

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de enero de 2022 (20.01.2022)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2022/013659 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

A01K 67/033 (2006.01) C09B 61/00 (2006.01)
A23L 2/58 (2006.01) C07D 309/10 (2006.01)

SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/IB2021/055774

(22) Fecha de presentación internacional:

28 de junio de 2021 (28.06.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

MX/a/2020/007632

16 de julio de 2020 (16.07.2020)

MX

(71) Solicitante: GARCÍA GIL DE MUÑOZ, David

[MX/MX]; Almendros 84, Col. Lomas de San Mateo, Naucalpan de Juárez, Estado de México, 53200 (MX).

(72) Inventor; y

(71) Solicitante: GARCÍA GIL DE MUÑOZ, Fernando Luis

[MX/MX]; Facc. Ciudad Satélite, Naucalpan de Juárez, Estado de México, 53100 (MX).

(74) Mandatario: PANAMERICANA DE PATENTES Y

MARCAS, S.C.; Av. Revolución 1392 2° piso, Guadalupe Inn, Álvaro Obregón, Ciudad de México, 01020 (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING CARMINIC ACID

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CARMÍNICO

(57) Abstract: Disclosed is a new, alternative, low-cost synthesis method for producing carminic acid in vitro by means of haemolymph cells of the insect *Dactylopius coccus* Costa (cochineal), for use in the industry for colourants used for foods, cosmetics, pharmaceuticals and textiles.

(57) Resumen: Un proceso novedoso, alternativo de bajo costo de síntesis para la producción de ácido carmínico in vitro mediante el uso de células de la hemolinfa del insecto *Dactylopius coccus* Costa (insectos cochinilla o grana cochinilla) para su empleo en la industria de los colorantes que se emplean para alimentos, cosméticos, farmacéuticos y textiles.



WO 2022/013659 A1

PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CARMÍNICO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se relaciona con un proceso novedoso, alternativo, de bajo costo, para la producción de ácido carmínico (AC) *in vitro*, para su empleo en la industria de los colorantes que tienen amplia aplicación en la Industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y textil, entre otras.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10

Existen en el arte previo, desde hace muchos años, métodos tradicionales de producción que implican la siembra, crecimiento y cosecha del insecto *Dactylopius coccus* Costa (insectos cochinilla o grana cochinilla) en ciclos de aproximadamente 80-90 días que utilizan sistemas de invernadero, cobertizo y/o cielo abierto. En esos casos se requiere el binomio de producción planta-insecto. Se sabe que el ácido carmínico extraído de la cochinilla se utiliza como colorante rojo y/o carmín en cosméticos (labiales, entre otros) y como E-120 en la industria alimenticia para dar un color rojo a los alimentos, aunque se sustituye cada vez más por colorantes sintéticos más económicos. Un sustituto ampliamente utilizado es el rojo cochinilla A, un colorante diazoico con el número E-124. En Europa se utiliza el ácido carmínico obtenido a partir de insectos autóctonos al menos desde la Edad de Hierro, y se han descubierto restos, por ejemplo, en tumbas de la cultura de Hallstad.

20

En el arte, se conocen los siguientes métodos, todos ellos tienen la misma fase primaria de preparación de la cochinilla para extraer el ácido carmínico: secado de materia prima, separación mecánica, molienda, extracción de grasas y ceras; diferenciándose en la extracción de grasas y ceras; y en la extracción del ácido carmínico que es la siguiente etapa y luego su continuación con la precipitación del carmín, reposo, filtración y secado del carmín.

Algunas soluciones del estado de la técnica para la producción de ácido carmínico en grandes cantidades se divulgan en los siguientes documentos:

25

Miguel González González et al, *Nota Científica* Rev. Fitotec. Mex. Vol. 25 (2): 209-212, 2002, "CULTIVO *in vitro* DE CÉLULAS EMBRIONARIAS DE COCHINILLA (*Dactylopius coccus* Costa) A DIFERENTES pH", ha evaluado la determinación de un pH óptimo al que cultivos celulares de cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) registran la máxima producción de ácido carmínico *in vitro*, en donde se evaluaron varios niveles de pH (4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5) y de fracciones de centrifugado (0, 2, 5 y 10 min) de células maceradas de embriones de cochinilla establecidos en medio de cultivo para cultivo de líneas celulares de insectos el cual es medio nutritivo de Schneider. El contenido de ácido carmínico presente en cada muestra se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución. La extracción del pigmento de las muestras se realizó con una solución de HCl 2M. Los límites de detección del pigmento fueron de 1.0 mg L⁻¹ a 120.0 mg L⁻¹. No se observó un efecto significativo del pH en el contenido de ácido carmínico ni en el número de líneas celulares, aunque el pH intermedio (5.5) tendió a dar mejores resultados. Sin embargo, las

35

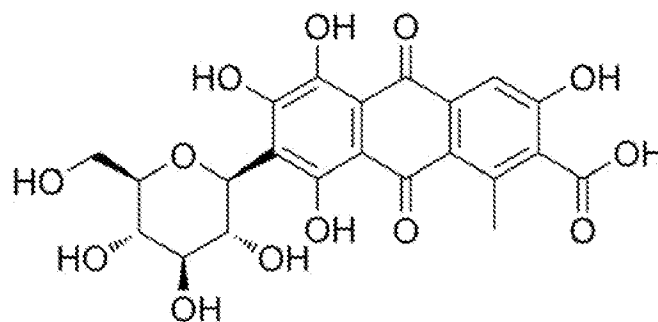
conclusiones de dicho documento señalan que “los medios de cultivo con 4.5 a 6.5 son adecuados para el cultivo *in vitro* de células de la cochinilla, aunque tendieron a ser mejores los pH intermedios en el contenido de carmín y el número de líneas celulares. Los tiempos de centrifugado de 2 y 5 min fueron los más adecuados para establecer líneas celulares de embriones de *D. coccus*. La producción de carmín en cultivos secundarios fue baja, por lo que se sugirió evaluar otras variables del medio de cultivo, como presión osmótica y constituyentes del medio nutritivo, principalmente.

US 8,919,281 (B2), 2013, *Means to culture cochineal insects in an artificial medium*, Hendrickson, Constance M.

Merkle, Denise Lynn, menciona un método para cultivar insectos del género *Dactylopius*, que comprende: calentar una mezcla que comprende (a) un aditivo para cactus obtenido de un cactus del género *Opuntia*, (b) un polisacárido y (c) glucosa; combinando la mezcla calentada con una matriz tridimensional; enfriar la mezcla combinada y la matriz para formar un medio endurecido; e inocular el medio endurecido con una especie seleccionada del grupo que consiste en el género *Dactylopius*.

