



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSGRADO EN FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**CONSERVACIÓN DE COLOR Y TEXTURA DEL
GUSANO ROJO DE MAGUEY *Comadia redtenbacheri*
(LEPIDOPTERA: COSSIDAE) EN BOTELLAS DE
MEZCAL**

ENHÉ MAGDALENA MILLÁN MERCADO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis, titulada: Conservación de color y textura del gusano rojo de maguey *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) en botellas de mezcal, realizada por la alumna: **Enhé Magdalena Millán Mercado**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



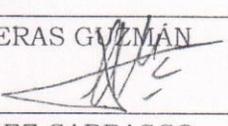
DRA. MA. CELINA M. LLANDERAL CÁZARES

ASESOR



DRA. ANA LILIA VIGUERAS GUZMÁN

ASESOR



M.C. JORGE M. VALDEZ CARRASCO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2016

CONSERVACIÓN DEL COLOR Y TEXTURA DEL GUSANO ROJO DE MAGUEY EN BOTELLAS DE MEZCAL

ENHE MAGDALENA MILLÁN MERCADO, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

En su etapa larval, *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt, conocido como gusano rojo del maguey, es un insecto comestible que representa un alto valor comercial para la industria mezcalera. Las larvas poseen una coloración roja intensa en los últimos instares, lo que incluso le da el nombre común a la especie. Sin embargo, los insectos incluidos en las botellas pierden su coloración natural al ser expuestas a concentraciones de alcohol sin un procedimiento previo de fijación, lo que demerita su aspecto físico, calidad y aceptación del producto. Con el objeto de preservar las características específicas de consistencia y color en larvas del insecto incluidas en mezcal comercial, se evaluó una técnica con cinco tratamientos: mezcal (38°), alcohol 70%, serie ascendente de alcoholes (40%,60%,80% y 96%), vinagre blanco-alcohol 40% y congelación. Mediante cortes histológicos se reconocieron las principales estructuras morfológicas como son: intestino medio, espiráculo, tráquea, cordón nervioso, cutícula y tejido graso, entre otros. Además se determinó que el tratamiento con vinagre blanco-alcohol 40% mantiene una mayor consistencia de las larvas y la técnica de congelación fue más eficiente para la conservación de color. Con el objeto de mantener el color en las larvas incluidas en mezcal, se ensayó un pigmento natural que permitió conservar una tonalidad similar al que presenta la especie.

Palabras claves: insecto comestible, *Comadia redtenbacheri*, fijación de tejidos, consistencia, agave, morfología interna.

CONSERVATION OF TEXTURE AND COLOR OF THE MAGUEY RED WORM
(Lepidoptera: Cossidae) IN BOTTLES

ENHE MAGDALENA MILLÁN MERCADO, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

During its larval stage, *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt), known as the agave red worm, is an edible insect that has a high commercial value to the mescal industry. Larvae are intense red in the last instars, which gives the common name to the species. However, the insects that are in mescal bottles lose their natural coloration after they are exposed to several alcohol concentrations without a previous fixation process, which diminishes their physical aspect, their quality and the acceptance of the product.

With the objective of preserving the specific characteristics of consistency and color of the larvae included in commercial mescal, a technique of five treatments was evaluated: mescal (38°), 70% alcohol, solutions of ascending concentrations of alcohol (40%, 60%, 80% and 96%), white vinegar – 40% alcohol, and freezing. Using histological sections, the main morphological structures were distinguished: midgut, spiracle, trachea, nerve chord, cuticle, and fat tissue, among others. The treatment with white vinegar – 40% alcohol preserves better the consistency of the larvae, and freezing was more efficient to preserve the color. To keep the color in larvae included in mescal bottles, a natural pigment was assayed, which allowed to maintain a hue that is similar to the one presented in the species.

Key words: Edible insect, *Comadia redtenbacheri*, tissue fixation, consistency, agave, internal morphology.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por seguir confiando en cada persona que se dedica a la investigación. Al pueblo de México por brindar los fondos para que personas como, yo puedan seguir en este maravilloso mundo que es la Ciencia.

Al Colegio de Postgraduados por permitirme ser parte de esta gran familia, formarme, y darme las herramientas para ser un mejor profesionista.

A la doctora Celina, por guiarme en esta gran aventura llamada Maestría y regalarme su tiempo para enseñarme con paciencia y cariño las bases de un buen investigador, pero sobre todo un mejor ser humano. *Gracias!!*.

Al maestro Jorge por mostrarme con cada estructura, el hermoso mundo llamado Entomología. Pero sobre todo por enseñarme que con dedicación y sencillez, hacer lo que uno ama no es trabajo. Para mí es un honor haber sido su alumna y poder decir que es mi amigo.

A la doctora Ana Lilia, quien siempre nos ha enseñado a persistir, resistir y nunca desistir, por no darse por vencida con nosotros, por confiar en mí y permitirme conocer otra visión del mundo. Pero sobre todo por ser mi gran amiga. La quiero mucho.

A mi Madre por creer en mí siempre, a mi familia por estar conmigo, a Carlos Chapa porque la distancia no significa nada cuando se conoce a los amigos. A Jorge Noriega por sorprenderme siempre, y enseñarme a resolver un mal día con una sonrisa. A mi Familia Colpos, por que sin ellos no hubiera llegado al final, por cada risa, develada y más. Sara, Areli, Isis, Paul, Lenin, Sergio, Lulú, Claudia, Chubie, Chucho, Pollo, Emir, Víctor, Ricardo, Manuel, Daysi, Luz. Gracias por su amistad.

DEDICATORIA

Por enseñarme con el ejemplo que el miedo debe ser transformado en un escalón y no una barrera, mi madre Raquel Mercado Muñoz, porque todo lo bueno que salga de mí, es el reflejo de tu trabajo diario, de cada una de tus desveladas y todo tu amor.

Te amo.

A mi mejor amigo, mi maestro y mi gran amor Carlos Fajardo, por el instante de vida que hemos compartido, por ser el colaborador sin crédito de este trabajo, dedicarme tiempo, y hacer esta maestría a mi lado. Por los días ausentes, por amar a esta loca bipolar con ideas extrañas.

Te amo enano.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Planteamiento del problema.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Literatura citada	3
CAPÍTULO I	6
Identificación de las principales estructuras morfológicas en larvas sanas de <i>Comadia redtenbacheri</i> (Lepidoptera: Cossidae) mediante histología.	6
Resumen	6
Abstract	7
1.1. INTRODUCCIÓN	8
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
1.2.1. Colecta de las Larvas.....	9
1.2.2. Selección de larvas	10
1.2.3. Histología de <i>C. redtenbacheri</i>	10
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
1.3.1 Descripción de cortes histológicos.....	12
Conclusiones	23
Agradecimientos	24
CAPÍTULO II.....	28
Conservación del gusano rojo <i>Comadia retenbacheri</i> para mezcal embotellado.....	28
Resumen	28
Abstract	29
2.1. INTRODUCCIÓN	30
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34

2.3.1 Observación de las características generales de la parte externa de los diferentes tratamientos y larvas incluidas en botellas de mezcal.....	34
2.3.2. Disecciones de las larvas de los diversos tratamientos y larvas incluidas en botellas de mezcal comercial.....	39
2.3.3 Análisis RGB.....	43
2.3.4. Tinción de larvas con colorantes naturales	44
2.4. CONCLUSIONES	48
2.5. AGRADECIMIENTO	49
2.6. LITERATURA CITADA	49
CONCLUSIONES GENERALES.....	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro. 1 Resultado de color de <i>Comadia redtenbacheri</i> mediante el análisis RGB.	43
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal en el integumento de <i>Comadia redtenbacheri</i> . CE, células epidérmicas; EP, epicutícula; MB, membrana basal; PR, procutícula.	12
Figura 2. Corte longitudinal en el integumento de <i>Comadia redtenbacheri</i> . CE, epidermis; E, espina; EP, epicutícula; PR, procutícula.	14
Figura 3. Corte transversal en el espiráculo de <i>Comadia redtenbacheri</i> . A, ATRIO; AE, apertura espiracular; C, cutícula; F, filamentos; TR, tráquea.	15
Figura 4. Corte transversal en la tráquea de <i>Comadia redtenbacheri</i> . CE, células epidérmicas; CTG, células de tejido graso; L, lumen; M, músculos; MB, membrana basal; TE, tenidios. 16	
Figura 5. Corte transversal en el músculo de <i>Comadia redtenbacheri</i> . CE, células epidérmicas; ME, músculos esqueléticos; MV, músculo visceral; TA, tejido adiposo.	17
Figura 6. Corte longitudinal en el músculo esquelético de <i>Comadia redtenbacheri</i> . ME, músculos esqueléticos; MV, músculos viscerales.	18
Figura 7. Corte transversal en el abdomen de <i>Comadia redtenbacheri</i> que muestra el tejido adiposo.	19
Figura 8. Corte longitudinal en el vaso dorsal de <i>Comadia redtenbacheri</i> . CE, células epidérmicas; CS, células suspensorias; DD, diafragma dorsal; SPC, seno pericardial; SPV, seno perivisceral; TG, tejido graso; VD, vaso dorsal.	20
Figura 9. Corte transversal en el cordón nervioso de <i>Comadia redtenbacheri</i> . AX, axones; C, cutícula; CNV, cordón nervioso ventral; G, ganglio; M, músculo; TG, tejido graso.	21
Figura 10. Corte transversal en la glándula salival de <i>comadia redtenbacheri</i> . TA; tejido adiposo.	22
Figura 11. Corte transversal de intestino medio de <i>Comadia redtenbacheri</i> . CD, célula diferenciada; CND, célula no diferenciada; L, lumen; MB, membrana basal; ML, músculos longitudinales; MV, micro vellosidades; T, tráqueas; TA, tejido adiposo.	23
Figura 12. Coloración típica de larvas desarrolladas de <i>C. redtenbacheri</i> , en restos de rizoma de agave hospedero.	35
Figura 13. Larvas de <i>C. redtenbacheri</i> . (a- e) larvas de los tratamientos. (f-j) testigos de los tratamientos. (k-n) larvas incluidas en botellas de mezcales comerciales. Escala: 1 cm.	38
Figura 14. Último segmento abdominal de una larva de <i>comadia redtenbacheri</i> en el que se observa la pigmentación en la epidermis (EPI) y cutícula (C) transparente.	40
Figura 15. Órganos internos de larvas de <i>C. redtenbacheri</i> . (a-e) larvas de los tratamientos. (f-j) testigos de los tratamientos. (k-m) larvas incluidas en botellas de mezcales comerciales. (n)	

testigo absoluto. <i>im</i> intestino medio, <i>m</i> músculo, <i>tg</i> tejido graso, <i>tm</i> tubos de malpighi. escala: 1 cm.	42
Figura 16. Tinción con diferentes colorantes naturales en larvas tratadas con vinagre - alcohol 40% de <i>Comadia redtenbacheri</i> . Pigmento A (a-c); pigmento B (d-f).	46
Figura 17. Coloración con distintos pigmentos naturales en larvas tratadas con vinagre - alcohol 40% de <i>Comadia redtenbacheri</i> . Pigmento C (a-c); pigmento natural D (d-f).	47

INTRODUCCIÓN GENERAL

Planteamiento del problema

La entomofagia, descrita en la literatura como una actividad tradicional en grupos étnicos, se practica en muchos países del mundo, principalmente en Asia, África y América Latina, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Van Huis, 2013). En la actualidad representa una actividad económica rentable, ya que por ejemplo en México existen 549 especies de insectos comestibles (Ramos-Elorduy, 2008). El gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri*, es consumido en varios estados del centro de México y ha llegado a comercializarse a precios altos en las zonas urbanas (Hernández- Livera *et al.* 2005). La larva presenta una coloración roja intensa en los últimos instares (Castro-Torres y Llanderal-Cázares, 2015) lo que incluso le da el nombre común a la especie. La coloración en insectos puede deberse a diferentes pigmentos, algunos de los cuales pueden ser solubles en agua o lípidos. El pigmento puede estar ubicado en la cutícula o epidermis subyacente, o deberse a estructuras físicas y también se puede encontrar en el tejido graso y la hemolinfa, lo que proporciona el color si la cutícula es transparente (Shamim *et al.* 2014).

Se ha establecido que el color en los insectos sirve para protegerlos de los depredadores, de heridas, o para el reconocimiento intraespecífico y/o sexual y también puede ser usado como un termorregulador (Gillott, 2005). El color rojo que caracteriza a la larva *C. redtenbacheri* podría atribuirse a un pigmento del grupo de los homocromos, que son responsables de dar tonos que van desde el dorado, pasando por rojo, púrpura y violeta, hasta negro, que al reducirse forman rojos y al oxidarse proporcionan una coloración usualmente amarilla (Cromartie, 1959; Insausti y Casas, 2008).

El gusano rojo tiene una gran importancia en la industria mezcalera de exportación, ya que por ejemplo el mercado chino solicita que tenga al menos 20 gusanos por botella (Encabo, 2000). La fuente de abastecimiento principal de larvas de *C. redtenbacheri* es la colecta silvestre, situación que Yen (2009) menciona para otros insectos comestibles y la sobreexplotación de éstas ha llegado a poner en riesgo su reproducción (Llanderal-Cázares *et al.* 2007). Con el paso del tiempo el insecto ha adquirido importancia en Japón, Estados Unidos y algunos países de Europa (Encabo, 2000). Las larvas incluidas en las botellas pierden su coloración natural al ser expuestas a las concentraciones de alcohol permitidas en el mezcal, que van de 36° a 55° Gay-Lussac (SAGARPA, 1994) sin un procedimiento previo de fijación, lo que demerita su aspecto físico, además de que en ocasiones hay degradación de los tejidos que al quedar como residuos en el fondo de las botellas desmerecen la calidad y aceptación del producto y causa restricciones en diversos países para su importación (Anónimo, 2011).

