the remaining groups ( $F = 2366.3$ ;  $df = 1,3$ ;  $P < 0.001$ ). The remaining groups did not show any statistical differences between them.

The percentage of carminic acid present in OF is shown in Table 1. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found in the cochineal of the OF groups. With the exception of the NFFI group, the cochineal of the groups that oviposited had a greater concentration of carminic acid ( $P < 0.05$ ) than the remainder of the evaluated groups.

Figure 1 shows the total fluorescence of the carminic acid globules from the various cochineal phases. The OF groups had the greatest total fluorescence when compared with the rest of the sampled groups ( $F = 170.8$ ;  $df = 1,12$ ;  $P < 0.05$ ).

The size of the carminic acid globules present in the groups of the various cochineal phases is shown as a percentage in Fig. 2. The cochineal of the NI, NII, FFI, FFI, FFIII, and FFIV groups had greater percentage of small globules than large globules ( $F = 798.88$ ;  $df = 2,24$ ;  $P < 0.05$ ). In contrast, the cochineal from the OFI, OFII, and OFIII groups had a greater percentage of large globules than small globules. The cochineal from the NFFII, NFFIII, and NFFIV groups had a greater percentage of small globules than large ones. No statistical differences were found in the percentage of medium globules in the cochineal of all groups tested ( $F = 798.88$ ;  $df = 2,24$ ;  $P > 0.05$ ).

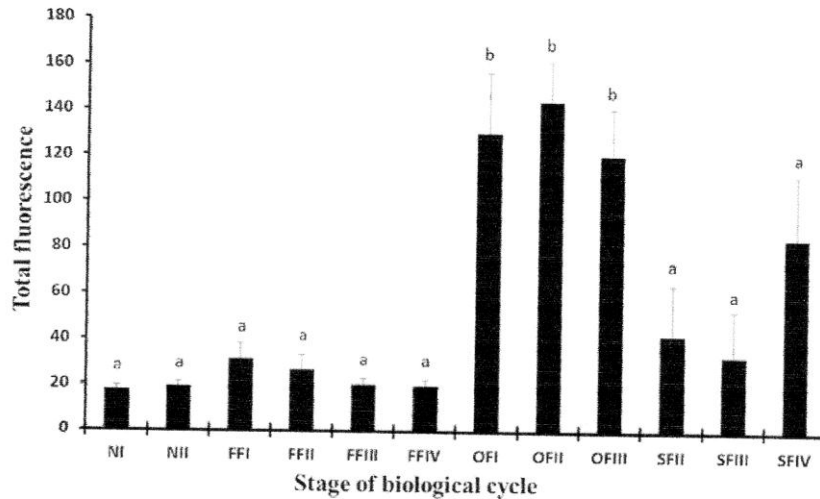


Fig. 1. Media ( $\pm$ SE) of total fluorescence of carminic acid globules from various stages of the *D. coccus*. NI, nymph I; NII, nymph II; FFI, fertilized female I; FFII, fertilized female II; FFIII, fertilized female III; FFIV, fertilized female IV; OFI, ovipositing female I; OFII, ovipositing female II; OFIII, ovipositing female III; SFII, sterile female II; SFIII, sterile female III; SFIV, sterile female IV. At least three replicates were performed, different letters indicate significantly different ( $P < 0.05$ ).

A significant correlation ( $F = 170.8$ ;  $df = 1,12$ ;  $P < 0.01$ ) was found between the percentage of carminic acid obtained by capillary electrophoresis and the total fluorescence that was observed from flow cytometry ( $r^2 = 0.68$ ;  $P < 0.05$ ).

**Discussion**

The quantity of carminic acid present in the cochineal is very important for determining the quantity of the coloring that is obtained during industrial processing (Briseño and Llanderal, 2008). This study determined that the concentration of carminic acid varies with the insect size and development stage.

After being dried in sunlight or in ovens at 50°C, the adult female cochineal contains the greatest percent-

age of carminic acid as compared with other development phases, and this phase is most often used in commercial production (Rodríguez et al. 2005). We found that all of the adult stages have a greater carminic acid concentration than the egg and nymph stages. Therefore, obtaining carminic acid from adult females will be most profitable.

