

**FACTORES BIÓTICOS Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CARMÍNICO
EN LA COCHINILLA (*Dactylopius coccus* COSTA)
(HOMOPTERA: DACTYLOPIIDAE)**

**Biotic factors and concentration of carminic acid in cochineal insects
(*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: Dactylopiidae)**

**Luis C. Rodríguez¹, Eric Faúndez¹, Judith Seymour¹, Carlos A. Escobar², Luis Espinoza³,
Maria Petroutsa¹, Alejandro Ayres⁴ y Hermann M. Niemeyer^{1*}**

ABSTRACT

The cochineal insect, *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae), grows on the prickly-pear cactus, *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae), and is exploited for its capacity to produce natural dyes based on carminic acid. Cochineal insects were introduced in Chile in 1989, and exports of dry cochineal began in 1994 and grew to cover approximately 15% of the world market. However, the current price of dry cochineal is nearing production costs; hence, it has become necessary to increase yields without increasing costs. This work reports on the effect of biotic factors on the concentration of carminic acid (CAC) in cochineal insects. CAC was positively affected by the density of cochineal insects around the insect, that was analyzed by plant age, and by the nutritional status of the plant, and was negatively affected by the age of the cladode. Additionally, CAC was significantly affected by season: 16.9% of dry weight in the Autumn and 19.1% in the Spring. This knowledge may be used in designing cultural strategies to increase carminic acid accumulation in cochineal insects.

Key words: cochineal, carminic acid, natural dyes, prickly-pear cactus, haplodiploidy, genetic improvement of insects.

RESUMEN

La cochinilla, *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae), es un insecto que crece sobre la tuna, *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae), y es explotado por su capacidad para producir colorantes naturales basados en el ácido carmínico. La cochinilla fue introducida a Chile en 1989. Las exportaciones de cochinilla seca se iniciaron en 1994 y los volúmenes y montos se elevaron de manera significativa año a año, hasta alcanzar a cubrir más del 15% de la demanda mundial. Sin embargo, el precio actual de la cochinilla se acerca a los costos de producción, siendo necesario aumentar los rendimientos sin aumentar los costos. En este trabajo se describe el efecto de diversas variables bióticas sobre la concentración de ácido carmínico (CAC), la que fue afectada positivamente por la densidad de cochinillas en torno a la cochinilla focal, la edad y el estado nutricional de la planta, y negativamente por la edad del cladodio. La estación afectó significativamente la CAC: 16,9% del peso seco de cochinilla en otoño y 19,1% en primavera. Estos conocimientos abren la puerta para el diseño de estrategias de manejo que conduzcan a un incremento de la CAC en la cochinilla.

Palabras clave: cochinilla, ácido carmínico, colorantes naturales, tuna, haplodiploidía, mejoramiento genético de insectos.

¹ Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Casilla 653, Santiago, Chile.

E-mail: niemeyer@abulafia.ciencias.uchile.cl *Autor para correspondencia.

² Universidad Nacional Andrés Bello, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Av. República 252, Santiago, Chile.

³ Universidad Técnica Federico Santa María, Departamento de Química, Av. España 1680, Valparaíso, Chile.

⁴ Los Tunantes, S.A., Cordovéz 490, Of. 204, La Serena, Chile.

Recibido: 2 de enero de 2004. Aceptado: 12 de agosto de 2004.

INTRODUCCIÓN

La cochinilla, *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae), es un insecto parásito de los cladodios y frutos de la tuna, *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae), cuyas hembras son la fuente de ácido carmínico, materia prima para la producción de carmín, un colorante rojo utilizado por la industria alimenticia, textil y farmacéutica (Rodríguez y Niemeyer, 2001). La colonización de la planta con propósitos comerciales se realiza manualmente con hembras ovíparas, utilizando cajas de cartón, plástico o bolsas de gasa que son fijadas al cladodio. Las ninfas migrantes buscan un lugar donde asentarse, colonizando preferentemente la base de las espinas y las irregularidades de la superficie de los cladodios. Luego de asentarse y tener una primera muda, las ninfas que generan hembras permanecen sésiles el resto de sus vidas, y tienen una muda adicional antes de convertirse en adultos. Las ninfas que generan machos, luego de la segunda muda forman un capullo en cuyo interior se forman la prepupa y la pupa. Éstas dan paso al insecto adulto, que vive en promedio tres días. Para que la hembra oviposite, es necesaria la cópula. Una vez fecundada, la hembra pone un promedio de 180 huevos hasta el término de su ciclo vital (Flores-Flores y Tekelenburg, 1995).