El mezcal, un destilado 100% de agave, se extrae de especies autorizadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Naturales, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 1994). Es producido artesanalmente en México, cuenta con denominación de origen y se ha posicionado como la bebida alcohólica con mayor crecimiento en el 2015 para el mercado nacional e internacional, con un aumento de 79% en su envasado de acuerdo con el Consejo Regulador del Mezcal (CRM, 2015). La producción es de aproximadamente 4.8 millones de litros y las ventas han llegado a ser de 97 millones de dólares. De acuerdo con la Secretaría de Relaciones Exteriores (SRE), el estado de Oaxaca es el principal exportador al generar el 54.4% de la producción total nacional, el segundo lugar lo ocupa Zacatecas con 45.3%, mientras que Durango y Guerrero producen el 0.3% restante (SRE, 2014). Una limitante importante para su exportación es la ausencia de protocolos y normas que aseguren la inocuidad del gusano rojo en

la bebida, lo que se refleja en pérdidas económicas para la industria mezcalera; esto, aunado a la falta de metodologías específicas para su conservación, ha provocado que su aspecto natural no se conserve en el producto. El objetivo de este estudio es generar nuevo conocimiento que permita proponer una metodología para la preservación de características específicas como textura y color en larvas de *C. redtenbacheri* incluidas en mezcal comercial.

2. Objetivos

- Identificar mediante histología las principales estructuras morfológicas en larvas de *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae).
- Evaluar diferentes métodos para la conservación de textura y coloración de la larva a diferentes concentraciones de alcohol.

3. Literatura citada

ANÓNIMO. El gusano de mezcal mexicano causa polémica en exposición. En línea:[http://mexico.cnn.com/historiasextraordinarias/2011/05/07el-gusano-mexicano-causa-polémica-en-exposición en Canadá](http://mexico.cnn.com/historiasextraordinarias/2011/05/07el-gusano-mexicano-causa-polémica-en-exposición-en-Canadá).

CRM. 2015. Informe del Consejo Regulador del Mezcal. En línea:

Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/269109491/Informe-2015-del-Consejo-Regulador-del-Mezcal>

- Castro-Torres, R. E. y C. Llanderal-Cázares. 2015. Principales caracteres morfológicos para el reconocimiento de *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: cossidae). *Entomología Mexicana* 2:798-803. [doi: 10.3958/059.039.020](https://doi.org/10.3958/059.039.020)
- Cromartie, R. 1959. Insect pigments. *Annu. Rev. Entomol* 4:59-76. [doi:10.1146/annurev.en.04.010159.000423](https://doi.org/10.1146/annurev.en.04.010159.000423)
- Encabo J., E. 2000. Mezcal, bebida de los dioses. En línea: <http://www.afuegolento.com/noticias/39firmas/encabo/1610/-44K>.
- Guillott, C. 2005. *Entomology*. 3th ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Hernández-Livera, A., C. Llanderal-Cázares, E. Castillo-Márquez, J. Valdez-Carrasco y R. Nieto-Hernández. 2005. Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (Hamm.) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia* 39:539–544. doi.org/10.3958/059.039.0206
- Insausti, T., and J. Casas. 2008. The functional morphology of color changing in a spider: development of ommochrome pigment granules. *J. Exp. Biol.* 211:780-789. [doi:10.1242/jeb.014043](https://doi.org/10.1242/jeb.014043)
- Llanderal-Cázares, C., R. Nieto-Hernández, I. Almanza-Valenzuela y C. Ortega-Álvarez. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 6:252-255.
- Ramos- Elorduy, J., M. J. Pino, y C. V. H Martínez. 2008. Base de datos de los Insectos Comestibles de México. UNIBIO-IBUNAM 78 p.
- SAGARPA. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Diario oficial de la federación En línea:

http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883475&fecha=12/06/1997

Shamim, G., S. K. Ranjan, D. M. Pandey and R. Ramani. 2014. Biochemistry and biosíntesis of insect pigments. Eur. J. Entomol. 111:149-164. doi:10.14411/eje.2014.021

SRE. 2014. Secretaria de Relaciones Exteriores en Serbia. En línea: <http://embamex.sre.gob.mx/serbia/index.php/sr?start=15>

Van Huis, A., J. Van Itterbeek, H. Klunder, E. Merterns, A. Halloran, G. Muiry and P. Vantomme. 2013. Edible insects- Future Prospects for Food and Feed Security. FAO. Forestry Paper, Roma. 171 p.

Yen, A. L. 2009. Entomophagy and insect conservation: some thoughts for digestion. J. Insect Conserv. 13:667–670. doi : 10.1007/s10841-008-9208-8

CAPÍTULO I

Identificación mediante histología de las principales estructuras morfológicas en *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae)

Resumen El gusano rojo de maguey *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) tiene una gran importancia económica en la industria mezcalera de exportación. Este trabajo describe las principales estructuras morfológicas encontradas mediante histología en larvas de la especie. Se hicieron cortes longitudinales y transversales en parafina, contrastados con eosina-hematoxilina. Se muestran imágenes del integumento, células epidérmicas, tejido graso, músculos, diafragma dorsal, espiráculo, tráquea, corazón y cordón nervioso, entre otras estructuras.

Palabras clave: Gusano rojo del maguey, insectos comestibles, intestino medio, espiráculo, tejido graso, integumento.

CAPÍTULO I

Identification of the main morphological structures in *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) using histology

Abstract The agave red worm, *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae), is economically important for the export-oriented mescal industry. This work describes the main morphological structures found by means of histology in larvae of the species. Longitudinal and transverse sections of paraffin-embedded tissue were made and stained using eosin-hematoxylin. Images of the integument, epidermal cells, fat tissue, muscles, dorsal diaphragm, spiracle, trachea, heart, and nerve chord among others, are shown.

Keywords: Agave red worm, midgut, spiracle, salivary gland, fat body.

1.1. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 2000 especies de insectos se han reconocido como alimento para humanos a nivel global (Jongema, 2015). Hay casi 400 especies de lepidópteros utilizados como alimento o medicina humana, con 86 especies descritas para México en la lista mundial de insectos comestibles (Yen, 2015). La entomofagia representa un medio de vida en algunos países, principalmente de Asia, África y América Latina, y en algunos desarrollados como Japón (Vantomme, 2010).

En México el gusano rojo del maguey *Comadia retenbacheri* es utilizado como parte de la dieta tradicional de los habitantes de la zona centro y sur de México y en la industria del Mezcal. Sus poblaciones son colectadas masivamente de forma silvestre (Miranda-Perkins *et al.* 2013), ya que además de servir de alimento contribuyen con la economía local, como sucede con otros insectos comestibles (DeFoliar, 1999). La abundancia del gusano rojo es cada vez menor debido en gran parte a la pérdida del hospedante, su ciclo de vida largo, la susceptibilidad al ataque de enfermedades y parasitoides (*Acantholespesia texana* y *Lissonota fascipennis*) y el desconocimiento de su biología (Llanderal-Cázares *et al.* 2007; Zetina *et al.* 2009).

Como es común con otros insectos en diferentes partes del mundo, a pesar de su importancia se conoce poco de las especies, lo que dificulta la integración de programas de manejo y mejoramiento (Yen, 2009). La información sobre la morfología del insecto es básica para complementar el conocimiento de la especie.

Los métodos histológicos son utilizados en la literatura desde hace décadas en la entomología para la descripción macroscópica de órganos, hasta el reconocimiento de modificaciones celulares (Villalobos *et al.* 2010; Silva - Zacarin *et al.* 2012), siendo una

herramienta que ayuda a generar información para conocer partes internas, donde los cortes nos brindan la clave de forma, estructura y disposición de estructuras (Eltringham, 1930.). Ejemplos de estudios histológicos podemos encontrar varios como son el estudio morfológico del intestino posterior de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Levy *et al.* 2004), la descripción de la anatomía interna en *Laetilia coccidivora* Comstock (Lepidoptera: Pyralidae) (Torres, 2005), la observación de las glándulas de cera de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Victoriano y Gregório, 2004) aspectos morfológicos del intestino medio en *Anopheles aquasalis* Curry (Díptera: Culicidae) (Ferreira *et al.* 2008) histología de *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) (Villalobos *et al.* 2010) y estudio del tubo digestivo de *Stenomacra marginella* (Herrich-Schaeffer) (Hemiptera: Heteroptera: Largidae) (Nava *et al.* 2007).

Debido a la importancia económica de *C. redtenbacheri* y con la finalidad de profundizar en el conocimiento del insecto, se planteó como objetivo conocer mediante histología las principales estructuras internas.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Colecta de las larvas

Se realizó una colecta en la localidad de Santiago Zacualuca, situado en el Municipio de Teotihuacán, Estado de México, en las coordenadas 19°42'07.8" N y 98°54'58.33" W donde se colectaron de un sistema de producción agrícola 15 plantas de maguey *Agave salmiana* Otto. ex Salm- Dyck. de aproximadamente dos años de edad, con rizoma y presencia de signos de debilidad de acuerdo con Kalisch y Banxedale (2010), quienes señalan que los barrenadores prefieren a su hospedero en este estado. La extracción de los magueyes se realizó con cuidado para evitar daño en el rizoma. Las plantas fueron trasladadas al Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, Estado de México. Posteriormente las larvas se extrajeron de los rizomas con

ayuda de un cuchillo y pinzas entomológicas en el laboratorio de Fisiología de Insectos del Colegio de Postgraduados.

1.2.2. Selección de larvas

Se utilizaron cinco larvas de cuarto y quinto instar, seleccionadas por color, consistencia, movilidad, así como lesiones presentes en el cuerpo, con base en el procedimiento de selección de larvas para iniciar una cría de la especie en confinamiento (Zetina *et al.* 2011; Zetina y Llanderal, 2014).

1.2.3. Histología de Comadia redtenbacheri

Se utilizó la técnica de histología básica de Barbosa *et al.* (2015) con algunas modificaciones.

Las larvas seleccionadas fueron anestesiadas en una cámara de vapores de acetato de etilo y posteriormente se enjuagaron con agua destilada para eliminar la basura superficial.

Los ejemplares se fijaron durante 72 h en Duboscq-Brasil y se lavaron en alcohol al 80%. Con una navaja de afeitar Gillette® se obtuvo un bloque de tres segmentos abdominales de cada larva y se hizo una post fijación de 24 h en Duboscq-Brasil. La deshidratación se realizó con una serie ascendente de alcoholes que va desde 80% hasta el 100% con un aumento del 10% cada vez; al último alcohol se le añadió eritrosina en polvo para que la preparación se tiñera de rojo y fuera visible en el bloque de parafina durante la microtomía.

Posterior a la deshidratación se desalcoholizaron las muestras con dos cambios de benzoato de metilo durante 24 h cada uno. El benzoato se eliminó con dos lavados de benceno puro. Las muestras se pasaron a una solución de benceno-parafina (1:1) a 60 °C, y posteriormente se incluyeron en moldes con parafina líquida pura a la misma temperatura y se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiental. Se hicieron cortes seriados de 7 µm de

espesor en un microtomo de rotación America Optical®. Los cortes fueron montados sobre portaobjeto de vidrio mediante un adhesivo formulado con albúmina de huevo y glicerol por partes iguales, más un cristal de timol como conservador.

Después los montajes fueron secados por un periodo de 72 h a 40 °C, desparafinados mediante inmersión de los portaobjetos en dos cambios de xilol en vasos de Coplin® y enjuagados con etanol 100% para eliminar los residuos de xilol. Después los cortes se hidrataron con una serie descendente de alcoholes hasta llegar a agua y al colorante de hematoxilina. Los portaobjetos se lavaron con agua destilada y posteriormente se colocaron en agua con bicarbonato de sodio al 0.25% y se realizó una deshidratación gradual hasta llegar al alcohol 96% en el que se disolvió eritrosina (eosina) como segundo colorante para contrastar con la hematoxilina.

Los cortes obtenidos se terminaron de deshidratar en dos pasos de alcohol absoluto para posteriormente aclarar con xilol puro. El montaje final se hizo en resina para microscopía “Entellan® de Merk”. La observación de las preparaciones se hizo con un microscopio Carl Zeiss® modelo 68020.

1.2.4. Toma de fotografías

Todos los cortes fueron fotografiados para su descripción. Para la captura de las imágenes se utilizó un microscopio Carl Zeiss® modelo Photomicroscope III. Las imágenes se editaron con el software GIMP 2.8.16.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Descripción de cortes histológicos

En el corte transversal del integumento de *Comadia redtenbacheri* (Figura 1) se distingue la cutícula, y una capa simple de células epiteliales (CE) sobre la membrana basal (MB) que es una capa de tejido conectivo. La cutícula está dividida en dos capas, una gruesa de procutícula (PR) localizada sobre la epidermis y una capa delgada de epicutícula (EP).

