



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO

Estudio de la interacción estilete-capa de nopal en tres etapas de desarrollo de la cochinilla hembra (*Dactylopius coccus*) y su relación con la composición química de la capa de nopal (*Opuntia ficus-índica*) en la que se localiza

**Tesis que presenta**

**LBE. Ruth Guadalupe Padilla Miranda**

Para Obtener el Grado de

**Maestro en Ciencias**

En la Especialidad de

**Biología de Plantas**

**Director de la Tesis:** Mercedes G. López Pérez

Irapuato, Guanajuato

Enero 2018

Este trabajo, cuyo título es: "Estudio de la interacción estilete-capas de nopal en tres etapas de desarrollo de la cochinilla hembra (*Dactylopius coccus*) y su relación con la composición química de la capa de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la que se localiza", fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, bajo la asesoría de la Dra. Mercedes G. López y con el apoyo del Conacyt.

## Agradecimientos

A la Doctora Mercedes López por haberme aceptado en su grupo de investigación y haberme permitido desarrollar un proyecto muy diferente a lo que ha venido desarrollando, por su constante apoyo, su inmensa paciencia y consejos valiosos a lo largo del proyecto; pero sobre todo por haberme brindado un gran ejemplo como investigadora, madre y compañera, por compartir y transmitir su conocimiento no sólo en la ciencia, sino en la vida. Muchas gracias por todo, la admiro y aprecio mucho.

A mi comité tutorial los doctores Alejandro Blanco y John Délano, gracias por sus preciadas aportaciones y correcciones las cuales enriquecieron y contribuyeron a las mejoras de este trabajo, pero más que nada les agradezco por mantener el interés y entusiasmo en el tema desarrollado.

Al CONACYT por la beca nacional que me otorgó para realizar la maestría, así como al CINVESTAV por la beca terminal que me brindó.

A mi familia, mi padre Guadalupe Padilla† por inspirarme a seguir adelante y cumplir mis metas, te amo y extraño apá; a mi madre Evelia Miranda, la columna vertebral de la familia, por tu incondicional apoyo, tanto emocional como económico, por enseñarme que lo que se quiere se puede y se logra con determinación, gracias Bella, eres la mejor te amo; a mis hermanos Rubén, Ángel, Noemí (mi hermana favorita, única e inigualable tq1ch) y Moisés, por siempre apoyarme en todo momento, escucharme y motivarme a continuar hasta el final, los quiero mucho; a mis cuñadas Martha, Angélica y Mitzy por su interés, sus atenciones y consejos durante esta etapa; a los chiquillos latosos, Rubén(sito), Jorge y Sebastián y Elías por alegrarme las reuniones familiares. A mi nueva familia mis suegros, cuñados y sobrinos, por su interés, apoyo, sus atenciones y su buen ánimo. A toda mi familia en general gracias infinitas, los quiero mucho.

A la familia Agavina: Marychuy, Pau, Blanca, Alice, Kari, Kelly y Juanito por su apoyo en la realización del proyecto, enseñarme y apoyarme en el uso de los equipos del laboratorio, sus comentarios, sugerencias y correcciones; por la gran amistad que entablamos durante este periodo de la maestría, Pau, Blanca, Kari y Kelly, gracias todos los momentos entre el cafecito, la comida, los eventos del grupo, y sociales, los cuales hicieron más ameno el tiempo de desarrollo del proyecto, gracias por su amistad, cariño y apoyo, los quiero.

Especial agradecimiento a la Mery White, mil gracias por todo tu apoyo en esta etapa final, por escucharme y apoyarme en tantos aspectos, te quiero mucho.

A la familia Laguna: Sofi, Felipe, Caro, Vincent, Bernardo y Sheila, quienes compartieron conmigo la frustración de la maestría de inicio a fin, que estuvieron desde los desvelos en las materias hasta las largas jornadas de sesiones de estudio, que me acompañaron en los momentos buenos y en los malos a lo largo de este trayecto, gracias por todos los momentos, los quiero.

A los compañeros de generación 2015-2017 y demás integrantes de la familia Cinvestav, que incluye compañeros, profesores y trabajadores, por hacer de esta estancia en Cinvestav un lugar de aprendizaje en mil y un áreas y por los momentos valiosos, risas y pláticas en pasillos, salones y reuniones sociales, me los llevo en el corazón.

A mis amigos de lejos que a lo largo de este tiempo estuvieron presentes, que se preocuparon por mis avances y siempre me echaron porras, Adriana, Daniela, Mel, Aida, Carlos y Robin, gracias por mantener contacto todo este tiempo, por su cariño y sus ánimos, los quiero mucho.

A Cafeta, la dueña de mis quincenas y becas, generadora de sonrisas y distribuidora oficial de pelos en ropa, gracias por el cariño y el buen ánimo en todo momento. Gracias por demostrarle a la humanidad que nunca es mal momento para estar feliz, aún en la enfermedad y en tus momentos más dolorosos.

Pero especialmente a mi mejor amigo y esposo Jasiel González, por todo tu amor, comprensión y apoyo, por desvelarte conmigo, apoyarme en las buenas, las malas y las peores situaciones a lo largo de este trayecto, gracias por ayudarme a ser mejor persona y a lograr mis metas, pero sobre todo gracias por regresarme a mi camino cuando me veías completamente perdida, por todo tu apoyo amor y muuuuuucha paciencia mil gracias, te amo mucho esposito.

RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	2
1.1. Cochinilla ( <i>Dactylopius coccus</i> ).....	2
1.1.1. Taxonomía.....	2
1.1.2. Contexto histórico.....	4
1.1.3. Ciclo biológico .....	5
1.2. Pigmentos derivados de la cochinilla.....	7
1.3. <i>Opuntia ficus-indica</i> .....	12
1.3.1. Composición química de <i>Opuntia</i> .....	13
1.3.2. <i>Opuntia</i> como huésped y fuente de alimento de <i>Dactylopius</i> .....	16
1.3.3. Producción de grana cochinilla .....	17
1.4. Áfidos, otros insectos chupadores y su mecanismo de búsqueda de alimento .....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. HIPÓTESIS .....	21
4. OBJETIVO GENERAL.....	21
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. Establecimiento de cultivo de cochinilla <i>Dactylopius coccus</i> en invernadero, infestando cladodios de nopal <i>Opuntia ficus-indica</i> variedad Esmeralda.....	22
5.1.1. Infestación de cladodios .....	22
5.2. Observación de estilete de cochinilla utilizando microscopía digital en las tres diferentes etapas de desarrollo.....	23
5.2.1. Tratamiento para microscopía de muestras de cochinilla.....	23
5.2.2. Histoacclarado.....	24
5.3. Determinación de la composición de las capas del cladodio .....	24
5.3.1. Hidrolizado de las muestras liofilizadas .....	25
5.3.2. Cromatografía de capa fina (TLC) .....	25
5.3.3. Electroforesis de carbohidratos asistida por un fluoróforo (FACE).....	26
5.3.4. Cromatografía líquida de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) .....	27
5.3.5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ...	28
6. RESULTADOS .....	29

6.1. Establecimiento de cultivo de cochinilla ( <i>Dactylopius coccus</i> ) en invernadero.....	29
6.2. Observación de estilete de cochinilla utilizando microscopía digital .....	32
6.3. Composición química de capas de cladodio.....	41
6.3.1. Carbohidratos .....	41
6.3.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ...	54
6.3.2.1. Aminoácidos .....	55
6.3.2.2. Ácidos Orgánicos .....	56
6.3.2.3. Carbohidratos .....	58
7. DISCUSIÓN.....	60
7.1. Estilete de <i>Dactylopius</i> .....	60
7.2. Carbohidratos en <i>Opuntia</i> .....	60
7.3. Aminoácidos y ácidos orgánicos en <i>Opuntia</i> y su relación con <i>Dactylopius</i> .....	61
8. CONCLUSIONES .....	64
9. PERSPECTIVAS .....	64
10. REFERENCIAS .....	65

Figura 1.1. <i>Dactylopius coccus</i> Costa. A) Diferencia morfológica entre cochinilla hembra (izquierda) y macho (derecha) en etapa adulta. B) Fotografía de este insecto en cladodio de <i>Opuntia</i> .	2
Figura 1.2. Distribución de <i>Dactylopius coccus</i> en República Mexicana en diferentes huéspedes. Adaptado de Chávez-Moreno et al. (2010).	3
Figura 1.3. Diferencias entre cochinilla silvestre y cochinilla fina.	4
Figura 1.4. Codex Mendocino (izquierda). Mención de costales de cochinilla como parte de los tributos al emperador azteca (ampliación derecha).	5
Figura 1.5. Ciclo de desarrollo de cochinilla <i>Dactylopius coccus</i> . Adaptado de Hernández-Hernández, 2005.	6
Figura 1.6. Ciclo de vida de cochinilla fina en cultivo con tiempos aproximados. Adaptado de Hernández-Hernández, 2005.	7
Figura 1.7. Estructura básica de una antraquinona.	8
Figura 1.10. Estructura química de ácido carmínico.	10
Figura 1.11. Insecto <i>Kermococcus ilicis</i> , fuente del ácido quermésico.	11
Figura 1.12. Estructura química de ácido quermésico (A) y flavoquermésico (B).	12
Figura 1.13. Definición de capas para estudio de carbohidratos (Ginestra et al.,2009).	15
Figura 1.14. Infestación de <i>Dactylopius</i> sp en <i>Agave</i> . (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato)	16
Figura 1.15. Producción de cochinilla en penca invertida.	188
Figura 5.1. Cochinilla en etapa ninfa I en tamiz como material para infestación de cladodios.	22
Figura 5.2. Cladodios de nopal <i>Opuntia ficus-indica</i> var Esmeralda de 2 años, previo a infestación por cochinilla.	23
Figura 5.3. A) Corte de <i>Opuntia</i> en sitio de infestación. B) Corte de muestra de <i>Opuntia</i> con cochinilla en solución fijadora.	24
Figura 5.4. Definición de capas del cladodio de <i>Opuntia</i> de acuerdo con lo observado en microscopía digital. Epidermis (EPI), clorénquima (CLOR), parénquima (PAR) y médula (MED).	25
Figura 6.1. Infestación de cochinilla en cladodios <i>Opuntia ficus-indica</i> var Esmeralda en invernadero.	29
Figura 6.2. Medición de tamaño aproximado de cochinilla en etapa de ninfa I.	30
Figura 6.3. A) Cladodio de <i>Opuntia</i> infestado con cochinillas en etapa de ninfa I. B) Ninfa I establecida con pelos cerosos. C) Grupo de cochinillas en etapa ninfa I, acercamiento.	30

Figura 6.4. A) Cladodio de <i>Opuntia</i> infestado con cochinillas en etapa de ninfa II. B) Ninfa II hembra en proceso de muda. C) Ninfa II hembra establecida cubierta con coccerina, polvo ceroso. D) Capullo o cocón de machos en desarrollo de macho adulto.....	31
Figura 6.5. A) Cladodio de <i>Opuntia</i> infestado con cochinillas en etapa adulta. B) Insecto adulto establecido con polvo ceroso. C) Grupo de capullos de macho emergiendo en etapa adulta. D) Grupo de cochinillas en etapa adulta pariendo cochinilla ninfa I. ....	32
Figura 6.6. Micrografía digital en sitio de cochinilla en etapa ninfa I en cladodio de <i>Opuntia</i> , objetivo 20X.....	33
Figura 6.7. Micrografía digital de cochinilla ninfa I en cladodio de <i>Opuntia</i> . A) Trayectoria de estilete de cochinilla a través de capas de <i>Opuntia</i> , objetivo 50X, ensamble de imagen. B) Punta de estilete localizada en células de parénquima, objetivo 200X. ....	34
Figura 6.8. Micrografía digital de varias cochinillas ninfa I en cortes de cladodio de <i>Opuntia</i> . A) Estilete en parénquima-vasculatura, objetivo 50X. B) Estilete en células de parénquima, objetivo 50X, ensamble de imagen. C) Estilete en parénquima, objetivo 100X, ensamble de imagen. ....	34
Figura 6.9. Micrografía digital de cochinilla ninfa II en cladodio de <i>Opuntia</i> . A) Trayectoria de estilete de cochinilla ninfa II (derecha y más grande) a través de capas de <i>Opuntia</i> , objetivo 100X, ensamble de imagen. B) Punta de estilete en células parenquimatosas, objetivo 150X.....	35
Figura 6.10. Micrografía digital de varios estiletes de cochinillas ninfa II en cladodio de <i>Opuntia</i> . A) Estilete en clorénquima, objetivo 30X. B) Estilete fuera de <i>Opuntia</i> , objetivo 50X. C) Estilete en parénquima, objetivo 100X, ensamble de imagen. ....	35
Figura 6.11. Micrografía digital de cochinilla ninfa II en cladodio de <i>Opuntia</i> . A) Trayectoria de estilete de cochinilla a través de capas de <i>Opuntia</i> , objetivo 50X, ensamble de imagen. B) Punta de estilete localizada en tejido parenquimatoso, objetivo 100X.....	36
Figura 6.12. Micrografía digital de cochinilla adulta en cladodio de <i>Opuntia</i> . A) Trayectoria de estilete de cochinilla a través de capas de <i>Opuntia</i> , objetivo 100X, ensamble de imagen. B) Punta de estilete localizada en vasculatura, objetivo 100X. ....	37
Figura 6.13. Micrografía digital de varios estiletes de cochinillas de etapa adulta en cladodio de <i>Opuntia</i> . A) Trayectoria de estilete, objetivo 50X. B) Estilete de cochinilla adulta con mayor grosor, objetivo 100X. C) Trayectoria de estilete hacia parénquima, objetivo 30X.....	37
Figura 6.14. Micrografía digital de varios estiletes de cochinillas. Estilete de cochinilla localizado en vasculatura, objetivo 150X. ....	38
Figura 6.15. Micrografía de corte de cladodio de <i>Opuntia</i> de haz a envés con identificación de capas. A) Sección completa de <i>Opuntia</i> . B) Epidermis. C) Clorénquima. D) Parénquima y haz vascular. E) Médula.....	40
Figura 6.16. Perfil cromatográfico de muestras control de capas de <i>Opuntia</i> en comparación con estándares de FOS, MOS y monosacáridos. ....	41



Figura 6.17. Cromatografía de capa fina de carbohidratos en capas de <i>Opuntia</i> hidrolizadas a diferentes tiempos.....	42
Figura 6.18. Electroforesis de carbohidratos asistida por un fluoróforo de carbohidratos en capas de <i>Opuntia</i> después de 12 h y 16 h de hidrólisis. ....	45
Figura 6.19. Perfil cromatográfico de estándares de monosacáridos utilizados para análisis de muestras de capas de <i>Opuntia</i> mediante HPAEC-PAD.....	46
Figura 6.20. Perfil cromatográfico de estándares de oligosacáridos utilizados en la identificación de carbohidratos de <i>Opuntia</i> mediante análisis por HPAEC-PAD.....	47
Figura 6.21. Perfil cromatográfico de carbohidratos como resultado de la hidrólisis de capas de <i>Opuntia</i> durante 4 h.....	48
Figura 6.22. Perfil cromatográfico de monosacáridos como resultado de la hidrólisis de capas de <i>Opuntia</i> durante 8 h.....	49
Figura 6.23. Composición de monosacáridos como resultado de la hidrólisis en capas de <i>Opuntia</i> a diferentes tiempos. ....	50
Figura 6.24. Variación de la composición de MOS como efecto de la hidrólisis en capas de <i>Opuntia</i> a diferentes tiempos. ....	51
Figura 6.25. Perfil cromatográfico de epidermis como efecto de la hidrólisis en capas de <i>Opuntia</i> a diferentes tiempos. Comparación con perfil de estándar pectina hidrolizada por 16 h. ....	52
Figura 6.26. Perfil cromatográfico de epidermis como efecto de la hidrólisis en capas de <i>Opuntia</i> a diferentes tiempos. Comparación con perfil de estándar pectina hidrolizada por 16 h. ....	53
Figura 6.27. Perfil cromatográfico de compuestos de <i>Opuntia</i> en diferentes capas, mediante GC-MS.....	54
Figura 6.28. Perfil cromatográfico de compuestos en capas de <i>Opuntia</i> con identificación de aminoácidos, mediante GC-MS. ....	55
Figura 6.29. Perfil cromatográfico de compuestos en capas de <i>Opuntia</i> con identificación de ácidos orgánicos, mediante GC-MS.....	56
Figura 6.30. Perfil cromatográfico de compuestos en capas de <i>Opuntia</i> con identificación de ácidos orgánicos, mediante GC-MS.....	57
Figura 6.31. Perfil cromatográfico de compuestos de capas de <i>Opuntia</i> obtenidos, mediante análisis por GC-MS. ....	59

## RESUMEN

*Dactylopius coccus*, comúnmente conocida como grana cochinilla, ha sido ampliamente utilizada para la producción de pigmentos a nivel industrial. Los estudios previos en relación con la cochinilla y al cladodio de nopal se enfocan primordialmente a las mejoras de producción de grana, y mayor obtención de ácido carmínico, para así obtener rendimientos altos en la producción del carmín. Sin embargo, la interacción de la cochinilla con el cladodio ha sido poco estudiada a nivel de la alimentación y las interacciones del pico chupador, o estilete, con las diferentes capas del nopal. En este trabajo se estudian las diferentes etapas de desarrollo de la cochinilla, la ubicación del estilete con las diferentes capas del nopal y la caracterización de componentes de las mismas, contribuyendo así a un mejor conocimiento de la relación cochinilla-nopal. De acuerdo con los resultados obtenidos, la longitud del estilete de la cochinilla varía dependiendo del individuo, no habiendo una longitud específica para las etapas de desarrollo, ni una localización en particular en busca de alimento. Se logró identificar las capas de cladodio de nopal a las cuales llegan los estiletes de la cochinilla en sus diferentes etapas de desarrollo, identificando al parénquima como la capa en la cual se observaron más estiletes, mientras que su localización en los haces vasculares solo se detectó en algunas ocasiones. La composición química de *Opuntia* en sus diferentes capas mostró que los componentes mayoritarios son los carbohidratos, principalmente, ácido galacturónico, glucosa, fructosa y sacarosa, localizándose mayoritariamente en la capa del parénquima, uno de los sitios donde se encontró la punta del estilete. Lo anterior sugiere que estos compuestos pudieran ser atractivos de la cochinilla. Los aminoácidos fueron abundantes en la capa del clorénquima, en la cual no se localizaron los estiletes de las cochinillas, por lo que no son blanco de la cochinilla como fuente de alimento. La composición de ácidos orgánicos se relaciona con el metabolismo ácido de las crasuláceas, propio del nopal. Sin embargo, algunos de los ácidos identificados como ácido fumárico, glicérico, succínico, maleico y malónico, también pueden ser de interés en la cochinilla como precursores de rutas metabólicas importantes.

## ABSTRACT

*Dactylopius coccus*, commonly known as cochineal, has been widely used to produce pigments on an industrial level. Previous studies of the relation between the cochineal and the cactus cladode have focused primarily on ways to improve the production of cochineal and concomitantly, of carminic acid, thus increasing the yield of carmine production. However, the interaction of the cochineal with the cladode has been little studied at the level of feeding and the interactions of the sucking beak, or stylet, with the different cactus layers. In this work, the different stages of development of the cochineal are studied, together with the location of the stylet with the different cactus layers and the characterization of their components. The latter, to improve the understanding of the cochineal-nopal relationship. According to the results obtained, the length of the cochineal stylet varies depending on the individual, not having a specific length at different stages of development or a particular location in search of specific food sources. In addition, the nopal cladode layers to which the stylets of the cochineal are directed in their different stages of development were identified. Consequently, the parenchyma layer was found to be location toward which the majority of the stylets were directed. Conversely, they were seldom localized in or around the vascular tissues. The chemical composition of the different layers of *Opuntia* showed that the major components are carbohydrates, mainly galacturonic acid, glucose, fructose and sucrose, being located mostly in the parenchyma layer, one of the sites where the tip of the stylet was usually found. The latter suggests that these components could be factors responsible for the cochineal attraction. The amino acids were abundant in the chlorenchyma layer, far from where the cochineal stylets were located, indicating that they are most probably not a source of food for the cochineal. The composition of organic acids is related to the Crassulacean Acid Metabolism, characteristic of *Opuntia*. However, some of the acids identified as fumaric, glyceric, succinic, maleic and malonic acids may be of interest in cochineal as precursors of important metabolic pathways.

## INTRODUCCIÓN

La grana cochinilla o cochinilla de grana, *Dactylopius coccus*, es un insecto hemíptero que se desarrolla unido a los cladodios de plantas de nopal, principalmente *Opuntia ficus-indica*, y ha sido utilizado en diferentes culturas para la obtención de colorante rojo. Numerosas culturas americanas precolombinas lo utilizaban para teñir telas, vasijas e incluso realizar pinturas rupestres (Baranyovits 1978; Coll-hurtado 1998).

El colorante se obtiene de los cuerpos secos de las hembras, los cuales son molidos y extraídos con agua o diferentes solventes. El ácido carmínico es el principal componente del colorante, el cual da la coloración roja a la hemolinfa de estos insectos y está presente desde el huevo del insecto (Caselín-Castro et al. 2008). Este es procesado para obtener el carmín, un colorante utilizado en la industria alimentaria, textil y cosmética. Debido a este compuesto, la grana cochinilla ha tenido gran importancia económica desde tiempos antiguos. En las culturas prehispánicas era utilizado como moneda o tributo (López-Munguía et al. 2017).

La conquista española dio a conocer al viejo continente la existencia de la cochinilla y su uso como colorante. Esto llevó a Europa la grana cochinilla, en donde se convirtió en uno de los colorantes más valiosos. La demanda europea por colorante llevó a México a ser uno de los mayores productores y exportadores de este insecto, siendo un costal de cochinilla incluso tan valioso como el oro y la plata. La producción de cochinilla en el continente americano se realizaba principalmente en México y Perú. Con la aparición de los colorantes sintéticos en 1856, gracias al descubrimiento de W. H. Perkin, la producción de cochinilla para la obtención de colorantes se vio desplazada. El uso de colorantes sintéticos reducía costos en la industria textil y la producción de cochinilla en México disminuyó considerablemente (Baranyovits 1978; Allevi et al. 1991, 1998).

En la actualidad, algunos colorantes sintéticos han sido prohibidos en la industria alimentaria, debido a reacciones de toxicidad y alergia, lo cual elevó la demanda en el mercado de los colorantes de origen natural, entre los cuales, el carmín de cochinilla es uno de los principalmente solicitados en la industria de alimentos (Loprieno et al. 2000).

Aproximadamente un siglo después de la caída de producción de cochinilla en México, se retomó el interés en el insecto en su producción e investigación. Sin embargo, no se ha recuperado del todo el auge que antaño tenía en producción y en exportación (Coll-hurtado 1998; Pérez Sandi y Cuen & Becerra 2001; Romero-López et al. 2006) .

La investigación respecto al nopal y a la cochinilla de manera individual se está retomando en México, al igual que la producción de cochinilla y obtención del carmín (Lloyd 1980; Romero-López et al. 2006; Coronado-Flores 2011; Ruiz-López 2011). Sin embargo, la investigación existente sobre la interacción puntual de la cochinilla con el hospedero es muy escasa (Chavez-Moreno et al. 2011).

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Cochinilla (*Dactylopius coccus*)

La cochinilla o grana cochinilla es un insecto originario de México que vive como parásito en cladodios de nopal, primordialmente en *Opuntia ficus-indica* (Chavez-Moreno et al. 2011). Ésta es considerada una plaga del nopal, ya que una vez que se adhiere a él permanece ahí hasta completar su ciclo biológico. Afortunadamente, esta plaga es también considerada como un beneficio para el hombre, por su utilidad en el área de los colorantes.

Entre las cochinillas del género *Dactylopius* se encuentra gran variedad de cochinillas silvestres. Las cochinillas silvestres poseen una capa algodonosa en la superficie de su cuerpo, a diferencia de la cochinilla fina *Dactylopius coccus* la cual posee una capa de polvo ceroso blanco que la recubre. De esta forma, es fácil identificar cuando una cochinilla *Dactylopius* es fina o silvestre (Chavez-Moreno et al. 2011).

### 1.1.1. Taxonomía

La cochinilla es un insecto hemíptero, perteneciente a la familia *Dactylopiidae*. En su primera clasificación, en 1758, Linneo la denominó *Coccus cacti*. Sin embargo, en 1835 Costa la reclasificó como *Dactylopius coccus*, clasificación que permanece hasta el presente (Tovar-Puente 2000). De manera general, su clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase: *Insecta*  
Orden: *Hemiptera*  
Familia: *Dactylopiidae*  
Género: *Dactylopius*  
Especie: *coccus*

Morfológicamente, la cochinilla hembra y el macho son diferentes (Figura 1.1), sin embargo, esta diferencia es observada sólo hasta la etapa adulta y en el proceso de metamorfosis del macho (Marin & Cisneros 1977).



Figura 1.1. *Dactylopius coccus* Costa. A) Diferencia morfológica entre cochinilla hembra (izquierda) y macho (derecha) en la etapa adulta. B) Fotografía mostrando el aspecto de este insecto en cladodio de *Opuntia*.

Las cochinillas del género *Dactylopius*, son endémicas del continente americano, encontrándose habitando cactáceas de los géneros *Opuntia*, *Nopalea* y *Grusonia*. El género *Dactylopius* incluye un total de nueve especies localizadas en el norte y sur de América: *Dactylopius coccus*, *D. ceylonicus*, *D. confusus*, *D. opuntiae*, *D. tomentosus*, *D. austrinus*, *D. confertus*, *D. salmianus* y *D. zimmermanni*. De acuerdo a lo reportado por Portillo (2005), en Norte América se incluye a *D. coccus*, *D. ceylonicus*, *D. confusus*, *D. opuntiae* y *D. tomentosus*, las cuales se ha reportado se localizan en México en los estados de Baja California, Coahuila, Estado de México, Jalisco, Oaxaca, Puebla y Veracruz, en un gran número de hospederos pertenecientes a los géneros *Opuntia*, *Cylindropuntia* y *Grusonia*.

De acuerdo con lo reportado por Chávez-Moreno et al. (2010), en México se ha encontrado especies de *Dactylopius* en los estados de Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Nayarit, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala y Zacatecas. Este estudio también reporta que la especie *D. coccus* infesta principalmente la especie de nopal *Opuntia ficus-indica*, llevando a los productores a decidir el uso de esta especie como huésped, por sobre otras especies de nopal.