El insecto es probablemente originario de Sudamérica (Rodríguez *et al.*, 2001). Perú es el principal productor mundial de cochinilla y productos derivados de ella, con cerca de 885 toneladas anuales, de las cuales aproximadamente 400 toneladas son exportadas como cochinilla seca, y las restantes como los colorantes carmín y ácido carmínico (PRA, 2002). La mayor parte de la producción peruana proviene de tunales naturales, donde los insectos son cosechados como complemento de los ingresos de los campesinos. Debido a la carencia de prácticas culturales en los tunales, la ocurrencia de infestaciones naturales y los bajos salarios imperantes en las zonas productoras, los costos de producción en Perú son muy bajos; sin embargo, la calidad de la cochinilla colectada en ocasiones no cumple los

requerimientos del mercado en términos de uniformidad y concentración de ácido carmínico (Flores-Flores y Tekelenburg, 1995).

En 1989, luego de superar los requerimientos sanitarios del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile, la cochinilla fue introducida desde Perú a terrenos de la IV Región. Las exportaciones de cochinilla seca se iniciaron en el año 1994 y los volúmenes y montos se elevaron de manera significativa año tras año, hasta alcanzar a cubrir más del 15% de la demanda mundial, y representar en 1997 ingresos superiores a los 4 millones y medio de dólares. En Chile, la producción de cochinilla se realiza en forma tecnificada, con manejo del riego y fertilización de las plantaciones de tuna, de modo que el rendimiento y la calidad de la cochinilla chilena está entre las mejores del mundo. Sin embargo, debido a la drástica caída de los precios y los elevados costos de producción asociados con las prácticas de manejo imperantes en el país, las utilidades de los productores se han reducido considerablemente.

Se han descrito y aplicado muchas prácticas agronómicas destinadas a mejorar el estado de la planta e indirectamente la calidad del insecto, incluyendo podas, riego y fertilización (Flores-Flores y Tekelenburg, 1995). Adicionalmente, estructuras o barreras mecánicas destinadas al control de factores ambientales, como viento y lluvia, han sido utilizadas con el fin de reducir la mortalidad natural e incrementar la densidad de insectos en la planta (Aquino y Bárcenas, 1999). Sin embargo, ambas estrategias incrementan significativamente los costos y sus resultados son discutibles, por lo que aún es necesario buscar alternativas que permitan incrementar los rendimientos de cochinilla y/o ácido carmínico de una forma rentable.

El objetivo de este trabajo fue describir un método analítico para determinar la concentración de ácido carmínico en individuos de cochinilla, y explorar diversos factores bióticos que inciden sobre la concentración de ácido carmínico en la cochinilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de la concentración de ácido carmínico (CAC) en insectos individuales

El estudio de factores bióticos que inciden sobre la CAC en la cochinilla requiere medir esta variable con exactitud y reproducibilidad. Los métodos analíticos descritos en la literatura (González *et al.*, 2002) son adecuados sólo para muestras provenientes de grupos de insectos. El método descrito a continuación se desarrolló sobre la base de los descritos anteriormente, con el objetivo de cuantificar ácido carmínico en extractos de cochinillas individuales, estudiándose diversos factores que permitieran hacerlo en forma exacta, reproducible, y suficientemente rápido como para permitir analizar cientos de muestras en un período breve de tiempo. Las variables estudiadas guardaron relación con: i) la capacidad para extraer el ácido carmínico desde los tejidos del insecto, generando soluciones homogéneas que condujeran a valores reproducibles de absorbancia, y ii) el efecto sobre la estabilidad del ácido carmínico una vez solubilizado o todavía contenido en el insecto muerto. El Cuadro 1 muestra los factores estudiados, el rango estudiado de cada factor, y destacado en negrita el valor finalmente utilizado.