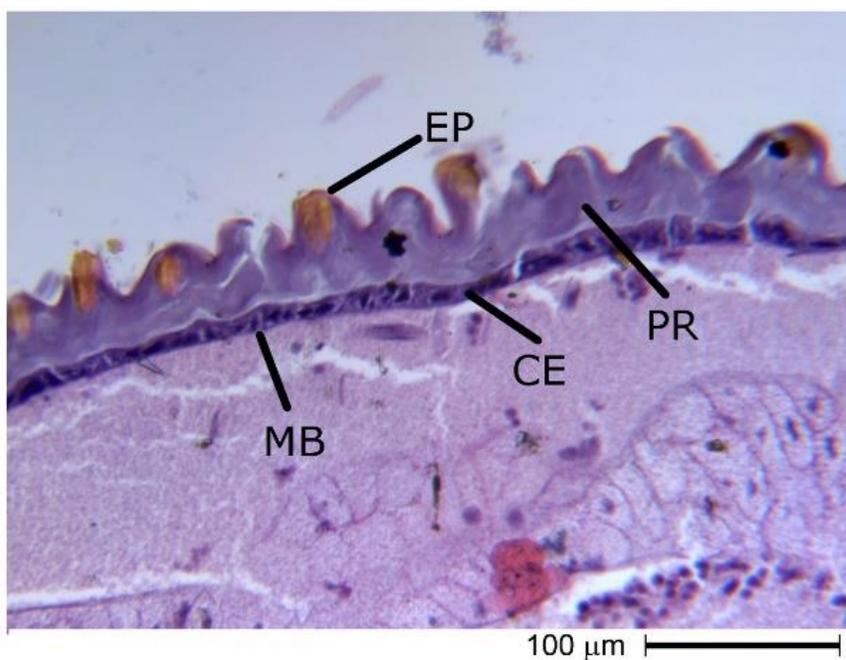


Figura 1. Corte transversal en el integumento de *Comadia redtenbacheri*. CE, células epidérmicas; EP, epicutícula; MB, membrana basal; PR, procutícula.

El integumento es una estructura compleja que se mantiene similar en todos los insectos. Está compuesto de membrana basal, epidermis y cutícula y sirve como un exoesqueleto que es el sitio de inserción de músculos y la primera línea de defensa contra hongos, bacterias, depredadores, parasitoides, agentes químicos y ambientales, incluidos pesticidas (Nation, 2008).

Además de evitar la pérdida de agua en el insecto, actúa como una reserva metabólica, ya que en cada muda sus componentes son reutilizados y también durante períodos de gran actividad metabólica o hambre (Guillot, 2005).

El componente más interno del integumento es la membrana basal, que facilita el transporte de sustancias y está unida a la membrana plasmática por hemidesmosomas y ésta a su vez a la epidermis (Chapman, 2013), que es una capa delgada de células que conservan la forma de epitelio simple inmediatamente debajo de la cutícula (Nation, 2008) y están especializadas para secretar la nueva cutícula en la muda y las diferentes estructuras en la superficie del integumento (Guillot, 2005; Chapman, 2013).

El integumento es una estructura de multicapas dispuesta de afuera hacia dentro por cemento, cera y epicutícula, esta última formada por proteínas, lípidos y lipoproteínas (Guillot, 2005; Chapman, 2013). La procutícula ocupa la mayor parte de la cutícula y en la mayoría de los insectos está dividida en dos zonas, endo y exocutícula, compuestas en su mayor parte por quitina. La endocutícula proporciona fuerza y rigidez con la quitina como elemento fibroso. En la Figura 2 se observa el integumento en corte longitudinal, que además muestra una espina (E) de color ámbar en la superficie de la epicutícula (EP) lo que es común en los insectos, ya que rara vez se encuentra liso, presentando una gran variedad de rugosidades en forma de puntos, hoyos, crestas y diseños esculpidos, que toman la forma de espículas, espinas, pelos y escamas (Snodgrass, 1935; Nation, 2008).

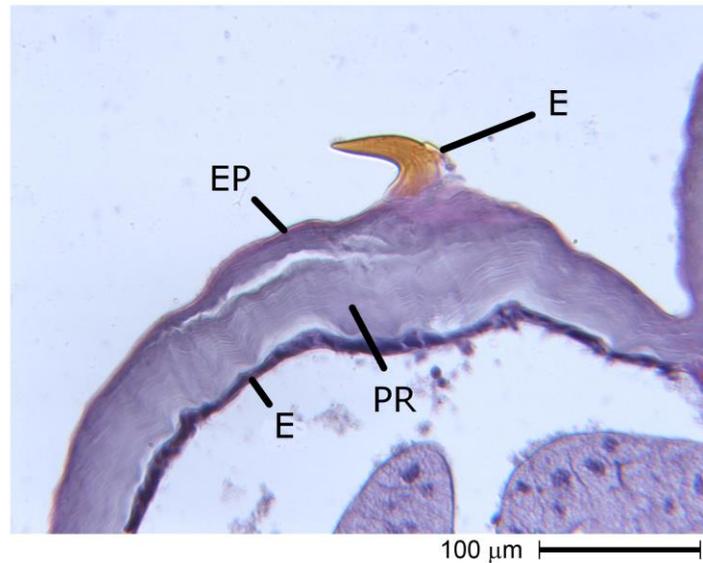


Figura 2. Corte longitudinal en el integumento de *Comadia redtenbacheri*. CE, epidermis; E, espina; EP, epicutícula; PR, procutícula.

La larva de *C. redtenbacheri* presenta dos pares de espiráculos torácicos y ocho pares abdominales. En el corte transversal de un espiráculo de larvas de *C. redtenbacheri* (Figura 3), se observa la abertura espiracular (AE) localizada en posición lateral en el abdomen, con bordes esclerosados y prolongaciones del integumento en forma de ganchos. Las tráqueas (TR) están reforzadas por tenidios marcados. La cámara atrial (A), formada por una cavidad amplia, con líneas de filamentos (F) en sus paredes, sirve para prevenir la entrada de microorganismos y polvo, según Chapman (2013).

La tasa metabólica en larvas de Lepidoptera es relativamente alta debido al crecimiento y desarrollo rápido, por lo que requieren de un sistema respiratorio que pueda suplir el oxígeno de manera eficiente (Hetz, 2007). Una función de los espiráculos es que al cerrarse reducen la pérdida de agua (Nation, 2008). Un espiráculo típico consta de una cámara o atrio, con un

mecanismo de apertura y cierre, o válvula, que se proyecta externamente o en el extremo interior del atrio. Cada espiráculo puede estar fijado en una placa de cutícula esclerosada (Gullan, 2010).

La figura 4 muestra la estructura de una tráquea con la membrana basal (MB) y sobre ésta una capa de células epidérmicas (CE); se nota el reforzamiento circular de las tenidias (TE). Alrededor se observan estratos de células de tejido graso (CTG) simples, además de la presencia de músculo (M).

El sistema traqueal es muy eficiente para la difusión de gases y en la mayoría de los insectos las tráqueas son tubos largos que corren hacia adentro del espiráculo con interconexiones longitudinales y transversales que se ramifican a medida que se distribuyen en los tejidos. Las tráqueas están formadas por invaginaciones del ectodermo cubiertas por la íntima cuticular que se separa del integumento en cada muda y que gracias a los tenidios pueden distenderse y presionarse sin llegar a colapsar (Lehmann, 2001; Nation, 2008; Chapman 2013).

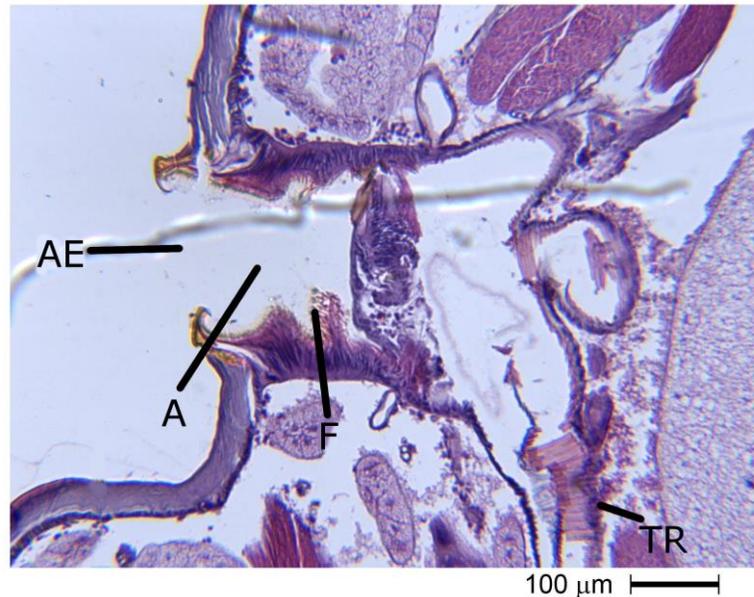


Figura 3. Corte transversal en el espiráculo de *Comadia redtenbacheri*. A, atrio; AE, apertura espiracular; C, cutícula; F, filamentos; TR, tráquea.



Figura 4. Corte transversal en la tráquea de *Comadia redtenbacheri*. CE, células epidérmicas; CTG, células de tejido graso; L, lumen; M, músculos; MB, membrana basal; TE, tenidios.

En la imagen del músculo en corte transversal (Figura 5) se observa el punto de inserción del músculo esquelético (ME) en el integumento, una capa delgada de células epidérmicas (CE) con una tonalidad morada y un grupo de músculos viscerales (MV).

Los insectos presentan dos tipos de músculos, los esqueléticos y los viscerales. Los primeros mueven una parte del cuerpo en relación con otra y están fijos por ambos extremos del integumento y tienen un punto de inserción capaz de romperse durante la muda (Gillot, 2005). La unión de una célula muscular a la cutícula se debe a un gran número de microtúbulos paralelos o tonofibrillas que se originan en la unión con las células epidérmicas, que son muy resistentes al fluido de muda y permiten al músculo permanecer unido al exoesqueleto después de la apólisis y la secreción de nueva cutícula. Los músculos esqueléticos están organizados por

pares antagonistas, un par flexor que permite el movimiento de un apéndice y un par de extensores que lo mantienen rígido (Nation, 2008).

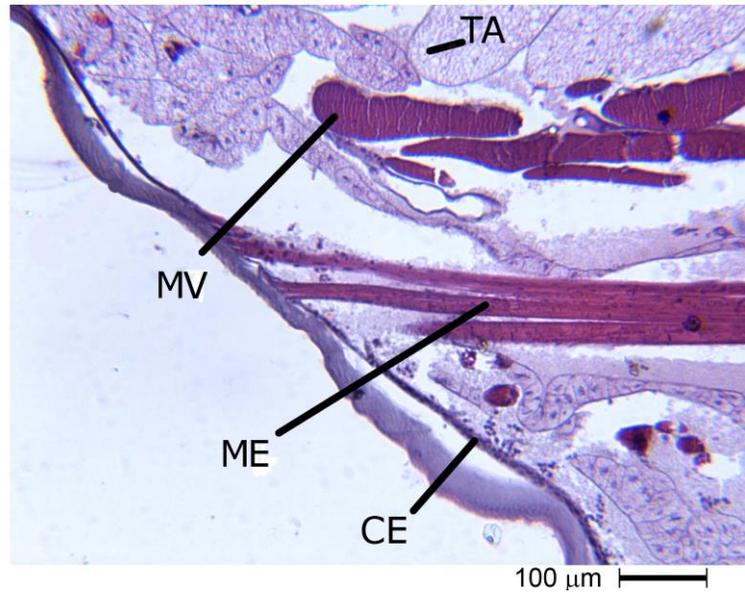


Figura 5. Corte transversal en el músculo de *Comadia redtenbacheri*. CE, células epidérmicas; y ME, músculos esqueléticos; MV, músculo visceral; TA, tejido adiposo.

En la imagen del músculo esquelético (ME) en corte longitudinal de *C. redtenbacheri* se observa el acomodo de las fibras musculares además de segmentos de los músculos viscerales (MV) (Figura 6).

Los músculos viscerales envuelven a los órganos internos, están unidos por desmosomas y tienen una apariencia diferente a la de los músculos estriados por la alineación de los filamentos. Las fibras de estos músculos son filamentos de miosina pequeños y cortos rodeados de 10 a 12 filamentos de actina, las bandas Z y H son irregulares y su longitud es de 7-8 micrómetros (Nation, 2008).

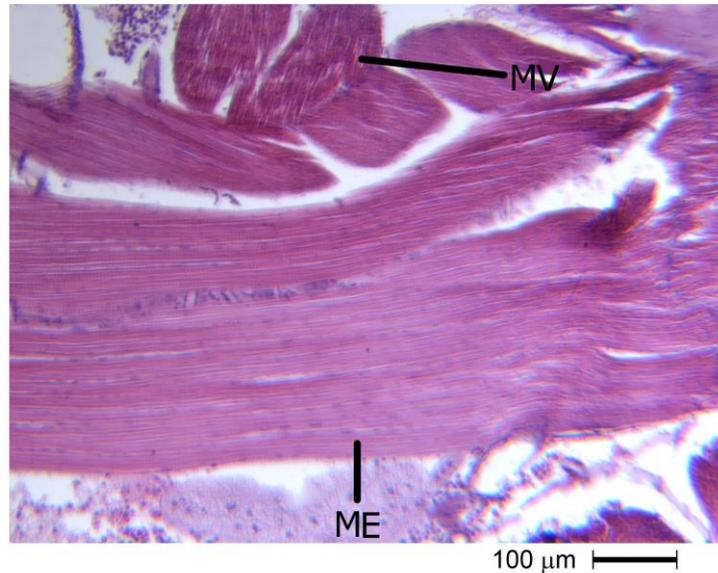


Figura 6. Corte longitudinal en el músculo esquelético de *Comadia redtenbacheri*. ME, músculos esqueléticos; MV, músculos viscerales.

En el corte transversal se distingue el tejido adiposo (Figura 7) el cual se muestra extendido por todo el hemocelo, formando un agregado de células blanquecinas, como lo menciona Snodgrass (1935) que están dispuestas en capas. También puede aparecer como pequeñas cuerdas suspendidas, llenando las cavidades de la cabeza, el tórax y el abdomen, ya que puede funcionar como tejido conectivo entre los órganos (Chapman, 2013).

El tejido graso es uno de los más importantes para procesos de mantenimiento y reproducción (Guillot, 2010); la grasa es un tejido de relleno que está distribuido a través del cuerpo, usualmente presente en dos capas: perivisceral alrededor de órganos y parietal adyacente al integumento. El tejido está formado por células llamadas trofocitos o adipocitos (Chapman, 2013).