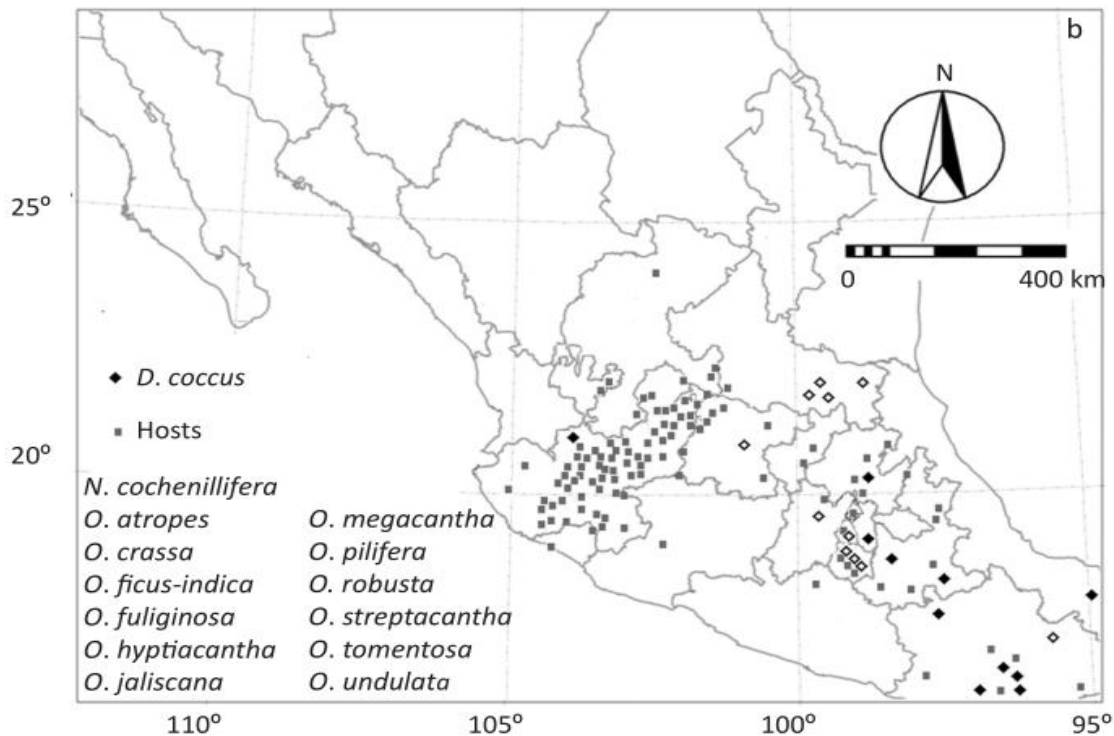


Figura 1.2. Distribución de *Dactylopius coccus* (diamantes) en la República Mexicana, en sus diferentes huéspedes (cuadrados). Adaptado de Chávez-Moreno et al. 2010.

La diferencia entre las demás especies de *Dactylopius* con *D. coccus*, radica en que las denominadas silvestres poseen un algodóncillo en su superficie difícil de retirar, mientras que *D. coccus* se identifica por poseer un polvo ceroso llamado coccerina (Figura 1.3) (Liebermann, 1885; Chibnall et al. 1934) .

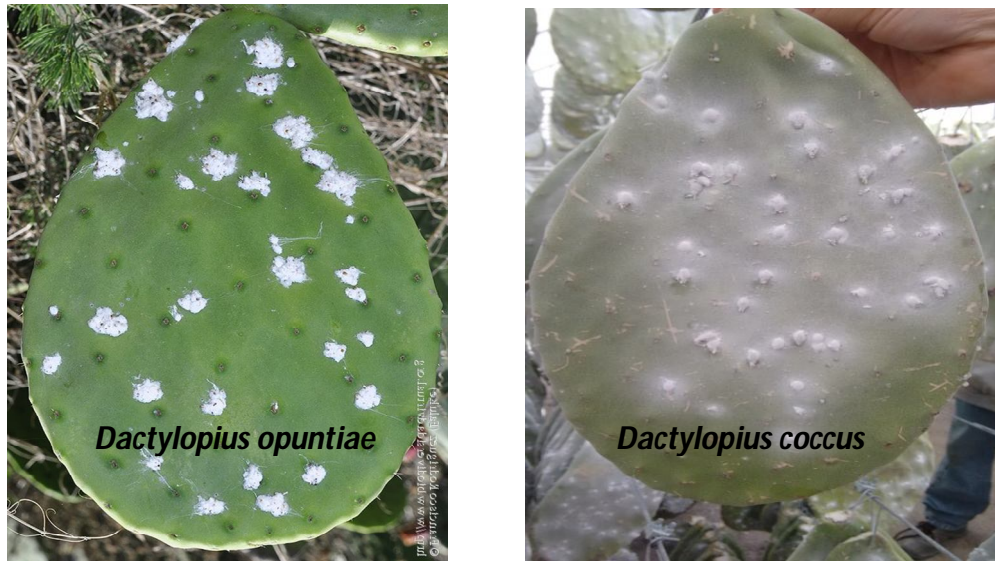


Figura 1.3. Diferencias entre cochinilla silvestre y cochinilla fina.

### 1.1.2. Contexto Histórico

La cochinilla ha sido de gran importancia desde tiempos precolombinos. Los Aztecas solían llamarla *nocheztlí*, que significa “sangre de tuna” debido a su color similar a la sangre. Se utilizaba como colorante de gran valor, encontrándose en murales, papeles mate y telas en la época prehispánica. La cerámica y algunas telas del periodo post clásico (900-1521 de nuestra era) también fueron teñidas con colorante de la cochinilla (Hernández-Hernández et al. 2003; Hernández-Hernández et al. 2005).

La cría de la grana cochinilla data de tiempos de Moctezuma, donde se utilizaba como pago de tributos (Figura 1.4). Se dice que era tan valiosa como las piedras preciosas y el oro (Coll-Hurtado 1998). Sin embargo, con la llegada de los españoles a América la importancia de la cochinilla aumentó. El gusano de seda y la cochinilla del carmín se convirtieron en productos muy valiosos que debían ser exportados a tierras europeas, donde eran de gran utilidad en la fabricación de prendas y el teñido de telas respectivamente

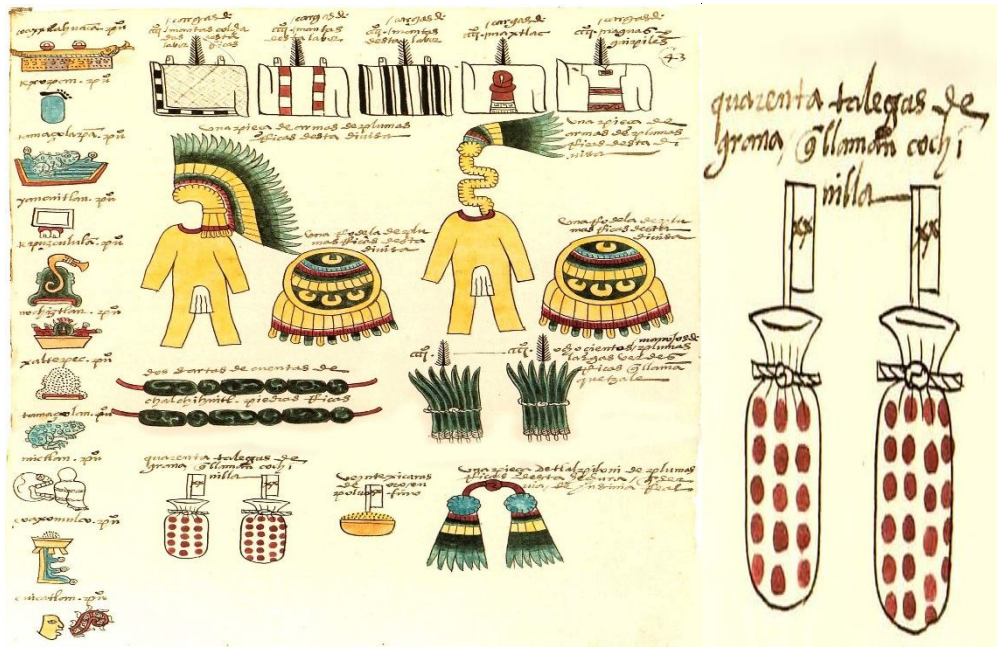


Figura 1.4. Codex Mendocino (izquierda). Mención de costales de cochinilla como parte de los tributos al emperador azteca (ampliación derecha).

El cultivo de la cochinilla fue estimulado por los españoles primero en Tlaxcala y posteriormente en Puebla, y en poco tiempo muchas ciudades de la Nueva España se encargaron de la producción de la cochinilla. La demanda de la cochinilla en Europa fue tal que la producción se extendió a varios estados de la actual República Mexicana, siendo el principal productor el estado de Oaxaca (Coll-Hurtado 1998). Oaxaca se encargaba principalmente de la minería y de la obtención de metales preciosos. Sin embargo, con la escasez de minerales en Oaxaca, se siguió con la producción de la cochinilla y se convirtió en el estado de mayor producción del insecto (Coll-Hurtado 1998; Abel 2012).

### 1.1.3. Ciclo biológico

La cochinilla tiene un ciclo de vida de 80-90 días aproximadamente. El ciclo comienza a partir del huevo, el cual mide aproximadamente 0.7 mm de largo por 0.3 mm de ancho y tarda en eclosionar de 10 min a 6 h (Figura 1.5) (Marin & Cisneros 1977; Pérez-Guerra 1991).



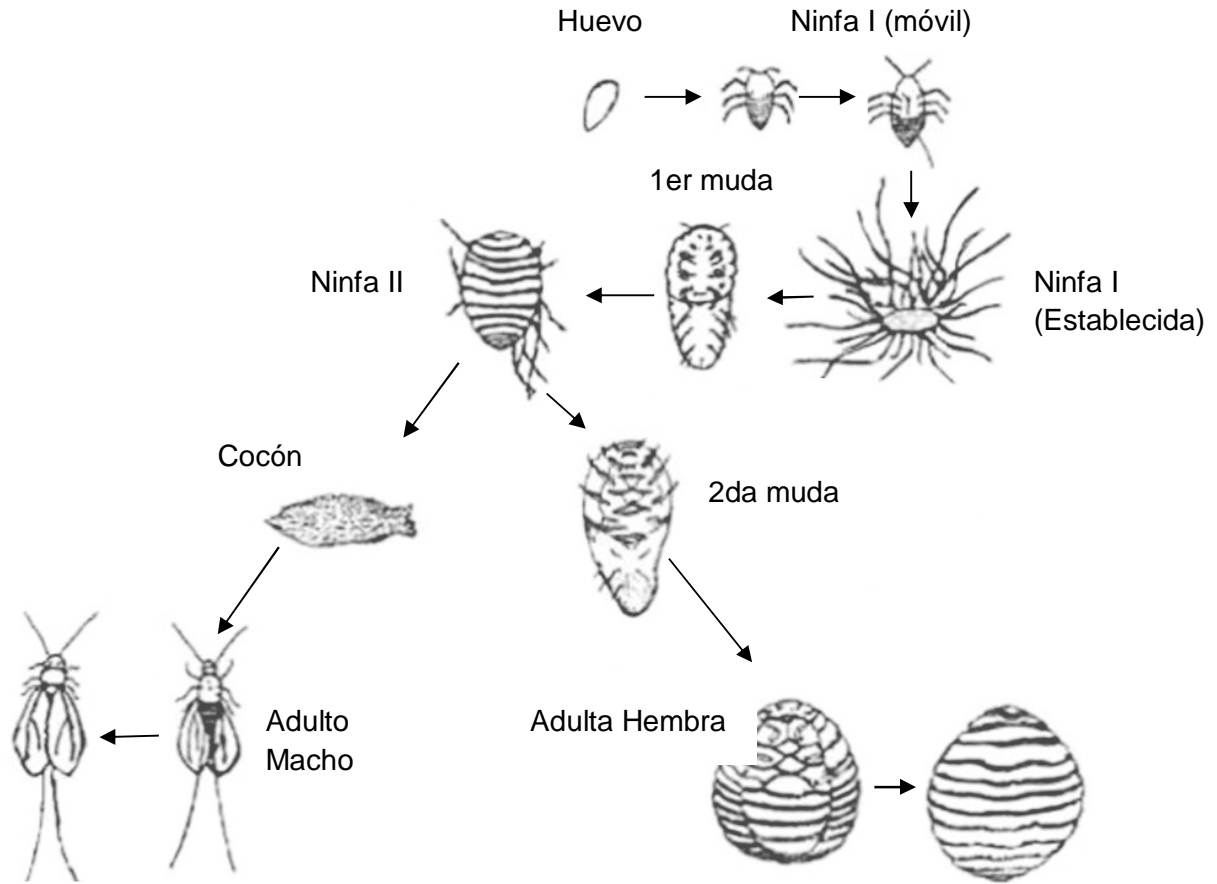


Figura 1.5. Ciclo de desarrollo de cochinilla *Dactylopius coccus*. Adaptado de Hernández-Hernández, 2005.

Del huevo emerge la ninfa I, la cual es un organismo móvil morfológicamente similar a una araña pequeña de color rojo. Mide aproximadamente 1 mm de largo por 0.5 mm de ancho. Las ninfas I son fotosensibles, buscan la parte del cladodio que no está expuesta a la luz y una vez que encuentran el sitio adecuado se anclan al nopal por medio de su cavidad bucal, conocido como pico chupador o estilete. Una vez establecida la ninfa I en el cladodio comienza el desarrollo de polvo y pelos cerosos en la superficie de su cuerpo, los cuales se cree le sirven para protección contra depredadores. En este punto la diferencia entre macho y hembra no es tan clara. Algunos autores reportan que la longitud de los pelos cerosos diferencia entre hembras y machos, siendo los machos los de pelos más cortos y las hembras de pelo más largo. También se cree que la localización de las ninfas I en el cladodio determina si serán machos o hembras, ya que los machos permanecen en las inmediaciones de la madre y las hembras buscan establecerse a mayor distancia (Pérez-Guerra 1991).

A medida que avanza el tiempo, alrededor de los 25-28 días, la ninfa I realiza una muda, la cual da origen a la ninfa II (Figura 1.6). La ninfa II es de cuerpo ovalado y presenta segmentos horizontales en su superficie. Su tamaño es de aproximadamente 1.1 mm de largo y 0.6 mm de ancho, no teniendo o presentando mucha diferencia con la ninfa I. Los

pelos cerosos no están presentes en la ninfa II, e inicialmente el insecto es de color rojo después de la muda. Sin embargo, el polvo ceroso comienza a secretarse y se torna de un color blanco grisáceo. La ninfa II tiene que volver a unirse al cladodio mediante su pico chupador o estilete, y en ocasiones no se aleja de la zona donde se encontraba como ninfa I. Sin embargo, en otras ocasiones se traslada a lugares un poco más lejanos y al hacerlo es probable que no pueda volver a unirse. En la ninfa II se observa el dimorfismo entre la hembra y el macho, ya que la hembra continúa con la misma morfología ovalada y segmentada mientras que el macho comienza el desarrollo de un capullo o cocón en el cual realizará el desarrollo de otras dos etapas, pre pupa y pupa. El macho se convierte en adulto a los 58 días de haber emergido del huevo, saliendo del cocón como un insecto alado similar a una palomilla blanca. El macho sale en busca de hembras para copular en los próximos 3 o 4 días. Pero, al no tener desarrollada una cavidad bucal en la etapa adulta, no sobrevive mayor tiempo por falta de alimento y muere después de haber copulado con varias hembras (Marin & Cisneros 1977; Pérez-Guerra 1991).

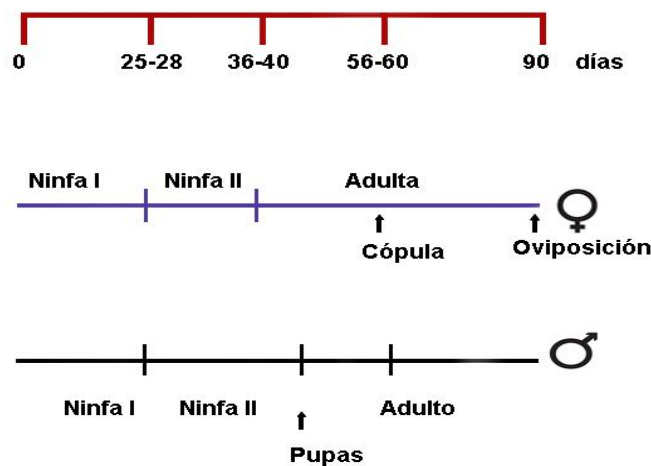


Figura 1.6. Ciclo de vida de cochinilla fina en cultivo con tiempos aproximados. Adaptado de Hernández-Hernández, 2005.

A los 23 a 25 días después de la primera muda la hembra realiza una segunda muda, la cual da origen a la hembra adulta. La hembra adulta aumenta en tamaño alcanzando a medir de 4-6 mm de largo, 3-4.5 mm de ancho y 3.8 a 4.2 mm de alto. También puede llegar a pesar de 40 a 47 mg dependiendo de las condiciones alimentarias. El polvo ceroso comienza a secretarse al poco tiempo después de la muda en la parte ventral y dorsal de la hembra, con un mayor espesor que en la ninfa II. La hembra adulta alcanza su madurez a los 57 días de haber emergido del huevo. Cuando el macho copula con ella en su edad madura, la oviposición se realiza en los 80-90 días (Pérez-Guerra 1991).

## 1.2. Pigmentos derivados de la cochinilla

La historia de los pigmentos data desde épocas prehispánicas, en donde obtenían colorantes de la naturaleza, de flores, frutos y algunos insectos como la cochinilla. Con

estos colorantes se teñía prendas, utensilios, se pintaba en las cavernas e incluso el cuerpo, como símbolo de alguna tribu o algún rango.

Las antraquinonas constituyen un grupo numeroso de quinonas naturales, que son base y fuente de una gran cantidad de colorantes. Son compuestos aromáticos polihidroxilados en ocasiones metilados (Figura 1.7). Las antraquinonas que poseen sustituyentes en los carbonos 2 ó 3 presentan variaciones en el estado de oxidación del carbono, además son capaces de formar grupos más complejos. Por ejemplo, algunas antraquinonas pueden variar del color amarillo a colores como el rojo o el negro, de acuerdo con sus sustituyentes, ya que mientras mayor sea el número de sustituyentes donadores de electrones, más fuerte y profundo será el color.

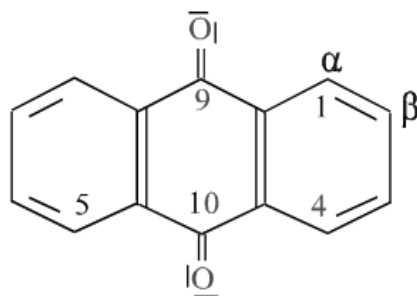


Figura 1.7. Estructura básica de una antraquinona.

Las antraquinonas se hallan libres en la naturaleza, principalmente en raíces y corteza de algunas plantas, líquenes, hongos y algunos insectos. Entre las plantas con presencia de antraquinonas se encuentran especies de las familias: *Rubiáceas*, *Rhamnáceas*, *Poligonáceas*, *Leguminosas*, *Escrofulariáceas*, *Liliáceas* y *Verbenáceas*.

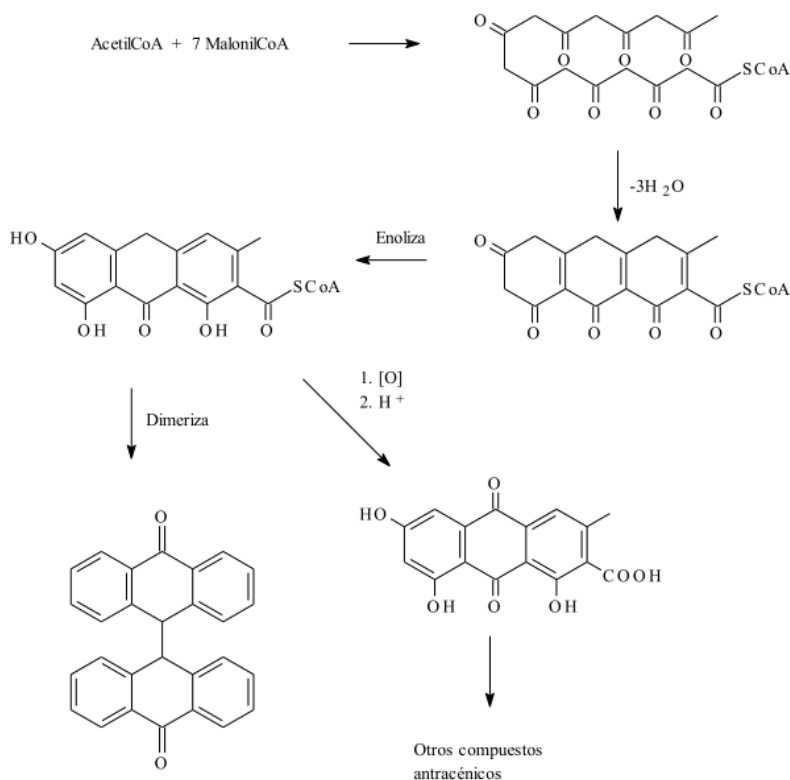


Figura 1.8. Biogénesis de compuestos antracénicos vía Malonil Coenzima A, adaptado de Martínez-Martínez 2012.

De acuerdo con estudios de biosíntesis, se dice que las antraquinonas y algunos compuestos antracénicos, se originan a partir de la ruta de la malonil coenzima A (Figura 1.8) en hongos, líquenes y plantas superiores de las familias *Ramnáceas*, *Poligonáceas* y *Fabáceas* (Leguminosas). A su vez, en las *Rubiáceas*, *Gesneriáceas*, *Escrofulariáceas*, *Verbenáceas* y *Bignoniáceas*, se originan a partir de ácido shiquímico y ácido mevalónico (Figura 1.9) (Martínez-Martínez 2012). Esta información, sin embargo, se desconoce en insectos como la cochinilla debido, en gran parte, al desconocimiento de la naturaleza de los precursores o de las rutas de biosíntesis de las antraquinonas.

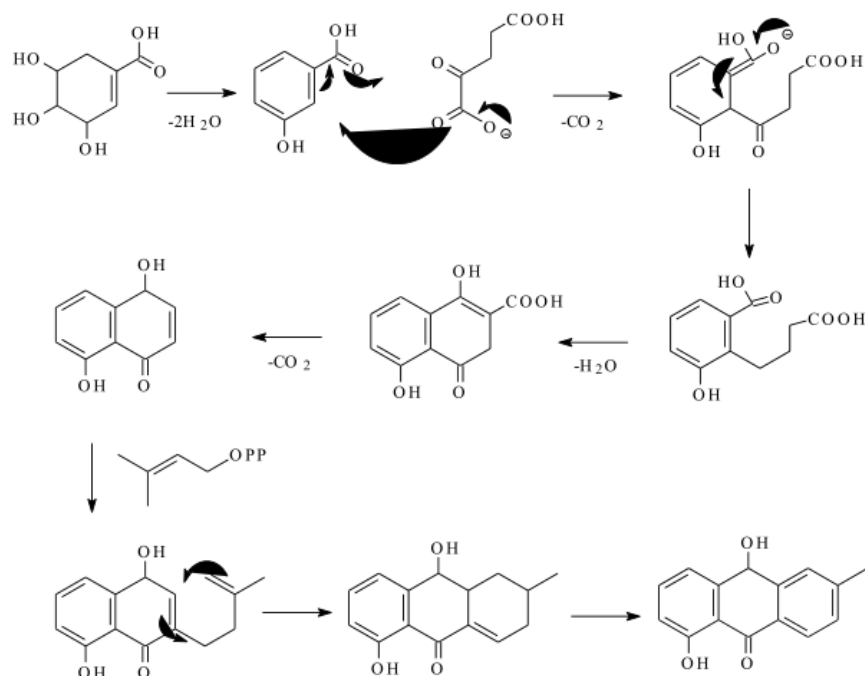


Figura 1.9. Biogénesis de compuestos antracénicos vía ácido shiquímico y acetil coenzima A, adaptado de Martínez-Martínez 2012.

El ácido carmínico es el principal pigmento presente en la cochinilla. Es un compuesto orgánico perteneciente al grupo de las antraquinonas, Su nombre, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) es ácido antraquinon-7-glucopiranosil-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-2-carboxílico y con formula condensada  $C_{22}H_{20}O_{13}$  (Figura 1.10). El ácido carmínico es la base para la producción del carmín, un colorante de gran importancia industrial, tanto por sus propiedades como colorante, que lo hacen tan versátil, como por su naturaleza e inocuidad, que le permiten utilizarlo en una amplia gama de productos.

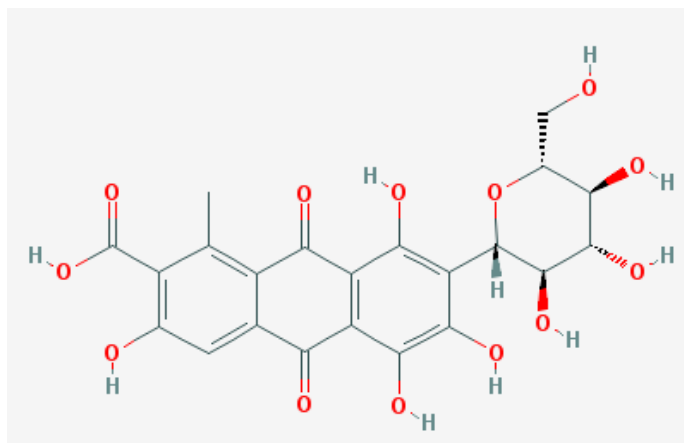


Figura 1.10. Estructura química del ácido carmínico.

El ácido carmínico representa de 15-23% del peso seco de la cochinilla hembra, el cual varía dependiendo de algunos factores como la humedad, temperatura y la fuente de alimento. Existen diferencias entre la calidad de la cochinilla fina respecto a su porcentaje de ácido carmínico producido. El porcentaje de ácido carmínico ideal para considerarla cochinilla de primera calidad es de aproximadamente 20% de ácido carmínico con respecto a los demás componentes de la cochinilla, mientras que se considera de segunda calidad a partir del 15 % de ácido carmínico (Chávez-Moreno et al. 2010).

Existen, además del ácido carmínico, otros pigmentos presentes en la hemolinfa del insecto. Estos pigmentos se encuentran en concentraciones muy por debajo del ácido carmínico; sin embargo, son detectables bajo ciertas condiciones de extracción (González et al. 2002). El ácido quermésico y flavoquermésico figuran entre los más abundantes de los pigmentos menores de la cochinilla. Estos pigmentos se han encontrado anteriormente en otros insectos, los cuales, alguna vez, también fueron fuente de pigmentos en Europa. El ácido quermésico, que posee una coloración rojiza-naranja, fue identificado en el insecto *Kermococcus ilicis* (Figura 1.11), que fue subsiguientemente utilizado como fuente de la obtención del pigmento. En la figura se observa la planta huésped que éste utiliza como fuente de alimento, notando la rama leñosa y diferentes coloraciones del insecto.



Figura 1.11. Insecto *Kermococcus ilicis* (flechas rojas), fuente de obtención de ácido quermésico.

La presencia de ácidos quermésico y flavoquermésico en la industria de los pigmentos fue corta debido a que se dio a conocer la cochinilla en Europa. Se cuenta que hubo una gran demanda del colorante de la cochinilla cuando ocurrió la conquista española en América, ya que los colorantes obtenidos de insectos en Europa no eran tan versátiles ni tan estables como el que se extraía de la cochinilla. Como se puede observar en la Figura 1.12, los ácidos quermésico (A) y flavoquermésico (B), difieren del ácido carmínico (Figura 1.10) por la ausencia del glicósido en el carbono 2 de la molécula.