Por su parte, MX 295682, ARIGEN PHARMACEUTICALS, INC, *METODO DE PROLIFERACION DE CELULAS ASESINAS ACTIVADAS POR LINFOCINA*, Watarai, Shinobu; Nishikawa, Shigeru, menciona un método de proliferación/activación de células asociadas con cánceres que se puede realizar a costos tan bajos que los métodos pueden ser aplicables a animales no humanos; un método de proliferación/activación de células de la presente solicitud comprende los pasos de, durante el cultivo de células, suplementar con al menos 5-15 µg/ml de concanavalina A y un factor de crecimiento que tiene actividad de tipo interleucina-2 al medio de cultivo, por consiguiente, el presente método puede proliferar/activar, en una base preferencial, células αβ.

No obstante, en las soluciones proporcionadas aún existe una necesidad en la técnica por aquellas que sean eficaces y que permitan una reducción en los tiempos de producción y cosechas inmediatas de ácido carmínico, así como en los gastos de operación y de recursos humanos. La presente invención resuelve este problema proporcionando un proceso novedoso e inventivo para la producción *in vitro* de ácido carmínico de la siguiente estructura:



BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona de manera particular con un procedimiento para la producción de ácido

carmínico *in vitro*, en donde el procedimiento se basa en el aislamiento, la purificación y la permanencia de una línea celular de hemocitos obtenida de hembras adulto ovíparas del insecto *Dactylopius coccus* Costa (insectos cochinilla) que se cultivan para generar un cultivo primario (fase I) y, posteriormente, estimular los hemocitos con una mezcla de mitógenos.

5 Ventajosamente, la producción de ácido carmínico a través del proceso novedoso de la presente invención proporciona reducción tanto en el número de insectos a utilizar como en los tiempos de producción y cosecha que ahora se estiman entre aproximadamente 12-14 días, así como también reducción en los gastos de operación y de recursos humanos, en espacio reducido se producen grandes cantidades y el manejo es con células en condiciones de laboratorio sin la necesidad de manejar volúmenes grandes de insumos, reducción de materia prima (eliminación
10 de planta hospedera), cosecha en forma soluble directa sin necesidad de procesos de secado (tiempos y materiales), crío-preservación de una estirpe celular de producción para la perpetuidad en caso de que en un futuro las poblaciones de insecto sean escasas, producción libre de plagas y depredadores naturales, empleo de menos insectos en una cantidad de aproximadamente 10-15 individuos para producir la misma cantidad comparado con los métodos tradicionales que requieren el sacrificio de aproximadamente 350,000 a aproximadamente 400,000 insectos
15 *Dactylopius coccus* Costa (cochinilla) para producir aproximadamente un kilogramo de ácido carmínico, el costo de producción es aproximadamente 50% menos que los costos por método tradicional, además de ser un proceso escalable bajo el esquema de reproducción de unidades de producción.

De acuerdo con la presente invención se provee una metodología para aislar, extraer y mantener una línea celular productora de AC pura para obtener cosechas de producción de AC reproducibles y constantes en condiciones
20 de laboratorio y en producción de recipiente de 1000 ml, así como mantener líneas celulares libres de contaminantes de forma constante que fueran reproducibles y replicables ante el estímulo que se les administra a los cultivos.

DESCRIPCIÓN DE LA FIGURAS

25 Las características particulares y ventajas de la invención, así como otros objetos de la misma, serán aparentes de la siguiente descripción, tomada en conexión con las figuras acompañantes, las cuales:

La Figura 1 muestra la Fase I de extracción de hemocitos de la hemolinfa del insecto *Dactylopius coccus* Costa, en donde:

A y B son cromatocitos (separados y concentrados en gradiente de Percoll 70%), cultivados por 96 horas
30 en medio Schneider. A y B son el mismo tipo de células con diferente contraste de imagen en microscopio. En B se hace más evidente la presencia en citoplasma de los gránulos de ácido carmínico.

C son cromatocitos de menor edad indiferenciados que una vez maduros empezarán a incrementar su producción de ácido carmínico.

La Figura 2 muestra los resultados de gradiente de Percoll (fases de separación) y formación de
35 carbamato (producto celular) en la superficie de los dos últimos tubos como un sobrenadante que se aprecia de color

negro.

La Figura 3 muestra una microscopia de contraste de fases de hemocitos estimulados por los mitógenos post-72 horas cultivados en medio de cultivo Schneider.

La Figura 4 muestra una microscopia de bioproducción viabilidad celular en cultivo en medio Schneider 72 horas post inoculación, ensayo MTT 2 Mm cultivo en placa.

La Figura 5 muestra una microscopia de los granulocitos 96 horas post inoculación.

La Figura 6 muestra una representación del proceso de producción y mantenimiento en recipientes de fondo plano de acuerdo a una modalidad de la invención.

La Figura 7 muestra los resultados de la revisión en recipientes al día 25 post inoculación.

La Figura 8 muestra una gráfica de resultados que describe el espectro de absorción (Absorbancia vs longitud de onda en nanómetros) para la identificación del AC en biocultivo de la tabla del ejemplo 1 detallado en la sección de ejemplos de más abajo.

La Figura 9 muestra una gráfica de resultados que describe el espectro de absorción para la identificación del AC en biocultivo purificado de la tabla del ejemplo 2 detallado en la sección de ejemplos de más abajo.

La Figura 10 complementaria a la Tabla 2 descrita abajo, dicha figura muestra resultados preliminares de los diferentes tipos celulares que se obtienen por gradiente de Percoll (microscopías de las células obtenidas en gradiente de Percoll) del método detallado más abajo.

La Figura 11 muestra una micrografía de un granulocito en cultivo en día 8.

La Figura 12 muestra una micrografía de un granulocito en cultivo en día 10.

La Figura 13 muestra un efecto anticoagulante en la obtención de la hemolinfa por perfusión.

La Figura 14 muestra integridad de las proteínas obtenidas durante la perfusión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las siguientes definiciones se proveen para permitir una mejor comprensión de la invención:

El uso del término “aproximado/aproximadamente” provee un determinado rango adicional. El término es definido de la siguiente manera. El rango adicional provisto por el término es de aproximadamente $\pm 10\%$. De manera ejemplar, pero no limitativa, si se dice “aproximadamente 40 gramos”, el rango se encuentra entre $\pm 10\%$ de desviación estándar y así sucesivamente para las demás mediciones.