De acuerdo con Chapman (2013) y Gislaine (2010) el cuerpo graso es el principal órgano involucrado en el metabolismo de los insectos, ya que se encuentra en contacto con la hemolinfa,

por lo que facilita el intercambio de metabolitos; se le adjudican también funciones de almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas que pueden ser enviados a la hemolinfa como precursores de otras sustancias, además de tener funciones endócrinas y de inmunidad, de manera que monitorea y responde a las necesidades fisiológicas del insecto en sus diferentes estados de desarrollo y bajo diferentes condiciones ambientales, por lo que su cantidad puede variar de acuerdo con el estado fisiológico del individuo.

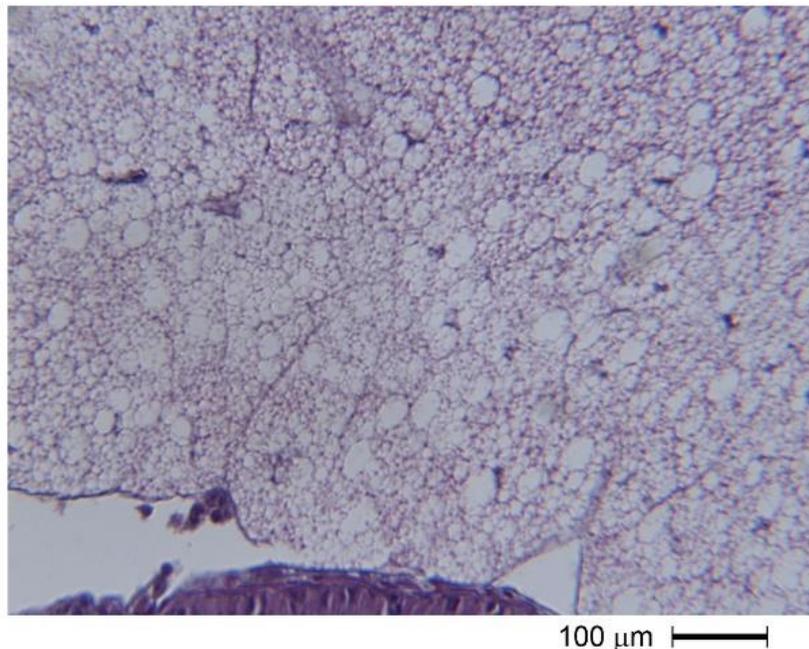


Figura 7. Corte transversal en el abdomen de *Comadia redtenbacheri* que muestra el tejido adiposo.

En el corte transversal del abdomen de *C. redtenbacheri* (Figura 8) se pudo diferenciar el vaso dorsal (VD), las células suspensorias (CS) que están unidas a un estrato de células epidérmicas (CE), el diafragma dorsal (DD) que separa al seno pericardial (SPC) del perivisceral (SPV) y que junto con el diafragma ventral ocasiona cambios de presión que facilitan la circulación de la hemolinfa. Además se notan lóbulos definidos de tejido adiposo (TG).

El sistema circulatorio está constituido por el vaso dorsal que presenta dos regiones, la anterior o aorta que funciona como vaso conductor y es un tubo que comienza en el tórax y termina en la cabeza. La parte posterior o corazón es el órgano pulsátil y en la mayoría de los insectos se encuentra en el abdomen (Snodgrass, 1935). Las paredes del vaso dorsal son contráctiles y usualmente constan de dos capas de células musculares con un arreglo en círculo o espiral (Snodgrass, 1935; Guillot, 2005; Chapman, 2013).

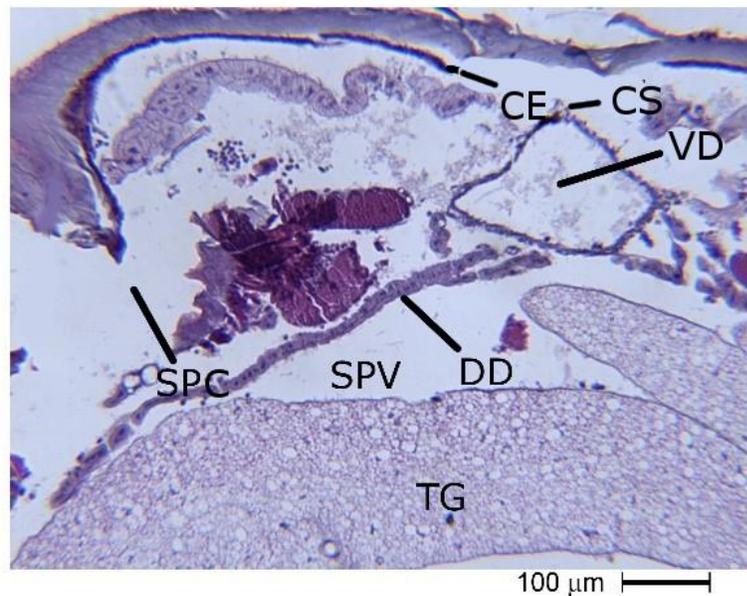


Figura 8. Corte longitudinal en el vaso dorsal de *Comadia redtenbacheri*. CE, células epidérmicas; CS, células suspensorias; DD, diafragma dorsal; SPC, seno pericardial; SPV, seno perivisceral; TG, tejido graso; VD, vaso dorsal.

En la figura 9 se distinguen fibras nerviosas o axones (AX) y un ganglio (G) del cordón nervioso ventral (CNV) a nivel del abdomen en corte transversal, rodeado de tejido graso (TG). En la parte inferior se distingue la cutícula (C).

En los lepidópteros el cordón nervioso está unido a la superficie del diafragma ventral por tejido conectivo. Los ganglios forman parte del sistema nervioso central y se localizan en cada segmento. En la parte central llamada neurópilo se llevan a cabo las sinapsis de fibras procedentes de diversos órganos sensoriales (Chapman, 2013). El cordón nervioso central inicia en el ganglio subesofágico, le siguen tres ganglios torácicos y hasta ocho abdominales. (Nation, 2008). Los ganglios abdominales son más pequeños y dan origen a sólo dos o tres nervios principales a cada lado (Chapman, 2013).

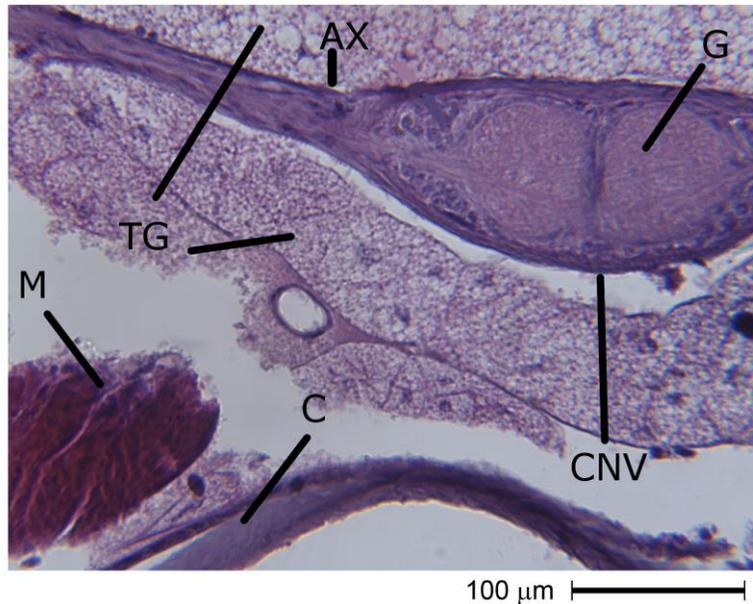


Figura 9. Corte transversal en el cordón nervioso de *Comadia redtenbacheri*. AX, axones; C, cutícula; CNV, cordón nervioso ventral; G, ganglio; M, músculo; TG, tejido graso.

La figura 10 presenta el corte transversal de una glándula salival de la larva de *C. redtenbacheri*, rodeada de tejido adiposo (TA).

Las glándulas salivales varían en tamaño y disposición a partir de tubos alargados simples a complejos y ramificados, o estructuras de lóbulos glandulares complicadas. En Lepidoptera producen seda, mientras que las glándulas mandibulares segregan saliva (Chapman, 2013). Estructuralmente son células de origen ectodérmico, con un gran núcleo irregular o ramificado

que probablemente sea la fuente de la sustancia que segregan, que en el caso de *C. redtenbacheri* es seda que sirve de protección de los diversos factores ambientales y es secretada por las larvas inmediatamente después de la eclosión y a través de todo el estado larvario, sobre todo cuando están fuera del rizoma de los agaves hospederos y durante la formación del capullo.

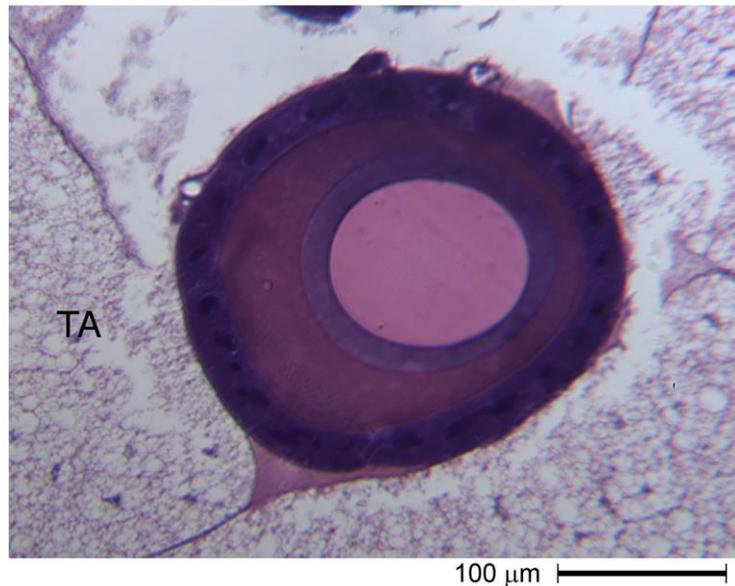


Figura 10. Corte transversal en la glándula salival de *Comadia redtenbacheri*. TA; tejido adiposo.

En el corte transversal de la figura 11 se observan, de afuera hacia el centro las estructuras principales del intestino medio, el tejido adiposo (TA) tráqueas (T), paquetes musculares longitudinales (ML), membrana basal (MB) que delimita la zona muscular y epitelio. Arriba de la membrana basal se encuentra un estrato de células no diferenciadas (CND), a continuación la capa de células digestivas con núcleos de color morado intenso y en la parte central células en diferenciación (CD). En la parte más interna se localizan las microvellosidades o microvilli (MV) y el lumen (L).

El intestino es un tubo continuo que va desde la boca hasta el ano, con invaginaciones y regiones diferenciadas. Contiene una pared especializada en la secreción de enzimas digestivas, con la función de absorber, digerir y transportar a la cavidad general del cuerpo los nutrientes para su posterior distribución. La mayoría de las células son columnares, con una membrana sobre el lado luminoso y un cojinete de microvellosidades que puede incrementar la superficie del área de las células llamadas enterocitos (Chapman, 2013).

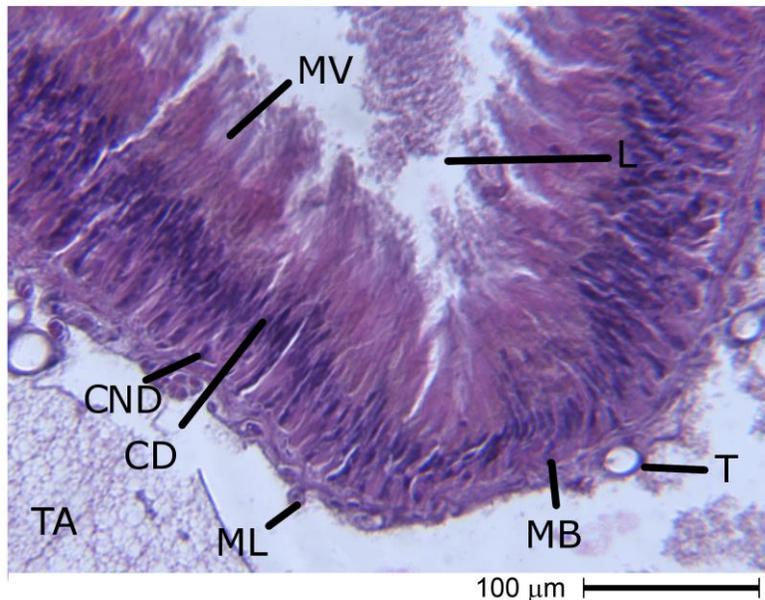


Figura 11. Corte transversal de intestino medio de *Comadia redtenbacheri*. CD, célula diferenciada; CND, célula no diferenciada; L, lumen; MB, membrana basal; ML, músculos longitudinales; MV, micro vellosidades; T, tráqueas; TA, tejido adiposo.

Conclusiones

La información obtenida de los cortes histológicos permitió conocer las principales estructuras de la larva de *Comadia redtenbacheri* que concuerdan con la anatomía general de los insectos con características histológicas similares. El conocimiento generado en este trabajo es el primero para este insecto.

Agradecimientos

Esta investigación se llevó a cabo con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), como parte del proyecto 166898 “Biología de *Comadia redtenbacheri* Hamm.”