La cochinilla presentaba una extracción de color más intensa y debido a que la planta huésped podía contener una gran densidad de población de estos insectos. Además, era más fácil y rápido obtener mayores cantidades del pigmento a partir de este insecto. Sin

embargo, mucho influyó la presencia de la glucosa en esta opción de obtención de pigmentos. Como se mencionó anteriormente, las antraquinonas con mayor número sustituyentes presentan coloraciones más intensas. Sin embargo, la presencia de la glucosa en el ácido carmínico presenta una mayor estabilidad electrónica, que permite que los colores de los pigmentos obtenidos al unir metales con el ácido carmínico, sean más estables y duraderos.

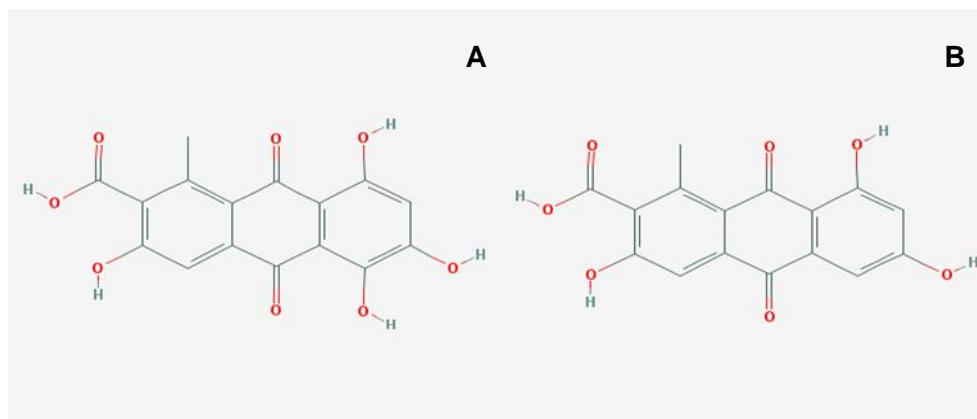


Figura 1.12. Estructura química de ácido quermésico (A) y flavoquermésico (B).

La importancia económica del carmín, ácido carmínico y la producción de cochinilla llevaron a investigadores a desarrollar estudios sobre su origen, producción, síntesis y mejoras en cuestión de obtención, por lo que es o fue objetivo de numerosos trabajos de tesis y proyectos de investigación, obteniendo incluso los pasos para la ruta sintética del ácido carmínico. Sin embargo, la ruta de biosíntesis de este compuesto aún no ha sido descrita (Allewi et al. 1991, 1998).

### 1.3. *Opuntia ficus-indica*

En México se conoce a los cladodios de *Opuntia* spp. y a la planta en general como nopal. Los nopales son originarios de América tropical y subtropical, aunque hoy en día se pueden encontrar en varios continentes de forma cultivada o silvestre debido a su facilidad de crecer en sitios con escasez de agua (Tovar-Puente 2000). Pertenece al género *Opuntia*, de la familia de las cactáceas, de las cuales se han descrito 125 géneros y 2000 especies aproximadamente, de acuerdo con el Instituto Nacional de Ecología (INE).

Los nopales son plantas suculentas que se caracterizan por tener tallos aplanados, conocidos en México como pencas. Estas alcanzan a medir de 60 a 70 cm de largo y de 20 a 30 cm de ancho, variando su grosor de 0.8 a 3 cm aproximadamente. En ambas caras presentan espinas, de las cuales existen dos tipos: los gloquídeos, que son pequeñas, comúnmente amarillas o naranjas y se agrupan en un gran número, y las hojas modificadas, que se reconocen por ser alargadas y blancas. Posee un sistema radicular extenso y ramificado. Las flores se dan en la parte superior del cladodio y pueden ser de diferentes colores, según la variedad. Normalmente las plantas de nopal florecen una vez

al año y posteriormente se forma el fruto, llamado tuna, el cual es carnoso y de colores variables (Ginestra et al. 2009).

Los nopales resisten en climas áridos y semiáridos, por lo que se encuentran en sitios donde la escasez de agua y las altas temperaturas se presentan en todo el año, sin embargo, son muy sensibles a las bajas temperaturas. Aunque existen casi 300 especies de *Opuntia*, el hombre utiliza aproximadamente de 10 a 12, de las cuales, la que se cultiva más a nivel mundial es *Opuntia ficus-indica* (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial 2011; Portillo, Liberato. & Viguera 2013).

El nopal se puede utilizar para diferentes propósitos, ya sea para la producción del fruto, tuna, obtención de *nopalitos* para consumo vegetal o como especie forrajera. De las especies conocidas para producción de tuna se encuentra a *Opuntia ficus-indica*, *O. amyclaea*, *O. joconostle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha*. De las especies silvestres que también producen fruto se encuentran *O. hyptiacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta*. Las especies utilizadas para la obtención de nopal verdura además de *Opuntia ficus-indica*, son *O. leucotricha* y *O. robusta*. Y por último, el uso de *O. ficus-indica* y *O. cochenillifera* para la producción de cochinilla (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial 2011).

### 1.3.1. Composición química de *Opuntia*

En México la importancia del nopal como fuente de alimento es grande. El nopal se consume como nopal verdura, asado, cocido, relleno, etc. Sin embargo, el consumo de nopal no se ha limitado a guisados o comida preparada, sino que se ha utilizado en mezclas para jugos verdes como fibra, y algunos dulces o gomitas a base de nopal. También se ha introducido en mercados como champús, cremas, jabones, etc. Debido a esto y a su gran importancia como alimento de animales y especie forrajera, ha sido de gran interés en la investigación de muchos grupos de trabajo. Y gracias a esto, el conocimiento de su potencial nutracéutico ha ido incrementando a nivel internacional.

La investigación de la composición química general de los cladodios de diferentes especies y variedades de *Opuntia* se ha realizado a lo largo de muchos años, enfocando dichos estudios en diferentes aspectos, desde su composición de carbohidratos, pectinas, fibra, hasta la caracterización del mucílago. Sin embargo, la composición química de *Opuntia* varía mucho entre especies: depende, además, de la edad de la planta y por lo tanto del cladodio, ubicación geográfica, clima del sitio de crecimiento, tipo de suelo, fertilización, etc. También, se ha evaluado el uso potencial del mucílago como agente espesante en pigmentos industriales y como tratamiento en investigaciones realizadas para diferentes enfermedades (Stintzing et al. 2001; Goycoolea & Cárdenas 2003; Stintzing & Carle 2005; Matsuhiro et al. 2006; Zhao et al. 2007; Celis-Fabian 2009; De Oliveira-Ribeiro et al. 2010; García-Osuna 2013; Angulo-Bejarano et al. 2014; Kyriacou et al. 2016; Lefsih et al. 2016; Lefsih et al. 2017).

Stintzing y Carle (2005) realizaron una revisión de las investigaciones realizadas hasta ese momento sobre la composición química de nopal (Tabla 1.1) En la tabla se observa



que el porcentaje de humedad constituye aproximadamente un 90% del peso de los cladodios frescos y que los carbohidratos son los componentes mayoritarios.

**Tabla 1.1. Composición química general de cladodios de *Opuntia* spp.**

	<b>Peso seco (g/100g)</b>	<b>Peso fresco (g/100g)</b>
<b>Agua</b>	--	88-95
<b>Carbohidratos</b>	64-71	3-7
<b>Ceniza</b>	19-23	1-2
<b>Fibras</b>	18	1-2
<b>Proteínas</b>	4-10	0.5-1
<b>Lípidos</b>	1-4	0.2

**De acuerdo a Stintzing y Carle (2005)**

Es bien conocido que *Opuntia* contiene gran contenido de carbohidratos, muchos de los cuales forman parte de la estructura de pectinas y otros polisacáridos. Lo anterior se deriva de que los carbohidratos derivados de su hidrólisis son principalmente, ácidos urónicos, que representan el mayor porcentaje en peso, ramnosa, galactosa, glucosa, arabinosa y xilosa. La Tabla 1.2 presenta los resultados reportados por Ginestra et al. 2009, en cuanto a monosacáridos más comunes.

**Tabla 1.2. Composición de monosacáridos en cladodios completos de *Opuntia*.**

<b>Monosacáridos</b>	<b>Cladodio completo µg/mg</b>
Ramnosa	7.13 ± 1.28
Fucosa	0.74 ± 0.11
Arabinosa	39.64 ± 1.96
Xilosa	18.64 ± 0.84
Manosa	13.63 ± 0.81
Galactosa	33.69 ± 2.89
Glucosa	153.15 ± 0.25
Ácido Galacturónico	96.26 ± 6.54

**Tomado de Ginestra et al. (2009).**

De acuerdo con Ginestra et al. (2009), la composición de los monosacáridos presentes en los polisacáridos y pectinas, varía de acuerdo a la capa del cladodio de *Opuntia* (Figura 1.13, Tabla 1.3)

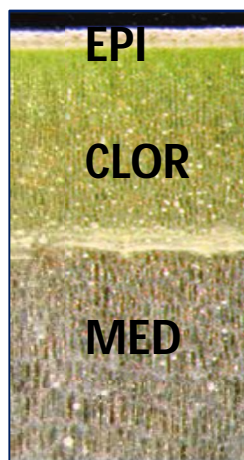


Figura 1.13. Definición de capas para estudio de carbohidratos (Ginestra et al. 2009). EPI = epidermis; CLOR = clorénquima; MED = médula.

**Tabla 1.3. Composición de monosacáridos en cladodios de *Opuntia* por capa.**

Monosacáridos	Epidermis	Clorénquima	Parénquima
	µg/mg	µg/mg	µg/mg
Ramnosa	7.23 ± 0.21	11.26 ± 0.99	9.92 ± 1.25
Fucosa	2.67 ± 0.21	4.15 ± 0.21	3.21 ± 0.48
Arabinosa	101.86 ± 5.59	43.46 ± 2.73	34.77 ± 6.32
Xilosa	23.42 ± 1.01	34.10 ± 1.24	41.11 ± 6.34
Manosa	12.59 ± 0.72	11.08 ± 1.33	8.28 ± 0.79
Galactosa	26.49 ± 0.73	98.24 ± 1.11	107.10 ± 3.45
Glucosa	53.81 ± 1.68	66.17 ± 2.11	59.36 ± 8.08
Ácido galacturónico	187.62 ± 10.05	223.46 ± 8.25	218.65 ± 9.09

Tomado de Ginestra et al. 2009.

En la caracterización de componentes de bajo peso molecular, se puede mencionar a los minerales, aminoácidos y ácidos orgánicos. Entre los minerales reportados en *Opuntia* se menciona a potasio, calcio, sodio, hierro, magnesio, manganeso, zinc y cobre, variando entre autores la ausencia o presencia de algunos y la abundancia o concentración dependiendo de las especies de nopal, sitio de cultivo y estado fisiológico del tejido del

cladodio. Sin embargo, coincide la abundancia de potasio como el principal mineral y en segundo lugar, el calcio (Stintzing y Carle 2005).

Para los ácidos orgánicos, por otro lado, se reporta la presencia de ácido oxálico, málico, cítrico, malónico, siendo el más abundante el ácido málico con un valor de 985 g/ 100g y el segundo el ácido cítrico, con un valor de 178 g/ 100g de tejido fresco en ambos casos, ésto evaluando las diferencias de acidez del tejido respecto al horario de colecta. El ácido succínico y tartárico fueron apenas detectados como trazas.

Dentro de los aminoácidos se reporta la presencia de alanina, arginina, asparagina, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina, triptófano y valina, siendo el más abundante la glutamina presentando un valor de 17.3 mg/ 100g en tejido fresco y el menor, glicina y triptófano con 0.5 mg/ 100g en tejido fresco (información obtenida de Stintzing y Carle 2005 modificada de Brückner y Westhauser 2003).

### 1.3.2. *Opuntia* como huésped y fuente de alimento de *Dactylopius*

Como se mencionó en el apartado de taxonomía, el género *Dactylopius* es muy variado en cuanto a su localización y su infestación en diferentes especies de cactáceas. Sin embargo, se caracteriza por infestar especies en climas secos o semi áridos como los géneros *Opuntia*, *Cylindropuntia*, *Grusonia* y en raras ocasiones, *Agave* (Figura 1.14, Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato n.d.). Pero hablando particularmente de la especie *Dactylopius coccus* Costa, su principal hospedero resulta ser *Opuntia ficus-indica* (Chávez-Moreno et al. 2010).



Figura 1.14. Infestación de *Dactylopius* sp en Agave. (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato)

*Opuntia ficus-indica* ha sido seleccionado por el hombre para la producción de cochinilla fina, en parte por su alta infestación de la cochinilla y por su alta variedad de cladodios en la especie, pero principalmente debido a que sus variedades poseen menos espinas que el resto de las *Opuntias*. Se conoce que *Opuntia ficus-indica* posee variedades de nopal en diferentes regiones, como lo son la variedad Atlixco, Esmeralda y Milpa Alta, por mencionar algunas.

### 1.3.3. Producción de grana de cochinilla

La producción de grana cochinilla se ha evaluado en diferentes aspectos, desde la preferencia de la cochinilla por la variedad de nopal, hasta su producción de ácido carmínico de acuerdo con los diferentes ambientes en los que se encuentra.

En cuanto a la producción de cochinilla, existen diferentes estudios. Tovar-Puente (2000) reportó la preferencia de la cochinilla en tres diferentes variedades de *Opuntia ficus-indica*, Villanueva, Jalpa y Copena en el estado de Nuevo León. En este estudio, se tomaron en cuenta las siguientes variables: el peso fresco, peso seco, número de insectos y peso seco de los insectos, durante dos estaciones del año, invierno y verano, evaluando con esto las ventajas o desventajas de utilizar alguna variedad más que otra en el cultivo de la cochinilla. Lo reportado indicó que la variedad Villanueva, presentó una mayor producción de la cochinilla, obteniendo mayores valores en peso fresco, peso seco y número de insectos, mientras que la variedad Jalpa mostró mayores porcentajes de peso seco, aunque no un gran número de insecto. Esto indicaría que en cuanto a cantidad y peso seco de insectos, Villanueva es una mejor opción (Tovar-Puente 2000). Al estudiar la época del año en la que se obtiene mejor producción de cochinilla, se reportó que la época de invierno presentó mejores resultados en todas las condiciones evaluadas, excepto en el número de insectos, donde no se registró diferencia entre las dos estaciones del año evaluadas (Tovar-Puente 2000).

Otras evaluaciones se enfocaron, por ejemplo, a identificar la forma más práctica para el cultivo de cochinilla. De modo que, Campos-Figueroa y Llanderal-Cazares (2003) evaluaron la producción de la grana cochinilla cultivada en invernadero, en el cual compararon la producción del insecto en diferentes acomodos del cladodio de nopal, evaluando en los acomodos, penca colgada en posición normal, penca colgada invertida y penca sobre redes de rafia, donde las variables fueron número de hembras por penca así como peso fresco. Las diferencias se presentaron únicamente en el número de hembras, ya que la penca invertida colgante presentó mayor cantidad de hembras que la penca sobre rafia (Figura 1.15).



Figura 1.15. Producción de cochinilla en penca invertida.

A su vez, Aldama-Aguilera (2005) evaluó la producción de cochinilla utilizando diferentes condiciones, infestando plantas de nopal en micro túneles, utilizando dos variedades de lona, lona de plástico transparente y lona de rafia, y plantas de nopal a la intemperie. Se evaluó el peso fresco y seco, contenido de ácido carmínico, la duración del ciclo biológico y la presencia de enemigos naturales de la cochinilla, así como la resistencia de la planta de nopal a varios ciclos. Lo que reportó este estudio fue que las plantas de nopal infestadas en micro túnel con lona de plástico transparente presentaron la mejor condición para la producción de cochinilla. La temperatura promedio fue mayor en estos microtúneles que, en la intemperie, lo cual favoreció a un ciclo biológico más corto. Se presentó un rendimiento similar al reportado por otros autores en la primera generación de cochinilla en el nopal, siendo aproximadamente de 7.7 g de peso fresco de cochinilla por penca ( Campos-Figueroa y Llanderal-Cazares 2003; Aldama-Aguilera et al. 2005). También reportaron un mayor rendimiento de la cochinilla en la segunda generación en plantas en micro túneles con lona transparente. Además, la calidad de la cochinilla fue mayor en la segunda generación, presentando un porcentaje de ácido carmínico de 22.9% en comparación con un 19% en la primera generación.

Coronado-Flores et al. (2015) publicaron el efecto de la fertilización en las plantas de nopal de donde obtenían las pencas utilizadas para producción de cochinilla en invernadero. Evaluaron el efecto de cuatro tipos de fertilizaciones: química, orgánica, química-orgánica y sin fertilizante, mientras que los indicadores a evaluar fueron: número de hembras por penca, duración del ciclo biológico, peso fresco, peso seco, porcentaje de

ácido carmínico y talla del insecto. Los resultados mostraron que la mayor producción de cochinilla se presentó en aquellos cladodios provenientes de las plantas fertilizadas mediante el método químico, lo que indica una relación positiva entre el nitrógeno en la planta y el número de hembras. Los tratamientos orgánicos y sin fertilizante, presentaron un menor ciclo de vida de la cochinilla, pero mayor integridad del cladodio. La grana criada sobre cladodios tratados con fertilización química-orgánica presentaron mayor concentración de ácido carmínico. Sin embargo, existe una relación negativa en cuanto a nitrógeno en la planta con el porcentaje de ácido carmínico en las hembras.

Todas estas investigaciones aportan resultados que permiten a los criadores de cochinilla elegir la variedad de la especie de *O. ficus-indica* que pueden utilizar, el tipo de cultivo y si deben fertilizar sus plantas huésped con algún fertilizante en específico, con el fin de obtener una mayor cantidad de insectos con un rendimiento más alto de ácido carmínico. Sin embargo, mucho se especula sobre los nutrientes que puede obtener la cochinilla del nopal, que le permitan producir una mayor cantidad de ácido carmínico.

#### 1.4. Áfidos, otros insectos chupadores y su mecanismo de búsqueda de alimento

Como se mencionó en el apartado de taxonomía, *Dactylopius* pertenece al orden *Hemiptera*, el cual comprende a insectos como las chinches, pulgones y cigarras. Existen cerca de 95,000 especies conocidas a nivel mundial. Los hemípteros se caracterizan por tener piezas bucales en forma de estiletes especializadas en la succión de savia de plantas y en otros casos para la succión de sangre o de fluidos de animales, dependiendo de su fuente de alimento.

Los áfidos representan uno de los géneros más estudiados de este orden debido a su importancia como plaga para algunos cultivos de importancia económica. Se sabe que los áfidos se alimentan de la savia del floema de diferentes tipos de cultivos, llevando a cabo todo un proceso de sensado y sondeo de la fuente de alimento, hasta llegar al sitio de alimentación.

Las partes que conforman la pieza bucal de estos insectos son el labio, labro, maxila y mandíbula. La mandíbula, maxila y el labro, se encuentran contenidos en una cubierta formada por lipoproteínas y fosfolípidos (labio). La maxila y la mandíbula tienen una forma alargada parecida a una aguja con grandes surcos, el cual uno les permite secretar saliva y el otro permite la ingesta del alimento. El labio provee rigidez y control direccional para el ápice flexible del estilete (Dixon 1998; Miles 1999).

El sensado de la alimentación se lleva a cabo en la punta del labio, en el cual se localizan quimiorreceptores que le permiten reconocer y probar el contenido del medio que lo rodea (Martín et al. 1997; Miles 1999). La entrada del estilete puede ser vía apoplástica o simplástica. El movimiento puede tener apariencia de ramificación debido a que en el rastreo existe redireccionalidad en caso de no encontrar el sitio de alimentación deseado (Fouche et al. 1984), aunque esto puede causar un daño masivo a las células circundantes.

Los áfidos también se han estudiado debido a la relación simbiote que presentan con bacterias, las cuales les proporcionan aminoácidos como fuente de nitrógeno. Esto les permite ser menos selectivos con su huésped al momento de la alimentación (Swanevelde 2010).

Los áfidos y la cochinilla *D. coccus*, son diferentes en morfología, tamaño, localización en plantas huésped, etc. Sin embargo, al ser del mismo orden, los mecanismos de alimentación y de interacción con la planta huésped, pueden representar una fuente de información relevante que pudiese explicar, al menos en parte, el comportamiento de la cochinilla y ayudar a responder, además, algunas de las preguntas derivadas de la información obtenida en este trabajo.

Este trabajo se enfocó primordialmente en la identificación del pico chupador o estilete de la cochinilla *D. coccus*, debido a la escasa información que existe sobre esta extremidad del insecto. También, se enfocó en determinar la localización del estilete en cladodios de *O. ficus-indica* y en identificar los posibles metabolitos o compuestos blanco del nopal, usados como fuente de alimento por la cochinilla.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre la cochinilla y el nopal se enfoca primordialmente en modos de aumentar la producción del insecto y así incrementar la cantidad de ácido carmínico y, por ende, del pigmento. Sin embargo, no se tiene información suficiente sobre el pico chupador y se desconoce el sitio de alimentación de la cochinilla dentro del nopal y la relación que éste pudiera tener con la variable composición química del nopal.

## 3. HIPÓTESIS

La cochinilla *Dactylopius coccus* elonga sus estiletes dentro del cladodio de nopal *Opuntia ficus-indica* hacia el sitio o capa en donde se localiza su principal fuente de alimento, encontrando ahí compuestos químicos que, además de ser nutrientes, pudieran ser utilizados para la síntesis del ácido carmínico.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Identificar el pico chupador o estilete de la cochinilla hembra, establecer su longitud y localización en las capas del cladodio de nopal y determinar la composición química de la capa de nopal en la que se localiza.

### 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un cultivo de cochinilla *D. coccus* en invernadero, infestando cladodios de nopal *O. ficus-indica* variedad Esmeralda.
- Identificar, utilizando microscopía digital, el estilete de la cochinilla, determinar su longitud e identificar la capa del cladodio de la que se alimenta en las tres diferentes etapas de su desarrollo.
- Determinar la composición química de cada una de las capas del cladodio relacionada con la profundidad del estilete en las tres diferentes etapas de desarrollo de la cochinilla.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Establecimiento del cultivo de cochinilla *Dactylopius coccus* en invernadero, infestando cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica* variedad Esmeralda

La infestación fue realizada en el invernadero 6B de la unidad Cinvestav Irapuato con el fin de monitorear las edades de la cochinilla y tomar muestras en los tiempos especificados.

#### 5.1.1. Infestación de cladodios

Se tomaron cladodios de nopal *O. ficus-indica* variedad Esmeralda de aproximadamente dos años de edad. Los cladodios de nopal fueron obtenidos de la comunidad El Zauco, localizada en el kilómetro 11 de la carretera León-San Felipe, al Noroeste del estado de Guanajuato. El pie de cría de cochinilla fue proporcionado por los productores de grana de Salvatierra, Guanajuato (Figura 5.1).



Figura 5.1. Cochinilla en etapa Ninfa I en tamiz, como material para infestación de cladodios.

Los cladodios fueron cortados de plantas adultas y mantenidos en un lugar fresco y seco de manera horizontal (Figura 5.2). La cría de cochinilla se depositó en los cladodios horizontales mediante tamizado. Los cladodios permanecieron horizontalmente por un periodo de 3 a 5 días y posteriormente se colocaron en modo penca invertida en un invernadero. Los tiempos de cosecha de las cochinillas fueron de 25, 40 y 80 días aproximadamente, de acuerdo a lo reportado por Marin y Cisneros (1977).



Figura 5.2. Aspecto de cladodios de nopal *O. ficus-indica* var. Esmeralda de 2 años, previo a infestación por cochinilla.

## 5.2. Observación de estilete de cochinilla utilizando microscopía digital en las tres diferentes etapas de desarrollo del insecto.

### 5.2.1. Tratamiento para microscopía de muestras de cochinilla

Las muestras de cochinilla se tomaron en los tiempos de cosecha mencionados anteriormente. Se realizaron cortes del cladodio de nopal, de aproximadamente 1 cm de ancho por 1 cm de largo, en los cuales se localizaba la cochinilla en la etapa deseada en el centro (Figura 5.3 A). Los cortes fueron tomados desde el haz al envés del cladodio en el sitio cercano al estilete.

Los cortes de cladodio con cochinilla se colocaron en tubos de 1.5 mL y se añadió 1 mL de solución fijadora (compuesta por 50 mL de etanol absoluto, 5 mL de ácido acético glacial, 10 mL de formaldehído y 35 mL de agua). Las muestras se dejaron en solución fijadora por 3 a 4 días.

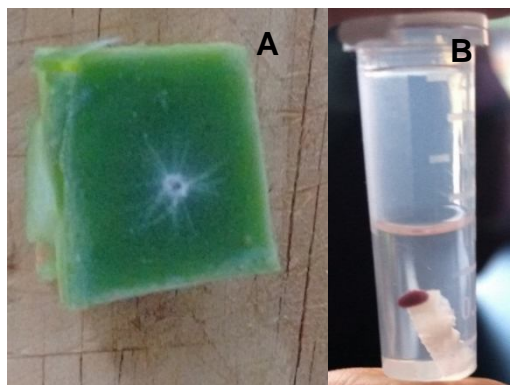


Figura 5.3. Corte de nopal en sitio de infestación (A). Corte de muestra de nopal con cochinilla, sumergido en solución fijadora (B).

### 5.2.2. Histoacclarado

Después de fijada la muestra, el corte de nopal fue aclarado con una solución conformada por cloroformo (27%), metanol (63%), ácido láctico (10%) y 0.74 g de ácido tricloroacético (volumen total de 100 mL) por un periodo de 48 a 96 h hasta observar el color deseado de aclarado del tejido (Figura 5.3 B).

Las muestras aclaradas fueron embebidas en una solución de glicerol al 50%, realizando 3 lavados de 15 min entre cada paso. Posteriormente se observaron con ayuda del microscopio digital de alta resolución VHX 5000 marca KEYENCE, a cargo del doctor Lino Sánchez.

### 5.3. Determinación de la composición de las capas del cladodio.

Las capas del nopal fueron separadas utilizando la metodología propuesta por Ginestra y colaboradores (2009). Se dividieron las capas del cladodio de nopal en tres secciones de acuerdo a sus diferentes tejidos, denominándolos como epidermis, clorénquima y médula. Sin embargo, de acuerdo a lo observado en la Figura 5.4, la capa denominada clorénquima por Ginestra et al. (2009), se dividió en clorénquima y parénquima debido a sus diferencias en el acomodo celular. De tal forma el clorénquima se definió como la sección del cladodio localizada adjunta a la epidermis, con el acomodo de las células en empalizada y una estructura más compacta. Mostró, también, un color verde más oscuro. A su vez, el parénquima se definió como la parte inferior cercana a la vasculatura del cladodio debido a sus diferencias en acomodo celular, forma y estructura y color, que resultó ser un verde más claro.