El método finalmente utilizado fue el siguiente: se colectaron los insectos individuales en la fase de hembra oviplena a punto de iniciar la oviposición, se secaron en una estufa con circulación de aire a 50°C por 72 h, se pesaron y luego se sumergieron en 1 mL de hexano contenido en un tubo Eppendorf y se agitaron con el fin de eliminar la cera que los recubría. Luego de descartar el hexano, se agregó a cada individuo 4 mL de solución amortiguadora de pH 6 (obtenida agregando 56 mL de NaOH 0,1 M a 500 mL de KH_2PO_4 0,1 M), la suspensión se sometió a ondas ultrasónicas durante 3 h y luego se molió el material sólido en morteros individuales. De esta suspensión se extrajo una alícuota de 0,6 mL. Ésta se agregó sobre 0,6 mL de amortiguador pH 6 contenido en un tubo Eppendorf que se centrifugó durante 8 min a 13.000 rpm. Se extrajo una alícuota de 50 μL del sobrenadante y se depositó en una de las cubetas de una placa de 96 cubetas, y se obtuvo la absorbancia a 490 nm de cada una de las muestras en un espectrofotómetro (Packard Instrument Co., SpectraCount™, Downers Grove, Illinois, USA) con capacidad para la lectura simultánea de 96 muestras.

En cada placa se incluyeron seis estándares con distintas concentraciones de ácido carmínico

Cuadro 1. Factores examinados durante el desarrollo del método para determinar la concentración de ácido carmínico (CAC). Se destacan en negrita los valores utilizados en la versión final del método.

Table 1. Factors studied during the development of the method for determination of carminic acid concentration (CAC). Bold letters indicate the values used in the final version of the method.

Factores	Unidad	Valores estudiados del factor	Criterio de optimización
Tiempo entre colecta de la cochinilla e inicio del proceso de secado	Días	< 0,5 - 2 - 4 - 6	Mayor CAC
Tiempo de secado	Horas	0 - 24 - 48 - 72	Peso constante y mayor CAC
Temperatura de secado	°C	40 - 50 - 60	Peso constante y mayor CAC
Tiempo de extracción de ceras	Segundos	30 - 60 - 90	Constancia de peso seco
Proceso de extracción del colorante	-	• triturar con polvo de vidrio • ultrasonicar	Mayor CAC
Separación del ácido carmínico	-	• filtrar por lana de vidrio, papel o algodón • centrifugar	Calidad de la separación y rapidez de la operación
Estabilidad de los extractos de ácido carmínico	Horas	0 - 4 - 8 - 24	Mayor CAC

-: no corresponde.

(Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, USA; 90% de pureza), dos testigos con solución amortiguadora y un número variable de las muestras. Los valores de CAC en las muestras se interpolaron de una recta de calibración hecha con los estándares, luego de restar de las absorbancias leídas el promedio de las absorbancias de los testigos. La CAC se expresó en función del peso seco de la muestra.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Química Ecológica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, durante el período comprendido entre enero de 2000 y diciembre de 2003.

Influencia de factores bióticos sobre la CAC

Como punto de partida, se exploró el potencial reproductivo de la cochinilla. Para ello se tomó una muestra aleatoria de 100 cochinillas ovíparas prontas a oviponer, de un predio productor de la zona ubicado en Las Rojas (29°58'lat. Sur; 71°02'long. Oeste), IV Región, Chile. Se llevaron dichas cochinillas al laboratorio, y luego de secadas, se categorizaron de acuerdo a su peso seco. Se determinó la fecundidad contabilizando el número total de huevos colocados por cada individuo, y finalizado el período de oviposición, se determinó la CAC de cada cochinilla usando el procedimiento ya descrito.