1.3. Literatura Citada

- Barbosa, P., S. L. Berry and C. S. Kary. 2015. *Insect Histology Practical Laboratory Techniques*. Wiley Blackwell. USA.
- Chapman, R. F. 2013. *The Insects: Structure and Function*. S. J. Simpson and A. E Douglas (eds). Cambridge University Press. 5th ed. Cambridge, U. K.
- DeFoliar, G. R. 1999. Insect as food; why the western attitude is important. *Annu. Rev. Entomol.* 44:21-50. DOI:10.1146/annurev.ento.44.1.21
- Eltringham, H. 1930. *Histological and Illustrative Methods for Entomologists*. Clarendon Press. Oxford. UK.
- Ferreira, M. A. P., J. B. Lima, R. M. Rocha and P. F. P. Pimienta. 2008. Morphological Aspect of the Midgut of *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932) *Insecta: Diptera*. *Int. J. Morphol.* 26:577-582.
- Gislaine, C. R., B. O. Correa and M. Camargo-Mathias. 2010. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron.* 41:395:401. [doi:10.1016/j.micron.2009.12.007](https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.12.007)
- Guillott, C. 2005. *Entomology*. 3th ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Gullan, P. J. and P. Cranston. 2010. *The insects. An Outline of Entomology*. 4th ed. Wiley-Blackwell. Oxford, UK.

- Hetz, S. K. 2007. The role of the spiracles in gas exchange during development of *Samia cynthia* (Lepidoptera, Saturniidae). [Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.](#) 148: 743-754. [doi:10.1016/j.cbpa.2007.08.017](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.08.017)
- Jongema, Y. 2015. World List of edible insect. En línea: <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Chair-groups/Plant-Sciences/Laboratory-of-Entomology/Edible-insects/Worldwide-species-list.htm>.
- Kalisch, J. A. and F. P. Baxendale. 2010. Insects borers of shade trees and woody ornamentals. EC1518. Univ. Of Nebr., Coop. Extension. 8p
- Llanderal-Cázares, C., R. Nieto-Hernández, I. Almanza-Valenzuela y C. Ortega-Álvarez. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae), *Entomología Mexicana* 6:252-255.
- Lehmann, F. O. 2001. Matching spiracle opening to metabolic need during flight in *Drosophila*. *Science* 294:1926-1929. [doi: 10.1126/science.1064821].
- Levi, S. M., A. M. F. Falleiros, F. Moscardi, E. A. Gregotio and L. A. Toledo. 2004. Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). [Neotrop. Entomol.](#) 33:427-431. dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000400005
- Miranda-Perkins, K., C. Llanderal-Cázares, H. M. De Los Santos, L. Portillo-Martínez and A. L. Viguera-Guzmán. 2013. *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) pupal development in the laboratory. *Florida Entomologist*. 96:1424-1433.
- Nation, J. L. 2008. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press. USA. [doi:http://dx.doi.org/10.1653/024.096.0422](https://doi.org/10.1653/024.096.0422)

- Nava-Gervasio, S. M., E. Ortiz -Ordoñez y E. A. Urías-Galicia. 2007. Estudio anatómico-histológico del sistema digestivo de *Stenomacra marginella* (Herrich-Schaeffer, 1850) (Hemiptera: Heteroptera: Largidae) *Acta Zool. Mexicana*. 23:49-57.
- Silva-Zacarin, E. C. M., M. P. Chauzant, S. Zeggane, P. Drajnudel, F. Schurr, J. P. Faucon, O. Malaspina and J. A. Engler. 2012. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larvae tissues: application in histopathology of honey bee. *Science and Technology* 2:698-703
- Torres, C. K. 2005. Histología del tubo digestivo de *Laetillia coccidiura* (Lepidoptera: Pyralidae). *Facultad de Ciencia y Tecnología*. 4:32-40.
- Vantomme, P. 2010. Los insectos forestales comestibles, una fuente de proteína que suele pasar por alto. *Unasyuva* 61:19-21.
- Victoriano, E. and E. A. Gregório. 2004. Ultrastructure of the Lyonet's glands in larvae of *Diatraeasaccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). [J. Insect Sci.](#) 28:165-169. [10.1673/031.012.12301](#)
- Villalobos-M, A., J. C. Agudelo y D. G. Arrieta. 2010. Histología de *Apis Mellifera* Linnaeus, 1755 (Hymenoptera) como aporte entomológico. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat.* 14:201-214.
- YEN, A. L. 2009. Entomophagy and insect conservation: some thoughts for digestion. [J. Insect Conserv.](#) 13:667–670. doi: 10.1007/s10841-008-9208-8.
- Yen, A. L. 2015. Conservation of Lepidoptera used as human food and medicine. [J. Insect Sci.](#) 12:102-108. doi: 10.1016/j.cois.2015.11.003.

- Zetina, D. H., C. Llanderal-Cázares, E. Ruíz Cancino y A. L. Khalaim. 2009. Registro para México de *Lissonota fascipennis* Townes (Hymenoptera: Ichneumonidae), como parasitoide del gusano rojo del maguey. *Acta Zool. Mexicana* (n.s.) 25:655-657
- Zetina, D. H., C. Llanderal-Cázares and H. M. De Los Santos-Posadas. 2011. Logistic regression analysis to predict parasitism in larvae of *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). *Entomotropica* 26:1–6. doi: /10.1653/024.096.0422
- Zetina, D. H., C. Llanderal and H. Huerta. 2012. *Acantholespesia texana*: A new report for Mexico, as a parasitoid of *Comadia redtenbacheri* Hamm. *Southwest. Entomol.* 37:235-237. doi: <http://dx.doi.org/10.3958/059.037.0217>
- Zetina, D. H. and C. Llanderal. 2014. Signs and symptoms in *Comadia redtenbacheri* Hamm. (Lepidoptera: Cossidae) larvae affected by parasitoids. *Southwest. Entomol.* 39: 285–290. doi: 10.3958/059.039.0206

CAPÍTULO II

Conservación del Gusano Rojo *Comadia redtenbacheri* para Mezcal Embotellado

Resumen. *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) es un insecto que representa un alto valor comercial para la industria mezcalera. La larva desarrollada tiene una coloración roja intensa que se pierde al ser incluida en la botella de mezcal, lo que demerita su aspecto estético, calidad y por lo tanto la aceptación del producto. Con objeto de preservar al insecto, se evaluaron cinco tratamientos: mezcal (38°), alcohol 70%, serie ascendente de alcoholes (40%,60%,80% y 96%), vinagre blanco-alcohol 40% y congelación. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con vinagre blanco-alcohol 40% mantiene una mayor consistencia de las larvas. La técnica de congelación fue más eficiente para la conservación de color.

Palabras clave: agave, preservación, insecto comestible.

CAPÍTULO II

Conservation of red worm *Comadia redtenbacheri* of mescal

Abstract. *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) is an insect with a high commercial value for the mescal industry. The coloration of the developed larvae is intense red, but the colour is lost inside mescal bottles, which diminishes their aesthetic appearance and quality, and the acceptance of the product. With the objective of preserving the insect, a technique with five treatments was evaluated. The treatments were the following: mescal (38°), 70% alcohol, solutions of ascending concentrations of alcohol (40%, 60%, 80% and 96%), white vinegar - 40% alcohol, and freezing. The results show that the treatment with white vinegar - 40% alcohol preserved better the consistency of the larvae; freezing was more efficient to preserve the colour.

Key words: edible insect, preservation,

2.1. Introducción

Comadia redtenbacheri (Hammerschmidt), conocido como gusano rojo del maguey, es utilizado como alimento en zonas rurales de varios estados del centro de México y se comercializa a precios elevados en las zonas urbanas para la industria de restaurantes y licores (Hernández-Livera *et al.* 2005). La larva tiene siete estadios larvales; los primeros no presentan coloración, pero a medida que crecen adquieren un color rojo que se intensifica en el último instar (Hernández-Livera *et al.* 2005; Castro-Torres y Llanderal-Cázares, 2015). El insecto tiene gran demanda en la industria mezcalera de exportación; por ejemplo el mercado chino solicita al menos 20 gusanos por botella (Encabo, 2000). Sin embargo, las larvas incluidas en las botellas pierden su coloración natural al ser expuestas a concentraciones de alcohol permitidas en el mezcal, que van de 36° a 55° Gay-Lussac (SAGARPA, 1994) sin un procedimiento previo de fijación, lo que demerita su aspecto físico, además de que en ocasiones hay degradación de los tejidos que al quedar como residuos en el fondo de las botellas desmerecen la calidad y aceptación del producto, lo que causa restricciones en diversos países para su importación (Anónimo, 2011).

El mezcal, un destilado 100% de agave, se extrae de especies autorizadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Naturales, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 1994). Es producido artesanalmente en México, cuenta con denominación de origen y se ha posicionado como la bebida alcohólica con mayor crecimiento en el 2015 para el mercado nacional e internacional, con un aumento de 79% en su envasado de acuerdo con el Consejo Regulador del Mezcal (CRM, 2015).

Los países que más consumen esta bebida son Estados Unidos, España, Inglaterra, Italia, Taiwán y Turquía, entre otros. Los tipos de mezcal más demandados en el extranjero son el joven abocado, joven, reposado y reposado con gusano. En México esta actividad genera alrededor de 30,000 empleos, de los cuales 5,270 son directos. La producción es de aproximadamente 4.8 millones de litros y las ventas han llegado a ser de 97 millones de dólares. De acuerdo con la Secretaría de Relaciones Exteriores (SRE), el estado de Oaxaca es el principal exportador al generar el 54.4% de la producción total nacional, el segundo lugar lo ocupa Zacatecas con 45.3%, mientras que Durango y Guerrero producen el 0.3% restante (SER, 2014).

Una limitante importante para su exportación es la ausencia de protocolos y normas que aseguren la inocuidad del gusano rojo en la bebida, lo que ocasiona pérdidas económicas para la industria mezcalera y aunado a la falta de metodologías específicas para su conservación, ha provocado que su aspecto natural no se conserve en el producto. El objetivo de este estudio es proponer una metodología para la preservación de características específicas como consistencia y color en larvas de *C. redtenbacheri* incluidas en mezcal comercial.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo las larvas se adquirieron el 12 de noviembre del 2014 en la localidad de San Juan Tianguistongo, municipio de Hueyoptla, situada a 2500 msnm en el Estado de México y fueron ubicadas en el laboratorio de Fisiología de Insectos del Colegio de Posgraduados, campus Montecillo. Para este experimento se requirió un total de 360 ejemplares de sexto y séptimo instar, que son los más utilizados por los vendedores para comercializarlos en alimentos y bebidas, quienes se guían por la intensidad del color. Cada larva se midió y fue seleccionada por su color, consistencia, movilidad e instar, así como lesiones presentes en el

cuerpo, con base en el procedimiento establecido por Zetina *et al.* (2011) y Zetina y Llanderal (2014).

El experimento constó de cinco tratamientos: 1) Mezcal comercial solo, 2) Alcohol 70%, 3) Serie ascendente de alcoholes a concentraciones de 40%, 60%, 80% y 96% con cambios cada siete días, 4) Vinagre blanco-alcohol 40% por un periodo de 24 h en vinagre, paso a alcohol 40% durante una semana e inmersión en mezcal, 5) Congelación por almacenamiento de las larvas en bolsas de plástico Ziploc® de 16.5 x 14.9 cm, que se mantuvieron en el congelador de un refrigerador Mabe® modelo RYMO4Y07B. Para cada tratamiento se estableció una larva testigo. Todos los tratamientos se colocaron en frascos de vidrio herméticos de 100 mL. El alcohol utilizado fue de caña 96%.

Se distribuyeron 36 larvas por tratamiento y los testigos correspondientes a cada uno de ellos, divididos en tres grupos de doce individuos, las cuales fueron sacrificadas mediante inmersión en agua a 80 °C por 5 min y posteriormente colocadas en los frascos correspondientes al tratamiento previamente preparado y rotulado para su almacenamiento. Las variables de color y consistencia de las larvas en cada uno de los tratamientos se evaluaron mensualmente durante un año.

Para comparación se utilizaron larvas confinadas en botellas de mezcal de cuatro marcas comerciales (A, B, C y D) de diferente costo. Los individuos se retiraron de cada una de las botellas y se colocaron en tubos de vidrio transparente de 10 mL con tapa de baquelita, llenos a su capacidad total con el mismo mezcal del que fueron obtenidas.

La integridad de los tejidos de las larvas se observó mediante la disección de un testigo y un ejemplar de cada tratamiento. A cada larva se le realizó un corte longitudinal en posición dorsal para observar las principales estructuras morfológicas de *C. redtenbacheri*. Se utilizó la

misma metodología para las larvas de las botellas de mezcal comercial. Todas las larvas fueron fotografiadas para su comparación con una larva sana de último instar considerada como testigo absoluto, que fue sacrificada mediante la inmersión en alcohol 70% por un periodo de 30 min.

El experimento de conservación de color se realizó el día 30 de julio del 2015 con cuatro larvas del tratamiento con vinagre blanco-alcohol 40%. El experimento constó de cuatro tratamientos: 1) agua destilada más pigmento natural A, 2) agua destilada más pigmento natural B, 3) agua destilada más pigmento natural C, 4) agua destilada más pigmento natural D. Todos los tratamientos fueron sometidos bajo las mismas condiciones, tiempo de emulsión y forma de inserción. El agua utilizada fue Nalgene®.

Las larvas fueron retiradas del medio alcohólico, y el exceso se eliminó con un papel absorbente; posteriormente se le agregó el pigmento con ayuda de una jeringa para insulina BD Ultra-Fine® por la parte anterior y en la parte posterior de la larva de una manera subdérmica. El procedimiento se realizó a cada una de las larvas. Al finalizar se incluyeron en frascos de vidrio transparente con tapadera de baquelita negra, con alcohol 40% Nalgene®; los frascos fueron rotulados y almacenados durante tres semanas, registrando los cambios ocurridos cada semana.

Los parámetros registrados fueron los siguientes: coloración obtenida, homogeneidad del color en el cuerpo del insecto y pérdida del pigmento en el solvente; se registraron a las 24 h, y a los 7 y 21 días. Posteriormente fueron colocados en mezcal solo.