De acuerdo con la presente invención, la producción de ácido carmínico *in vitro*, comprende: extraer, aislar, purificar y permanecer una línea celular de hemocitos obtenida de hembras adulto ovíparas (llenas de huevecillos) del insecto *Dactylopius coccus* Costa (insectos cochinilla) de la siguiente manera generalizada:

Extracción de Hemocitos de la hemolinfa:

A partir de cepas grávidas ovíparas de *Dactylopius coccus* se obtiene hemolinfa por perfusión del

hemocelo de la cepa con una solución amortiguadora anticoagulante que comprende una base, una sal iónica, un agente quelante y un ácido orgánico, hasta obtener una solución pigmentada roja que contiene células productoras de ácido carmínico (AC) entre otras.

En una modalidad de la invención la solución amortiguadora anticoagulante comprende NaOH, NaCl, EDTA y ácido cítrico.

La solución pigmentada obtenida se deposita en recipientes estériles y se centrifuga.

El sobrenadante es recuperado.

Por otro lado, se prepara un gradiente discontinuo de Percoll con solución salina de fosfatos.

El gradiente discontinuo de Percoll se precorre por centrifugación.

Una vez finalizada la precorrida se adiciona la solución pigmentada obtenida.

Se corre por centrifugación para obtener células identificadas (Tabla 2).

Al final de la corrida, se obtienen las células de la hemolinfa que se destinará para generar un cultivo.

Las células son recuperadas y colocadas en placas con medio de cultivo para cultivo de líneas celulares de insectos para su adaptación.

Selección de la línea Celular y obtención de Cultivos primarios:

Se revisan, evalúan y seleccionan los cultivos que muestran al microscopio células diferenciadas.

Se seleccionan granulocitos y hemocitos.

Se siembran las células seleccionadas en placas con medio de cultivo para cultivo de líneas celulares de insectos para su adaptación.

Finalmente, se revisan y evalúan de acuerdo con su integridad celular fenotipo.

Estimulación y Activación de las líneas celulares:

A cada célula en cultivo se les adiciona una combinación de mitógenos en solución salina de fosfatos para promover la mitosis.

Los cultivos son incubados hasta volverse gradualmente rojos y se observan células en la división celular debido a los mitógenos.

Los cultivos que muestran aumento en su densidad poblacional son seleccionados y se propagan en recipiente en donde se recomienda elaborar un preservado criogénico.

Propagación y producción en recipiente:

Las células en placa se cultivan en recipientes con medio de cultivo para crecimiento de líneas celulares de insectos.

Los recipientes se incuban durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10-14 días (línea primaria).

Durante este período de tiempo las células forman una monocapa confluyente de células adheridas al recipiente, y el

medio de cultivo se vuelve rojo como una señal positiva de producción de color.

Los recipientes se revisan cada día para evaluar y comprobar la presencia de mitosis.

Al finalizar el ciclo, los cultivos se recolectan y se ordeña o cosecha el color de cada uno de los recipientes de cultivo.

5 La “ordeña” o “cosecha” se hace en un ambiente desinfectado y cada cosecha es centrifugada en recipientes con el propósito de eliminar los detritus celulares y solamente recuperar el sobrenadante que es en este caso: “El pigmento” (ácido carmínico).

Para fines de la presente invención, se presentan detalladamente los pasos del método arriba mencionado:

10

Extracción de Hemocitos de la hemolinfa:

En primer lugar, a partir de por lo menos aproximadamente 20 a aproximadamente 95 mg de cepas grávidas ovíplanas de *Dactylopius coccus*, preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 85 mg de cepas grávidas ovíplanas del insecto, se obtiene hemolinfa por perfusión del hemocele de la cepa con una solución amortiguadora anticoagulante reportada en la literatura por Graham et al., 1986 compuesta por un intervalo de aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 0.75 mM de NaOH, preferiblemente aproximadamente 0.61 mM; un intervalo de aproximadamente 0.15 M a aproximadamente 0.50 M de NaCl, preferiblemente aproximadamente 0.56 M; un intervalo de aproximadamente 0.10 mM a aproximadamente 0.25 mM de EDTA, preferiblemente aproximadamente 0.16 mM; un intervalo de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM de ácido cítrico, preferiblemente aproximadamente 100 mM; a un pH aproximado en un intervalo de 4.5-6.5 como puede observarse en la Tabla 1 más abajo. La solución que se obtiene es una solución pigmentada roja en donde van suspendidas las células productoras de ácido carmínico (AC) así como otras variantes celulares (hemocitos) de la hemolinfa.

La solución pigmentada obtenida se deposita en recipientes estériles, de manera preferida para los efectos de la presente invención en tubos cónicos estériles de polipropileno y se centrifuga a un intervalo de aproximadamente 500-1200 revoluciones por minuto (rpm), preferiblemente de aproximadamente 600-1000 rpm, por aproximadamente un intervalo de 8-17 minutos, preferiblemente aproximadamente 10-15 minutos a una temperatura aproximada en un intervalo de 2-5°C, de manera preferida aproximadamente 4°C.

El sobrenadante es recuperado en recipientes estériles, de manera preferida para los efectos de la presente invención en tubos cónicos estériles de polipropileno y se mantienen a temperatura ambiente.

30 Adicionalmente, se prepara un gradiente discontinuo de Percoll (aproximadamente a un intervalo de aproximadamente 10-90%, de manera preferida a un intervalo entre aproximadamente 20-80%) con solución salina de fosfatos (PBS 1X a un rango de pH de aproximadamente 4.5 a 5.2, de manera preferida a un pH de aproximadamente 5.5) como puede observarse en la subsecuente Tabla 2 y en la Figura 10 en la sección de Figuras.

35

TABLA 2: Gradientes de Percoll empleados

	Gradiente (Concentración)	Velocidad Centrifugado	Células Identificadas
5	Percoll 90%	1500 rpm/5min	Plasmacitos trinucleados, Granulocitos maduros.
	Percoll 70%	1000 rpm/5min	Granulocitos abundantes.
10	Percoll 50%	1000 rpm/10 min	Escasos Granulocitos, Abundantes Oenocytoides.
	Percoll 40%	700 rpm/10 min	Escasos Granulocitos, Abundantes Oenocytoides
15	Percoll 40%	1000 rpm/10 min	Escasos Granulocitos, Abundantes Oenocytoides
	Percoll 40%	800 rpm/10 min	Escasos Granulocitos, Abundantes Oenocytoides
20	Percoll 30%	1000 rpm/10 min	Plasmacitos trinucleados abundantes. Escasos Granulocitos.
	Percoll 40%	600 rpm/5 min	Abundantes Granulocitos maduros y jóvenes.
25			
30			

El gradiente se precorre centrifugando a un intervalo de por lo menos aproximadamente 4000-5500 rpm, preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 4500-5000 rpm, en un intervalo de tiempo de aproximadamente 12-22 minutos, preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 15 a 20 minutos.