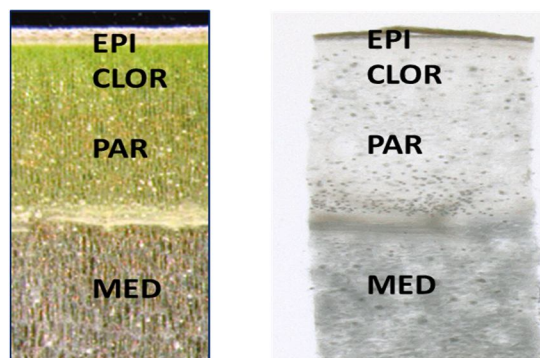


Figura 5.4. Definición de capas del cladodio de nopal de acuerdo con lo observado en microscopía digital. Epidermis (EPI), Clorénquima (CLOR), Parénquima (PAR) y Médula (MED). Izquierda, fotografía adaptada de Ginestra et al. (2009), y derecha, fotografía tomada durante el transcurso de este estudio mediante microscopía digital.

La separación de capas se realizó utilizando un bisturí con navaja número 24 B Braun (LOTZ7503562). Las muestras fueron congeladas inmediatamente y almacenadas en tubos de 50 mL (Nara Biotec). Se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso y posteriormente fueron liofilizadas (Virtis SP Scientific Sentry 2.0). Posteriormente fueron almacenadas en un desecador hasta su uso.

### 5.3.1. Hidrolizado de las muestras liofilizadas

Las muestras de capas de nopal liofilizadas previamente fueron molidas con ayuda de un mortero de Agatha e hidrolizadas para el análisis de los componentes principales utilizando la metodología reportada por Matsuhira et al. (2006), con algunas modificaciones.

Se adicionó 1.8 mL de HCl 0.08 M a 10 mg de tejido liofilizado de cada capa (5 viales por capa). La mezcla se llevó a cabo en viales de 3.0 mL (Pierce R2825-030, referencia MV-30). Las muestras fueron calentadas durante 0, 4, 8, 12 y 16 horas a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  utilizando un termoblock VWR Scientific para observar el efecto de la hidrólisis ácida con respecto al tiempo. Posterior al tiempo de hidrólisis, las muestras se colocaron a temperatura ambiente y se detuvo la hidrólisis neutralizando el pH utilizando NaOH 1 M hasta llegar a  $\text{pH} = 7$ . Las muestras hidrolizadas fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 5.3.2. Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (o TLC, por las siglas, en inglés, de *Thin Layer Chromatography*) de carbohidratos de nopal se realizó de acuerdo con el protocolo de Mellado-Mojica et al. (2009) con algunas modificaciones. De las hidrólisis de capas de nopal *O. ficus-indica* var. Esmeralda de 2 años, se tomaron 3 microlitros y aplicaron uno a uno a una placa de silica gel con soporte de aluminio. Se colocaron estándares de fructooligosacáridos (FOS), maltooligosacáridos (MOS) y algunos monosacáridos como fucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa a una concentración de 10 mg/mL, para la identificación de carbohidratos y su grado de polimerización. La placa de TLC se

desarrolló corriendo cuatro veces utilizando los solventes butanol/ propanol/ agua en proporción 3: 12: 4 (Kanaya et al. 1978). Los carbohidratos se visualizaron al calentar las placas tratadas con anilina/ difenilamina/ ácido fosfórico en acetona (Anderson et al. 2000).

### 5.3.3. Electroforesis de carbohidratos asistida por un fluoroforo (FACE)

Los azúcares reductores son aquellos que poseen en su extremo un grupo aldehído libre, con el cual pueden reaccionar con otras moléculas. La electroforesis de carbohidratos asistida por un fluoroforo (FACE, por sus siglas en inglés Fluorophore Assisted Carbohydrate Electroforesis) es un procedimiento que utiliza un gel electroforético de poliacrilamida de alta resolución. Las fracciones de carbohidratos individuales son marcadas en el aldehído terminal con un fluoróforo altamente cargado, 8-aminonaptalene 1,3,6-trisulfonato (ANTS) el cual le imparte una carga fuerte uniformemente negativa a cada azúcar reductor de mono u oligosacárido y permite su separación a partir de un gel de poliacrilamida por electroforesis. Para el análisis de carbohidratos mediante esta técnica se realizó la siguiente metodología.

#### 5.3.3.1. Derivatización de carbohidratos.

Se prepararon las soluciones acuosas de las capas de nopal hidrolizadas previamente y se llevaron a una concentración conocida, tomando 200 µg totales de las capas de nopal mencionadas anteriormente y se colocaron en tubos de 500 µL. Las muestras fueron liofilizadas durante 24 h. Secadas las muestras, fueron tratadas con 20 µL de la solución de ácido 8-amino naftaleno, 1, 3, 6-trisulfónico (ANTS) 0.2 M. Se agregó 20 µL de la solución de cianoborohidruro de sodio (NaBH<sub>3</sub>CN) 0.1 M en dimetilsulfóxido (DMSO). Se mezcló en vórtex durante 20 s, y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 s. Se incubó a 37 °C durante 24 h en oscuridad. Se mezcló en vórtex por otros 20 s. Se secó la muestra por centrifugación al vacío (Maxydry) durante 2 h aproximadamente. Se resuspendió la muestra seca en 100 µL de buffer de resuspensión (1.25 mL buffer 4X para gel concentrador pH = 6.8, 2.0 mL de glicerol al 99%, 6.75 mL de agua). Se preparó un gel de acrilamida para electroforesis de carbohidratos utilizando un gel separador (o *Resolving gel*) de acrilamida al 35 % y un gel concentrador (o *Stacking gel*) de acrilamida al 5 %. Las condiciones para preparar los geles se muestran en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1. Reactivos y volúmenes para preparación de los geles separador y concentrador para FACE.**

<b>Soluciones Gel Separador</b>	<b>Volumen</b>	<b>Soluciones Gel Concentrador</b>	<b>Volumen</b>
Solución Stock de Acrilamida al 55%	7.5 mL	Solución Stock de Acrilamida al 20%	0.5 mL
Buffer 4X (pH = 8.8)	2.5 mL	Buffer 4X (pH = 6.8)	0.5 mL
APS* (10%)	50 µL	H <sub>2</sub> O	1.0 mL
TEMED	10 µL	APS (10%)	20 µL
		TEMED	3 µL

\* APS = Persulfato de amonio.

Se cargaron 2  $\mu\text{L}$  de las muestras derivatizadas en el gel de poliacrilamida. Se añadió un estándar de MOS como escalera de grado de polimerización. Se colocó el buffer de corrida en la cámara y se colocó el ánodo y cátodo en sus respectivas conexiones en la fuente de poder. Se corrió el gel a un voltaje de 150 Volt (V) a una temperatura de 4°C por 4 h aproximadamente. Se observó el avance del gel con una lámpara de UV ( $\lambda$  254/ 356 nm) y finalmente se observó el gel en un foto documentador utilizando un protocolo para observación de geles de DNA con bromuro de etidio.

#### 5.3.4. Cromatografía líquida de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

El análisis de los hidrolizados de capas de nopal se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplado a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD, por las siglas en inglés, de *High-Performance Anion-Exchange liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*).

Los productos obtenidos de la hidrólisis de capas de *Opuntia* fueron analizados por HPAEC-PAD utilizando un cromatógrafo de iones Dionex ICS-3000 (USA) con una guarda-columna y columna CarboPac PA-100 de la marca Dionex. Las muestras fueron diluidas y aforadas llevándolas a una concentración de 0.5 mg/ mL con agua desionizada (resistividad de 17 M $\Omega$ ) y posteriormente filtradas utilizando una membrana de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  antes de su inyección. El volumen de inyección fue de 25  $\mu\text{L}$ .

La separación e identificación de los productos de la hidrólisis a diferentes tiempos se realizó a una temperatura de columna de 25°C, flujo de 0.8 mL/ min utilizando como solventes: A) hidróxido de sodio (NaOH) 0.15 M, B) NaOH 0.15 M/ acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) 0.5 M y C) agua desionizada (resistividad de 17 M $\Omega$ ), mediante un gradiente de CH<sub>3</sub>COONa, empleando diferentes gradientes de los eluentes como se muestra en la Tabla 5.2 de acuerdo al programa diseñado para polisacáridos de largo grado de polimerización (LDP, por sus siglas en inglés), previamente diseñado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Dra. Mercedes G. López.

**Tabla 5.2. Sistema de elución empleado para el análisis de carbohidratos de *Opuntia* mediante HPAEC-PAD.**

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	%C
0	0.8	30	0	70
5	0.8	50	0	50
15	0.8	45	15	40
30	0.8	40	30	30
45	0.8	30	50	20
60	0.8	15	75	10
65	0.8	0	100	0
70	0.8	50	0	50
75	0.8	30	0	70

### 5.3.5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

#### 5.3.5.1. Extracción de compuestos de Opuntia

La extracción se realizó de la siguiente manera: 50 mg de muestra se extrajeron con etanol al 80% en proporción 1:20 (w/v). La mezcla se sonicó 30 min a 50 °C, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 2 mL. El paso anterior se realizó dos veces y los sobrenadantes se combinaron. Por último, el solvente de los extractos se evaporó usando un concentrador por centrifugación al vacío Eppendorf Maxi-Dry (Concentrador plus/Vacufuge® plus). Una vez secas, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

#### 5.3.5.2. Derivatización

A las muestras previamente secadas se les agregaron 20 µL de piridina y 80 µL de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) +1% de Trimetilclorosilano (TMCS) y se sonicó durante 5 min a temperatura ambiente. La reacción se llevó a cabo en un Thermomixer (Eppendorf) durante 25 min a 80 °C. Una vez finalizada la reacción, se dejó temperar a temperatura ambiente. Después, se adicionaron 100 µL de isooctano, mezclando en vórtex y centrifugando a 10,000 rpm por 30 s. Inmediatamente, 100 µL de sobrenadante se transfirieron a vial con inserto y tapa septada. Posteriormente se analizó por GC-MS.

#### 5.3.5.3. Análisis mediante GC-MS.

Se usó un GC (GC 7890B Agilent technologies) acoplado a un espectrómetro de masas (MSD 5977A Agilent technologies) equipado con una columna capilar (HP-5MS 30 m x 250 µm x 0.25 µm; Agilent Technologies). Se inyectó 1 µL en el modo sin partición mediante un inyector automático (Serie 7683B; Agilent technologies). La temperatura del puerto de inyección fue de 280 °C. Se utilizó helio como gas acarreador a flujo constante de 1 mL min<sup>-1</sup>. El programa de temperaturas del horno del GC inició a 40 °C y así se mantuvo por 2 min, después se aplicó una rampa de temperatura de 4 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 240 °C y se mantuvo durante 1 min, finalmente se aplicó una rampa de 10 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 315 °C y así se mantuvo durante 15 min. La temperatura de la línea de transferencia al MS fue de 280 °C. Las temperaturas de la fuente de ionización y del cuádruplo fueron de 230 °C y 150 °C, respectivamente. Las mediciones se efectuaron en el modo SCAN con un rango de masas de 40-550 m/z, se operó a 2.9 scans s<sup>-1</sup>. Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV. Los datos fueron colectados con el software MassHunter Workstation. El tiempo de retención y el espectro de masas de cada componente se depuraron con el software "AMDIS". La identificación de los compuestos se realizó por comparación de espectros de masas usando el software NIST y la base de datos MS2011 de la misma compañía.

Las muestras fueron analizadas para aminoácidos, ácidos orgánicos y carbohidratos de pequeño tamaño.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Establecimiento del cultivo de cochinilla (*Dactylopius coccus*) en invernadero.

Se realizó el cultivo de la cochinilla, *D. coccus* en invernadero (Figura 6.1). La temperatura promedio registrada durante el periodo de cultivo de cochinilla fue de 27.5 °C, presentando un máximo y un mínimo promedio de 40 °C y 15 °C, respectivamente.



Figura 6.1. Infestación de cochinilla en cladodios *Opuntia ficus-indica* variedad Esmeralda en invernadero

El seguimiento de crecimiento de cochinilla se realizó mediante la calendarización de acuerdo con la fecha de infestación. Sin embargo, se apoyó también con la medición de ancho y largo de los insectos y las características morfológicas que los distinguen entre las etapas de desarrollo (Figura 6.2).





Figura 6.2. Medición de tamaño aproximado de cochinilla en etapa de ninfa I.

En los tiempos previamente mencionados (25, 40 y 80 días  $\pm$  3 días) se realizó la observación de las cochinillas para determinar el tiempo de cosecha y procesado de las mismas. Los cladodios infestados y las diferentes etapas de la cochinilla se muestran en las Figuras 6.3, 6.4 y 6.5.

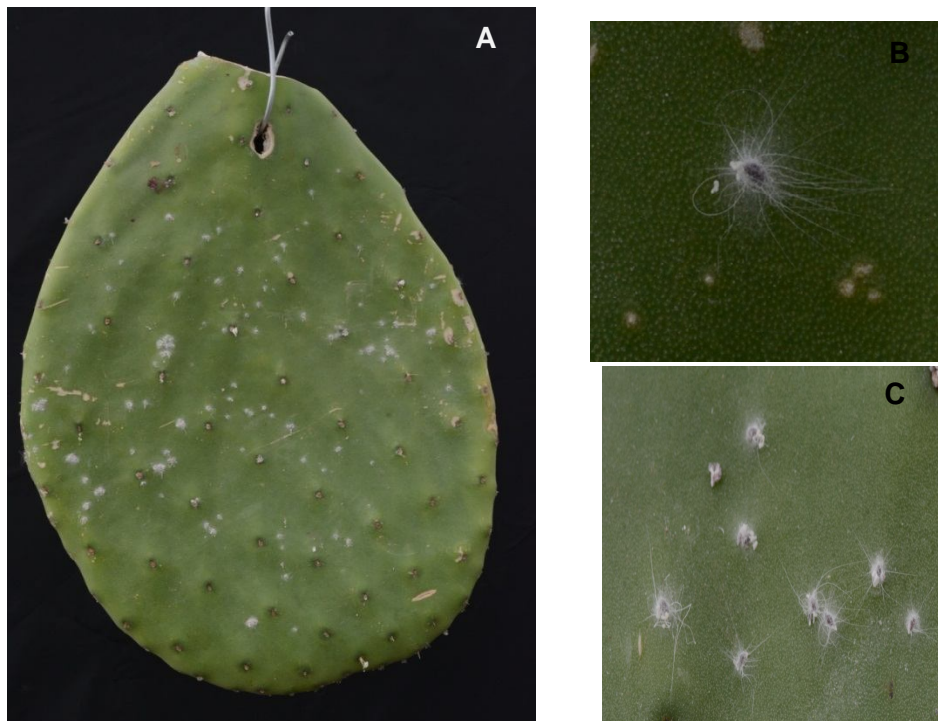


Figura 6.3. A) Cladodio de *Opuntia* infestado con cochinillas en etapa de ninfa I. B) Ninfa I establecida con pelos cerosos. C) Grupo de cochinillas en etapa ninfa I (acercamiento).

Se tomaron cochinillas que estuvieran aisladas del resto para realizar los cortes. Los cortes realizados se almacenaron inmediatamente en la solución fijadora en tubos de 2 mL para evitar la deshidratación del nopal y el desprendimiento de la cochinilla.

Durante la etapa ninfa I (Figura 6.3) las cochinillas establecidas desarrollaron pelos cerosos. Sin embargo, se encontraban carentes de coccerina. El establecimiento de la ninfa I fue mayormente en el lado del cladodio que no estuvo expuesto a la luz debido a su fotosensibilidad de la cochinilla en esta etapa. El tiempo que la cochinilla tardó en llegar a esta etapa varió entre 22 y 29 días. Lo anterior pudo haberse debido a las diferencias en el establecimiento de las cochinillas en la etapa ninfa I móvil y/ o al tiempo que tarda en migrar hacia la parte oscura del cladodio cuando se encuentra en posición horizontal.



Figura 6.4. A) Cladodio de *Opuntia* infestado con cochinillas en etapa de ninfa II. B) Ninfa II hembra en proceso de muda. C) Ninfa II hembra establecida cubierta con coccerina, polvo ceroso. D) Capullo o cocón de machos en desarrollo de macho adulto.

El tiempo que tardó la cochinilla en la metamorfosis de ninfa I a ninfa II varió mucho dependiendo de cada insecto, ya que se encontraron hembras que a partir de los 33 días ya estaban presentando la muda y algunas que tardaron hasta 42 días. El tiempo de maduración de la cochinilla varía mucho de acuerdo con la temperatura del invernadero, siendo así que en los días más calurosos hubo una mayor transformación de hembras.

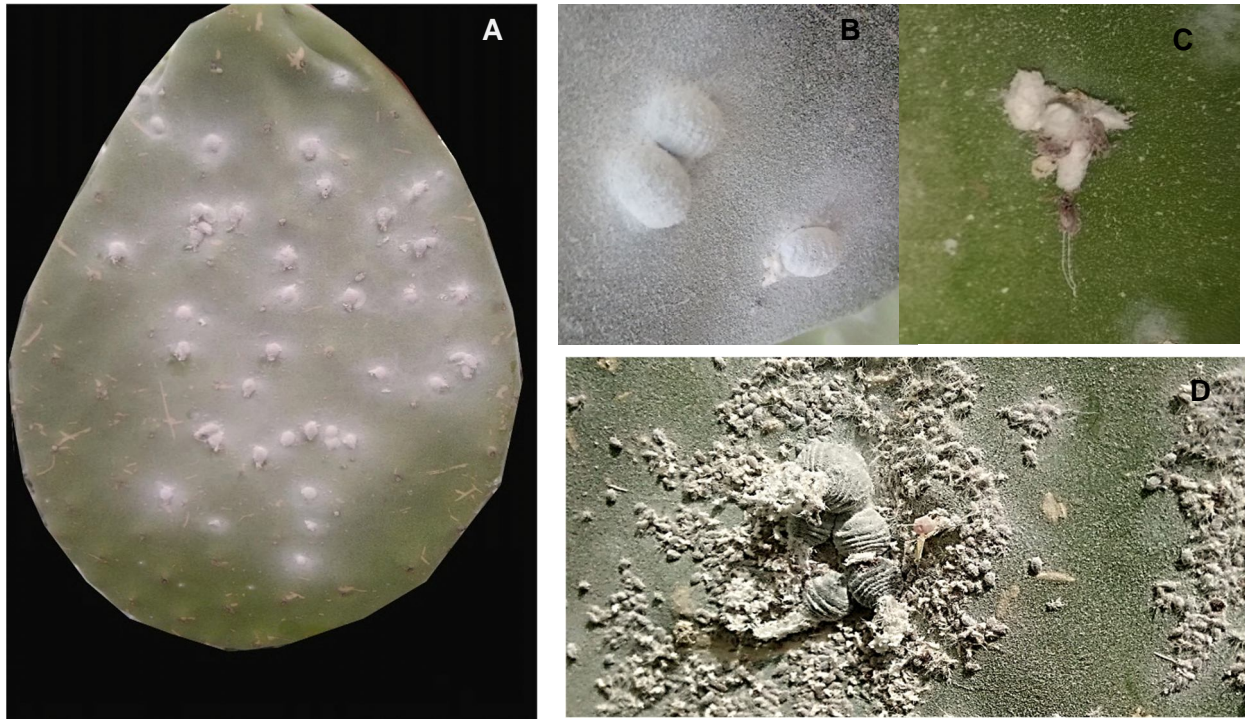


Figura 6.5. A) Cladodio de *Opuntia* infestado con cochinillas en etapa adulta. B) Adulta establecida con polvo ceroso. C) Grupo de capullos de macho emergiendo en etapa adulta. D) Grupo de cochinillas en etapa adulta pariendo a cochinillas ninfa I.

Las hembras adultas fueron colectadas a partir del día 60, ya que no fue necesario esperar el periodo de oviposición para la observación del estilete. La Figura 6.5 D muestra la oviposición de cochinillas en etapa adulta a la edad de 85 días, aproximadamente.

Una vez colectadas las muestras, se trataron con solución fijadora, se aclararon y se siguió con la observación en el microscopio digital.

## 6.2. Observación de estilete de cochinilla utilizando microscopía digital

El estilete de la cochinilla se compone por varias secciones, las cuales sólo han sido observadas en ciertos insectos, mayormente áfidos. La localización del estilete en el nopal es una incógnita, ya que no hay ningún estudio sobre la longitud o sitio donde se alimenta la cochinilla del cladodio de *Opuntia*.

Se realizaron los cortes en la sección del *Opuntia* donde se localiza la cochinilla tratando de no tocar a la cochinilla y dañar el estilete. Los cortes se realizaron del haz al envés, como se muestra en la Figura 6.6. Las muestras se fijaron y aclararon como se mencionó previamente y se observaron con ayuda del microscopio digital de alta resolución VHX 5000.

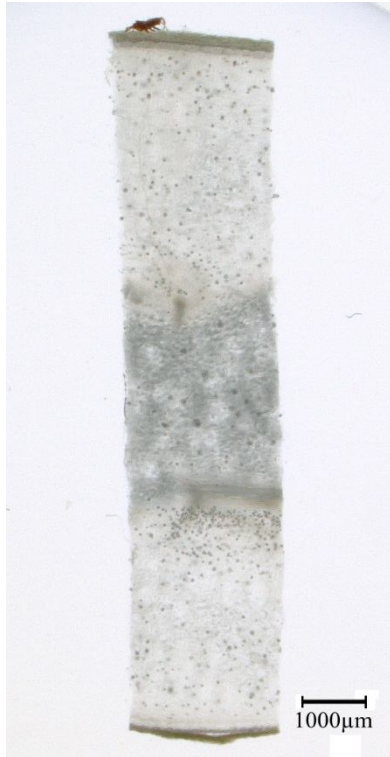


Figura 6.6. Micrografía digital que muestra el sitio donde la cochinilla se localiza, en etapa ninfa I, en el cladodio de *Opuntia* (objetivo 20X).

Debido al aclarado realizado, se pudo observar la presencia del estilete en las diferentes etapas de desarrollo. El estilete de la cochinilla aparenta ser un hilo delgado de color rojocafé de 3-5 micras de grosor. Su movimiento a través de las capas del cladodio no es lineal, sino que se mueve a través de ellas, sin dirección precisa. Es flexible, ya que se forman curvaturas a lo largo del movimiento en la parte interna del cladodio.

En la etapa de ninfa I, como se observa en la Figura 6.7, se observa el estilete con terminación localizada en el parénquima (las flechas negras señalan la punta del estilete). Se determinó la longitud aproximada del estilete de acuerdo con lo observado en la micrografía, obteniendo una longitud de 4300 µm. Sin embargo, la longitud y localización del estilete varía mucho de cochinilla a cochinilla.

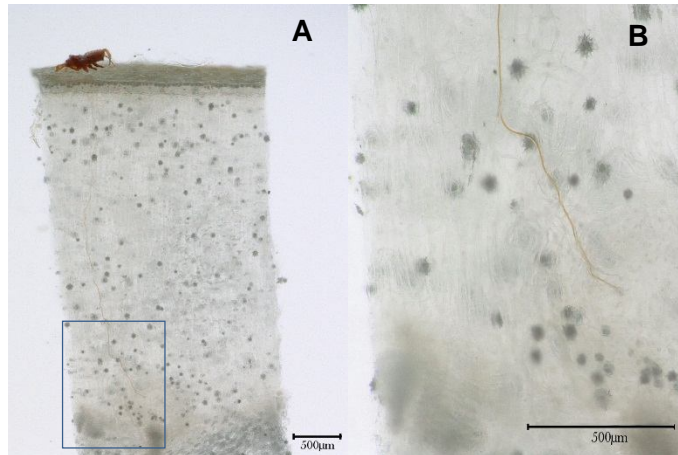


Figura 6.7. Micrografía digital de cochinilla ninfa I en un cladodio de *Opuntia*. A) Trayectoria de estilete de cochinilla a través de capas de *Opuntia* (objetivo 50X, ensamble de imagen). B) Punta del estilete localizada en células de parénquima (objetivo 200X).

Se observaron variaciones entre la longitud y localización del estilete, incluso en misma etapa de desarrollo. Como se observa en la Figura 6.8, se puede observar que no hay un punto definido en cuanto a la localización del estilete ya que la punta del mismo pudo detectarse en varios sitios en el interior del cladodio.

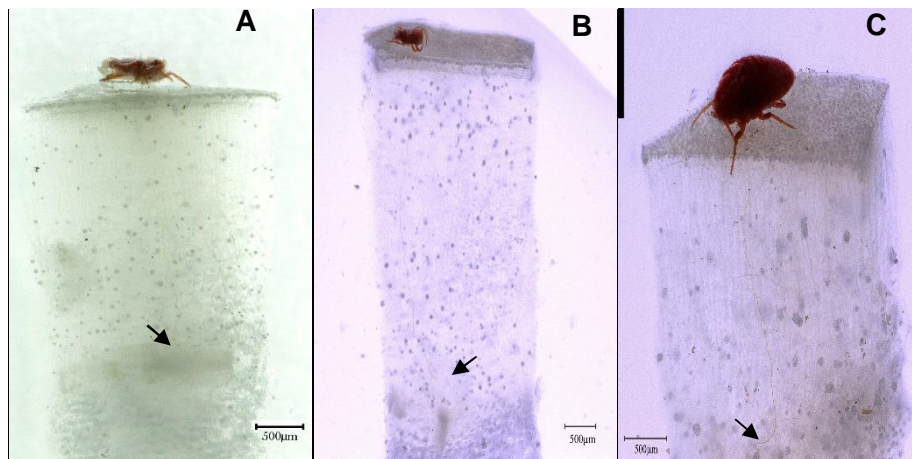


Figura 6.8. Micrografía digital de varias muestras de cochinillas ninfa I en cortes de cladodio de *Opuntia*. A) Estilete en parénquima-vasculatura (objetivo 50X). B) Estilete en células de parénquima, (objetivo 50X, ensamble de imagen). C) Estilete en parénquima (objetivo 100X, ensamble de imagen).

La Figura 6.9 muestra la ninfa II de cochinilla junto con una cochinilla en ninfa I. Como se mencionó anteriormente, las cochinillas variaron mucho en edad, incluso en el mismo cladodio. Lo que se puede observar es la trayectoria del estilete de la cochinilla (A) a través de las capas del cladodio. Sin embargo, no hay diferencia clara entre la longitud del estilete en la etapa ninfa I y ninfa II. Por el contrario, en la etapa ninfa II se observó frecuentemente que el estilete era más corto que el de la ninfa I (Figura 6.10).