Se realizó un análisis de color a las larvas de los tratamientos de mezcal comercial solo, alcohol 70%, serie ascendente de alcoholes, vinagre blanco-alcohol 40%, y congelación, con base en el modelo de color rojo, verde o azul por sus siglas en inglés (RGB), para lo cual se seleccionaron 10 larvas de cada tratamiento y se registró el RGB de cada una, para

posteriormente obtener el promedio. El análisis RGB se realizó sobre las imágenes digitales con la herramienta de selección de color (color picker) del programa GIMP 2.8.14, con un radio de 25 píxeles por cada medición. La lectura de los valores RGB se hizo en la paleta del mezclador de colores de GIMP, de donde se obtuvieron también los códigos hexadecimales que representaban a los colores promedio, para su representación visual. El resultado de cada código fue comparado con el testigo total.

Para la captura de las imágenes se utilizó un microscopio Carl Zeiss® modelo Tessoar. Las imágenes se editaron con el software GIMP 2.8.16.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Observación de las características generales de la parte externa de los diferentes tratamientos y larvas incluidas en botellas de mezcal.

Las larvas sometidas a los diferentes tratamientos de mezcal solo, alcohol 70% y la serie ascendente de alcoholes (Figura 14, a-c), que fueron previamente fijadas por inmersión en agua a 80 °C, presentaron pérdida de pigmentación de la cutícula en un lapso de dos a tres meses, que pudo deberse a que el sistema de alcoholes jugó un papel importante por la naturaleza química del pigmento en larvas, que podría tener una polaridad semejante al disolvente, siendo este un factor para la decoloración. De acuerdo con Verdín *et al.* (2013) el alcohol fija los tejidos y disuelve los lípidos, y aunque en el caso de *C. redtebancheri* no se conoce la naturaleza del pigmento, numerosos colorantes naturales son solubles en alcohol y cuando éste penetra en los tejidos causa contracción muscular y endurecimiento, por lo que es un método utilizado para la preservación de insectos (Gullan, 2010; Barbosa *et al.* 2015). La consistencia de las larvas en el

tratamiento con alcohol 70%, se conservó ligeramente mejor que las de los tratamientos de mezcal solo y la serie ascendente de alcoholes.

En el tratamiento con vinagre blanco (Figura 13, d) los individuos perdieron la pigmentación roja típica de la larva (Figura 12) pero conservaron una mayor turgencia que los de cualquier otro tratamiento. De acuerdo con diversos autores (Peterson, 1964; Stehr, 1987; Uría y Mora, 1996) el ácido acético detiene la acción enzimática y por lo tanto evita el oscurecimiento, ayuda a mantener la flexibilidad, tiene un potencial de oxidación moderado y un efecto preservador de las estructuras histológicas.



Figura 12. Coloración típica de larvas desarrolladas de *C. redtenbacheri*, en restos de rizoma de agave hospedero.

En el tratamiento de congelación (Figura 13, e) la presencia de pigmento fue evidente en la epidermis con una tonalidad rosada. Según Stehr (1987) la congelación permite conservar el color por un tiempo prolongado. Sin embargo, cuando los ejemplares se pasaron al mezcal se

observó pérdida de consistencia de los tejidos. De acuerdo con He *et al.* (2015) la congelación (Figura 13, e) es un método comúnmente utilizado para la fijación de tejidos y para mantener frescos los alimentos, ya que las bajas temperaturas retrasan su deterioro y extienden su vida útil, aunque tiene un impacto negativo en la calidad del material, ya que durante el almacenamiento la cristalización provoca cambios en la microestructura del tejido muscular.

El efecto en los testigos (Figuras 13, f-i) al finalizar el experimento, fue un obscurecimiento de la cutícula, con excepción del tratamiento por congelación (Figura 13, e) en el que la cutícula se transparentó y pudo observarse el daño a los tejidos y órganos internos.

La pigmentación de los individuos que no fueron sometidos al proceso previo de fijación con calor, hace suponer que éste era necesario para detener o inhibir la degradación de éstos; sobre el particular, Stehr (1987) menciona que la técnica de inmersión de diferentes organismos en agua caliente, puede detener la acción enzimática al tiempo que se sacrifica a los ejemplares y se les limpia de residuos de otros materiales.

Por lo que respecta a los ejemplares obtenidos en botellas comerciales, la larva incluida en el mezcal A (Figura 13, k), que fue el de mayor precio, mostró un color amarillento en la totalidad del cuerpo y consistencia aceptable aunque ligeramente rígida, lo que sugiere que el insecto fue sometido a calor excesivo antes de ser embotellado.

La larva obtenida en el mezcal B (Figura 13, l), de precio intermedio, mostró deformación muy avanzada, al grado de que el cuerpo estaba colapsado, lo que podría indicar que la preservación se hizo por congelación y la inclusión en el mezcal pudo haber acelerado el proceso de deterioro. Se sabe que la congelación provoca una reducción de la actividad enzimática debido a la formación de cristales de hielo que modifican la disponibilidad del agua y evitan que se favorezcan reacciones de deterioro (Gómez-Sánchez, 2007), pero se provoca una

pérdida de peso debido a la sublimación del hielo y al descongelar el material se favorece el crecimiento de microorganismos (Campañone *et al.* 2002), que en este caso se observaron sobre el integumento de la larva. El ejemplar además presentó una coloración oscura, que posiblemente se deba a la degradación de los productos involucrados en la producción de melanina (Hackman *et al.* 1970).

El ejemplar del mezcal C (Figura 14, m) presentó los síntomas de deshidratación y colapso, además de una coloración amarillenta.

La larva del mezcal D (Figura 13, n) mostró un obscurecimiento en el eje dorso ventral del metatórax y en los dos primeros segmentos abdominales, mientras que en varios de ellos presentó una queratinización circular localizada sobre los espiráculos. Durante el manejo de colecta y compra venta de las poblaciones, las larvas sufren diferentes tipos de lesiones debidas a daños mecánicos en cualquier parte del cuerpo, que tienen la apariencia de manchas oscuras e irregulares que pueden ser causadas por fricción, mordeduras u hongos (Zetina y Llanderal, 2014). En este caso las lesiones observadas sugieren una falta de selección previa a la inclusión en las botellas.

Lo observado en los testigos de cada tratamiento fue similar al encontrado en las larvas de las botellas comerciales, con obscurecimiento de la cutícula que va desde tonalidades cafés hasta negras y presencia de manchas en algunos casos. Además de la deformación de los tejidos, que podría deberse a que las larvas estuvieron sometidas a congelación, al pasarlas al mezcal se colapsaron, adicionalmente otras reacciones que pudieran favorecer la invasión por microorganismos. Es importante mencionar que los ejemplares testigo fueron seleccionados en cuanto a sanidad, por lo que no presentaron lesiones por parasitismo.

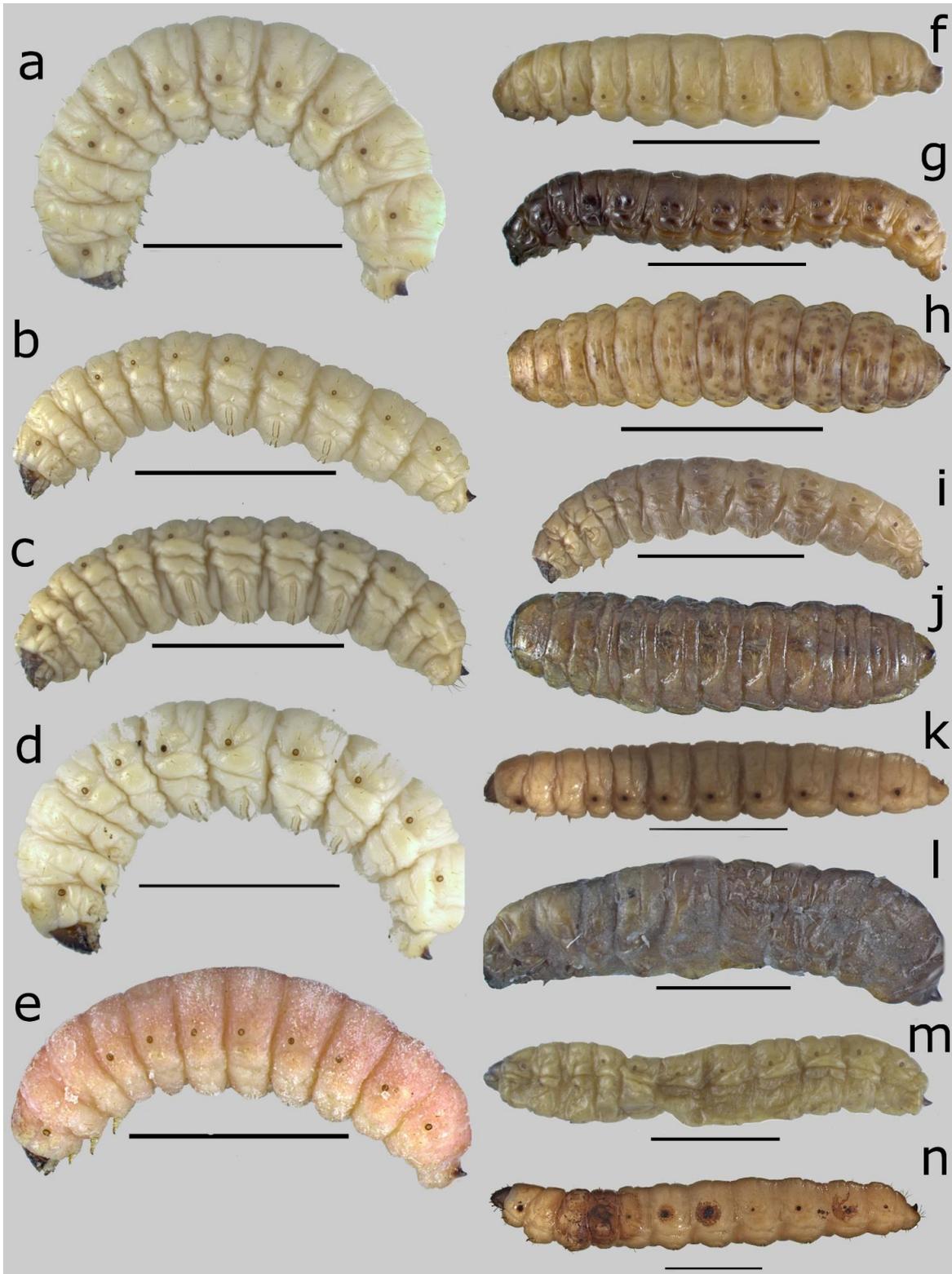


Figura 13. Larvas de *C. redtenbacheri*. (a- e) Larvas de los tratamientos. (f-j) Testigos de los tratamientos. (k-n) Larvas incluidas en botellas de mezcales comerciales. Escala: 1 cm.

2.3.2. Disecciones de las larvas de los diversos tratamientos y larvas incluidas en botellas de mezcal comercial

En los individuos disecados de los tratamientos para mezcal solo (Figura 15, a) y serie ascendentes de alcoholes (Figura 15, c), se observaron resultados semejantes en cuanto a la poca cantidad de tejido graso distribuido en el hemocelo, así como tracto digestivo y tubos de Malpighi de color blanco translúcido.

En la larva del tratamiento con alcohol 70% (Figura 15, b) también hubo poco tejido graso de color blanco, concentrado alrededor del intestino de color ámbar claro, que permitía observar los músculos transversales y longitudinales de los segmentos del cuerpo, y tubos de Malpighi bien diferenciados con una coloración más clara que la del intestino. En el tratamiento vinagre- alcohol 40% (Figura 15, d) el tejido graso fue abundante y estuvo distribuido de manera uniforme en el hemocelo, de modo que no fueron visibles los músculos; el epitelio entérico era ligeramente café y los tubos de Malpighi bien diferenciados. Para el caso de congelación (Figura 15, e), la cutícula transparente permitió localizar la pigmentación rosada en la epidermis (Figura 14), las capas de tejido graso escasas, intestino contraído y deformado y tubos de Malpighi poco evidentes.

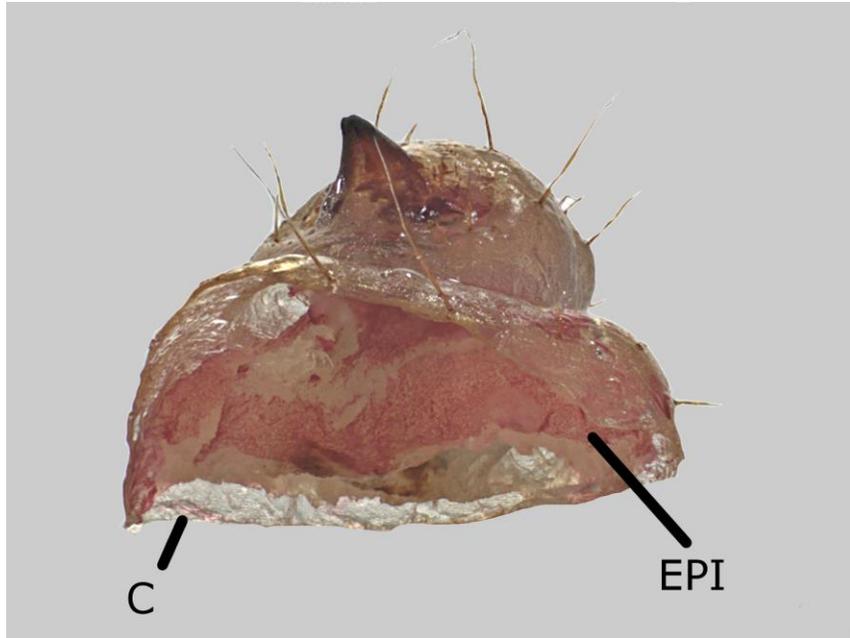


Figura 14. Último segmento abdominal de una larva de *Comadia redtenbacheri* en el que se observa la pigmentación en la epidermis, EPI; y la cutícula transparente, C.