Una vez finalizada la precorrida se adiciona una cantidad en un intervalo de aproximadamente 95-550 μ l,

preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 100-500 μ l de la solución pigmentada obtenida.

Se centrifuga a aproximadamente a 1000 revoluciones por minuto (rpm) durante un período de tiempo en un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 minutos, de manera preferida aproximadamente 15 minutos, a temperatura ambiente, para obtener los siguientes resultados como pueden apreciarse en la Tabla 2 que se reproduce nuevamente abajo y en la Figura 10 en la sección de Figuras.

TABLA 2: Gradientes de Percoll empleados

Gradiente (Concentración)	Velocidad Centrifugado	Células Identificadas
Percoll 90%	1500 rpm/5min	Plasmacitos trinucleados, Granulocitos maduros.
Percoll 70%	1000 rpm/5min	Granulocitos abundantes.
Percoll 50%	1000 rpm/10 min	Escasos Granulocitos, Abundantes Oenocytoides.
Percoll 40%	700 rpm/10 min	Escasos Granulocitos, Abundantes Oenocytoides
Percoll 40%	1000 rpm/10 min	Escasos Granulocitos, Abundantes Oenocytoides
Percoll 40%	800 rpm/10 min	Escasos Granulocitos, Abundantes Oenocytoides
Percoll 30%	1000 rpm/10 min	Plasmacitos trinucleados abundantes. Escasos Granulocitos.

Percoll 40%	600 rpm/5 min	Abundantes Granulocitos maduros y jóvenes.
-------------	---------------	--

Al final de la corrida por centrifugación, se obtienen varias fases, la interfase entre el Percoll y el colorante (pigmento) contiene las células purificadas de la hemolinfa que se destinará para generar un cultivo primario (fase I).

Las células son recuperadas y colocadas en placas, preferiblemente pero no de manera limitada, placas multipocillos de 16 pocillos con aproximadamente 100 a aproximadamente 500 μ l, de manera preferida aproximadamente 250 μ l, de medio de cultivo para cultivo de líneas celulares de insectos, de manera preferida medio comercial Schneider por un intervalo de tiempo de aproximadamente 20-30 horas, preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 24-26 horas a una temperatura aproximada en un intervalo de aproximadamente 20-28°C, preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 22-26°C para su adaptación.

Selección de la línea Celular y obtención de Cultivos primarios:

Aproximadamente 24 horas después del cultivo, se revisan, evalúan y seleccionan los cultivos que muestran al microscopio mejor integridad celular y fenotipo.

Se seleccionan la variante celular: "Granulocitos jóvenes" y la variante "hemocitos indiferenciados jóvenes" (SELECCIÓN DE CANDIDATOS).

Estas dos variantes son seleccionadas y sembradas nuevamente en placas, preferiblemente pero no de manera limitada, placas multipocillos de 16 pocillos con aproximadamente 100 a aproximadamente 500 μ l, de manera preferida aproximadamente 250 μ l, de medio de cultivo para cultivo de líneas celulares de insectos, de manera preferida medio comercial Schneider por un tiempo en un intervalo de aproximadamente 20-30 horas, preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 22-26 horas a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 20-28°C, preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 22-26°C para su adaptación.

Finalmente, aproximadamente 24 horas después se revisan y evalúan de acuerdo con su integridad celular y mantenimiento del fenotipo.

Estimulación y Activación de las líneas celulares:

A cada uno de los pocillos con las células en cultivo se les adiciona una combinación de mitógenos (Concanavalina A a un intervalo de aproximadamente 0.20-0.30 micromoles, de manera preferida aproximadamente 0.25 micromoles + Fitoheماغlutinina a un intervalo de aproximadamente 0.40-0.60 micromoles, de manera preferida aproximadamente 0.50 micromoles) en solución salina de fosfatos (PBS 1X a un pH de entre aproximadamente 4.8-5.2, de manera preferida a un pH de aproximadamente 5.0), para promover la mitosis en granulocitos jóvenes.

Los cultivos son incubados a un intervalo de temperatura aproximada de 20-28°C, preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 22-26°C por un intervalo de tiempo de aproximadamente 20-50 horas, preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 24-48 horas, en donde se vuelven gradualmente rojos y se observan células en la

división celular debido a los mitógenos.

Los cultivos que muestran aumento en su densidad poblacional son seleccionados y llevados a la etapa de propagación y producción en recipiente.

En la etapa de propagación en recipiente se recomienda elaborar un preservado criogénico para guardar en tanques de nitrógeno líquido (en un intervalo de entre aproximadamente -160 a -180°C, preferiblemente a aproximadamente -170°C) por un tiempo aproximado de dos a tres meses.

Propagación y producción en recipiente:

Las células en placa son llevadas a cultivo en recipientes con medio de cultivo para crecimiento de líneas celulares de insectos, para los propósitos de la presente invención se prefieren recipientes de fondo plano con un área superficial en un intervalo de aproximadamente 200-300 cm², más preferiblemente recipientes de aproximadamente 225 cm² de superficie; para esto, a manera de ejemplo se utilizan aproximadamente 200 µl del cultivo de placa y se inocula en un intervalo de aproximadamente 200-350 µl, más preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 250-300 µl de medio de cultivo para cultivo de líneas celulares de insectos, de manera preferida medio de cultivo Schneider.

Los recipientes se incuban a un intervalo de aproximadamente 20-28°C, preferiblemente a un intervalo de aproximadamente 22-26°C durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10-14 días, preferiblemente durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 12-13 días (línea primaria). Durante este período de tiempo, las células forman una monocapa confluyente de células adheridas al recipiente, y el medio de cultivo se vuelve rojo como una señal positiva de producción de color.

Los recipientes se revisan aproximadamente cada 24 horas para evaluar y comprobar la presencia de mitosis en las líneas celulares.

Al finalizar el ciclo, los cultivos se recolectan y se ordeña o cosecha el color de cada uno de los recipientes de cultivo.

La “ordeña” o “cosecha” se hace en un ambiente sanitizado y cada cosecha es centrifugada en recipientes, para efectos de la presente invención se prefieren tubos cónicos de una capacidad de aproximadamente 40-60 ml de volumen, de manera más preferida a una capacidad de aproximadamente 50 ml, a un intervalo de velocidad de aproximadamente 3500-5500 rpm, preferentemente 4000-5000 rpm por un intervalo de tiempo aproximado de entre 18-22 minutos, preferiblemente aproximadamente 20 minutos, con el propósito de eliminar los detritus celulares y solamente recuperar el sobrenadante que es en este caso: “El pigmento” (ácido carmínico).