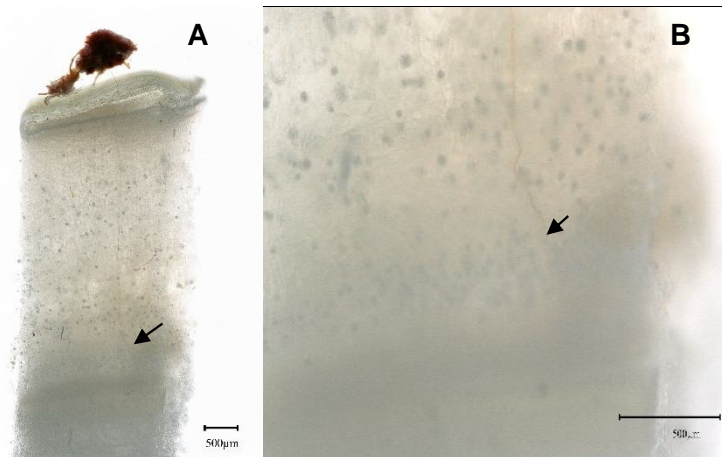


Figura 6.9. Micrografía digital de cochinilla ninfa II en cladodio de *Opuntia*.

A) Trayectoria de estilete de cochinilla ninfa II a través de capas de *Opuntia* (objetivo 100X, ensamble de imagen). B) Punta de estilete en células parenquimatosas (objetivo 150X).

En la Figura 6.10 se observa como el estilete de la cochinilla en etapa ninfa II es más corto que lo observado anteriormente. Esto no indica que generalmente las cochinillas en etapa de ninfa II tengan el estilete más corto, sino que coincide con lo reportado por Marin & Cisneros (1977) que mencionan que la cochinilla en la etapa ninfa II después de la muda vuelve a insertar sus estiletos en el cladodio de nopal, habiéndose observado más corto porque probablemente apenas iba adentrándose en el cladodio. Algunos autores incluso mencionan el movimiento de la cochinilla en la superficie del cladodio, lo cual se observó también en nuestro caso (datos no mostrados). Tal comportamiento sugiere que la cochinilla en etapa ninfa II busca, en algunas ocasiones, sitios más adecuados para adherirse al nopal.

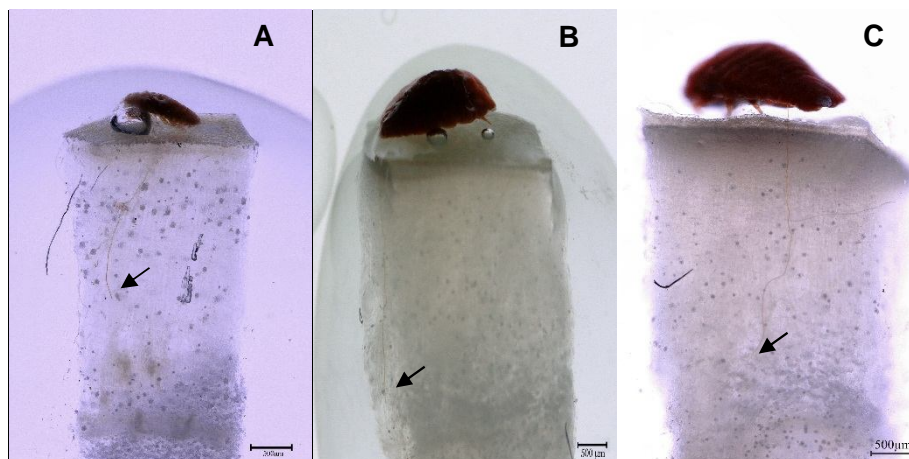


Figura 6.10. Micrografía digital de varios estiletos de cochinillas ninfa II en cladodio de *Opuntia*. A) Estilete en clorénquima (objetivo 30X). B) Estilete fuera de *Opuntia* (objetivo 50X). C) Estilete en parénquima (objetivo 100X, ensamble de imagen).

La cochinilla en ninfa II, como se observó anteriormente, aumenta su tamaño con respecto a la ninfa I. En la Figura 6.11 se observó a la cochinilla en etapa ninfa II unida al nopal mostrando un estilete bastante flexible, pero más corto que en la ninfa I. La punta del estilete se observa segmentado, presentando tres puntas, algo que no se observó en ninfa I. La longitud del estilete fue mucho más corta que la observada en ninfa I, siendo de aproximadamente 3100  $\mu\text{m}$  y la localización, de acuerdo con la morfología celular del cladodio, se mantuvo en la capa del parénquima.

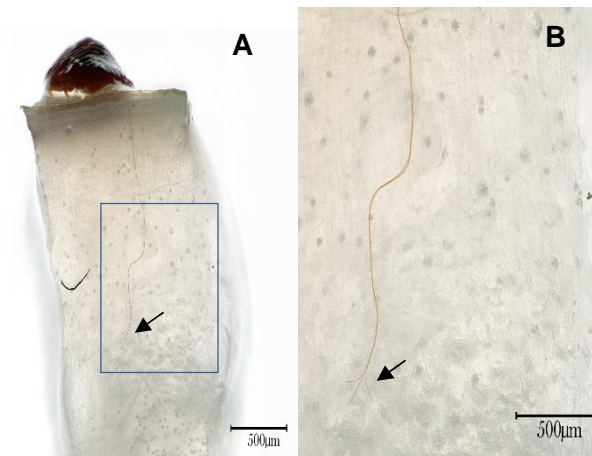


Figura 6.11. Micrografía digital de cochinilla ninfa II en cladodio de *Opuntia*. A) Trayectoria de estilete de cochinilla a través de capas de *Opuntia* (objetivo 50X, ensamble de imagen). B) Punta de estilete localizada en tejido parenquimatoso (objetivo 100X).

De acuerdo con lo reportado por la literatura para los estiletes de insectos hemípteros, el estilete se conforma de labro, maxila, mandíbula y labio, siendo el labio la parte que cubre y protege a las otras tres, formando una vaina. Esto les permite insertar con rigidez el pico y adentrarse en búsqueda del alimento (Marín y Cisneros, 1977). Lo anterior parece coincidir con lo observado en la Figura 6.11, en la cual se puede distinguir que la punta del estilete está dividida en segmentos.

La cochinilla en etapa adulta presentó cambios interesantes en lo que a la localización del estilete se refiere (Figura 6.12). En esta etapa, éste parece estar llegando a la vasculatura del nopal, introduciendo la punta dentro de los haces vasculares. Esto pudiera indicar que la cochinilla adulta se alimenta de fotosintatos que se transportan a través del floema.

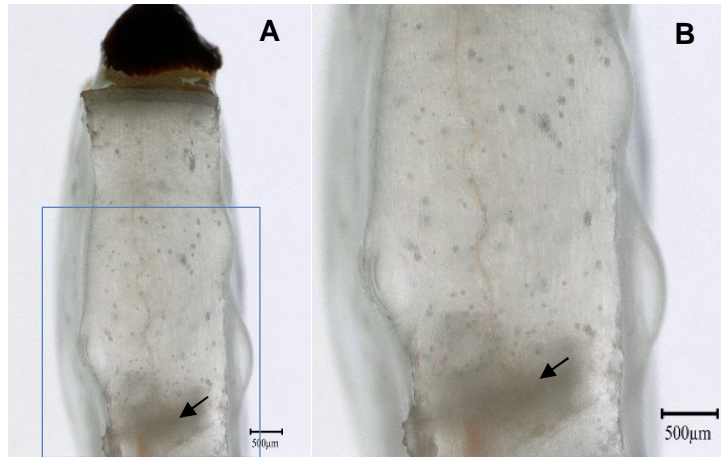


Figura 6.12. Micrografía digital de cochinilla adulta en cladodio de *Opuntia*. A) Trayectoria de estilete de cochinilla a través de capas de *Opuntia* (objetivo 100X, ensamble de imagen). B) Punta de estilete localizada en vasculatura (objetivo 100X).

En la Figura 6.13 se puede observar como el cuerpo de la cochinilla en etapa adulta es de un mayor tamaño, comparado con el de las cochinillas en etapa ninfa I y II (datos no mostrados).

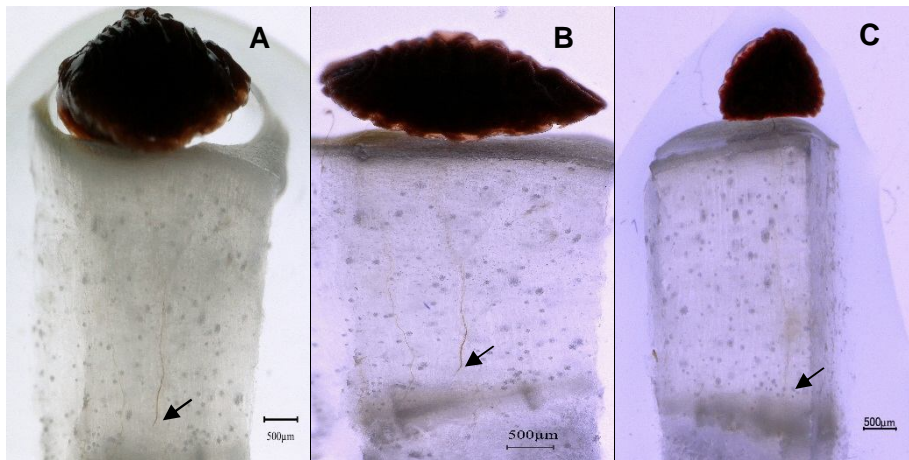


Figura 6.13. Micrografía digital de varios estiletes de cochinillas de etapa adulta en cladodio de *Opuntia*. A) Trayectoria de estilete (objetivo 50X). B) Estilete de cochinilla adulta con mayor grosor (objetivo 100X). C) Trayectoria de estilete hacia parénquima (objetivo 30X).

Como se puede observar en la Figura 6.14, la longitud del estilete varía mucho de cochinilla a cochinilla. En esta imagen se observa que incluso algunos de los estiletes claramente entran a la vasculatura. Sin embargo, este comportamiento no parece ser frecuente, ya que fue observado una sólo vez y en cochinillas en la etapa ninfa II.



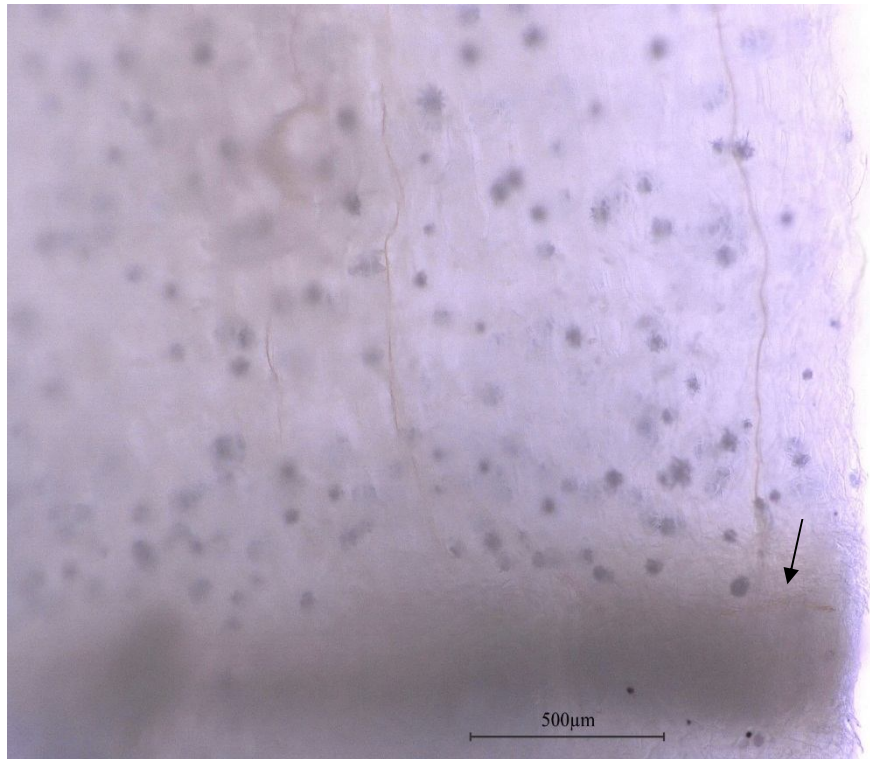


Figura 6.14. Micrografía digital de varios estiletes de cochinillas. Se muestra que el estilete de la cochinilla ha alcanzado la vasculatura del cladodio (objetivo 150X).

Lo observado en las imágenes indica que la localización del estilete en el cladodio de *Opuntia* no sigue un patrón uniforme, ya que la longitud del mismo varía mucho en las distintas etapas de desarrollo, como se observa en la Tabla 6.1 y, por lo tanto, puede localizarse en diferentes capas de *Opuntia*.

**Tabla 6.1. Medidas obtenidas de longitud de estilete de *Dactylopius coccus* en diferentes etapas de desarrollo.**

Etapa de desarrollo <i>Dactylopius coccus</i>			
	Ninfa I	Ninfa II	Adulta
Individuo	Medida estilete (µm)		
1	4355	4260	4560
2	3952	3176	3971
3	2754	3276	3965
4	4761	4332	4754
5	4360	4634	4368
<b>Prom</b>	4036.4	3861.4	4446.1
<b>Desv Est</b>	771.8	663.7	352.1
<b>Varianza</b>	595735.3	440548.8	124005.3

$p > 0.05$ ; valor F = 0.605

De acuerdo con los datos mencionados en la tabla, al realizar el análisis de varianza, no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los estiletes de las tres etapas de desarrollo ( $p > 0.05$ ).

En la Figura 6.15 se observa un corte de nopal en ausencia de cochinilla. En él, se marcan las diferencias entre las capas de *Opuntia* (A). La epidermis (B) se identifica por células compactadas y por la presencia de cristales de calcio en la parte superior. El clorénquima (C) mantiene las células ordenadas de forma vertical, poco compactas y con poca presencia de cristales de oxalato de calcio (o "drusas"); también, se observa la presencia de un ducto mucilaginoso. En el parénquima (D), las células difieren del clorénquima, al ser más redondas y poco ordenadas. Se exhibe abundancia de drusas de parénquima y parte de médula, sobre todo en el centro, donde se localizan los haces vasculares. Es posible que los haces observados en D sean parte de la vasculatura principal del cladodio por el tamaño y coloración que presentan. En la Médula (E) se observa la presencia de abundantes drusas, así como de plastidios, los cuales cumplen la función de almacén de diferentes tipos de compuestos, probablemente carbohidratos, como reservas de carbono.

Sin embargo, de acuerdo con lo observado en las figuras anteriores a la Figura 6.15, las capas a las que logra llegar el estilete en las diferentes etapas e individuos analizados, es muy variable y no se distinguen diferencias claras entre éstas, más allá de la abundancia de drusas y la morfología celular. Es posible que el análisis de la composición química arroje información relevante que permita explicar este comportamiento.

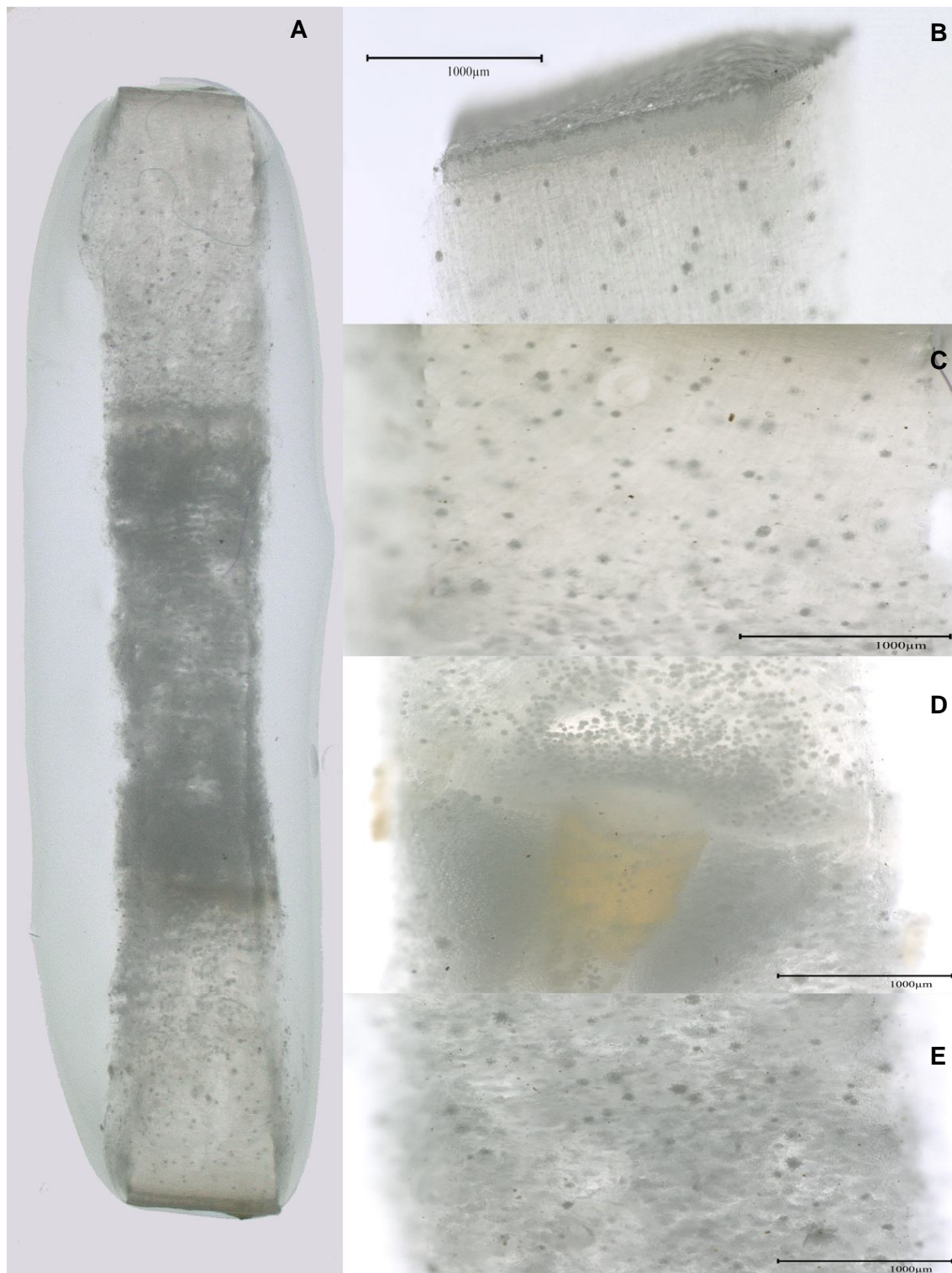


Figura 6.15. Micrografía de corte transversal de cladodio de *Opuntia* del haz al envés, con identificación de capas. A) Sección completa de corte de *Opuntia*. B) Epidermis. C) Clorénquima. D) Parénquima y haz vascular. E) Médula.

### 6.3. Composición química de las capas de cladodio

#### 6.3.1. Carbohidratos

Los carbohidratos de *Opuntia ficus-indica* variedad Esmeralda de 2 años de edad fueron analizados primeramente por TLC. Esta técnica, a pesar de ser cualitativa únicamente, aporta información valiosa que permite visualizar mediante el color y el factor de retención (FR), la posible composición de la fracción de carbohidratos presentes.

Debido a que la literatura reporta una riqueza de carbohidratos en cladodios de nopal, se optó por analizar preliminarmente la composición de carbohidratos suponiendo que la cochinilla los utiliza como fuente de carbono. Sin embargo, sabiendo que la composición de *Opuntia* está mayormente conformada por polisacáridos y pectinas, se decidió realizar un análisis en diferentes capas de los cladodios, hidrolizadas a diferentes tiempos.

##### 6.3.1.1. Cromatografía de capa fina (TLC)

Se analizó inicialmente la fracción de carbohidratos en las capas de *Opuntia* sobre la base de las diferencias de coloración de las bandas producidas por el revelador. Al reaccionar con éste, las aldosas producen un color azul, mientras que el producido por las cetosas es rojo (Anderson et al. 2000). De esta forma, se pudo determinar la composición básica de los polisacáridos presentes en los cladodios de *Opuntia*, que de acuerdo a reportes anteriores están formados mayormente por glucosas (azul) y/o fructosas (rojo), lo cual se ejemplifica al observar la escalera de fructooligosacáridos (FOS) y maltooligosacáridos (MOS) en la Figura 6.16.

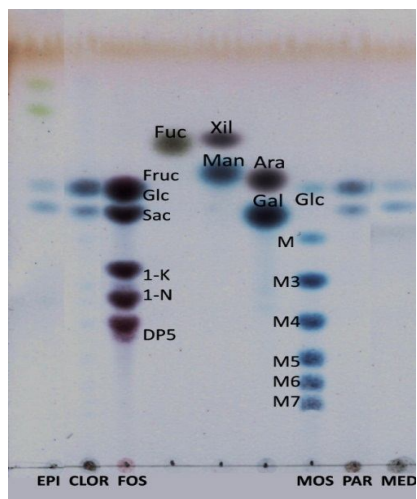


Figura 6.16. Perfil cromatográfico de muestras control de capas de *Opuntia* en comparación con estándares (ver Tabla 6.2) de fructooligosacáridos (FOS; 1-K = 1 kestosa; 1-N = 1 nistosa; DP5 = grado de polimerización 5), maltooligosacáridos (MOS; M3 a MT7 se refieren a crecientes grados de polimerización), disacáridos (Suc = sacarosa; M = maltosa) y monosacáridos (Glu = glucosa; Fru = fructosa; Fuc = fucosa; Ara = Arabinosa; Man = manosa; Gal = galactosa). Se muestran los resultados obtenidos de la EPI = epidermis; CLOR = clorénquima; PAR = parénquima y MED = médula del cladodio de *Opuntia*.

En la Figura 6.16 se muestra el perfil cromatográfico de los carbohidratos de *Opuntia* en el tiempo 0, refiriéndonos así a la muestra control cuyo proceso de hidrólisis no fue realizado. En ella se puede observar la presencia de monosacáridos, mayormente glucosa, fructosa y sacarosa. Las diferencias en los tiempos 0 de las capas radican en los monosacáridos identificables mediante el FR. De este modo, en la epidermis y médula se detectó sólo glucosa y sacarosa, a diferencia del clorénquima y el parénquima, que contienen fructosa, además de glucosa y sacarosa. La epidermis difiere del resto por la presencia de dos señales de color verdoso, de naturaleza química desconocida, en la parte superior izquierda de la TLC, las cuales no coincidieron con el FR de ninguno de los estándares.

Estos monosacáridos son los carbohidratos presentes en *Opuntia* de forma libre, lo cual los haría disponibles como fuente de alimento para que la cochinilla. Sin embargo, no existen diferencias químicas puntuales entre las capas del cladodio capaces de explicar la necesidad de que es estilete se extienda hasta las capas más profundas del cladodio.

En la línea de origen de las cuatro capas se observan manchas de polisacáridos de alto peso molecular, que están presentes en las soluciones pero que, no fueron capaces de migrar a través de la TLC por su tamaño.

En la Figura 6.17 se observa el perfil cromatográfico resultante de analizar los carbohidratos generados de la hidrólisis de las capas de *Opuntia* por diferentes tiempos. En esta figura se puede apreciar claramente la presencia de polisacáridos, mayormente de color azul, y algunos otros monosacáridos, los cuales coinciden con algunos FR de los estándares utilizados.

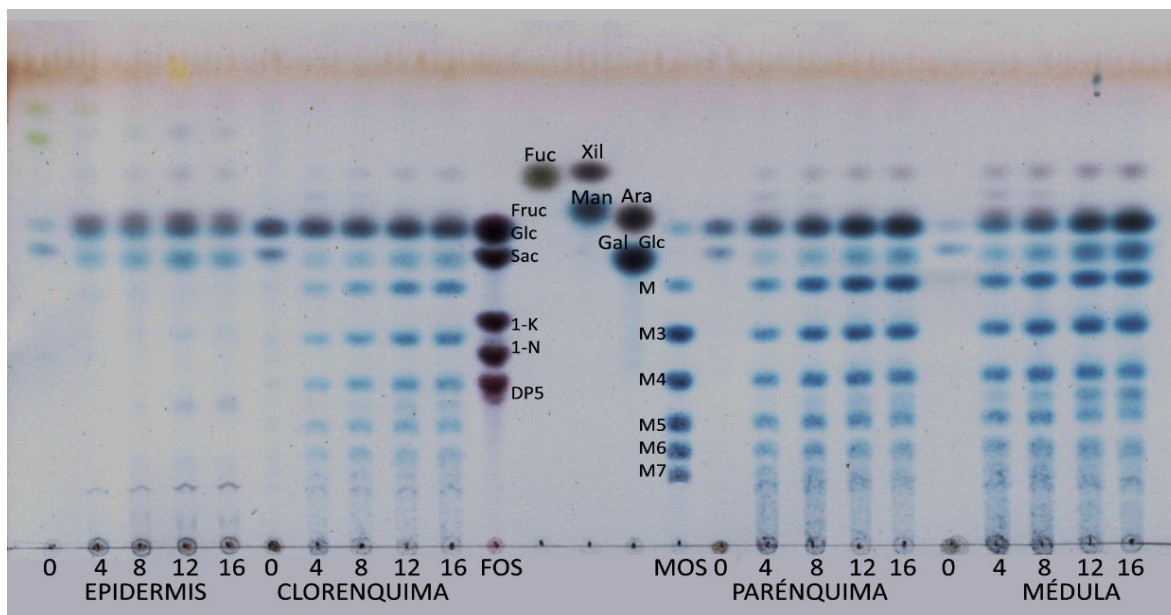


Figura 6.17. Cromatografía de capa fina de carbohidratos en capas de *Opuntia* hidrolizadas a diferentes tiempos (0, 4, 8, 12 y 16 h). La identidad de los estándares empleados se describe en la Fig. 6.16 y la Tabla 6.2.

La composición de la epidermis posterior a la hidrólisis muestra algunas bandas identificables como maltosa, maltotriosa (M3) y otras dos de coloración rojiza que pudieran ser polisacáridos formados por unidades de fructosa. La intensidad de las bandas se puede relacionar con la abundancia en los carbohidratos en cuestión. Algunas de las bandas de menor peso molecular coinciden con los FR de xilosa, fructosa, glucosa y galactosa (Tabla 6.2), sin embargo, otras no pudieron ser identificadas.

**Tabla 6.2. Perfil cromatográfico de los carbohidratos utilizados como estándares en la identificación de carbohidratos de *Opuntia* mediante TLC.**

FR	Nomenclatura	Carbohidrato	Color
0.71	Fuc	Fucosa	Café-verde
0.72	Xil	Xilosa	Rojo
0.64	Man	Manosa	Azul
0.62	Ara	Arabinosa	Rojo
0.62	Gal	Galactosa	Azul
0.61	Glc	Glucosa	Azul
0.61	Fruc	Fructosa	Rojo
0.55	Sac	Sacarosa	Marrón
0.43	1-K	Kestosa	Rojo
0.36	1-N	Nistosa	Rojo
0.31	DP5	DP5	Rojo
0.50	M	Maltosa	Azul
0.40	M3	Maltotriosa	Azul
0.32	M4	Maltotetraosa	Azul
0.24	M5	Maltopentaosa	Azul
0.18	M6	Maltohexaosa	Azul
0.14	M7	Maltoheptaosa	Azul

Las bandas verdes presentes en la parte superior de la epidermis no aparecen en las demás capas. Es posible que sean resultado de la hidrólisis de pectinas de la pared celular: Sin embargo, la falta de estándares adecuados hizo difícil su identificación correcta.