Several qualities of dried cochineal are commercially available. The primary factor that differentiates cochineal quality is size. The largest (>2 mm) are first grade, medium ones (between 1 and 2 mm) are second grade, and the smallest (<1 mm) are third grade (Méndez, 2001). Although international prices often fluctuate, the price always correlates with the quality of the dried cochineal (Méndez 2001, Portillo and Viguera 2013). In this study, it was found that the

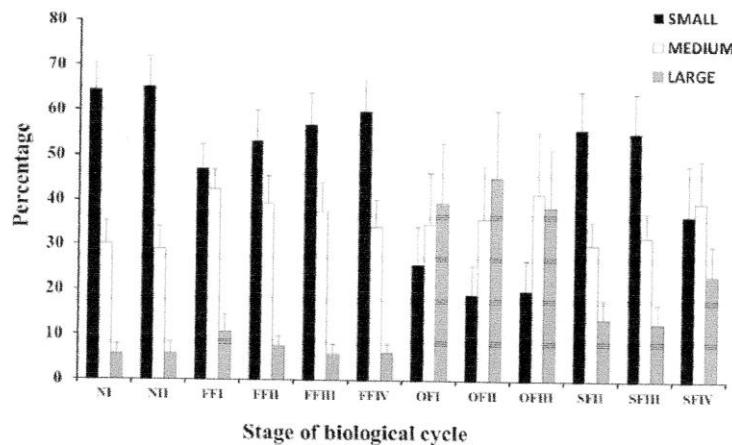


Fig. 2. Percentage ( $\pm$ SE) by flow cytometry of small, medium and large globules from different maturation stages of cochineal (*D. coccus*). NI, nymph I; NII, nymph II; FFI, fertilized female I; FFII, fertilized female II; FFIII, fertilized female III; FFIV, fertilized female IV; OFI, ovipositing female I; OFII, ovipositing female II; OFIII, ovipositing female III; SFII, sterile female II; SFIII, sterile female III; SFIV, sterile female IV. At least three replicates were performed.



smallest females (FFI and NFFI = 0.005–0.015 g) had a greater concentration of carminic acid than larger females. Our observations are in agreement with those made by Rodríguez et al. (2005), who reported that heavier cochineals had a lower concentration of carminic acid than lighter cochineals. Therefore, we conclude that the quantity of carminic acid obtained from first-grade cochineal is less than that obtained from second- or third-grade cochineal. Further studies are needed to determine whether the current quality classification used during industrial processing of cochineal is the most accurate measurement.

The color of cochineal eggs is red, which has led many producers and authors to believe that adult females that have oviposited have decreased amounts of carminic acid than those that have not oviposited (Flores 1996, Ventura 1996, Berrilla 1998). Other authors, such as Tekelenburg (1995), have recommended that females be left to oviposit for 12 d before they are harvested. In this study, we observed that females that have oviposited yield a greater percentage of carminic acid than females that have not oviposited. Although the weight of females that have oviposited is reduced, which reduces market value, they may be valuable as breeders and for their higher concentration of carminic acid.

The most commonly used technique to measure the concentration of carminic acid in the cochineal is through a spectrophotometry reading at 494 nm (Norma oficial mexicana [NOM-119-SSA1] 1994). Huang et al. (2002, 2003, 2005) and Jaworzka et al. (2005) have used capillary electrophoresis to measure the quantity of carminic acid in food and beverages. Because of its sensitivity, specificity, and reproducibility, these authors have suggested that this technique is ideal for determining the concentration of carminic acid in any product. Given these results, we modified and optimized the capillary technique to measure the concentration of carminic acid in cochineal at various life cycle stages. After analysis of our results and taking into consideration the characteristics of capillary electrophoresis, we believe that this technique should be considered for the official measurement of carminic acid in cochineal samples.

Furthermore, we used flow cytometry to calculate the size and fluorescence of the hemolymph globules from different cochineal phases by taking advantage of the natural fluorescence of carminic acid. We found a positive correlation between the concentration of carminic acid determined by capillary electrophoresis and the total fluorescence of the cochineal globules. These findings confirm that carminic acid is concentrated within hemolymph globules, although its exact synthesis location is unknown.

Very little reliable information is available about the worldwide production of cochineal, possibly because it is primarily produced in areas that have limited access to new technologies. This study shows that the current criteria to classify cochineal are not adequate because cochineals that are considered to be third grade are the ones with the highest concentration of carminic acid. Further studies should examine the

industrial processing of cochineal, and the data obtained in this study could be used to modify the current classification criteria.