Es importante mencionar que el arte previo divulga que con los métodos convencionales de producción de ácido carmínico se requieren miles de insectos para producir aproximadamente 1 kg de ácido carmínico (AC), además se requiere una planta hospedera de alta calidad que en estos casos es la planta del nopal *Opuntia ficus-indica*, que debe ser reemplazada o cultivada de forma constante (costos) al igual que un control fitosanitario preventivo y profiláctico de la penca que implica empleo de recursos humanos para el cuidado constante del cultivo; para las cosechas se requieren cumplir ciclos de crecimiento de 80-90 días para que el insecto crezca, alcance la edad adulta

y se coseche; además, para la producción de AC se requiere de un proceso de secado después de la cosecha en la cual hay mermas de producción naturales. Aproximadamente en una proporción 3:1 (insecto vivo: insecto seco), existe presencia de plagas y depredadores que merman producción en algunos momentos, hay costos de producción elevados por todo lo anteriormente expuesto, el precio internacional es monopolizado por los países que producen altas cantidades de AC, se fija el precio arbitrariamente por ser la única forma de producción y porque en los países altamente productores las condiciones biogeográficas permiten producir al año grandes cantidades por lo que se requieren de áreas de producción grandes para producir cantidades atractivas de AC.

En algunas modalidades de la presente invención, la propagación y producción en recipiente del ácido carmínico se puede realizar en recipientes tales como, pero sin ser limitativos a, botellas de cultivo de fondo plano, Matracas de Roux, biorreactores de mesa, biorreactores especializados, biorreactores industriales, recipientes en los que se lleve a cabo un proceso químico que involucra organismos, microorganismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos y/o microorganismos y/o cualquier otro recipiente o dispositivo adecuado donde se pueda llevar a cabo una reacción de propagación como la que se describe en la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1.- ESPECTRO DE ABSORCIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL AC EN BIOCULTIVO

Tabla de resultados:

ID de la muestra	Descripción	Absorbancia AC 494 nm	% AC
Muestra carmín std 95%	0.1 g	1.088	1.521
Muestra carmín lote 1	Lote rack anterior	0.0703	0.09823
Muestra carmín lote 2	0.1 g	0.5208	0.7277

La filtración se realizó con membrana PVOF (0.2 mm)/ calentamiento 30 minutos (55°C).

Ejemplo obtención del % AC con el resultado 3:

Fórmula: %AC = $0.5208 / 0.139 \times 0.1 \text{ g} = 37.46\%$

Ejemplo 2.- ESPECTRO DE ABSORCIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL AC EN BIOCULTIVO PURIFICADO

Tabla de resultados:

ID de la muestra	Descripción	Absorbancia AC 494 nm	% AC
Muestra dilución carmín std 95%	0.05 g	0.5562	0.7772

Ejemplo obtención del % AC:

Fórmula: $\%AC = 0.5562/0.139 \times 0.05 \text{ g} = 80.02\%$

Aunque se han descrito las modalidades de la invención precedente en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con el propósito de mejorar su comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención, sólo ilustran algunas de las variaciones que se encuentran comprendidas dentro del espíritu y alcance de la misma. Como será evidente para una persona con conocimientos medios en la materia, las variaciones o modificaciones que no se alejen del espíritu de la invención se encuentran dentro del alcance de la misma. Las descripciones de la literatura científica aquí citadas se incorporan de forma expresa como referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de ácido carmínico proveniente de insectos del género *Dactylopius coccus* (grana cochinilla), el método comprendiendo:

extraer hemocitos de hemolinfa de los insectos hasta obtener una solución que comprende células productoras de ácido carmínico;

precorrer una solución de gradiente de Percoll;

agregar la solución que comprende las células productoras de ácido carmínico a la solución precorrida de gradiente de Percoll para obtener una mezcla que comprende hemocitos;

purificar los hemocitos de la mezcla;

recuperar los hemocitos purificados;

cultivar los hemocitos purificados con medio de cultivo para cultivo de líneas celulares de insectos;

estimular y activar las líneas celulares de insectos; y

propagar las líneas celulares de insectos produciendo el ácido carmínico.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde extraer hemocitos de hemolinfa se realiza por perfusión del hemocele con una solución amortiguadora anticoagulante que comprende una base, una sal iónica, un agente quelante y un ácido orgánico;

en donde la solución de gradiente de Percoll se prepara con una solución salina de fosfatos;

en donde la etapa de precorrer el gradiente de Percoll se realiza mediante centrifugación; y,

en donde la etapa de purificar los hemocitos de la mezcla se realiza por centrifugación.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde antes de estimular y activar las líneas celulares, el método comprende seleccionar granulocitos y hemocitos jóvenes y cultivar las células seleccionadas con medio de cultivo para cultivo de líneas celulares de insectos.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde estimular y activar las líneas celulares comprende:

agregar una combinación de mitógenos en solución salina de fosfatos;

incubar las líneas celulares con la combinación de mitógenos agregada para generar cultivos; y

después de la incubación, seleccionar los cultivos que muestren aumento en su densidad poblacional.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde propagar las líneas celulares de insectos y producir el ácido carmínico comprende:

cultivar las células seleccionadas de los cultivos que muestren aumento en su densidad poblacional en recipientes con medio de cultivo para crecimiento de líneas celulares de insectos; y

recolectar los cultivos y cosechar el ácido carmínico (color) producido.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gradiente de Percoll se encuentra a aproximadamente 10-90%.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los cultivos se realizan durante un intervalo de

tiempo de aproximadamente 20-50 horas a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 20-28°C.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los cultivos que muestren aumento en densidad poblacional se preservan en fase criogénica con nitrógeno líquido.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la fase criogénica se lleva a cabo a una temperatura en un intervalo aproximado de entre -160°C a -180°C por un tiempo de aproximadamente 2-3 meses.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de extraer hemocitos de la hemolinfa comprende aproximadamente de 20 mg a aproximadamente 95 mg de cepas grávidas ovíparas del insecto *Dactylopius coccus* (cochinilla).