En la disección, el testigo del tratamiento de mezcal solo (Figura 15, f) presentó el tejido adiposo adherido al integumento y distribuido de forma regular en el hemocelo, arreglado en lóbulos bien definidos, con una tonalidad blanca brillante y translúcida en algunas áreas, intestino y tubos de Malpighi bien diferenciados.

El ejemplar en alcohol 70% (Figura 15, g) mostró tejido graso blanco brillante, principalmente alrededor del intestino de color blanco opaco y tubos de Malpighi visibles, también de color blanco.

En el caso de la serie ascendente de alcoholes (Figura 15, h) el tejido graso estuvo en lóbulos definidos alrededor del intestino, en el cual se notaron los músculos circulares y tubos de Malpighi visibles.

El testigo del tratamiento con vinagre blanco-alcohol 40% (Figura 15, i) presentó tejido graso escaso, musculatura visible en intestino e integumento y tubos de Malpighi poco evidentes.

Para el caso de congelación (Figura 15, j) tanto el tejido graso como las tráqueas de aspecto brillante, tenían una apariencia fragmentada y no se apreciaron los órganos.

En cuanto a las larvas procedentes de marcas comerciales, la del mezcal A (Figura 15, k) mostró las fibras musculares rotas sobre la parte interna de la cutícula y una cantidad mínima de tejido graso alrededor de un tracto digestivo obscurecido y tubos de Malpighi visibles. La larva en el mezcal B no permitió la disección por estar excesivamente deformada, colapsada y cubierta con microorganismos.

En la marca comercial de mezcal C (Figura 15, l) el tejido graso fue reducido y solo se mostró adherido en zonas específicas del tórax, tracto digestivo obscurecido y tubos de Malpighi visibles.

Con respecto al mezcal D (Figura 15, m), el ejemplar presentó una descomposición severa, al grado de que el intestino estaba fragmentado, aunque los tubos de Malpighi tenían una apariencia normal.

En el testigo absoluto que no fue sometido a la fijación con agua caliente, el tejido graso se mostró en lóbulos de color blanco, bien definido y abundante en el hemocelo, que cubría el resto de las estructuras. Tubos de Malpighi de color amarillo.

De acuerdo con Chapman (2013) las células del cuerpo graso, el principal órgano involucrado en el metabolismo de los insectos, están en contacto con la hemolinfa, lo que facilita el intercambio de metabolitos y se le adjudican también funciones de almacenamiento, endócrinas y de inmunidad, de manera que monitorea y responde a las necesidades del insecto en sus diferentes estados de desarrollo y bajo diferentes condiciones ambientales, por lo que su cantidad puede variar de acuerdo con el estado fisiológico del individuo.

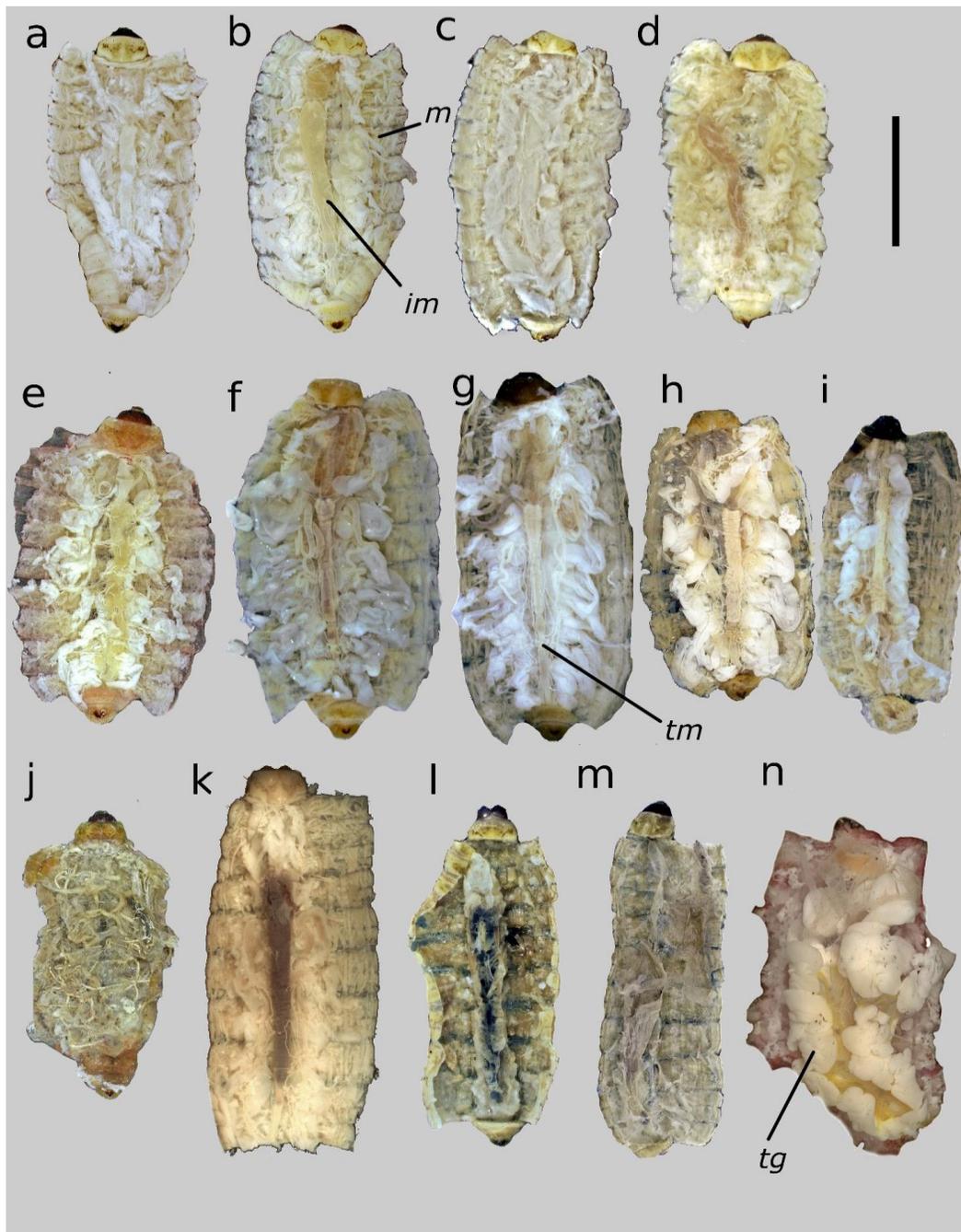


Figura 15. Órganos internos de larvas de *C. redtenbacheri*. (a-e) Larvas de los tratamientos. (f-j) Testigos de los tratamientos. (k-m) Larvas incluidas en botellas de mezcales comerciales. (n) Testigo absoluto. *im* intestino medio, *m* músculo, *tg* tejido graso, *tm* tubos de Malpighi. Escala: 1 cm.

El análisis de color arrojó los siguientes RGB los cuales fueron convertidos en códigos hexadecimales en donde se muestra la pérdida de color al finalizar el experimento. El cambio de color fue evidente y mostró que el método de congelación mantuvo el pigmento natural pero la tonalidad cambio a rosa (Cuadro 1).

2.3.3 Análisis de RGB

Cuadro. 1 Resultado de color de *Comadia redtenbacheri* mediante el análisis RGB.

Tratamiento	RGB			Hex	Color
Mezcal solo	180	155	115	B49B73	
Alcohol 70%	171	149	111	AC956F	
Alcoholes ascendentes	180	158	120	B49E75	
Vinagre blanco - alcohol 40%	180	157	117	B49C75	
Congelación	211	160	126	D2A17E	
Mezcal solo testigo	155	120	72	9B7848	
Alcohol 70% testigo	108	70	48	6C4630	
Alcoholes ascendentes testigo	130	98	65	836241	
Vinagre blanco - alcohol 40% testigo	111	80	54	836241	
Congelación testigo	143	92	66	905C42	
Testigo total	177	76	83	B24D53	

2.3.4. Tinción de larvas con colorantes naturales

Con el pigmento A, tanto a las 24 h como a los siete días, se pudo observar que la coloración fue rosa tenue, la cual se mantuvo de forma parcial en el cuerpo del insecto, además de que presentó una leve pérdida del pigmento en el alcohol. A los 21 días el color se conservó con la misma tonalidad, pero se homogenizó en todo el cuerpo y no hubo pérdida del color cuando se encontraba en el mezcal (Figura 16, a-c).

En el ejemplar con el pigmento natural B, a las 24 h y a los siete días la tonalidad obtenida fue ligeramente rosa y el color se encontró de forma parcial en el cuerpo del individuo. A los 21 días la coloración y la disposición del pigmento en el cuerpo no presentó cambios y solo hubo un ligero desprendimiento del color en el mezcal (Figura 16, d-f).

La coloración de la larva con el pigmento natural C presentó una tonalidad roja tenue, con una distribución parcial en el cuerpo de la larva y desprendimiento leve en el alcohol 40% y en el mezcal durante todo el proceso (Figura 17, a-c).

El pigmento natural D mostró una tonalidad rojiza en el individuo en las primeras 24 h, en las cuales presentó una ligera pérdida del pigmento en el alcohol. El color se distribuyó parcialmente en el cuerpo del insecto, a los siete días la tonalidad fue un poco más oscura y la pérdida mínima en el alcohol 40%, mientras que a los 21 días la larva mostró un tono morado distribuido homogéneamente en el cuerpo, además de que no presentó rastros del pigmento en el mezcal (Figura 17, d-f). El pigmento natural D podría ser útil para la industria mezcalera, ya que la coloración se mantiene en un sistema alcohólico y no hay pérdida de color, lo que puede favorecer su vida útil en almacenamiento. El pigmento D es de grado alimenticio y no hay restricción en cuanto a las partes por millón a utilizar, lo que permite al consumidor ingerirlo sin poner en riesgo su salud y está en la lista de aditivos aceptados por la Food and Drug

Administration (FDA), lo que puede significar ser una ventaja para la industria mezcalera de exportación.

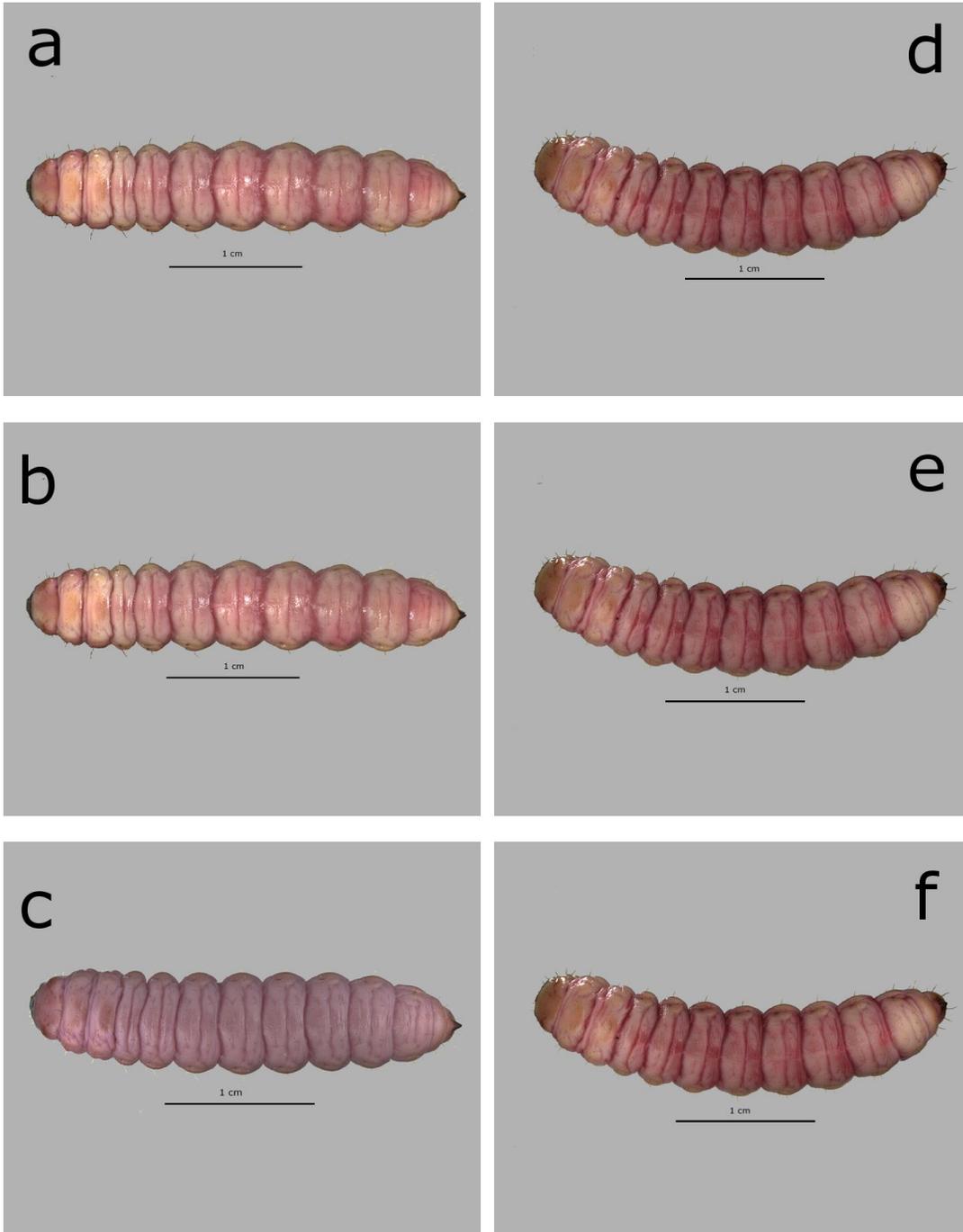


Figura 16. Tinción con diferentes colorantes naturales en larvas tratadas con vinagre - alcohol 40% de *Comadia redtenbacheri*. Pigmento A (a-c); pigmento B (d-f).