El clorénquima, parénquima y médula muestran similitud en las bandas resultantes de la hidrólisis. Los monosacáridos presentes en las tres capas son similares, mostrando bandas de xilosa o arabinosa (no fue posible diferenciarlos), fructosa, glucosa y galactosa y por último una banda no identificada sobre la fructosa de un color rojizo en las muestras hidrolizadas a 4 y 8 h. Los polisacáridos que se observan coinciden en su mayoría con la escalera de los estándares de MOS, habiendo algunos que se localizan entre maltotetraosa (M4) y maltopentaosa (M5) en los tiempos de hidrólisis de 12 y 16 h. En general, las tres capas muestran similitud en composición. Sin embargo, existen diferencias en la intensidad de las bandas, lo que sugiere que su concentración pudiera ser diferente..

De acuerdo con lo anterior, se podría sugerir que la abundancia de los carbohidratos es mayor en las capas internas del cladodio de nopal. Sin embargo, en las tres capas aún se observa nuevamente la mancha en el punto de origen, indicando la posible existencia de polímeros incapaces de ser hidrolizados en las condiciones empleadas.

La hidrólisis de capas de *Opuntia* permitió observar mayoritariamente el tipo de carbohidratos presentes e incluso identificar algunos de los monosacáridos y polisacáridos de los cuales está conformado el cladodio de nopal en sus diferentes capas. Sin embargo, esta técnica solo sirvió para hacer un análisis preliminar de componentes el cual sólo permitió sugerir la configuración química de las mismas. Desafortunadamente, el uso de esta técnica fue incapaz de proveer información capaz de dar indicios la razón por la cual el estilete de la cochinilla migra hacia el centro del cladodio, salvo que éste migre en búsqueda de sitios de mayor abundancia de carbohidratos.

#### 6.3.1.2. FACE

El análisis tipo FACE es de utilidad para diferenciar azúcares reductores de los no reductores. De acuerdo con lo mostrado en la Figura 6.18, los carbohidratos de *Opuntia* de la capa de epidermis exhibieron un perfil un poco diferente al observado en la cromatografía de capa fina (TLC). De acuerdo al perfil cromatográfico en las hidrólisis de epidermis durante el desarrollo de la TLC (Figura 6.17), la composición de la epidermis constaba sólo de algunas manchas identificados como monosacáridos y sólo muy pocos polisacáridos. Sin embargo, en el perfil FACE correspondiente a la epidermis sometida a 12 h de hidrólisis, se observa la presencia de un gran número de bandas no coincidentes con los estándares utilizados, exhibiendo un patrón de escalera que comienza entre maltosa y termina aproximadamente en maltoheptaosa. Aunque los carbohidratos no fueron identificados, su detección mediante esta técnica indica que se trata de carbohidratos con capacidad reductora. Estos resultados abren una nueva ventana de posibilidades de investigación. Sin embargo, no fue objetivo de este estudio, que tuvo una naturaleza exclusivamente exploratoria.

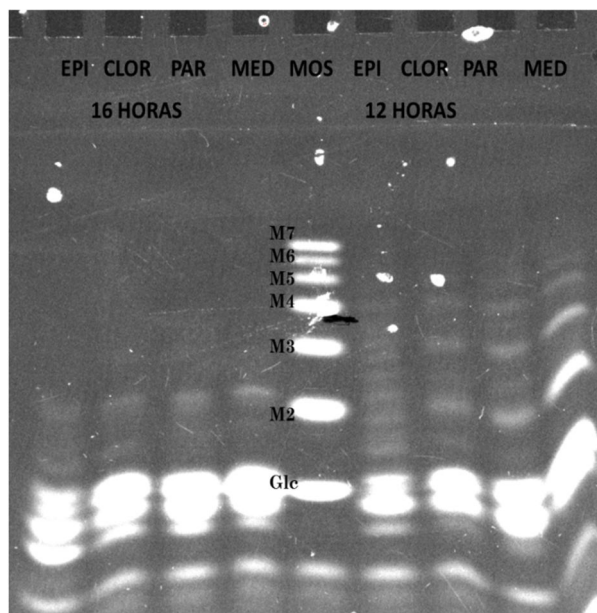


Figura 6.18. FACE de carbohidratos en diferentes capas de *Opuntia* liberados después de 12 h y 16 h de hidrólisis. EPI = epidermis; CLOR = clorénquima; PAR = parénquima y MED = médula del cladodio de *Opuntia*.

#### 6.3.1.3. HPAEC-PAD

Como se mencionó en la sección 5.3.4, los productos obtenidos de la hidrólisis de capas de nopal también fueron analizados mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplado a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), explorando los carbohidratos presentes en cada una de las capas. Debido a que las técnicas anteriores no mostraron información suficiente sobre los carbohidratos de mayor grado de polimerización.

La identificación de los carbohidratos resultantes de la hidrólisis en las capas de nopal se realizó mediante la comparación del tiempo de retención (TR) con estándares disponibles en el Laboratorio de Química de Productos Naturales a cargo de la Dra. Mercedes G. López.

En la Figura 6.19 se observa el perfil cromatográfico de los estándares utilizados para la identificación de monosacáridos en muestras de *Opuntia*.



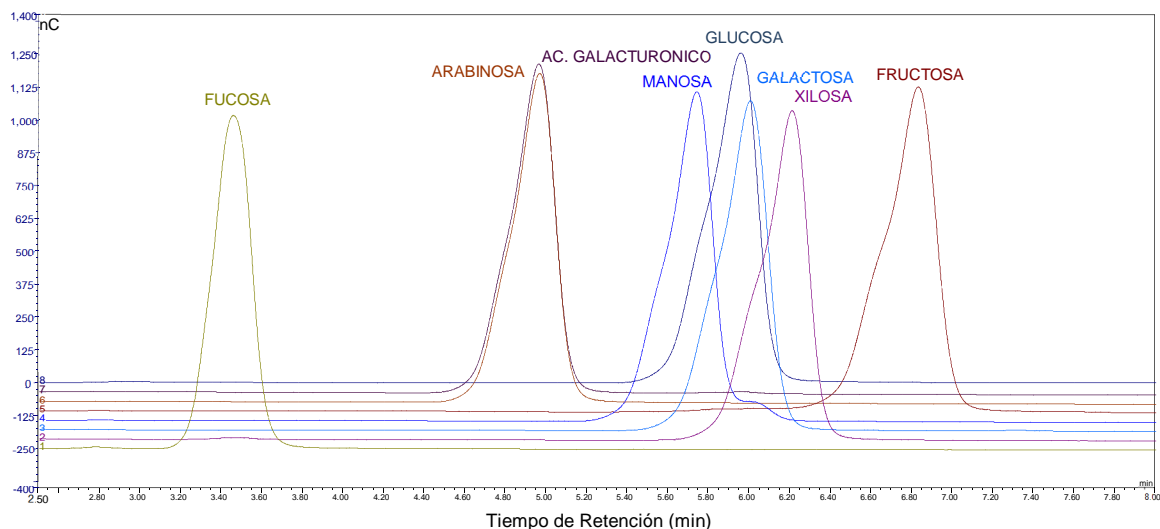


Figura 6.19. Perfil cromatográfico de estándares de monosacáridos utilizados para análisis de muestras de capas de *Opuntia* mediante HPAEC-PAD.

La selección de estos estándares fue basada en la disponibilidad de ellos y en lo reportado en la literatura sobre la composición química de los polisacáridos hidrolizados, observado previamente en los análisis por TLC y FACE (Ginestra et al. 2009; Chidouh et al. 2014).

En la Tabla 6.3 se muestra el tiempo de retención de los estándares de los monosacáridos utilizados para la comparación con muestras de *Opuntia*.

**Tabla 6.3. Perfil cromatográfico de carbohidratos monosacáridos mediante HPAEC-PAD, incluyendo sus respectivos tiempos de retención (TR).**

Pico	TR (min)	Nombre	Abreviatura
1	3.46	Fucosa	Fuc
2	4.81	Arabinosa	Ara
3	4.97	Ácido Galacturónico	Gal Ac
4	5.82	Manosa	Man
5	6.00	Glucosa	Glc
6	6.22	Galactosa	Gal
7	6.41	Xilosa	Xil
8	6.85	Fructosa	Fruc

A continuación, se muestran los perfiles cromatográficos de los estándares (mezclas) de oligosacáridos que sirvieron como comparación para la identificación de polisacáridos no identificados mediante las técnicas anteriores (Figura 6.20).

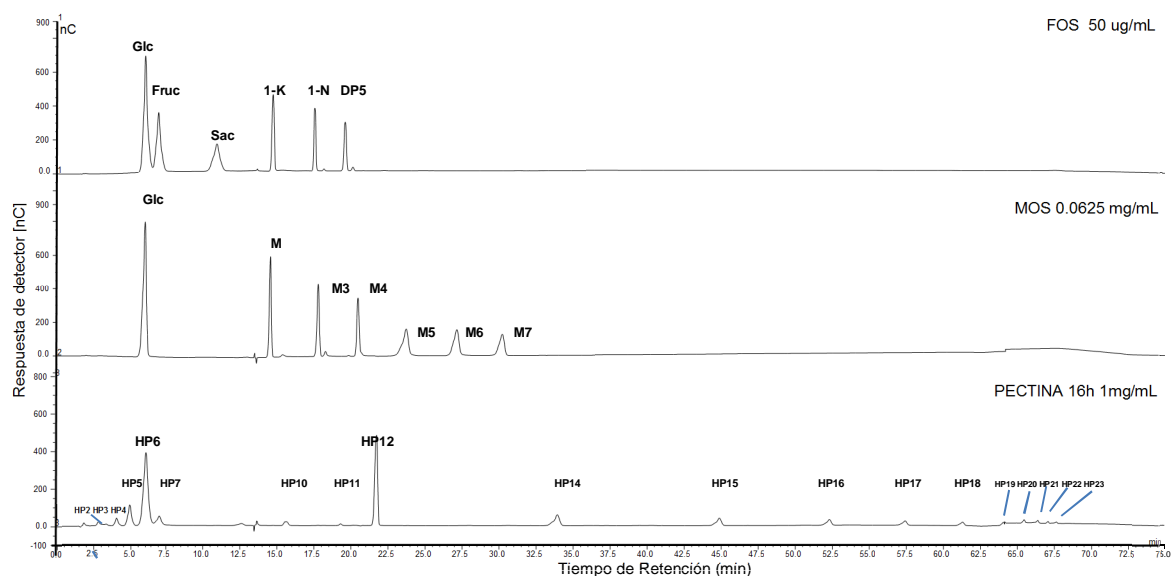


Figura 6.20. Perfil cromatográfico de estándares de oligosacáridos utilizados en la identificación de carbohidratos de *Opuntia* mediante análisis por HPAEC-PAD. Fructooligosacáridos (FOS; 1-K = 1 kestosa; 1-N = 1 nistosa; DP6 = grado de polimerización 6). Maltooligosacáridos (MOS; M3 a M7 se refieren a crecientes grados de polimerización). Glu = glucosa; Fru = fructosa; Suc = sacarosa. Carbohidratos resultantes de la hidrólisis de pectinas (HP) se muestran como HP1-HP23.

El análisis de las capas de *Opuntia* se realizó como se mencionó en la sección 5.3.4. Debido a que mediante el uso de técnicas como la TLC y FACE se encontraron más coincidencia con los MOS que con los FOS, se comparó primordialmente con los primeros, por lo cual en la Tabla 6.4 se muestra el perfil cromatográfico de los tiempos de retención de la escalera de MOS.

**Tabla 6.4. Perfil cromatográfico de carbohidratos MOS mediante HPAEC-PAD con tiempo de retención (TR).**

Pico	TR (min)	Nombre	Abreviatura
1	6.00	Glucosa	Glc
2	14.40	Maltosa	M2
3	17.64	Maltotriosa	M3
4	20.27	Maltotetraosa	M4
5	23.46	Maltopentaosa	M5
6	26.93	Maltohexaosa	M6
7	30.17	Maltoheptaosa	M7

En la Figura 6.21, se observa el perfil cromatográfico obtenido de las capas tratadas en un periodo de hidrólisis de 4 h, el cual es el periodo más cercano a la composición natural de las capas del cladodio de *Opuntia*. En la figura se exhibe el perfil cromatográfico de los carbohidratos de las cuatro capas analizadas, enfatizando las diferencias observadas mediante la TLC entre la epidermis y las tres capas restantes.

En epidermis se identificaron pocos monosacáridos, siendo el ácido galacturónico el más abundante y sólo la presencia de un oligosacárido (flecha EPI 4 h) cuyo tiempo de retención coincidió con el de la maltosa. El clorénquima, parénquima y la médula mostraron glucosa, fructosa y ácido galacturónico en mayor o menor proporción (ver Figura 6.1) y además el perfil de MOS (ver Tabla 6.3 para tiempo de retención), el cual, por la tendencia de los picos, pudiera indicar un gradual crecimiento del grado de polimerización.

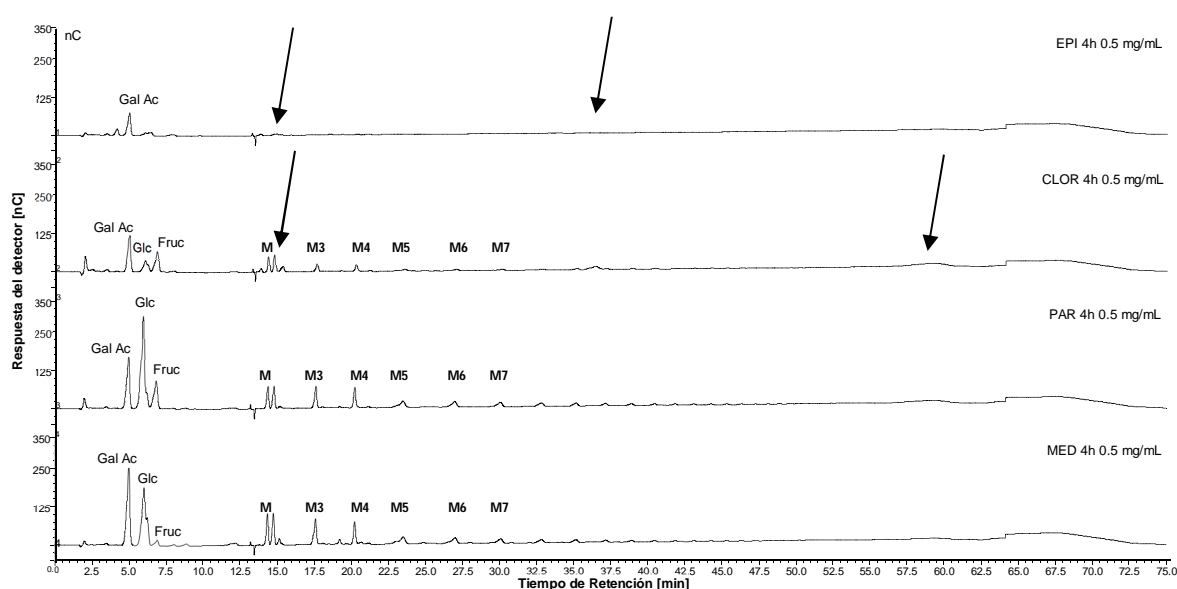


Figura 6.21. Perfil cromatográfico de carbohidratos obtenido como resultado de una separación por HPAEC-PAD de los hidrolizados ácidos de las diferentes capas de cladodios de *Opuntia* digeridos durante 4 h.

El pico de glucosa en la capa de parénquima y médula exhibe un hombro, lo que pudiera indicar el traslape de algún otro monosacárido que coincide en tiempo de retención, posiblemente galactosa o xilosa (Tabla 6.3). En el minuto 15 aproximadamente, se observa la presencia de un pico de igual abundancia que maltosa, pudiéndose tratar de un isómero.

Con esta figura se puede discutir sobre la presencia de oligosacáridos de mayor grado de polimerización compuestos principalmente de unidades de glucosa, con enlaces  $\alpha$  (1-4), que forman parte del tejido parenquimatoso y el centro del cladodio de nopal. Probablemente la principal función de estos polisacáridos sea de reserva de fuentes de carbono.

La comparación del perfil cromatográfico de las capas hidrolizadas durante 8 h exhibe algunas diferencias en abundancia en la región de los monosacáridos (Figura 6.22). Tal como se observó anteriormente en la Figura 6.21, existen diferencias en la abundancia de ácido galacturónico, glucosa y fructosa, los cuales representan los monosacáridos mayoritarios. Sin embargo, se observan algunos hombros presentes en la glucosa, que coinciden con el tiempo de retención de galactosa en clorénquima, parénquima y médula y además de la galactosa, un hombro de xilosa en epidermis. De la misma manera se observó puntualmente la presencia de la fucosa, que es más notoria en epidermis y en médula.

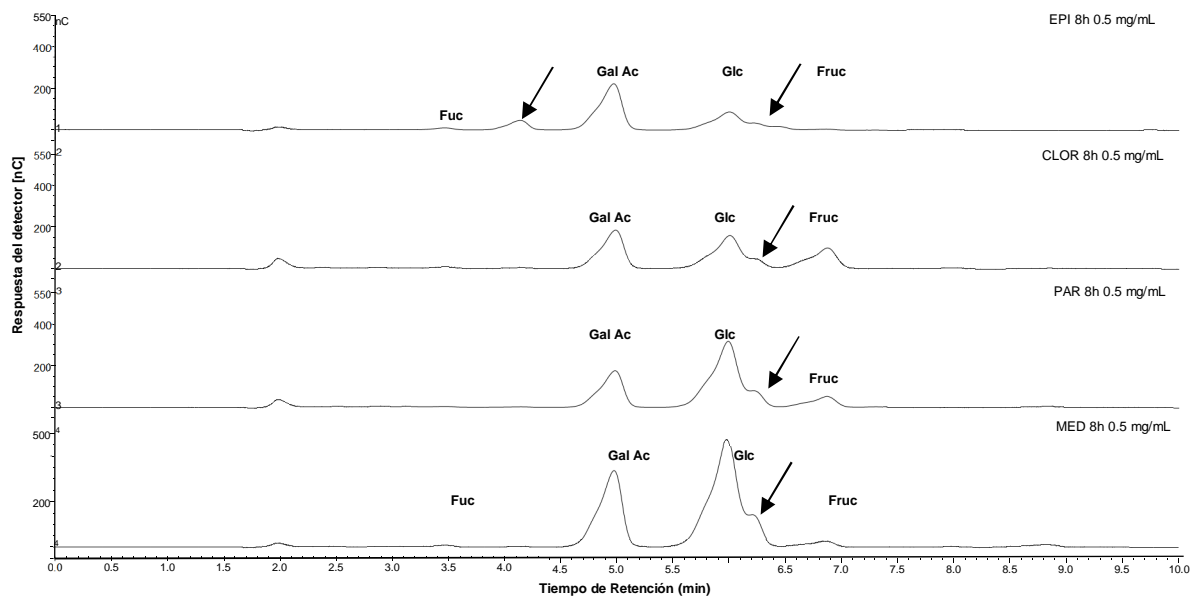


Figura 6.22. Perfil cromatográfico de monosacáridos como resultado de la hidrólisis de capas de cladodios de *Opuntia* durante 8 h. El análisis se realizó por HPAEC-PAD. Referirse a la Tabla 6.3 para la identidad de los monosacáridos aquí mostrados.

De acuerdo con lo que se observó como resultado de la hidrólisis de las capas a diferentes tiempos y a los resultados obtenidos de los cromatogramas de las capas se obtuvo la siguiente gráfica (Figura 6.23) de los componentes de las capas clorénquima, parénquima y médula de *Opuntia*. En la figura se pueden observar los monosacáridos presentes en mayor abundancia, como glucosa y ácido galacturónico, que pueden ser el resultado de la hidrólisis de pectinas y OS y posiblemente de otros polisacáridos no identificados.

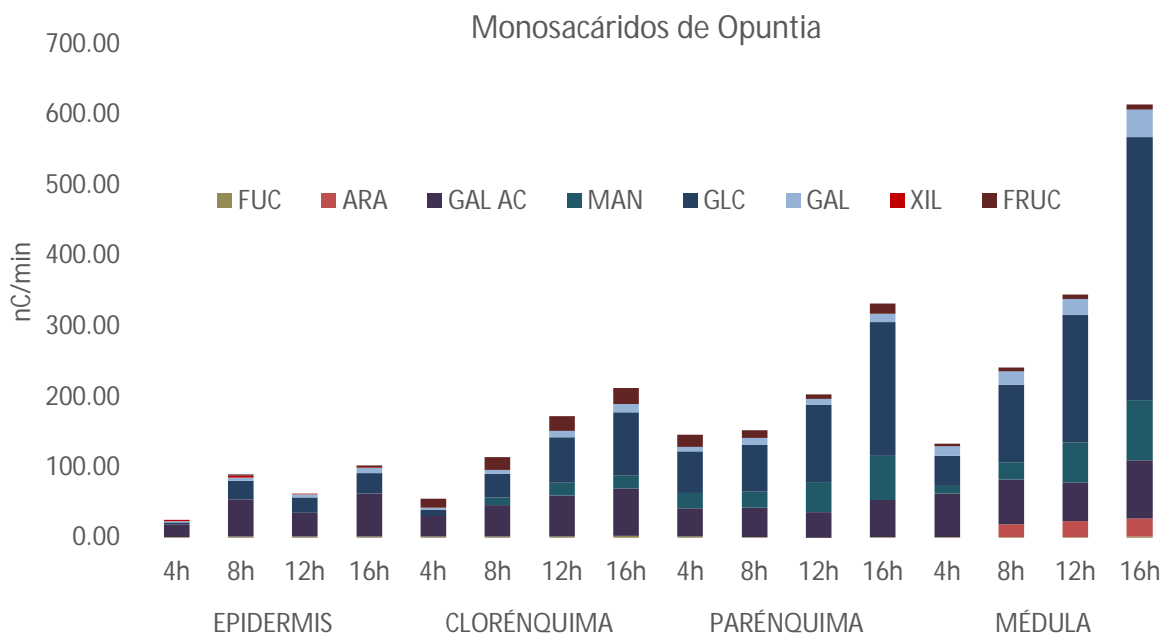


Figura 6.23. Abundancia relativa de monosacáridos obtenida como resultado de la hidrólisis de las cuatro diferentes capas de *Opuntia* sometidas a hidrólisis ácida por diferentes tiempos (4, 8, 12 y 16 h).

El gráfico permite observar la presencia de carbohidratos que coincidieron con el TR de manosa, arabinosa y galactosa. Muy posiblemente, éstos son liberados de polisacáridos como resultado de la hidrólisis y se encuentran en mayor abundancia en médula que en las demás capas. También se puede observar que la fructosa es uno de los componentes de los polisacáridos de clorénquima y parénquima, aunque en mucha menor abundancia que glucosa, ácido galacturónico y manosa. La presencia de arabinosa y ácido galacturónico indica que las pectinas de *Opuntia* están siendo hidrolizadas, mientras que la xilosa sólo fue posible observarla en epidermis, lo que podría indicar que proviene de la hidrólisis de pectinas, en las cuales se sabe se presenta como ramificación de la cadena principal de poligalacturónidos.

Las diferencias de composición de monosacáridos entre las capas indican que a medida se avanza hacia la parte central del cladodio se incrementa la abundancia de carbohidratos. A su vez, en cuanto a los carbohidratos identificados de menor abundancia, arabinosa mostró ser más abundante en la médula y no parece estar presente en las otras capas. Fructosa fue más abundante en el clorénquima que en las demás capas. Por otro lado, la xilosa sólo se presentó en la epidermis.

De acuerdo con lo observado en las micrografías en la sección 6.1, el estilete de *Dactylopius* fue localizado en la sección del clorénquima, parénquima y sólo en una ocasión penetrando la vasculatura. Sin embargo, no existen diferencias en la composición de monosacáridos entre estas capas que puedan indicar por qué la cochinilla migra hacia el centro del cladodio de *Opuntia*; la única diferencia radicó en su abundancia.

La composición de polisacáridos del tipo MOS entre las capas clorénquima y parénquima no difiere en el tamaño de los MOS que se localizan en cada capa, sino que al igual que los monosacáridos, solo en la abundancia de éstos. Como se observa en la Figura 6.24A, las capas de clorénquima y parénquima poseen los mismos carbohidratos y grados de polimerización a las 4 h de hidrólisis. Sin embargo, la abundancia de estos carbohidratos en parénquima es mayor que en clorénquima. El aumento de glucosa en el gráfico indica que, al hidrolizar los polisacáridos presentes, se están liberando unidades de glucosa, siendo ésta el componente principal de estos polisacáridos, como se mencionó anteriormente.

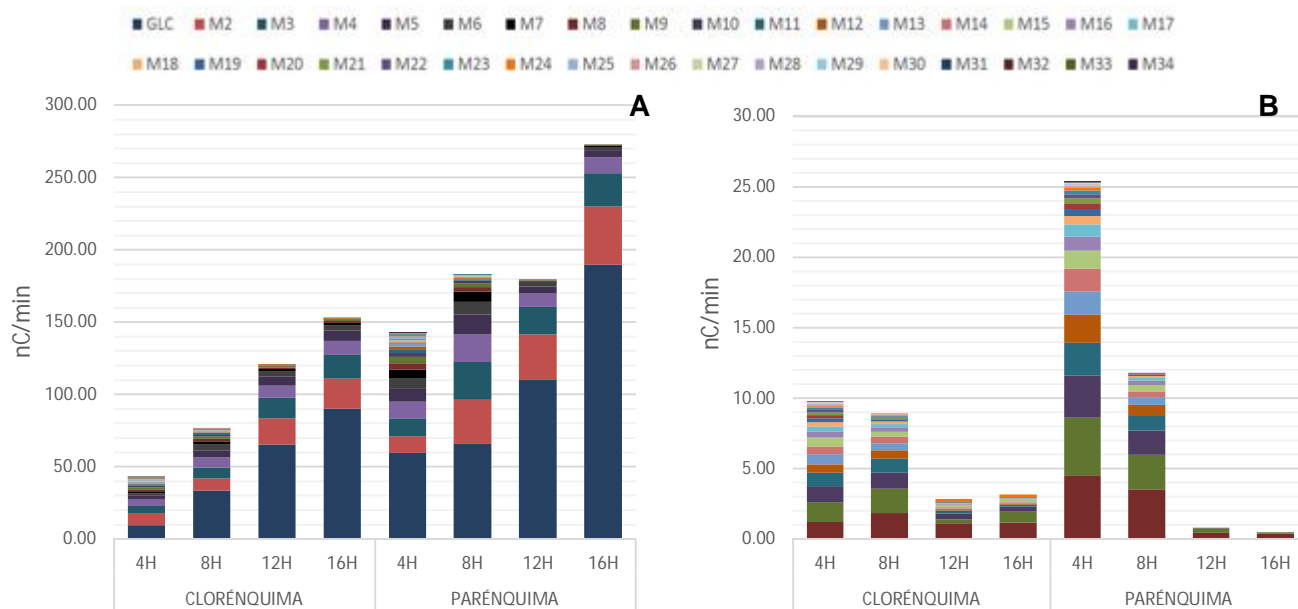


Figura 6.24. Variación de la abundancia relativa de MOS y polisacáridos compuestos de unidades de glucosa, por efecto de la hidrólisis ácida de dos capas de cladodios de *Opuntia* a diferentes tiempos (4, 8, 12, y 16 h) A) MOS, maltooligosacáridos de 1 a 34 unidades de glucosa (M1 – M34). B) Maltooligosacáridos de abundancia minoritaria de 8 a 34 unidades de glucosa (M8 – M34).