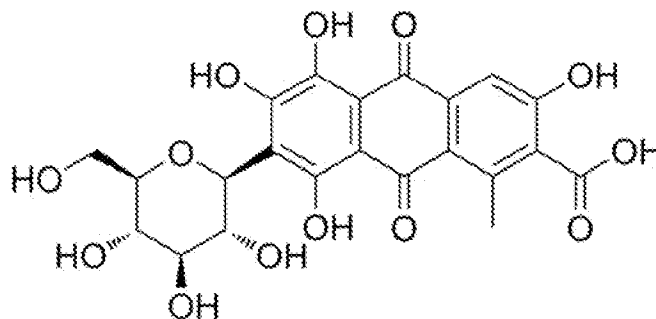
11. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la solución amortiguadora anticoagulante comprende de 0.25 mM a aproximadamente 0.75 mM de NaOH; un intervalo de aproximadamente 0.15 M a aproximadamente 0.50 M de NaCl; un intervalo de aproximadamente 0.10 mM a aproximadamente 0.25 mM de EDTA; un intervalo de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM de ácido cítrico; a un pH aproximado en un intervalo de 4.5-6.5.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la solución amortiguadora anticoagulante comprende preferiblemente 0.61 mM de NaOH; 0.56 M de NaCl; 0.16 mM de EDTA; 100 mM de ácido cítrico; a un pH aproximado en un intervalo de 4.5-6.5.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el medio de cultivo de líneas celulares de insectos es medio de cultivo Schneider.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los mitógenos son Concanavalina A a un intervalo de aproximadamente 0.20-0.30 micromoles con Fitohemaglutinina a un intervalo de aproximadamente 0.40-0.60 micromoles.

15. Ácido carmínico caracterizado porque comprende la estructura:



producido de acuerdo con el método de la reivindicación 1.