Por otra parte, se evaluó la incidencia de diversos factores bióticos asociados a los tunales infestados con cochinillas, sobre la CAC. Durante marzo y agosto de 2003, se seleccionaron aleatoriamente 150 cochinillas en terreno, para cada una de las cuales se evaluaron factores que se consideraron relacionados con lo habitualmente observado en los tunales de la IV Región destinados a la producción de cochinilla, *i.e.*, la presencia de hongos sobre los cladodios y sobre las excretas de cochinilla, así como variables destinadas a evaluar calidad de hospedero y efectos densodependientes en el insecto.

La infección fúngica sobre los cladodios y sobre las excretas de cochinilla, así como la cobertura cérica sobre los cladodios se evaluaron según una escala elaborada por los autores, con valores que iban desde 1 hasta 4, donde el primer valor repre-

sentaba escasa o nula cobertura y el valor 4 representaba cobertura total. Para el caso del color, se confeccionó una escala cromática tomando como base la variabilidad presente en el predio, que permitió la clasificación de los cladodios en cuatro categorías del 1 al 4, en la que 1 representaba el verde intenso y 4 el amarillo pálido. La superficie del cladodio se evaluó en cm², midiendo el diámetro mayor y el diámetro menor del cladodio y aproximando la figura a una elipse. La densidad de insectos en torno a una cochinilla focal, aquella en la cual se determinó la concentración de ácido carmínico, se evaluó contabilizando el número de cochinillas adultas vivas en un área circular correspondiente a la superficie promedio que ocupan las colonias (5 cm de radio) con centro en dicha cochinilla focal. Finalmente, la edad del cladodio y la edad de la planta se obtuvieron de los registros mantenidos por la empresa dueña del predio donde se realizaron las colectas.

Una vez obtenidos los datos de campo, las cochinillas focales se separaron de la planta, se secaron, y se cuantificó la CAC en ellas por el método descrito anteriormente. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión múltiple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 muestra el rango de valores estudiados para cada uno de los factores que determinan la calidad del método de análisis de ácido carmínico en cochinilla, y también los valores óptimos de dichos factores. Los resultados muestran la conveniencia del pronto secado de la cochinilla luego de colectada, del secado por un tiempo largo pero a una temperatura media, del procesamiento del extracto por ultrasonicación y centrifugación, y de la medición espectrofotométrica inmediata del extracto. El método, como fue aplicado, resultó rápido, exacto y reproducible.

Dado que la cochinilla es comercializada principalmente por peso seco, se investigó la relación entre el peso de la madre y fecundidad, la relación entre el peso de la madre y la concentración de ácido carmínico, y finalmente la relación entre la

fecundidad y ácido carmínico. Los resultados muestran que cochinillas de mayor peso poseen menor concentración de ácido carmínico (Figura 1 B) y ponen mayor número de huevos (Figura 1 A), lo cual conduce a una relación inversa entre concentración de ácido carmínico y fecundidad (Figura 1 C). Dada la función defensiva del ácido carmínico (Eisner *et al.*, 1980), esta relación sugiere la existencia de un compromiso fisiológico entre la asignación de recursos a reproducción o a defensa.

El Cuadro 2 resume los resultados del experimento realizado para evaluar los efectos de factores bióticos sobre la CAC. Se observó un efecto significativo de la estación sobre la CAC (16,9% del peso seco de cochinilla en marzo 2003 y 19,1% en agosto 2003, prueba de Student, $p < 0,01$). Dicha variación estacional probablemente está asociada a las condiciones de estrés hídrico de la planta durante el verano, debido al incremento de la temperatura y la disminución de las precipitaciones. Este efecto sería más evidente