Esto se observa mejor en la Figura 6.24 B, en la cual se muestran los polisacáridos a base de glucosa a partir del grado de polimerización 8. El carril correspondiente a las 4 h de hidrólisis de ambas capas exhibe un patrón de carbohidratos del mismo tipo. Sin embargo, en parénquima se presentaron tres carbohidratos denominados M32, M33 y M34 que no fueron detectados en clorénquima, cuyo último carbohidrato fue M31. También se observa que la abundancia de los polisacáridos de parénquima es mayor que en clorénquima.

Como se mencionó anteriormente, algunos de los monosacáridos identificados forman parte de la composición de pectinas, por lo que durante el proceso de hidrólisis se están liberando carbohidratos provenientes de diversos polisacáridos, incluyendo pectinas. Sin embargo, la capa que mejor coincide con el perfil cromatográfico de la hidrólisis del estándar fue la epidermis hidrolizada por 16 h. En la Figura 6.25, se presenta la comparación del perfil cromatográfico obtenido de la hidrólisis de epidermis a las 16 h con

el perfil cromatográfico obtenido de la hidrólisis de un estándar de pectina al mismo tiempo.

Por otra parte, se pueden observar diferencias en la abundancia de ácido galacturónico y glucosa presente en ambos perfiles, ya que el perfil de la pectina muestra mayor abundancia de glucosa que de ácido galacturónico, comportamiento contrario a lo exhibido en la hidrólisis de epidermis.

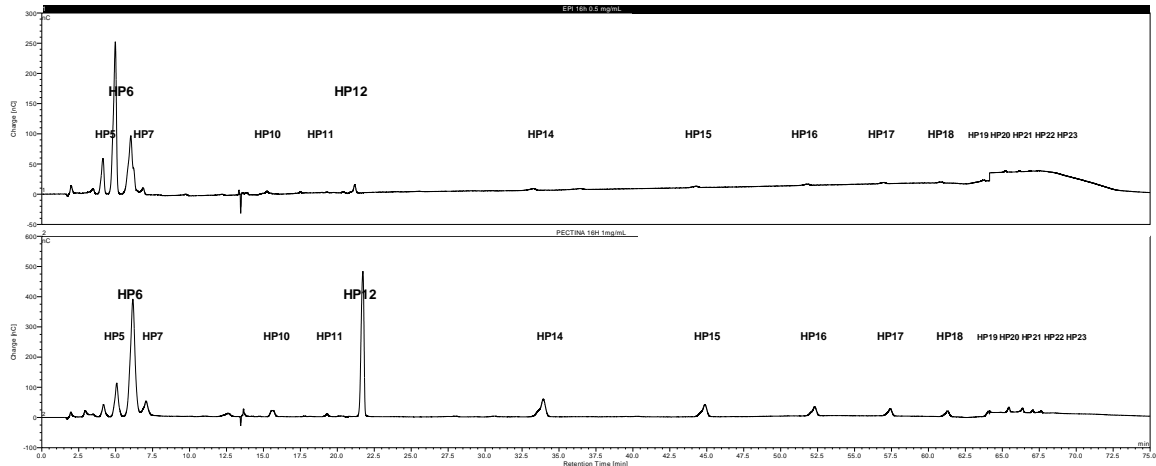


Figura 6.25. (A) Perfil cromatográfico por HPAEC-PAD, de la hidrólisis ácida, por 16 h, de la epidermis de cladodios de *Opuntia*. (B) Se muestra, como comparación, el perfil cromatográfico de estándar pectina hidrolizada por 16 h.

Sin embargo, aunque el perfil cromatográfico de la hidrólisis de epidermis durante 16 h exhibe gran cantidad de picos coincidentes con la hidrólisis de pectinas, las demás capas exhibieron algunos picos coincidentes también con la hidrólisis de pectinas por tiempos similares. En la Figura 6.26, se observa que las tres capas internas del cladodio exhibieron algunos picos en el tiempo entre 60 y 70 min del programa de carbohidratos de alto grado de polimerización. En estos picos se ve una abundancia un cuanto menor a la reflejada en epidermis. Sin embargo, es suficiente para detectar la presencia de pectina que está siendo hidrolizada en estas capas.

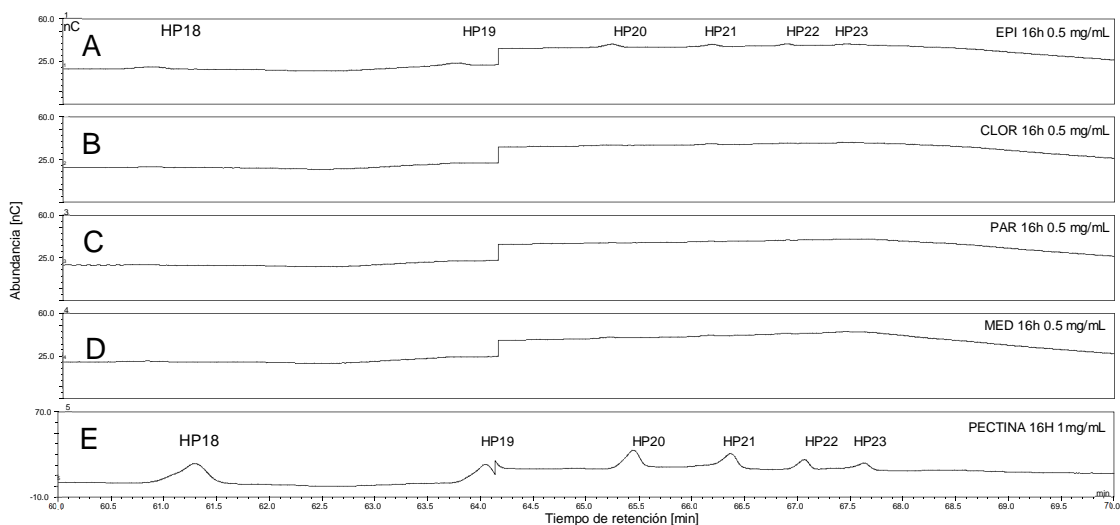


Figura 6.26. (A-D) Perfil cromatográfico de diferentes capas de cladodios de *Opuntia* después de 16 h de hidrólisis ácida. EPI = epidermis; CLOR = clorénquima; PAR = perénquima, y MED = médula. (E) Comparación con perfil de estándar de pectina de manzana (SIGMA) hidrolizada por 16 h.

Con los experimentos realizados, se encontraron diferencias cuantitativas más que cualitativas. Sin embargo, dado que la composición es resultado de la hidrólisis de capas individuales, es poco probable que la cochinilla pueda tener acceso a estos compuestos, que tanto por disponibilidad como por tamaño serían difíciles de obtener para un insecto chupador, a menos que tuvieran la facilidad de consumir compuestos de gran peso molecular o tuvieran la capacidad de hidrolizarlos.

De acuerdo con lo reportado en insectos chupadores, las partes bucales buscan el floema de las plantas, las cuales contienen un alto contenido de fotosintatos, azúcares, aminoácidos y proteínas (Kehr 2006). Sin embargo, de acuerdo con lo observado en la sección 6.1 de este escrito, sólo en pocas ocasiones fue observado el estilete en el floema de *Opuntia*, por lo que la cochinilla debe estar alimentando de las capas anteriores, sin tener que llegar al floema para hacerlo. Debido a que la composición de carbohidratos no exhibe diferencias puntuales que indiquen la razón de introducir el estilete tan profundamente, se continuó con el análisis de capas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para monitorear otro tipo de compuestos diferentes a los azúcares en cada una de las capas.



### 6.3.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Las capas de clorénquima, parénquima y médula fueron procesadas como se mencionó en la sección 5.3.5 y se realizó su análisis utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, en el cual se enfatizó la búsqueda en aminoácidos, ácidos orgánicos y carbohidratos, considerando que éstos pudieran ser parte importante de la alimentación de la cochinilla.

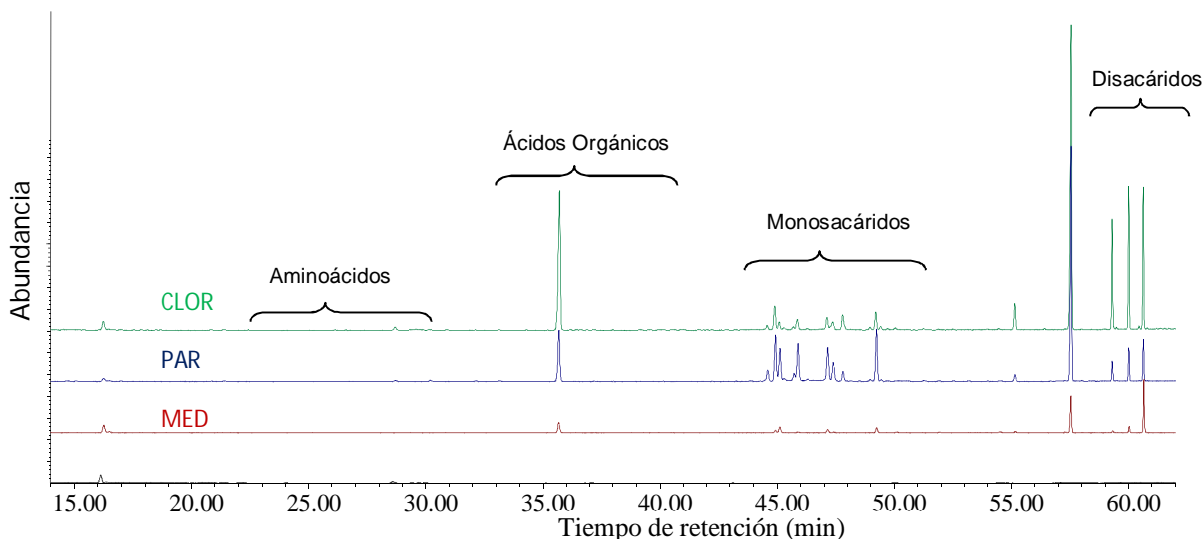


Figura 6.27. Perfil cromatográfico de compuestos presentes en diferentes capas de cladodios de *Opuntia* en diferentes obtenido mediante GC-MS.

CLOR = clorénquima; PAR = parénquima y MED = médula.

En la Figura 6.27 se muestra el perfil cromatográfico que dio como resultado el análisis de las capas de *Opuntia*. En él, se señalan las regiones en las cuales se detectan los diferentes compuestos mayoritarios. Lo observado en la figura indica diferencias en abundancia entre capas, similar a lo señalado en la sección de carbohidratos 6.3.1.3. Sin embargo, mediante este análisis se observó que la abundancia de ciertos compuestos, como ácidos orgánicos, aminoácidos y algunos disacáridos, es mayor en clorénquima.

Las diferencias de los resultados obtenidos con estas dos técnicas es posible que se deban a los procesos de manipulación previo al análisis cromatográfico, ya que las muestras analizadas mediante HPAEC-PAD sufrieron un proceso de hidrólisis, mismo que pudiera disminuir la concentración de los compuestos pequeños en las muestras, mientras que en GC-MS las muestras no fueron hidrolizadas para su análisis. El proceso de derivatización usado para GC/MS también pudo haber sido un factor que contribuyó a las diferencias observadas.

### 6.3.2.1. Aminoácidos

El perfil de aminoácidos en capas de *Opuntia* se observa en la Figura 6.28. La identidad de los aminoácidos se determinó mediante el análisis comparativo con la biblioteca NIST (por sus siglas en inglés, *National Institute of Standards and Technology*), localizada en la biblioteca del equipo.

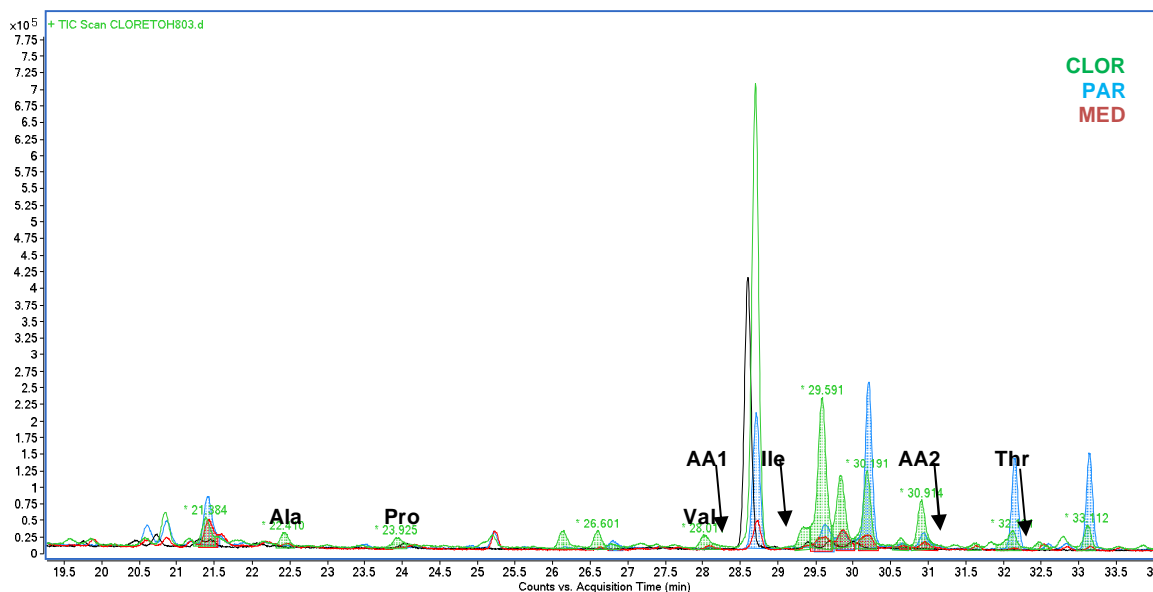


Figura 6.28. Perfil cromatográfico por GC-MS de compuestos presentes en capas de cladodios de *Opuntia*, algunos de los cuales fueron identificados como aminoácidos. CLOR = clorénquima; PAR = parénquima y MED = médula.

Los aminoácidos identificados mediante GC-MS se muestran en la Tabla 6.5. En la Figura 6.28, se señala con una flecha y nombre los aminoácidos identificados con esta biblioteca. Como se observa en el cromatograma, la abundancia de aminoácidos fue menor que casi todos los otros compuestos identificados. Sin embargo, un detalle interesante es que éstos se localizaron sólo en clorénquima. En la tabla se señalan algunos como aminoácidos\* que no fue posible identificar mediante la comparación con la biblioteca, sin embargo, presentaron las características del grupo funcional de los mismos. Quizá pudiera deberse a aminoácidos no protéicos.

**Tabla 6.5. Aminoácidos identificados en capas de cladodios de *Opuntia* mediante GC-MS.**

Aminoácido	Abreviatura	TR (min)	CLOR	PAR	MED
			( $\times 10^5$ iones)	( $\times 10^5$ iones)	( $\times 10^5$ iones)
L-Alanina	L-Ala	22.363	1.9	0.0	0.0
L-Prolina	L-Pro	23.860	5.3	0.0	0.0
L-Valina	L-Val	26.565	1.8	0.0	0.0
Aminoácido1*	AA1	27.947	1.9	0.0	0.0
L-Isoleucina	L-Ile	29.248	2.8	0.0	0.0
Aminoácido2*	AA2	31.567	0.7	0.0	0.0
L-Treonina	L-Thr	32.480	0.8	0.0	0.0

Los valores mostrados en la tabla indican que los aminoácidos más abundantes fueron prolina e isoleucina, y los menos abundantes el segundo aminoácido no identificado y treonina. Como se observa claramente, los aminoácidos sólo se detectaron en la capa del clorénquima caso contrario a lo que se observó en los carbohidratos, ya que clorénquima presentó la menor abundancia de carbohidratos comparado con las otras capas.

### 6.3.2.2. Ácidos Orgánicos

El perfil de ácidos orgánicos obtenido por GC-MS se observa en las Figuras 6.29 y 6.30, en las cuales se muestra una variedad de picos con diferentes abundancias.

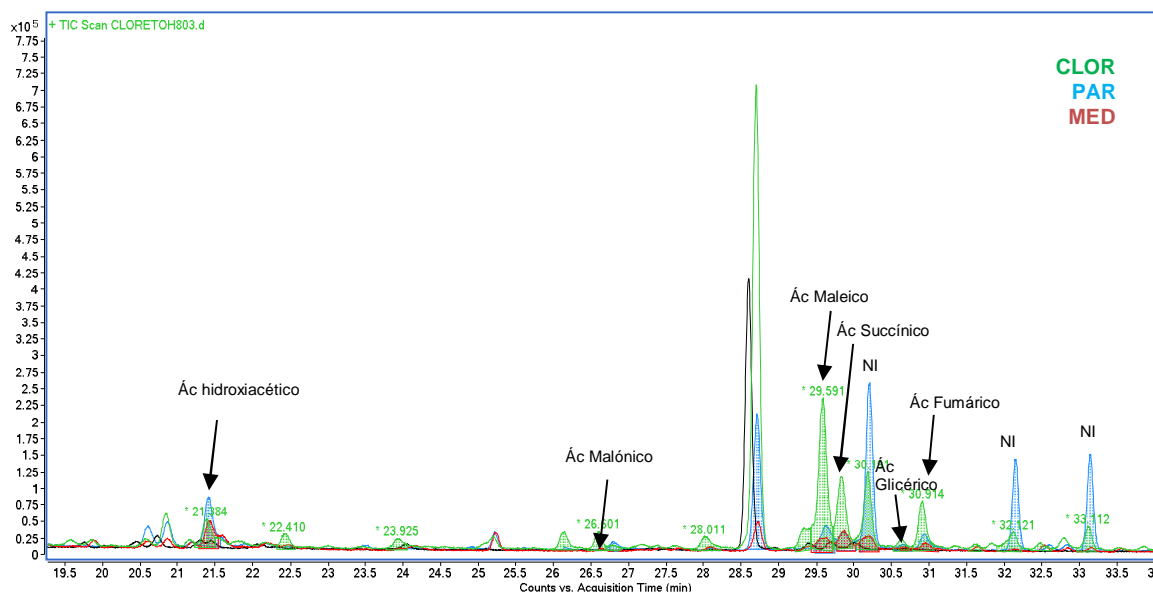


Figura 6.29. Perfil cromatográfico de compuestos en capas de cladodios de *Opuntia*, identificados como ácidos orgánicos mediante GC-MS. CLOR = clorénquima; PAR = parénquima y MED = médula. Ácidos no identificados (NI)

La abundancia de ácidos orgánicos varió dependiendo del tipo de ácido. Por ejemplo, los ácidos malónico, maleico, succínico, glicérico, fumárico y málico se encontraron en mayor proporción en clorénquima, siendo el ácido málico el más abundante (Figuras 6.29 y 6.30). Sin embargo, en la capa del parénquima un grupo de ácidos no identificados (marcados en la figura 6.29 como NI a los minutos 301.1, 32.1 y 31.1) presentaron la mayor abundancia entre capas (Tabla 6.6).

La presencia del ácido málico en clorénquima es, probablemente, el resultado de la asimilación del CO<sub>2</sub>. Siendo *Opuntia* una cactácea, presenta el metabolismo CAM (por sus siglas en inglés, *Crassulacean Acid Metabolism*) las cuales realizan la absorción de CO<sub>2</sub> y su fijación en dos pasos, absorbiendo el CO<sub>2</sub> por la noche para almacenarlo en forma de ácido málico en vacuola, liberándolo CO<sub>2</sub> de la vacuola durante el día para continuar con la formación de carbohidratos en el ciclo de Calvin. Sin embargo, los cladodios de *Opuntia* fueron colectados en la tarde, aproximadamente a las 5 o 6 pm, por

lo que la presencia del ácido málico pudiera estar relacionada con un proceso tardío de liberación de la vacuola.

**Tabla 6.6. Ácidos orgánicos identificados en capas de cladodio de *Opuntia* mediante GC-MS.**

Compuesto	TR (min)	CLOR	PAR	MED
		(x10 <sup>6</sup> iones)	(x10 <sup>6</sup> iones)	(x10 <sup>6</sup> iones)
Ác hidroxiacético	21.39	0.2	0.9	0.3
Ác Malónico	26.07	0.2	0.0	0.0
Ác Maleico	29.37	1.5	0.5	0.4
Ác Succínico	29.90	0.8	0.3	0.3
NI-1	30.20	0.7	1.7	0.2
Ác Glicérico	30.62	0.1	0.1	0.04
Ác Fumárico	30.93	0.5	0.2	0.1
NI-2	32.14	0.2	0.9	0.0
NI-3	33.12	0.2	0.8	0.0
Ác Málico	35.69	185.2	73.7	14.4
Ác Octadecanoico	54.49	2.1	1.1	1.6

La presencia de ácidos orgánicos diferentes del málico, indica la formación de metabolitos en *Opuntia* que pudieran ser importantes para otras rutas metabólicas, como el ciclo de Krebs o síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, los ácidos no identificados se encuentran en mayor abundancia en parénquima que clorénquima, lo cual pudieran ser un indicador del proceso de exploración del estilete de la cochinilla.

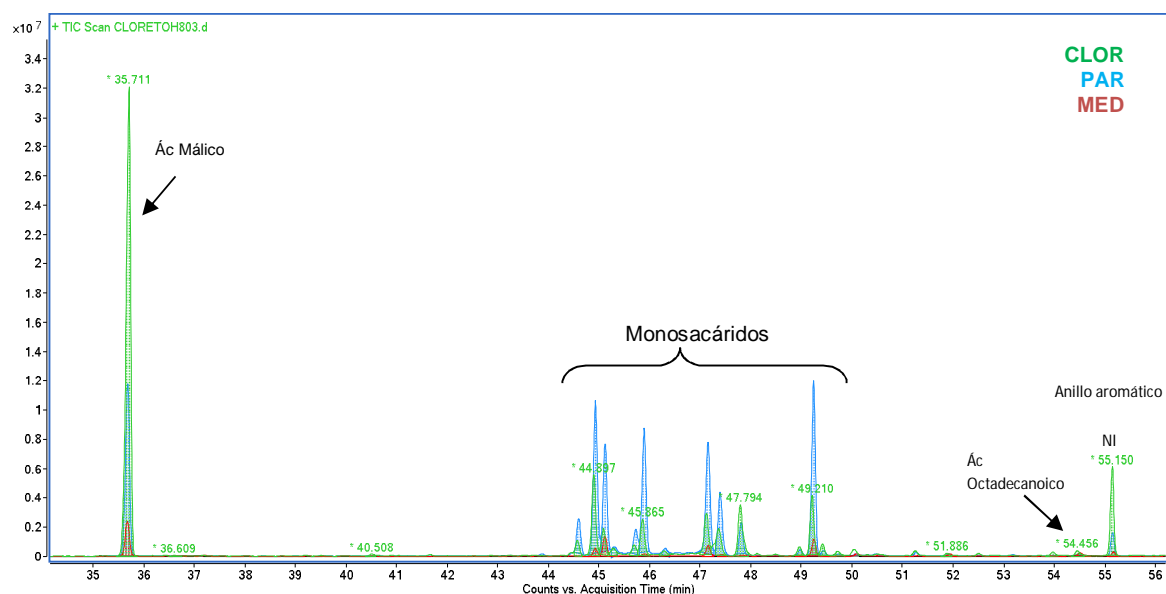


Figura 6.30. Perfil cromatográfico de compuestos en diferentes capas de cladodios de *Opuntia*, identificados como ácidos orgánicos y monosacáridos mediante GC-MS. CLOR = clorénquima; PAR = parénquima y MED = médula.

En la Figura 6.30, además del ácido málico, se detectó la presencia del ácido esteárico u octadecanoico, el cual es un ácido graso saturado. Esta combinación de resultados sugiere que la presencia del ácido malónico podría ser el precursor del malonil Coenzima A, la cual, a su vez, parte esencial de la síntesis de ácidos grasos. También se puede observar la presencia de un compuesto no identificado, que incluye un anillo aromático en su estructura.

En la Figura 6.30 también se observa la presencia de algunos carbohidratos, en su mayoría monosacáridos. Aunque éstos se describen en la siguiente sección, se puede apreciar que la abundancia de éstos se detectó en la capa de parénquima a diferencia de los aminoácidos y ácidos orgánicos cuya abundancia se reflejó principalmente en el clorénquima.

### 6.3.2.3. Carbohidratos

El análisis de carbohidratos mediante GC-MS permitió identificar nuevamente algunos de los monosacáridos presentes de forma libre en las capas de cladodio de *Opuntia*. Los resultados de abundancia que se presentan en la Tabla 6.7 arrojan un resultado diferente a lo observado al analizar el perfil de carbohidratos obtenido como resultado de la hidrólisis de capas de los cladodios, descritos en la sección 6.3.1.3 y mostrados en la Figura 6.24. En éstos la mayor abundancia de monosacáridos hidrolizados fue mayor en la capa de la médula y no en el parénquima. Sin embargo, la abundancia de monosacáridos de parénquima con respecto al clorénquima, se mantuvo en ambos análisis.

Los tres monosacáridos más abundantes en el parénquima fueron, en orden de abundancia, galactosa, glucosa y fructosa, mientras que manosa, ribosa y sacarosa, presentaron mayor abundancia en el clorénquima.

**Tabla 6.7. Carbohidratos identificados en capas de cladodios de *Opuntia* mediante GC-MS.**

Compuesto	Abreviatura	TR	CLOR	PAR	MED
			(x10 <sup>6</sup> iones)	(x10 <sup>6</sup> iones)	(x10 <sup>6</sup> iones)
D-Fructosa	Fruc	45.033	29.5	127.0	20.6
D-Galactosa	Gal	46.618	78.9	325.8	43.6
D-Glucosa	Glc	46.683	48.8	162.3	11.3
D-Xilosa	Xil	47.397	10.5	26.9	0.8
D-Ribosa	Rib	49.741	2.1	1.4	0.0
D-Manosa	Man	53.963	1.7	0.4	0.1
Disacárido1*	Ds1	59.299	64.5	19.1	2.3
Disacárido2*	Ds2	60.009	86.1	25.7	5.6
Sacarosa	Sac	60.629	120.0	38.7	39.9

La Figura 6.31 muestra la presencia de un compuesto no identificado por la biblioteca, que presenta una abundancia mayor incluso que la del ácido málico que era, al parecer, el componente principal de cladodios de *Opuntia* en este análisis.