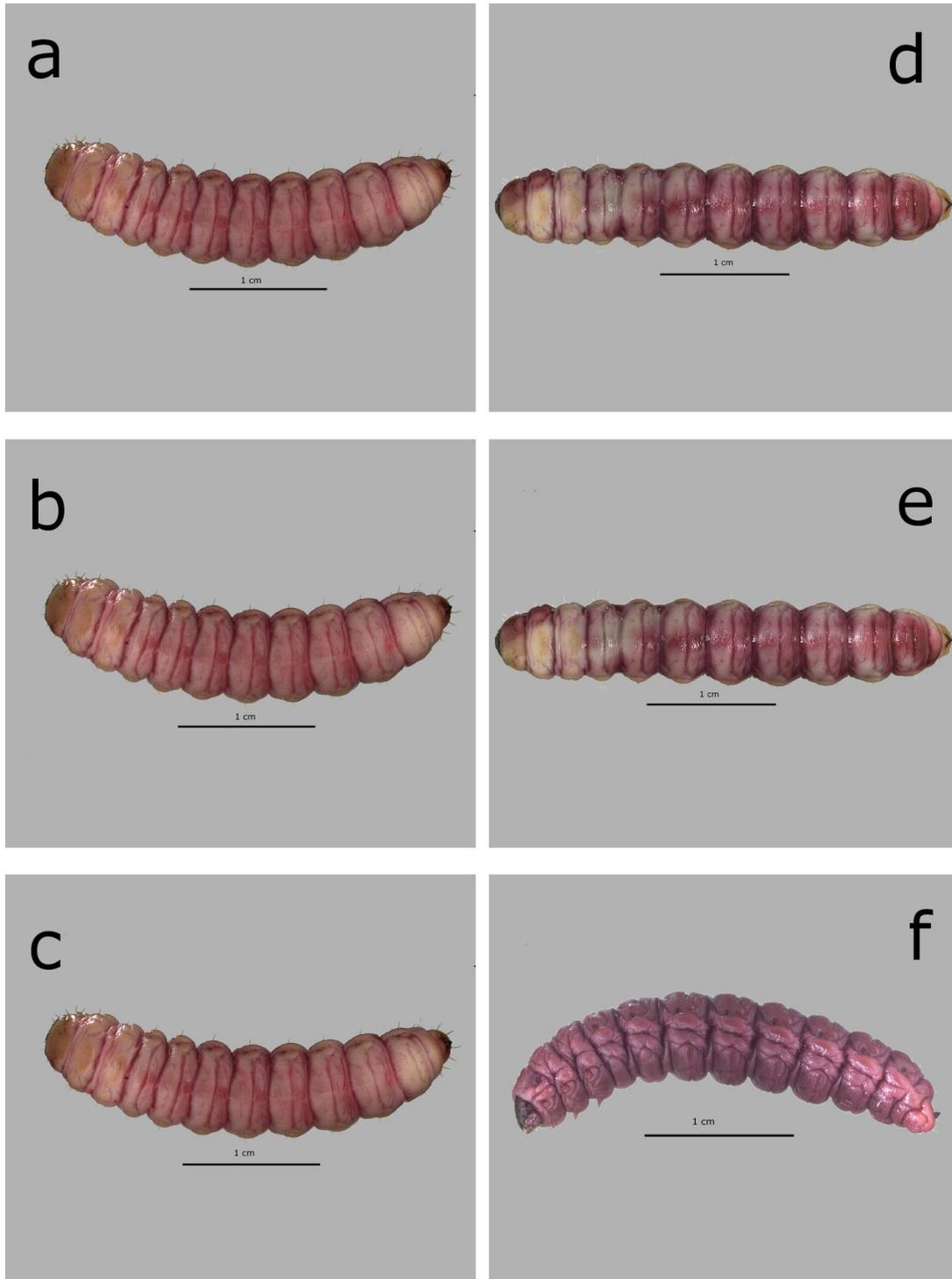


Figura 17. Coloración con distintos pigmentos naturales en larvas tratadas con vinagre - alcohol 40% de *Comadia redtenbacheri*. Pigmento C (a-c); pigmento natural D (d-f).

La coloración en insectos puede deberse a diferentes pigmentos, algunos de los cuales pueden ser solubles en agua o lípidos. El pigmento puede estar ubicado en la cutícula o epidermis subyacente, o deberse a estructuras físicas y también se puede encontrar en el tejido graso y la hemolinfa, lo que proporciona el color si la cutícula es transparente (Shamim *et al.* 2014).

El color rojo que caracteriza a la larva *C. redtenbacheri* podría atribuirse a un pigmento del grupo de los homocromos, que son responsables de dar tonos que van desde el dorado, pasando por rojo, púrpura y violeta, hasta negro, que al reducirse forman rojos y al oxidarse proporciona una coloración usualmente amarilla (Cromartie, 1959; Insausti y Casas 2008). Los homocromos son producidos en la epidermis y dan la coloración al cuerpo, como en el caso del lepidóptero *Cerura*, que cambia su tonalidad a roja justo antes de la pupación (Chapman, 2013). Otro ejemplo de este tipo de pigmentos, es el color rosa en adultos inmaduros de *Schistocerca*, la coloración roja en odonatos y las tonalidades rojas y cafés en mariposas (Shamim *et al.* 2014).

En el caso del gusano rojo del maguey, los procedimientos de colecta, acopio y venta que transcurren durante periodos largos de tiempo, pudieran causar un debilitamiento de los individuos, que se vería reflejado en el consumo de las reservas del tejido graso al estar sin alimento antes de ser incluidos en las botellas de mezcal, lo que también pudiera estar relacionado con el aspecto del canal alimenticio, como se describió anteriormente para algunos de los ejemplares obtenidos de las marcas comerciales. La separación de los tejidos de los puntos de anclaje con el integumento puede interpretarse como resultado de una deshidratación derivada de la inclusión en la solución alcohólica del mezcal sin un tratamiento previo de fijación de los

tejidos, como puede ser el someterlos a calor. Es importante resaltar que ninguna de las larvas incluidas en las botellas de mezcal presentó signos de parasitismo, aunque esto puede ser frecuente en poblaciones silvestres de *C. redtenbacheri*, como lo mencionan Zetina y Llanderal (2014).

La revisión del estado general de las larvas incluidas en las botellas de mezcal reflejó una carencia de procedimientos para asegurar la inocuidad del insecto en el producto, lo que debería ser una responsabilidad de las empresas, pero que también es consecuencia de la flexibilidad de las normas sanitarias vigentes para bebidas alcohólicas emitidas por la SAGARPA, sin una especificación clara de la calidad que deben tener los ingredientes opcionales que son permitidos.

2.4. CONCLUSIONES

Con base en este trabajo, se recomienda la utilización de alcohol 70% y vinagre-alcohol 40% para la conservación de larvas de *C. redtenbacheri* en mezcal, previa fijación con calor para conservar la calidad de las larvas que son incluidas en las botellas y extender la vida de almacenamiento. Este es el primer trabajo que propone una metodología para la preservación de insectos comestibles en bebidas alcohólicas. Se considera necesario continuar con más pruebas para lograr una coloración similar a las que presentan las larvas en su estado natural. Se debe de profundizar en la generación de protocolos y normas de calidad que garanticen el manejo, aprovechamiento sustentable y la inocuidad de la especie. Es importante un proceso de selección previo a la utilización de las larvas para garantizar la calidad para su consumo. Además se propuso la estandarización del uso de un pigmento natural, el cual cumple con las normas de la FDA y brinda un color atractivo para el consumo en botellas de mezcal.

2.5. AGRADECIMIENTO

Esta investigación se llevó a cabo con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), como parte del proyecto 166898 “Biología de *Comadia redtenbacheri* Hamm.”

2.6. LITERATURA CITADA

Anónimo, 2011. El gusano de mezcal mexicano causa polémica en exposición. En línea:

<http://mexico.cnn.com/historias-extraordinarias/2011/05/07el-gusano-mexicano-causa-polémica-en-exposición-en-Canadá>.

Barbosa, P., Berry, S. L. and C. S. Kary, C. S. 2015. Insect Histology Practical Laboratory Techniques. Wiley Blackwell. USA.

Campañone, L. A., L. A. Roche, V. O. Salvadori and R. H. Mascheroni. 2002. Monitoring of weight losses in meat products during freezing and frozen storage. Food Sci. Tech. Int. 8:229–238. [doi:10.1106/108201302028555](https://doi.org/10.1106/108201302028555)

Castro-Torres, R. E. y C. Llanderal-Cázares. 2015. Principales caracteres morfológicos para el reconocimiento de *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: cossidae). Entomología Mexicana 2:798-803.

Chapman, R. F. 2013. The Insects: Structure and Function. S. J. Simpson and A. E Douglas (eds). Cambridge University Press. 5th ed. Cambridge, U. K.

CRM. 2015. Informe del Consejo Regulador del mezcal. En línea:

- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal. Disponible en:
<https://es.scribd.com/doc/269109491/Informe-2015-del-Consejo-Regulador-del-Mezcal>
- Cromartie, R. 1959. Insect pigments. *Annu. Rev. Entomol* 4:59-76.
[doi:10.1146/annurev.en.04.010159.000423](https://doi.org/10.1146/annurev.en.04.010159.000423)
- Encabo, J. E. 2000. Mezcal, bebida de los dioses. En línea:
<http://www.afuegolento.com/noticias/39firmas/encabo/1610/-44K>.
- Gómez-Sánchez, A. I., T. G. Cerón-Carrillo, V. Rodríguez-Martínez y M. M. Vázquez-Aguilar. 2007. Aspectos tecnológicos de la congelación en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 1:80-96.
- Gullan, P. J. and P. S. Cranston. 2010. *The Insects: an Outline of Entomology*. 4th ed. Wiley Blackwell. pp. 26.
- Hackman, R. H. and M. Goldberg. 1970. Studies of the hardening and darkening of insect cuticles. *J. Insect Physiol.* 17:335-347. [doi:10.1016/0022-1910\(71\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0022-1910(71)90218-6)
- He, Q. L., Y. Zhu, X. Shen, X. Lin and K. Xiao. 2015. Evaluation of the effects of frozen storage on the microstructure of Tilapia (Perciformes: Cichlidae) through fractal dimension method. *LWT - Food Sci Tech-Brazil* 64:1283–1288. [doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.036](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.036)
- Hernández-Livera, R. A., C. Llanderal-Cázares, L. E. Castillo-Márquez, J. Valdez-Carrasco y R. Nieto-Hernández. 2005. Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (Hamm.) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia* 39:539–544. [doi: doi.org/10.3958/059.039.0206](https://doi.org/10.3958/059.039.0206)
- Insausti, T. C. and J. Casas. 2008. The functional morphology of color changing in a spider: development of ommochrome pigment granules. *J. Exp. Biol* 211:780-789.

doi:10.1242/jeb.014043

SAGARPA. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Diario oficial de la federación En línea:

Shamim, G., S. K. Ranjan, D. M. Pandey and R. Ramani. 2014. Biochemistry and biosíntesis of insect pigments. [Eur. J. Entomol.](#) 111:149-164. doi:10.14411/eje.2014.021

Sterh, F. W. 1987. Immature Insects. Hunt Publishing Company. USA.

Peterson A. 1964. Entomological Techniques. Edwards Brothers Inc. pp. 57-61.

SRE. 2014. Secretaria de Relaciones Exteriores en Serbia. En línea: <http://embamex.sre.gob.mx/serbia/index.php/sr?start=15>

Uría, G. E. y C. V. Mora. 1996. Apuntes para el Curso Teórico Práctico de Histología Animal. Instituto Politécnico Nacional. México.

Verdín, S. L., F. L. Moreno, N. R. Rojo, A. L. García, M. Omaña, A. Meneses y O. Nieto. 2013. Histología e Inmunohistoquímica. Manual de Métodos. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Zetina, D. H., C. Llanderal-Cázares and H. M. De los Santos-Posadas. 2011. Logistic regression analysis to predict parasitism in larvae of *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). *Entomotropica* 26:1–6. doi: /10.1653/024.096.0422

Zetina, A. D. H. and C. Llanderal. 2014. Signs and symptoms in *Comadia redtenbacheri* Hamm. (Lepidoptera : Cossidae) larvae affected by parasitoids. [Southwest. Entomol.](#) 39:285–290. doi: 10.3958/059.039.0206

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se generó información nueva sobre anatomía interna de la larva de *C. redtenbacher*, que muestra una estructura anatómica similar a los demás insectos, además con base en los resultados obtenidos se concluye que el utilizar alcohol 70% y vinagre-alcohol 40% se obtiene una mejor conservación de las larvas utilizadas en la inclusión en botellas de mezcal.

También se determinó que la fijación con calor es esencial para la preservación integral del insecto. Se observó que el proceso de selección previo a la utilización del insecto para uso comercial es de vital importancia para garantizar la calidad para su consumo.

Además se estableció un nuevo método de tinción y el uso de un pigmento específico que mantiene el color en larvas incluidas en mezcal, que no presenta riesgo al consumidor al ser ingerido y que podría ser usado para la producción de mezcal de exportación ya que es permitido su uso por la FDA. La incorporación del pigmento natural es un avance innovador para la industria mezcalera ya que permitirá mostrar el color característico de la larva. Es necesario continuar con más pruebas para lograr una coloración similar a las que presentan las larvas en su estado natural.