### Acknowledgments

This study was supported by the PAPIIT/UNAM Project IN215314. This work was conducted as part of the Project Cátedra: Epidemiología de las Enfermedades Parasitarias of FESC-UNAM-2012. We thank Cuenca-Verde C. and Romero-Sánchez Y., from FESC-UNAM, for their technical assistance.

### References Cited

- Berrilla, C. N. 1998. Manual Técnico del cultivo de la tuna y crianza de la cochinilla. Edigraber. Lima, Perú.
- Briseño, G. A., and C. Llanderal. 2008. Contenido de ácido carmínico en hembras de grana cochinilla de diferentes edades, pp. 16–20. In: C. Llanderal, D. H. Zetina, A. L. Viguera and L. Portillo (eds.), Grana Cochinilla y Colorantes Naturales. Colegio de Postgraduados, México.
- Casellín, C., C. Llanderal, A. Ramírez, M. Soto, and J. T. Méndez. 2008. Caracterización morfológica de hemocitos de la hembra de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Agrociencia* 42: 349–355.
- De Haro, M. E., and L. E. Claps. 1995. Conociendo nuestra fauna III. Familia Dactylopiidae. (Insecta-Homoptera). Morfología, Biología e Importancia Económica. Serie Monográfica y Didáctica No. 19. Instituto Superior de Entomología, INSUE. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- (FDA) U.S. Food and Drug Administration. 2005. Cosmetic handbook. US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. (<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/scos-hdb.html>) (accessed 9 April 2013).
- Flores, F. V. 1996. Cosecha y Postcosecha de la Cochinilla en la Sierra de Perú, pp. 137–155. In: Anales del primer Seminario Internacional de la Cochinilla, Ayacucho, Perú.
- Flores-Alatorre H. L., F. C. Salinas, L. E. Chávez, and J. A. Reyes. 2010. La Hemolinfa de Grana Cochinilla, Estudio Citométrico, pp. 43–51. In: L. Portillo y A. L. Viguera (eds.), Conocimiento y aprovechamiento de la Grana Cochinilla. Universidad de Guadalajara, México.
- Grant, D., I. F. Gaunt, and F.M.B. Carpanini. 1987. Teratogenicity and Embryotoxicity study of carmine of cochineal in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 25: 913–917.
- Guía de validación de Métodos Analíticos. 2002. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C., México.
- Huang, H. Y., S. Ying-Chieh, and Ch. Yun-Chieh. 2002. Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 959: 317–325.
- Huang H. Y., Ch. Chen-Wen, S. Show-Li and Ch. Chi-Feng. 2003. Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking. *J. Chromatogr. A* 995: 29–36.
- Huang, H. Y., Ch. Chia-Ling, Ch. Chen-Wen, and Ch. Ming-Che. 2005. Determination of food colorants by micro-emulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 26: 867–877.
- Jaworzka, M., Z. Szulińska, M. Wilk, and E. Anuszczyńska. 2005. Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system: Application to Pharmaceutical Analysis. *J. Chromatogr. A* 1081: 42–47.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aldama A. C., Llanderal C. C., Soto H. M., Castillo M. L. E. 2005. Producción de grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en plantas de nopal a la intemperie y en micro túneles. *Agrociencia* 39; 002; 161-171.
- Aquino P. G., Bárcenas C. y Valdez C. 2002. Avances en la citología de la cochinilla del nopal en condiciones *in vivo* e *in Vitro* y su biología reproductiva. En: Portillo, L. y A. L. Viguera (editores). *Memorias II Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales y II reunión Internacional del Grupo de Trabajo en Cochinilla Cactusnet-FAO*. Universidad de Guadalajara, México, 3-25.
- Beaz R. J. A. 2007, Validación para la cuantificación de Ácido Carmínico en cochinilla de nopal (*Dactylopius coccus*) por cromatografía de líquidos de alta resolución, Tesis, Facultad de Química, UNAM. México.
- Berzas N., Guiberteau C., Cabanillas, A.M., Contento S. 1999. Method development and validation for the simultaneous determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chemical Acta* 378, 63-71.
- Bravo-Hollis H, Sánchez-Mejorada H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol I y III. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.
- Briseño G. A. 2001. Contenido de Ácido Carmínico en la Grana Cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en relación con su edad y fecundación, e influencia de la clasificación y secado. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
- Briseño G. A., Llanderal C. C. 2008. Contenido de ácido carminico en hembras de grana cochinilla de diferentes edades. En: Grana Cochinilla y Colorantes Naturales. Llanderal C., D. H. Zetina, A. L. Viguera y L. Portillo (editores). Colegio de Postgraduados. México. 16-20.
- Caselín C. S. Llanderal C. C., Ramírez C. A., Soto H. M. y Méndez M. J. T. 2008. Caracterización morfológica de Hemocitos de la Hembra de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Agrociencia* 42: 349-355.
- Castillo R, M. A. 2005, Fundamentos de electroforesis capilar., Facultad de estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México.
- Ceballos G. y Sánchez O. 1994. Wildlife diversity and conservation in Tropical America. En: Balakrishnan M. SW Bie y R Bosgtrom (editores.) *Tropical ecosystems: a synthesis of tropical ecology and conservation*. Oxford y IBH Publishing Co, Nueva Delhi. 233-262.
- Chankvetadze, B. 1997. *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley and Sons. New York.
- Chapman, R. F. 1998. *The insects, Structure and Function*. 3ra. Ed. Editorial Harvard University Press, Massachusetts, USA.
- Chávez M. C., Tecante, A., Fragoso S. M., Pereda M. R., 2010. Metabolic profiling of *Dactylopius* (Hemiptera:Dactylopiidae) species pigments by geographical origin and hosts using multivariate data analysis *Biochemical Systematics and Ecology*, 1-9.
- Dahlgren Barbro. 1990. *La grana cochinilla*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- De Haro, M. E., and L. E. Claps. 1995. Conociendo nuestra fauna III. Familia Dactylopiidae. (Insecta-Homoptera). *Morfología, Biología e Importancia Económica. Serie Monográfica y Didáctica No. 19*. Instituto Superior de Entomología, INSUE. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Del Río D. I. 2006. Grana cochinilla fina, regalo de México para el Mundo. Instituto de Ecología del Estado de Oaxaca, Gobierno del Estado de Oaxaca, México.