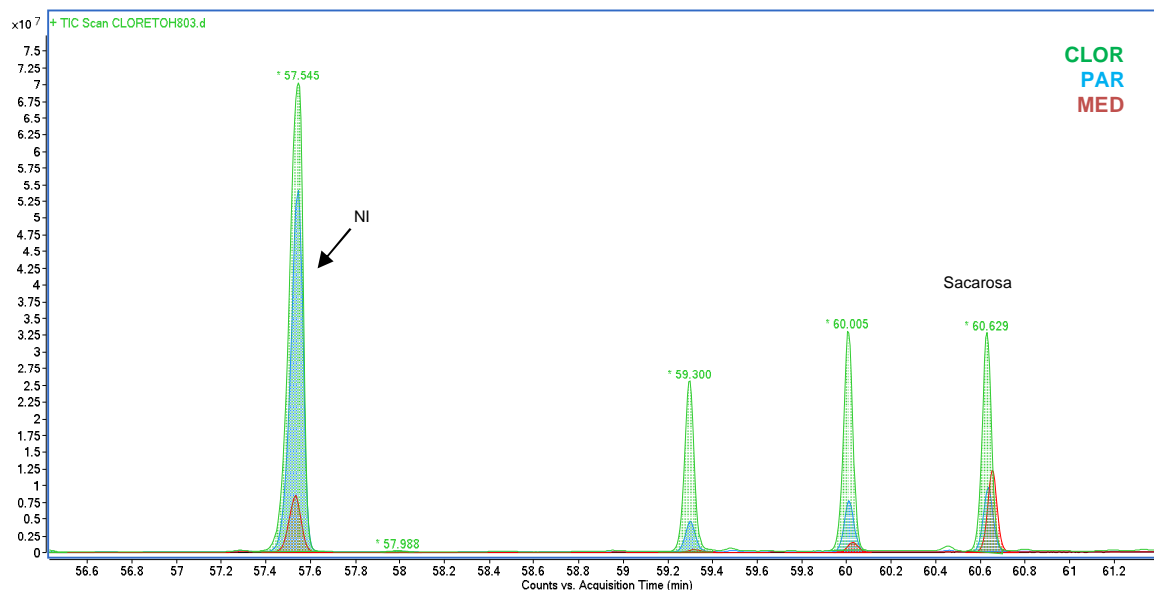


Figura 6.31. Perfil cromatográfico de compuestos, algunos no identificados, de capas de cladodios de *Opuntia* obtenidos mediante un análisis por GC-MS. CLOR = clorénquima; PAR = parénquima y MED = médula.

El compuesto no identificado presenta el ion 179 al ser fraccionado y analizado en el espectrómetro de masas. Éste es característico de compuestos con anillos aromáticos. Sin embargo, no fue posible identificarlo con la información contenida en la biblioteca. Este compuesto es el de mayor abundancia en todas las capas de *Opuntia*, presentando mayor abundancia en el clorénquima, seguida por el parénquima.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Estilete de *Dactylopius*

La cochinilla presentó diferentes longitudes de estiletes incluso en cochinillas de la misma etapa de desarrollo. El valor promedio de longitud para **ninfa I** fue de **3936.7 ± 1289.7** ( $\pm$  desviación estándar). La **ninfa II** presentó un valor de longitud promedio de **3861.4 ± 1195.2** y por último, la **adulta** presentó un valor de **4446.1 ± 666.1** (valores mostrados en la Tabla 6.1), no existiendo diferencias significativas entre las medias de los estiletes de las tres etapas de desarrollo ( $p > 0.05$ ). Esto parece indicar que la cochinilla presenta una búsqueda de nutrientes que varía drásticamente entre individuos, los cuales presentan patrones de exploración que parecen depender del sitio en el cual los nutrientes se localicen en el cladodio de nopal.

Asimismo, la dirección del estilete dentro del nopal en búsqueda de alimento varía no sólo entre individuos, sino que es independientemente de la edad o etapa de desarrollo, ya que algunas cochinillas guiaban el estilete en orientación diagonal al sitio de inserción, de acuerdo con lo reportado por Fouche et al. (1984).

Se corroboró la información sobre la segunda inserción del estilete en cochinillas en etapa de ninfa II, observando estiletes más cortos que los presentados en la ninfa I (Marin y Cisneros, 1977). Además de este comportamiento, se observó movimiento de cochinillas sobre el cladodio en la etapa de ninfa II. Lo observado coincide con lo reportado para áfidos, los cuales mencionan que los estiletes de los áfidos se introducen en el abdomen cuando realizarán un movimiento o cuando comienzan la alimentación, retrayendo la longitud y por lo tanto teniendo una inserción más corta en la hoja (Labandeira 1997; Brozek 2015).

Se observó y se obtuvo una imagen de la punta del estilete, en la cual se aprecian las partes que conforman el pico chupador, descritas en la literatura (Figura 6.11 B), aunque no fue posible identificarlas específicamente mediante esta micrografía. Con estas imágenes fue posible describir al estilete de *D. coccus* como un pico chupador delgado (no mayor a 11  $\mu\text{m}$  de grosor), que se conforma por estructuras típicas de los hemípteros, y que a diferencia de algunos áfidos, el labio del estilete no está segmentado, sino que es una vaina rígida aunque flexible. También se pudo identificar que, de acuerdo con la edad de la hembra, el grosor del estilete puede variar.

Además se identificó la punta del estilete en clorénquima y, mayormente en parénquima, en las etapas de desarrollo ninfa I y ninfa II (Figuras 6.6 a 6.11) y en pocas ocasiones en los cilindros vasculares, en etapa adulta (Figuras 6.12, 6.13 y 6.14). La localización del estilete en los cilindros vasculares coincide con el patrón de alimentación de áfidos e insectos chupadores, descrita en la bibliografía (Labandeira 1997; Kehr 2006; Brozek 2015).

### 7.2. Carbohidratos en *Opuntia*

El análisis de carbohidratos en capas de nopal mediante TLC y FACE permitieron el estudio preliminar de las capas de nopal sometidas a hidrólisis ácida. Mediante este

proceso se pudieron identificar algunos carbohidratos, comparando con el FR de los estándares. El análisis FACE permitió, por otro lado, observar bandeos que no eran visibles en la TLC en la capa de la epidermis hidrolizada a 12 h. Sin embargo, con el uso de estas herramientas no fue posible identificar algún carbohidrato que definiera la localización del estilete de la cochinilla en una capa específica del cladodio.

El análisis de las muestras hidrolizadas mediante HPAEC-PAD permitió observar y corroborar la presencia de los monosacáridos (Figura 6.23), MOS (Figura 6.24) y algunos polisacáridos de mayor tamaño provenientes de la hidrólisis de pectinas (Figura 6.26). Esto coincide en gran medida con lo reportado por Ginestra et al. (2009). Sin embargo, debido al uso de diferentes procesos de hidrólisis, se obtuvieron diferencias en la abundancia de algunos monosacáridos. Por otro lado, la falta de estándares no permitió la identificación de ácido glucurónico y ramnosa, componentes que se reportan en pectinas (Goycoolea y Cárdenas 2003; Ginestra et al. 2009; De Oliveira-Ribeiro et al. 2010; García-Osuna 2013). La presencia de residuos de pectinas se localizó en mayor abundancia en la capa de epidermis, la cual presentó mayor coincidencia con los picos mostrados en el perfil cromatográfico del estándar de pectina hidrolizada (Figura 6.25). Por otro lado, se encontró mayor abundancia de polisacáridos en la médula, siempre en muestras hidrolizadas por 16 h (Figura 6.21).

La comparación entre los carbohidratos identificados en clorénquima y parénquima (dos de las capas en las que se localizó el estilete de la cochinilla) arrojó resultados similares en composición de monosacáridos y polisacáridos. Sin embargo, el parénquima presentó una mayor abundancia de MOS y otros polisacáridos a base de glucosa, por lo que la abundancia de los carbohidratos podría ser un factor importante para determinar la localización del estilete de la cochinilla en esa capa, o en las capas centrales cercanas al floema.

### 7.3. Aminoácidos y ácidos orgánicos en *Opuntia* y su relación con *Dactylopius*

Los resultados obtenidos mediante GC-MS presentados en la sección 6.3.2 mostraron la presencia de aminoácidos en la capa clorénquima y ausencia de los mismos en parénquima y médula. La Tabla 6.5 muestra el contenido de aminoácidos presentes en *Opuntia*. En ésta, se observó que el aminoácido más abundante fue la prolina, seguida de la isoleucina. De los 20 aminoácidos esenciales, sólo fue posible detectar a siete e identificar a cinco.

Feitosa-Teles et al. (1997) reportaron a la serina como el aminoácido de mayor concentración, seguida del ácido aspártico, con valores de 39 y 32 mg/100mg de tejido respectivamente. Estos datos no coinciden con lo observado en este trabajo, ya que la prolina resultó ser el aminoácido más abundante. Sin embargo, esto coincide con lo mencionado por Stintzing y Carle (2005), y con lo reportado por varios otros estudios (Díaz et al. 1999; Bárcenas-Argüello y Flores-hernández 2000) donde la prolina presenta mayor abundancia en *Opuntia* como respuesta a estrés hídrico. Sin embargo esta acumulación es mayor cuando los cladodios son de mayor edad. Los aminoácidos de



menor concentración reportados por Feitosa-Teles et al. (1997) fueron histidina, glicina, alanina, metionina, isoleucina, leucina y tirosina. Sin embargo, en este trabajo isoleucina y alanina fueron más abundantes. Estos valores pueden variar mucho dependiendo de la especie, variedad y sitio donde se cultivó el nopal y sobre todo, por el método de extracción utilizado, por lo que la comparación no es válida.

La poca abundancia de aminoácidos comparada con la abundancia de carbohidratos se relaciona con lo reportado por Stintzing y Carle (2005), quienes presentaron una tabla de datos sobre la composición general de cladodios. En este estudio, se resume que la composición química del cladodio en peso seco fue de 64-71 g de carbohidratos y 4-10 g de proteína, ambos por 100 g de tejido seco y que el contenido de agua fue del 88-95 g, donde 3-7 g son de carbohidratos y 0.5-1 g de proteína por cada 100 g de tejido fresco. Esto indica que la cantidad de proteína de *Opuntia* es baja, por lo que la abundancia de aminoácidos libres debería ser aun más baja. Siendo el nopal una fuente de aminoácidos muy pobre, es poco probable que *Dactylopius* busque a *Opuntia* como fuente principal de nitrógeno, además de que la localización de los aminoácidos no coincide con lo observado en el movimiento del estilete hacia el centro del cladodio.

Existen reportes de insectos áfidos que contienen bacterias simbióticas que les proporcionan aminoácidos como fuente de nitrógeno (Swanevelder 2010). En el caso de *Dactylopius*, existe un reporte reciente de Vera-Ponce de León et al. (2017), en el cual se reporta a *Dactylopiibacterium* como una bacteria simbiote presente en *Dactylopius opuntiae* (cochinilla silvestre) y en *D. coccus* (cochinilla fina). Los autores especulan que la presencia de la bacteria en la cochinilla le aporta el nitrógeno necesario como óxido nitroso (NO) y le confiere mayor longevidad a la cochinilla. De acuerdo a lo anterior, es posible que la presencia de esta bacteria en la cochinilla permita que ésta no tenga la necesidad de obtener nitrógeno de su hospedero, ya que se confirmó que la bacteria tiene los genes suficientes para la de síntesis de todos los aminoácidos esenciales (Vera-Ponce de León et al. 2017).

La composición de los ácidos orgánicos obtenidos coincide con lo encontrado por Stintzing y Carle (2005). Sin embargo, se detectaron algunos otros, además de los ya reportados, como los ácidos maleico, glicérico, fumárico, esteárico, succínico y octadecanoico. Podría especularse que si los carbohidratos no son la fuente principal de nutrientes para la cochinilla, los ácidos orgánicos, como el ácido fumárico, succínico y malónico, podrían servir como componentes de algunas rutas metabólicas, como el ciclo de Krebs, mientras que el ácido octadecanoico podría ser importante para la síntesis de ácidos grasos de mayor tamaño o grado de insaturación.

Según lo reportado, la síntesis de antraquinonas en algunas plantas, mencionada anteriormente en la introducción, puede realizarse mediante dos vías: la vía de la malonil coenzima A y la vía del ácido shiquímico o mevalónico. Dado lo anterior, la presencia del ácido malónico pudiera ser un punto clave en la síntesis de antraquinonas en el insecto y, por lo tanto, del ácido carmínico.

A modo de resumen y de acuerdo con los resultados obtenidos, la longitud del estilete de la cochinilla varía dependiendo del individuo, no habiendo diferencias significativas entre la longitud del estilete en las tres etapas de desarrollo ni una localización en particular en busca de alimento. Se logró identificar las capas de cladodio de nopal a las cuales llegan los estiletes de la cochinilla en sus diferentes etapas de desarrollo, identificando al parénquima como la capa en la cual se observaron más estiletes y a la vasculatura sólo en muy raras ocasiones. La composición química de cladodios de *Opuntia* en sus diferentes capas mostró que los componentes mayoritarios son los carbohidratos, principalmente, ácido galacturónico, glucosa, fructosa y sacarosa, localizándose mayoritariamente en la capa del parénquima. Éste fue uno de los sitios donde se encontró con mayor frecuencia la punta del estilete, por lo que pudiera ser atrayente para la cochinilla. Los aminoácidos se detectaron sólo en la capa del clorénquima, lejano al sitio donde se localizaron los estiletes de las cochinillas, por lo que, aparentemente, no son un blanco de la cochinilla como fuente de alimentación. La composición de ácidos orgánicos se relaciona con el metabolismo ácido de las crasuláceas. Sin embargo, algunos de los ácidos identificados pueden ser de interés en la cochinilla como fuente de metabolitos de alguna ruta metabólica importante, sobre todo la del ácido carmínico, que hasta el momento se desconoce.

## 8. CONCLUSIONES

No se encontró una correlación entre la longitud de estilete de *Dactylopius coccus* y la etapa de desarrollo.

La punta del estilete de *Dactylopius coccus* se localizó principalmente en las capas de parénquima y raramente en cilindros vasculares de cladodios de *Opuntia ficus-indica*.

La composición de carbohidratos de cladodios de *Opuntia* entre las capas de clorénquima y parénquima no parece ser un factor que determina la profundidad que alcanza el estilete de *D. coccus* en el mismo.

Los aminoácidos de cladodios de *Opuntia* no parecen ser una fuente de alimento para *Dactylopius coccus*.

Los ácidos orgánicos localizados en parénquima son posibles blancos de *Dactylopius* como fuente de intermediarios en rutas metabólicas, más aquellos que contienen anillos aromáticos en su estructura, los cuales pudieran ser de interés para la ruta de biosíntesis del ácido carmínico, sin embargo, lo obtenido hasta ahora no aporta información suficiente para respaldar dicha posibilidad.

## 9. PERSPECTIVAS

Estudiar cochinillas ninfa I en tiempos más cortos posteriores a la infestación (horas o días) y observar la longitud del estilete, para determinar si la llegada al sitio de la punta del estilete es un proceso direccionado y rápido, o es un proceso exploratorio más lento.

Utilizar diferentes edades de nopal infestado para identificar si la edad de los mismos podría ser un factor capaz de explicar las diferencias observadas en la localización del estilete de *D. coccus*.

Estudiar la composición de la savia del floema de *Opuntia*, en busca de algunos metabolitos de interés para la cochinilla y comparar con la composición de floema de otras plantas, en busca de algún(os) componente(s) únicos del nopal que contribuyan a hacerlos más atractivos a estos insectos.

Estudiar la relación de los pigmentos de la cochinilla de acuerdo a su etapa de desarrollo y determinar si ésta define la presencia de algunos precursores clave para la síntesis de ácido carmínico.

## 10. REFERENCIAS

- Abel, A., 2012. The history of dyes and pigments: from natural dyes to high performance pigments, Woodhead Publishing Limited. Available at: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857095534.3.433>.
- Aldama-Aguilera, C., Llanderal-Cázares, C., Soto-Hernández, M., Castillo-Márquez, L. E., 2005. Producción de Grana-Cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en Plantas de Nopal a la Intemperie y en Microtúneles. *Agrociencia*, 39, 161–171.
- Allevi, P., Anastasia, M., Bingham, S., Ciuffreda, P., Fiecchi, A., Cighetti, G., Muir, M., Scala, A., Tyman, J., 1998. Synthesis of carminic acid, the colourant principle of cochineal. *Journal of Chemistry Society., Perkin Transaction.*, 1, 575–582.
- Allevi, P., Anastasia, M., Ciuffreda, P., Fiecchi, A., Scala, A., Bingham, S., Muir, M., Tyman, J., 1991. The First Total Synthesis of Carminic Acid. *Journal of Chemistry Society., Chemistry Community*, 1, 1319–1320.
- Anderson, K., Li, S. & Li, Y., 2000. Diphenylamine – Aniline – Phosphoric Acid Reagent, a Versatile Spray Reagent for Revealing Glycoconjugates on Thin-Layer Chromatography Plates. *Analytical Biochemistry*, 287, 337–339.
- Angulo-Bejarano, P.I., Martínez-Cruz, O. & Paredes-López, O., 2014. Phytochemical Content, Nutraceutical Potential and Biotechnological Applications of an Ancient Mexican Plant: Nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Current Nutrition & Food Science*, 10, 196–217.
- Aquino-Pérez, G., Producción de grana cochinilla. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación., 7, 1–8.
- Baranyovits, F.L.C., 1978. Cochineal carmine: an ancient dye with a modern role. *Endeavour*, 2(2), 85–92.
- Bárcenas-Argüello, M.L. & Flores-hernández, A., 2000. Acumulación de prolina en raíces de dos cultivares de Nopal (*Opuntia* spp.) bajo tensión por calor. *Revisata Chapingo Serie Zonas Aridas*, 1(1), 7–12.
- Brozek, J., Mróz, E., Wylezek, D., Depa, L., Wegierek, P., 2015. The structure of extremely long mouthparts in the aphid genus *Stomaphis* Walker (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae). *Zoomorphology*, 134, 431–445.
- Brückner, H. & Westhauser, T., 2003. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*, 24, 43–55.
- Campos-Figueroa & Llanderal-Cazares, 2003. Producción de grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. *Agrociencia*, 37, 149–155.
- Caselín-Castro, S. Llanderal-Cázarez, C., Ramírez-Cruz, A., Soto-Hernández, M., Méndez-Montiel, J, T., 2008. Caracterización Morfológica de Hemocitos de la

- Hembra de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Agrociencia*, 42(num 3, Abril-Mayo), 349–355.
- Celis-Fabian, E.F., 2009. Potencial nutraceutico de cladodios de nopal. 1-117.
- Chavez-Moreno, C.K. Tecante, A., Casas, A., Claps, L.E., 2011. Distribution and Habitat in México of *Dactylopius* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) and their Cacti Host (Cactaceae: Opuntioideae). *Neotropical Entomology*, 40(1), 62–71.
- Chávez-moreno, C.K. Tecante, A., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R., 2010. Metabolic profiling of *Dactylopius* ( Hemiptera : Dactylopiidae ) species pigments by geographical origin and hosts using multivariate data analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 671–679. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2010.04.003>.
- Chibnall, A.C., Latner, A.L., Williams, E.F., Ayre, C. A., 1934. XLIII. The Constitution of Coccerin, *Biochemistry*, XXVIII, 313-325.
- Chidouh, A., Aouadi, S. & Heyraud, A., 2014. Food Hydrocolloids Extraction , fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle ( *Myrtus communis* L .) fruit. *Food hydrocolloids*, 35, 733–739. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.001>.
- Coll-Hurtado, A., 1998. Oaxaca : Geografía Histórica de la Grana Cochinilla. *Investigaciones Geográficas Boletín*, 36, 71–82.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal De Guanajuato, A.C., Manual de Plagas y Enfermedades del Agave. Campaña Manejo Fitosanitario de Cultivos Perennes. 1-28.
- Coronado-Flores, V., 2011. Efecto de la Fertilización de Nopal (*Opuntia ficus-indica*) Sobre la Productividad y Calidad de Grana Cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa). 1-110.
- Díaz, P., Borsani, O. & Monza, J., 1999. Acumulación de Prolina en Plantas en Respuesta al Estres Osmótico. *Agrociencia*, 3(1), 1–10.
- Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, D.E. de A.S., 2011. Monografía del Nopal y la Tuna. *Financiera Rural*. 1-15.
- Feitosa-Teles, F.F. Whiting, F.M., Price, R.L., Borges, V.E.L., 1997. Protein and Amino Acids of Nopal (*Opuntia ficus indica* (L.)). *Revista Ceres*, XLIV(252), 205–214.
- García-Osuna, H.T., 2013. Identificación de Pectinas y Mucílago de Cuatro Variedades de Nopal (*Opuntia ficus-indica* L.) Miller y Validación de su Actividad Hipoglucémica. 1-206.

- Ginestra, G. Parker, M.L., Bennett, R.N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R.B., Bisignano, G., Faulds, C.B. Waldron, K.W., 2009. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10323–10330.
- González, M., Méndez, J., Carnero, A., Lobo, G.M., Afonso, A., 2002. Optimizing Conditions for the Extraction of Pigments in Cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) Using Response. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.6968–6974.
- Goycoolea, F.M. & Cárdenas, A., 2003. Pectins from *Opuntia* spp. : A Short Review. *Journal of the Professional Association of Cactus Development*, 5, 17–29.
- Hernández-hernández, F.D.C. García-Gil de Muñoz, F., del Río-Dueñas, I., Lanz-Mendoza, H., 2005. La cochinilla fina del nopal. *Ciencia*, octubre-diciembre, 78–87.
- Hernández-Hernández, F.D.C. García-Gil de Muñoz, F., Rojas-Martínez, A., Hernández-Martínez, S., Lanz-Mendoza, H., 2003. Carminic Acid Dye From the Homopteran *Dactylopius coccus* Hemolymph Is Consumed During Treatment With Different Microbial Elicitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 45, 37–45.
- Kehr, J., 2006. Phloem sap proteins : their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 767–774.
- Kyriacou, M.C., Emmanouilidou, M.G. & Soteriou, G.A., 2016. Asynchronous ripening behavior of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) cultivars with respect to physicochemical and physiological attributes. *Food Chemistry*, 211, 598–607. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.113>.
- Labandeira, C.C., 1997. Insect Mouthparts : Ascertaining the Paleobiology of Insect Feeding Strategies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 153–194.
- Lefsih, K. Delattre, C., Pierre, G., Michaud, P., Aminabhavi, T.M., Dahmoune, F., Madani, K., 2016. Extraction, characterization and gelling behavior enhancement of pectins from the cladodes of *Opuntia ficus indica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 645–652. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.046>.
- Lefsih, K., Giacomazza, D., Dahmoune, F., Mangione, M.R., Bulone, D., San Biagio, P.L., Passantino, R., Costa, M.A., Guarrasi, V., Madani, K., 2017. Pectin from *Opuntia ficus indica*: Optimization of microwave-assisted extraction and preliminary characterization. *Food Chemistry*, 221, 91–99. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.073>.
- Lloyd, A.G., 1980. Extraction and Chemistry of Cochineal. *Food Chemistry*, 5, 91–107.
- López-Munguía, A., Larqué-Saavedra, A., Pedraza-Escalona, M., Vargas, L.A., Alpuche-Garcés, O., Wacher-Rodarte, Ma del C., Escalante-Lozada, A., García-Fadrique, J.,

2017. Biotecnología en Movimiento. Biotecnología prehispánica en Mesoamérica. Número 9., 1–36.
- Loprieno, G., Boncristiani, G. & Loprieno, N., 2000. Genotoxicity Studies In Vitro and In Vivo on Carminic Acid (Natural Red 4). *Food and Chemical Toxicology*, 30(9), 759–764.
- Marin, R.L. & Cisneros, F. V., 1977. Biología y Morgía de la Cochinilla del Carmín, *Dactylopius coccus* Costa. *Revista peruana de Entomología*, 20, N° 1, 115–120.
- Martínez-Martínez, A., 2012. Antraquinonas. In *Quinonas y compuestos relacionados*. 1–70.
- Matsuhira, B. Lillo, L.E., Sáenz, C., Urzúa, C.C., Zárate, O., 2006. Chemical Characterization of the Mucilage from Fruits of *Opuntia ficus indica*. *Carbohydrate Polymers*, 63, 263–267.
- De Oliveira-Ribeiro, E.M. Da Silva, N.H., De Lima-Filho, J.L., De Brito, J.Z. Carvalho Da Silva, M. da P., 2010. Study of Carbohydrates Present in the Cladodes of *Opuntia ficus-indica* ( fodder palm ), According to Age and Season. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 933–939.
- Pérez-Guerra, G.M., 1991. Biosystematics of the family Dactylopiidae (Homoptera: coccinea) with Emphasis on the Life Cycle of *Dactylopius coccus* Costa. 1-181.
- Pérez-Sandi, M. & Becerra, R., 2001. Nocheztli: el Insecto Rojo del Carmín. *CONABIO. Biodiversitas.*, 36(Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad), 1–8.
- Portillo, Liberato. & Viguera, A.L., 2013. Actas de la Segunda Reunión para el Aprovechamiento Integral de la Tuna y otras Cactáceas y I Reunión Sudamericana Cactusnet Fao-Icarda. In *Cría de la grana cochinilla (Dyeing with cochineal and natural dyes: Use of typical species of South American)*. 85–94.
- Romero-López, B.E., Flores-Hernández, A., Santamaría-César, E., Salazar-Torres, J.C., Ramírez-Delgado, M., Pedroza-Sandoval, A., 2006. Identificación, Biología y Adaptación de la Cochinilla Condiciones Ambientales de Bermejillo, Durango. *Chapingo Serie Zonas Aridas*, 5, 41–48.
- Ruiz-López, S., 2011. El nopal: Propiedades y Paquete Tecnológico para su Producción, *Fundación Produce Sinaloa A. C. Memoria de Capacitación*. SAGARPA, 1–14.
- Stintzing, F.C. & Carle, R., 2005. Cactus stems ( *Opuntia* spp .): A review on their Chemistry, Technology, and Uses. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 175–194.
- Stintzing, F.C., Schieber, A. & Carle, R., 2001. Phytochemical and Nutritional Significance of Cactus Pear. *European Food Research and Technology*, 212, 396–407.

- Swanevelder, Z.H., 2010. Aphid-Plant Interactions and the Possible Role of an Endosymbiont in Aphid Biotype Development. 1-276
- Tovar-Puente, A., 2000. Producción de Grana Cochinilla del Nopal *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: dactylopiidae) en dos Localidades del Sur del Estado de Nuevo León. 1-87.
- Vera-Ponce de León, A. Ormeño-Orrillo, E., Ramírez-Puebla, S.T., Rosenblueth, M., Esposti, M.D., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E., 2017. *Candidatus Dactylopiibacterium carminicum*, a Nitrogen-Fixing Symbiont of *Dactylopius* Cochineal Insects (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Genome Biol. Evol.*, 9(9), 2237–2250.
- Zhao, M., Yanga, N., Yang, B., Jiang, Y., Zhang, G., 2007. Structural Characterization of Water-Soluble Polysaccharides from *Opuntia monacantha* Cladodes in Relation to their Anti-Glycated Activities. *Food Chemistry*, 105, 1480–1486.