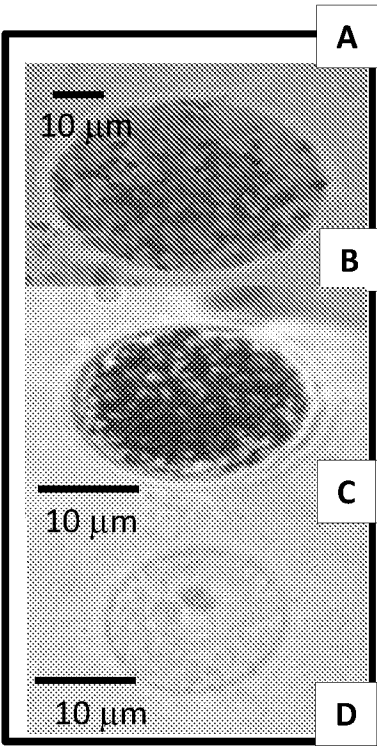


FIG. 1

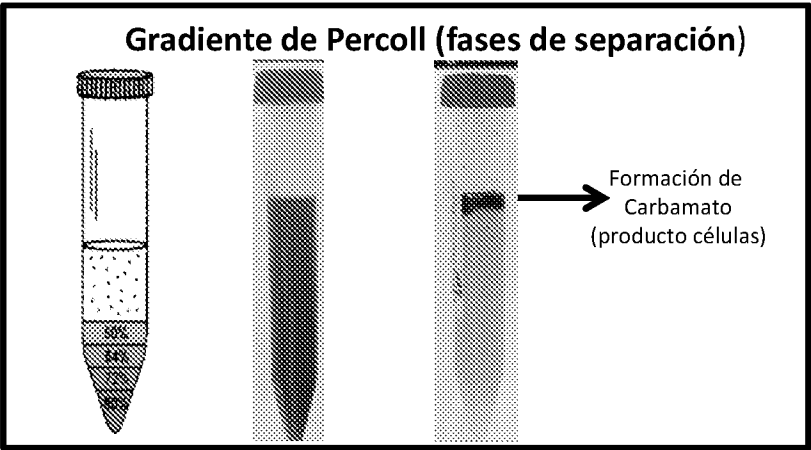


FIG. 2

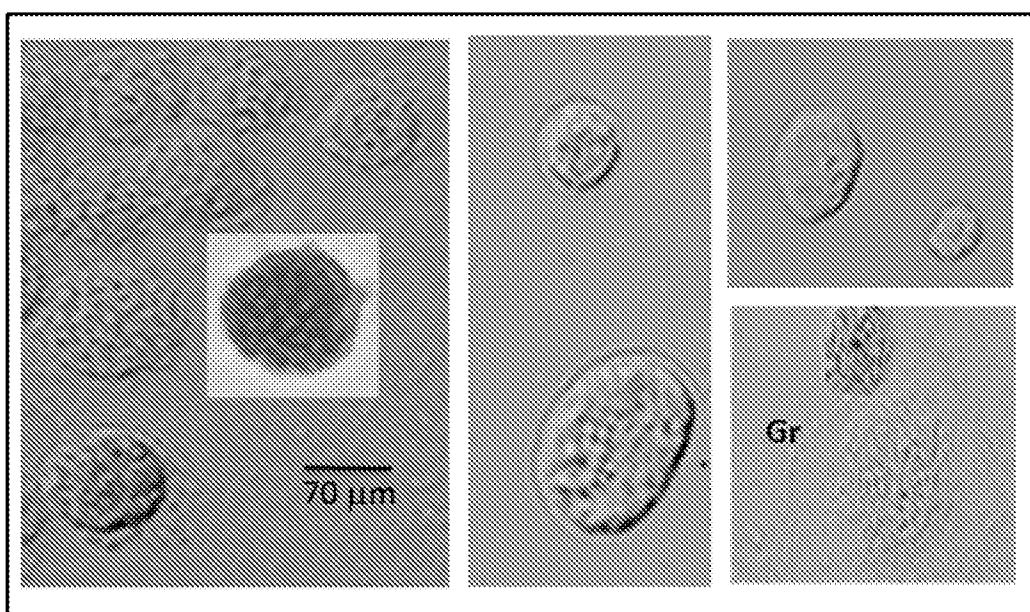


FIG. 3

Gr= Granulocitos

Microscopia de contraste de fases

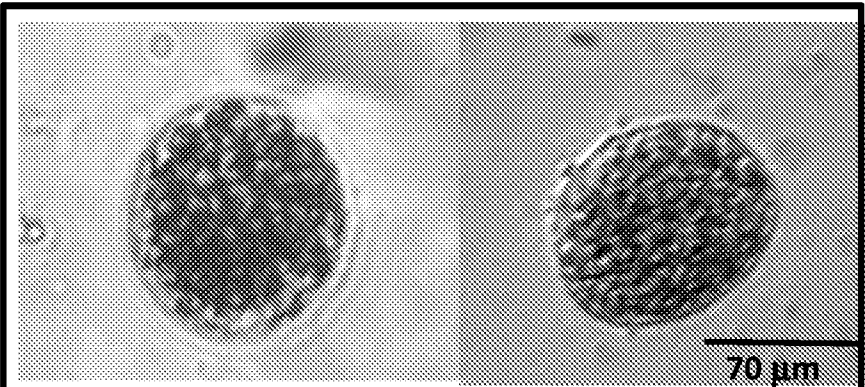


FIG. 4

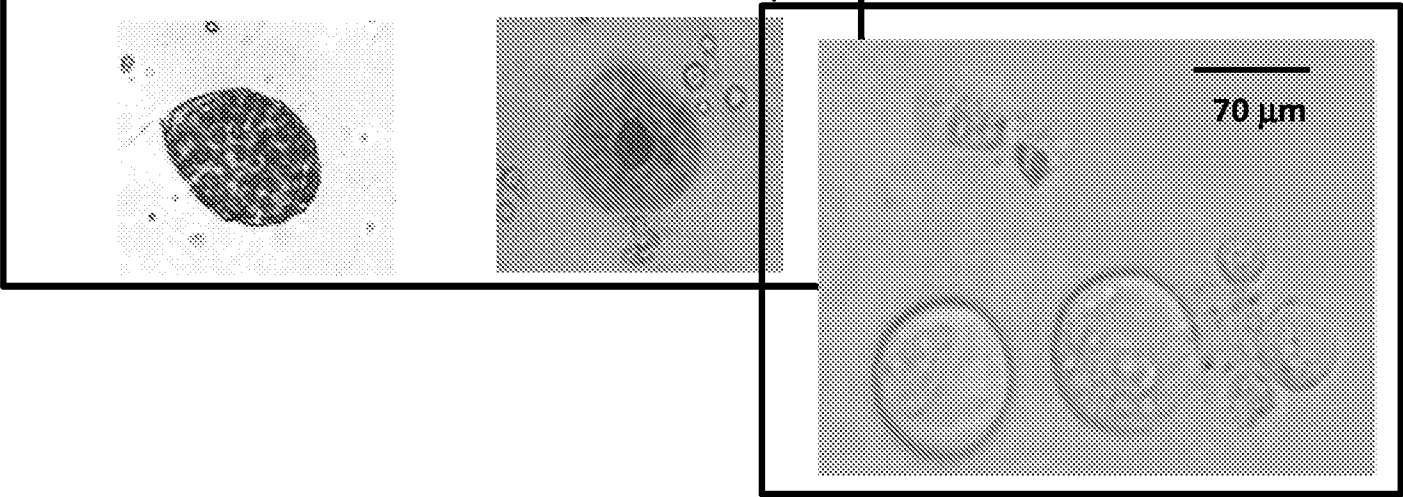


FIG. 5

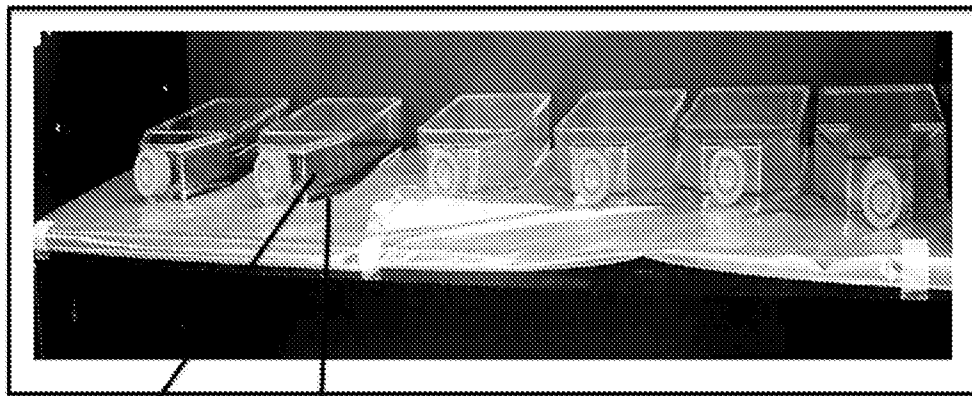
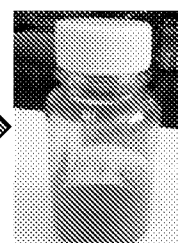
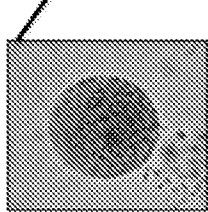


FIG. 6



Obtención de
AC Liquido

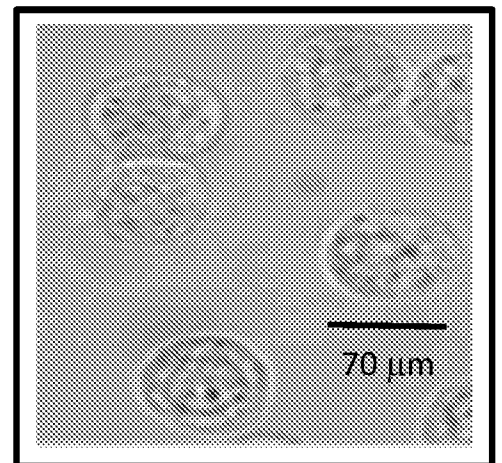
Obtención
de la Laca a
partir de
este proceso
de producción

Cultivo Celular en botella CA = 0.52% después de 48 hrs en botella de fondo plano



FIG. 7

**Incremento en
produccion de color**



**Observación integridad de
células día 25 postinoculación**

Gráfica de resultados:

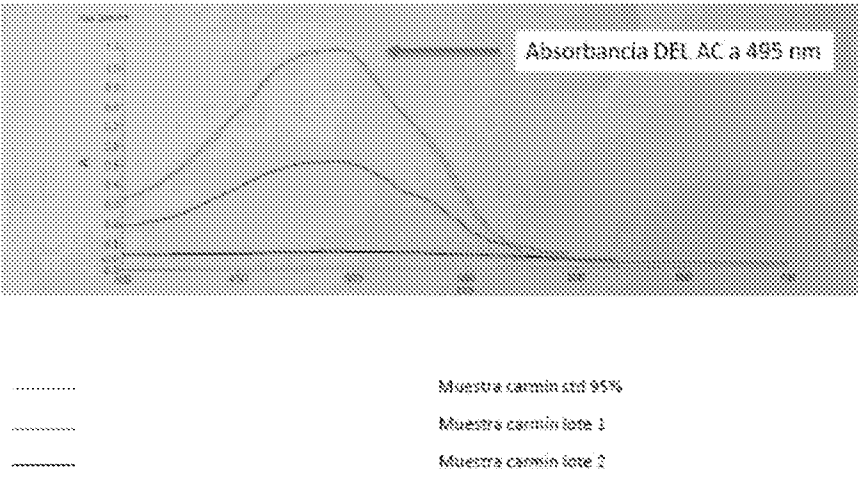
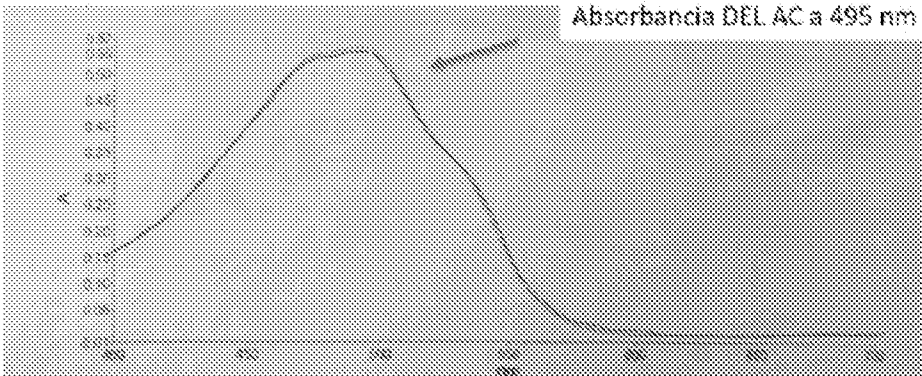