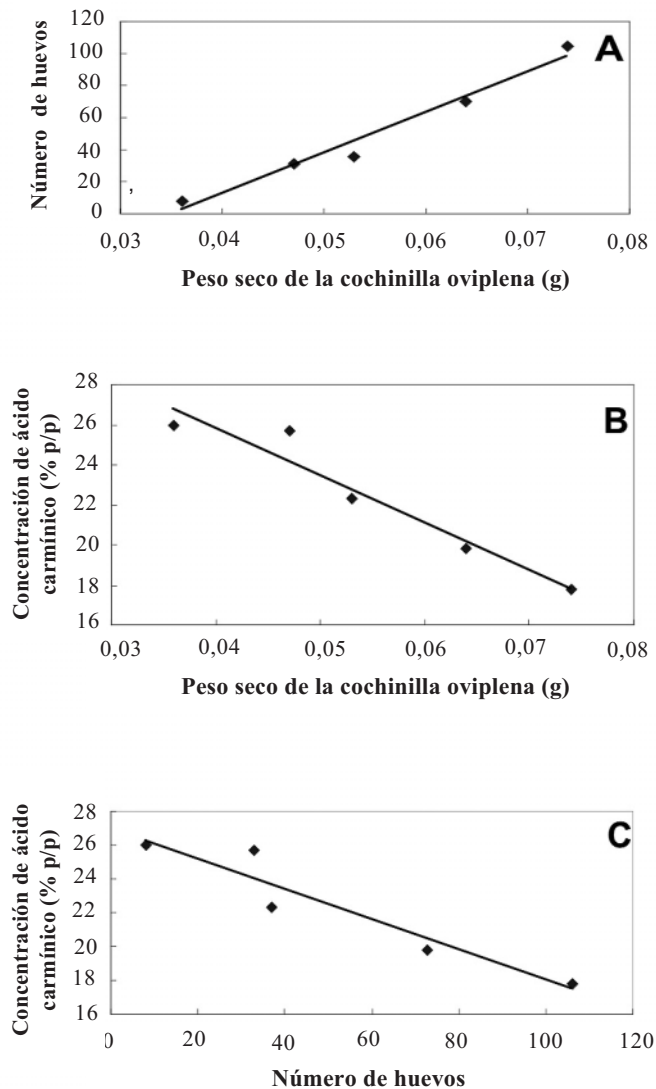


Figura 1. Relaciones entre número de huevos puestos por una hembra de cochinilla, y su peso seco y concentración de ácido carmínico CAC).

Figure 1. Relationships between the number of eggs oviposited by female cochineal insects, and their dry weight and carminic acid concentration (CAC).

debido a que los bajos precios de la cochinilla en los últimos años han generado problemas económicos que se han reflejado en la disminución de la periodicidad del riego en el predio.

La edad de la planta influyó positivamente sobre la CAC. Entre las prácticas agrícolas habituales, las plantas de tuna son regularmente podadas, alterándose el tamaño de la canopia y el número de cladodios; sin embargo, el sistema radicular no es modificado por la poda. En consecuencia, una planta de mayor edad presentaría una mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes que una de menor edad, lo cual beneficiaría positivamente al insecto, al tener un hospedero de mayor calidad.

La edad del cladodio afectó negativamente la CAC. Estudios de fisiología vegetal en la tuna evidencian cambios en la asignación de recursos entre cladodios de diferentes edades (Inglese *et al.*, 1999). Dichos cladodios constituirían para el insecto recursos de distinta calidad nutricional.

El color del cladodio resultó una variable significativa. Se observó que las plantas cloróticas hospedaron cochinillas con menor CAC, efecto que puede estar relacionado también con el estado nutricional de la planta.

La densidad de cochinillas en el cladodio aumentó la CAC, sugiriendo que al incrementarse los niveles de infestación ocurren respuestas densodependientes, que se traducen en cochinillas con menor tamaño corporal y menor potencial reproductivo, resultados de la competencia intraespecífica y, como se describió más arriba, un menor tamaño corporal tiene asociada una mayor CAC.