- FDA, U. S. Food and Drug Administration. 2005. Cosmetic Handbook. U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. (<http://www.cfsan.fda.gov>. Accessed 31 April, 2013).
- Finck A. 1988. Fertilizantes y fertilización. Ed. Reverté España. 43p.
- Flores H. A., Murillo A. B., Rueda P. E. O., Salazar T. J. C., García H. J. L., Troyo D. E., 2006. Reproducción de cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae). Rev Mex Biodiver, 77: 97-102.
- Flores V.I. 2008. Usos artesanales de la cochinilla en el teñido y la confección de textiles. Memorias del IV Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- García H. F. 2012. Protocolo de procesamiento de muestras para microscopía electrónica. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Guía de validación de Métodos Analíticos 2002, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C., México.
- Hernández H. F., García G. M. F., Rojas M. A., Hernández M. S., Lanz M. H. 2003. Carminic acid dye from the homopteran *Dactylopius coccus* hemolymph is consumed during treatment with different microbial elicitors. Arch Insect Bioch Physiol. 54:1, 37-45.
- Huang Hsi-Ya \*, Ying-Chieh Shih, Yun-Chieh Chen. 2002. Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, 959, 317–325.
- Huang Hsi-Ya \*, Chen-Wen Chiu, Show-Li Sue, Chi-Feng Cheng. 2003. Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking Journal of Chromatography A, 995, 29–36.
- Huang, Chia-Ling Chuang, Chen-Wen Chiu, Ming-Che Chung, 2005. Determination of food colorants by microemulsion electrokinetic chromatography. Electrophoresis 26, 867–877.
- Jaworska M., Szulinska, S. Małgorzata W. E. A, 2005. Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system Application to pharmaceutical analysis. Journal of Chromatography A, 1081. 42–47.
- Jorgensen K., Skibsted L. H. 1991. Light sensitivity of Cochineal. Quantum Yields for Photodegradation of Carminic Acid and Conjugate Bases in Aqueous Solution. Food Chemistry, 40. 25-34.
- Lancaster E. F., Lawrence J. F. 1996. High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid,  $\alpha$  and  $\beta$  bixin, and  $\alpha$  and  $\beta$  norbixin, and the determination of carminic acid in foods. J of Chromatography, 732. 394-398.
- Llanderal C. C., Campos F. M. 2001. Sistemas de Producción de la Grana Cochinilla. En: Producción de Grana Cochinilla, Llanderal C. C y Nieto H. R. (editores.) Colegio de Postgraduados, México, 61-68.
- Llanderal C. C., Nieto H. 2001. Características biológicas de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa). En: Producción de grana cochinilla. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, México. 23-30.
- Lloyd A. G. 1980. Extraction and chemistry of cochineal. Food Chemistry 5, 91 -107. Lloyd and Associates, c/o 18 Min-y-coed, Radyr, Cardiff CF4 8AQ, Wales, Great Britain.
- López-Montes A, García R. 2007, Simultaneous identification of natural dyes in the collection of drawings and maps from The Royal Chancellery Archives in Granada (Spain) by CE, Electrophoresis 28, 1243–1251.
- Maguregui M.I., Alonso R. M., Barandiaran R., Jimenez R. M., García N. 2007. Micellar electrokinetic chromatography method for the determination of several natural red dyestuff and lake pigments used in art work. Journal of Chromatography A, 1154, 429–436.
- Marrone L. 2008. Tintes naturales al alcance de nuestras manos. Editorial Parábola. Buenos Aires, Argentina.
- Matadamas O. E. J. 2006. Manual para la producción de grana cochinilla. Asociación Local de Productores Rurales de Grana Cochinilla, Nopaltepec, ALPR, México.

Mathenge C W, Holford P., Hoffmann J. H., Zimmermann H. G., Spooner-Hart R., Beattie G. A.. 2009. Nonnative species, Plant populations, Entomology, Cactus, Insects. South Africa Bulletin of Entomological Research. Cambridge: 99, 619-628.

Maza B. L. 1999. Aspectos biológicos de la grana cochinilla del Nopal (*Dactylopius coccus* Costa) y métodos de infestación. Memoria de residencia profesional. ITA No. 29, DGETA, Xocoyucan, Tlaxcala, México, 27p.

Méndez-Gallegos S. 2001. Cultivo y Manejo de la Grana Cochinilla. En: Producción de Grana Cochinilla, Llanderal C. C y Nieto H. R. (editores.) Colegio de Postgraduados, México, 69-77.

Méndez-Gallegos S., Gallegos V. C. 2001. Establecimiento y manejo de huertos de Nopal para la cría de la Grana Cochinilla (*Dactylopius coccus*). En: Producción de Grana Cochinilla, Llanderal C. C y Nieto H. R. (editores) Colegio de Postgraduados, México, 31-60.

Méndez-Gallegos S. 2010. Crecimiento Poblacional de la Cochinilla *Dactylopius coccus* Costa Criada en cinco Cultivares de Nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. Agrociencia 44: 225-234.

Mills H.A. y Jones J. B. 1996. Plant Analysis Handbook II. Micro Macro Publishing, Inc. E. U. pp. 6-62.

Montiel R. M L. 1995. Morfología de *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae), y su biología y producción en dos fotoperiodos, Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. México.

Norma oficial mexicana NOM-119-SSA1-1994, bienes y servicios. Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes orgánicos naturales. Especificaciones sanitarias. México.

Ortuño B., V. 1991. Crianza de la cochinilla. Agroexplotación para todos. Tukuypaj. Planning Assistance/USAID. Bolivia. 16p.

Pérez G., Kosztarab M. 1992. Biosystematics of the family Dactylopiidae (Homoptera: Coccinea) with emphasis on the life cycle of *Dactylopius coccus* Costa, Virginia Agricultural Experiment Station Bulletin, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA.

Portillo L. y Viguera A. L. 2006. A review on the cochineal species in Mexico, hosts and natural enemies. Acta Hort. 728: 249-255.

Portillo L. 2008. Los hospederos norte y sudamericanos de *Dactylopiidae*. En: Grana Cochinilla y Colorantes Naturales, Llanderal C., Zetina D., Viguera A., Portillo L. (editores). Colegio de Postgraduados, México.

Portillo L., Viguera A. 2010. Factores que afectan el cultivo de la Grana Cochinilla. En: Producción de Grana Cochinilla. Llanderal C., Nieto H. (editores). Colegio de Postgraduados, México.