El Cuadro 2 muestra que los efectos fúngicos sobre cladodios y cochinilla no fueron significativos al ser analizados a lo largo del año. Sin embargo, en Chile, las infecciones fúngicas sobre los frutales son más importantes durante los meses de primavera-verano debido al incremento de la temperatura ambiental (Razeto, 1999). Debido a ello, no es sorprendente que sólo durante esos meses, el efecto de las infecciones fúngicas en la superficie de los cladodios de tuna y en las excretas de cochinilla sobre la CAC, sean marginalmente significativos, $p = 0,065$ y $p = 0,061$, respectivamente. Las infecciones sobre los cladodios tienen un efecto negativo sobre la CAC, al disminuir la superficie fotosintética de la planta o alterar su metabolismo, mientras que las infecciones fúngicas sobre excretas de cochinilla tienen un efecto positivo sobre la CAC, sugiriendo que niveles moderados de estrés derivados del am-

Cuadro 2. Resumen de los resultados del análisis por regresión lineal múltiple de los datos obtenidos de los experimentos realizados para evaluar los efectos de factores bióticos sobre la concentración de ácido carmínico, en dos temporadas.

Table 2. Summary of multiple linear regression results for data from experiments evaluating the effect of biotic factors on carminic acid concentration in cochineal insects, during two seasons.

Variable estudiada	Coficiente	Error estándar
Constante	2,359**	0,176
Estación	0,134**	0,031
Infección fúngica sobre los cladodios	-0,014	0,013
Cobertura cérea sobre el cladodio	-0,032	0,018
Densidad en torno a cochinilla focal	0,055**	0,017
Superficie del cladodio	0,033	0,023
Infección fúngica sobre excretas de cochinilla	0,029	0,017
Color del cladodio	-0,051**	0,015
Edad del cladodio	-0,069*	0,037
Edad de la planta	0,068*	0,036

$R^2 = 0,16$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

biente o de interacciones biológicas podrían gatillar mecanismos defensivos que incluyen incremento de las defensas químicas.

En conclusión, se diseñó e implementó un método analítico para cuantificar la concentración de ácido carmínico (CAC) en cochinillas individuales, y se determinó el efecto de diversos factores bióticos que inciden sobre la CAC. El bajo valor de ajuste de la regresión entre factores bióticos y CAC sugiere que factores ambientales como temperatura y fotoperíodo, y prácticas culturales como

el riego, la fertilización y las podas tendrían un mayor efecto sobre la CAC que las interacciones biológicas evaluadas.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Innovación Agraria, proyecto V99-O-A-017. Los autores agradecen la colaboración de Lucía Briones, Nava Concha, Angélica Durán y Lafayette Eaton durante distintas fases del desarrollo del proyecto.

LITERATURA CITADA

- Aquino, G., y N. Bárcenas. 1999. Cría de cochinilla para la producción de grana y sus posibilidades de resurgimiento en México. 34 p. VI Congreso Internacional Sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. 6-10 de octubre. Universidad Autónoma San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- Eisner, T., S. Nowicky, M. Goetz, and J. Meinwald. 1980. Red cochineal dye (carminic acid): its role in nature. *Science* 208:1039-1042.
- Flores-Flores, V., and A. Tekelenburg. 1995. Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. *Plant Production and Protection Paper* 132. 242 p. FAO, Rome, Italy.
- González, M., J. Méndez, A. Carnero, M.G. Lobo, and A. Alfonso. 2002. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* 50:6968-6974.
- Inglese, P., G. Barbera, and T. La Mantia. 1999. Seasonal reproductive and vegetative growth patterns and resource allocation during cactus pear fruit growth. *HortScience* 34:69-72.
- PRA. 2002. El mercado de la cochinilla. 28 p. Proyecto Programa Regional Ayacucho (PRA). Centro de Servicios Económicos Ayacucho, Ayacucho, Perú.
- Razeto, B. 1999. Para entender la fruticultura. 373 p. 3^a. ed. Editorial Vértigo, Santiago, Chile.
- Rodríguez, L.C., and H.M. Niemeyer. 2001. Cochineal production: a reviving Precolumbian industry. *Athena Review* 2:76-78.
- Rodríguez, L.C., M.A. Méndez, and H.M. Niemeyer. 2001. Direction of dispersion of cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) within the Americas. *Antiquity* 75:73-77.