Portillo, M. L., Viguera A. L. 2013. Cría de la Grana Cochinilla del nopal, pp. 85 - 94. En: M. Nazareno, M. J. Ochoa, and J. C. Dubeaux (editores), Actas de la Segunda Reunión para el Aprovechamiento Integral de la Tuna y otras Cactáceas y I Reunión Sudamericana CACTUSNET FAO-ICARDA, Santiago del Estero, Argentina.

Prophet E. B., Mills B. 1995, Métodos histotecnológicos, Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EUA, Versión en Castellano Editada y traducida por Heffers y Mullick, EUA.

Puchalska M., Orlinska M., Mohamed A., Ackacha, Kasia P., Pawlak and Maciej J. 2003. Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. J. Mass Spectrom. 38: 1252–1258.

Ramírez C. A., Llanderal C. C., Racotta R. 2008. Ovariole structure of the cochineal scale insect, *Dactylopius coccus*. Journal of Insect Science ISSN: 1536-2442.

Ramírez C. A. 2010. Actividad ovárica durante la fase adulta de *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Coccoidea: Dactylopiidae), Tesis de Doctorado, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México.

Ramírez C. A., Llanderal C. C. 2010. Biología reproductiva de la hembra de *Dactylopius coccus*. Pp. 13-14. En: Portillo, L. y A. L. Viguera (editores). Conocimiento y aprovechamiento de la Grana Cochinilla, Universidad de Guadalajara, México.

Rodríguez L. C., Faundez E., Seymour J., Escoba L., Espinoza L., Petrousa M., Ayres A, y Niemeyer H. 2005. Factores bióticos y concentración de ácido carminico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (HOMOPTERA: DACTYLOPIIDAE). *Agricultura Técnica (Chile)* 65:3. 323-329.

Rafaely L., Héron S. 2008. Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC anthraquinone dyes. *Dyes and Pigments*, 77:1. 191-203.

Skoog A. Douglas, Holler F. J. 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5a. Ed., Editorial Mc Graw-Hill. Madrid.

Stapeifeidt H., Jun H., Skibstedt L. H. 1993. Fluorescence properties of carminic acid in relation to aggregation, complex formation and oxygen activation in aqueous food models. *Food Chemistry* 48, 1-11.

Viguera G. A. 1992. Influencia de los macro y micro elementos en el desarrollo, crecimiento y producción de la grana o cochinilla *Dactylopius coccus* Costa. (Homóptera: Dactylopiidae): Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

Viguera G. A., Portillo M. L. 2001. Factores que afectan el cultivo de la grana cochinilla. En: Producción de Grana Cochinilla, Llanderal C. C y Nieto H. R. (Eds.) Colegio de Postgraduados, México, 79-91.

Yoshida A., Takagaki Y., Nishimune T. 1995. Enzyme immunoassay for carminic acid in foods. *J AOAC Int.* May-Jun; 78:3, 807-811.

#### PAGINAS ELECTRÓNICAS:

<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/Libros/Quimica/pigmentos/archivos%20PDF/tecnologia.pdf>

<http://www.calvo.qb.fcem.uba.ar/cEtaina.ppt>

<http://www.Citometry.Biomedicalres>

<http://www.Citometry.Flowcytometry>

<http://www.Citometry.History>

<http://www.Citometry.Howitworks>

<http://www.citometriadeflujo.com/>

<http://www.FACSLaboratory.CellSorting>

<http://www.FACSLaboratory.Equipment>

<http://www.FACSLaboratory.Multicoloranalysis>

<http://www.FACSLaboratory.Sorting>

<http://www.FACSLaboratory.whatisFlowcytometry>

<http://www.FACSLaboratory/Data-analysis>

<http://www.Flowcitometry.anintroduction.cf.ac.uk>

<http://www.Flowcitometry.cf.ac.uk>.

<http://www.lajoyaexport.com/precios.php>

<http://www.monografias.com/trabajos35/cochinilla-exportacion/cochinilla-exportacion.shtml>

<http://www.opolanco.es/Apat/Boletin/CITOFLUJO.htm>

<http://www.opolanco.es/Apat/Boletin2/CITOFLUJO.htm>

<http://www.udl.es/dept/medicina/sedaiomf/seda/>