FIG. 8

Gráfica de resultados:



..... Muestra dilución carmín std 95%

FIG. 9

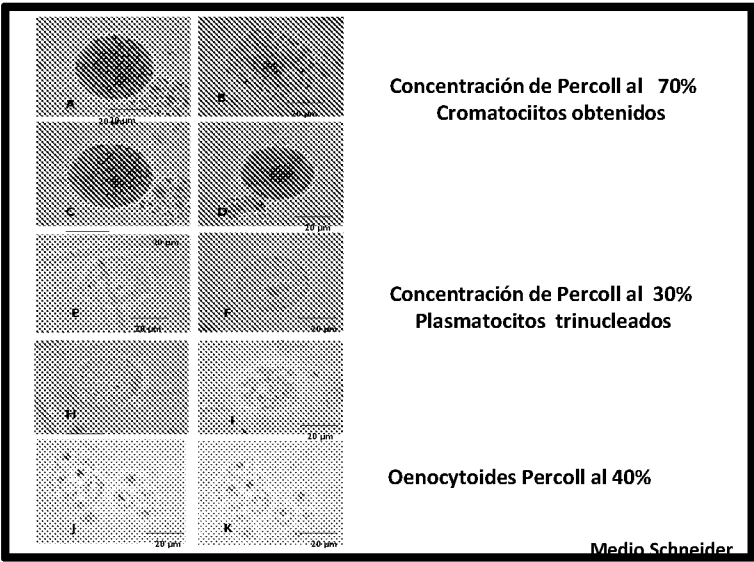
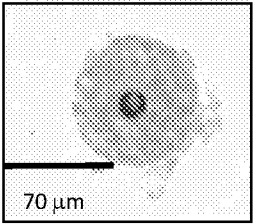
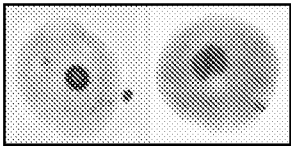


FIG. 10



Granulocito en cultivo
Día 8

FIG. 11



Granulocito en culture
Día 10

FIG. 12

FIG. 13

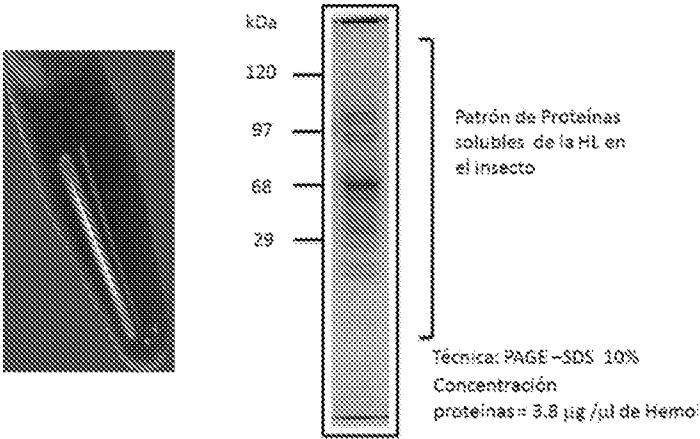
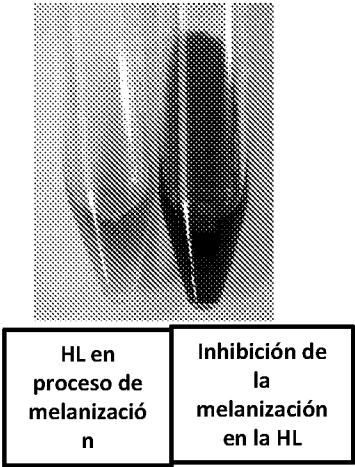


FIG. 14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/055774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(CIP) A01K 67/033, A23L 2/58, C09B 61/00, C07D 309/10 (2021.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

(CIP) A01K, A23L, C09B, C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORTES, D. "RELACIÓN DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO DE <i>Dactylopius coccus</i> COSTA (HEMIPTERA: DACTILOPIIDAE) EN LA SÍNTESIS DE ÁCIDO CARMÍNICO", TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EI TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA, CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS, UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, MEXICO, Pages 1-60, see the whole document (in ligne) 31.01.2013 (recuperated the 04.10.2021) Internet link : http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3098	15
X	CASELIN, S. et al., "CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HEMOCITOS DE LA HEMBRA DE <i>Dactylopius coccus</i> Costa (HEMIPTERA: COCCOIDEA: DACTILOPIIDAE)", Agrociencia, vol. 42, núm. 3, abril-mayo, 2008, páginas 349-355, Colegio de Postgraduados Texcoco, México, see the whole document (in ligne) 15-05-2008 [recuperated the 04-10-2021]. Internet link : https://www.redalyc.org/pdf/302/30211245009.pdf	15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12/10/2021

Date of mailing of the international search report

20/10/2021

Name and mailing address of the ISA/

INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194,
Piso 17, Santiago, Chile

Facsimile No.

Authorized officer

BOBADILLA RABOY, Andres

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/055774

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GONZALEZ M. et al, "CULTIVO in vitro DE CELULAS EMBRIONARIAS DE COCHINILLA (Dactylopius coccus Costa) A DIFERENTES pH", Nota Científica Rev. Fitotec. Mex. Vol. 25 (2), Pages 209-212, 2002, see the whole document (in ligne) 2002 [recuperated the 04-10-2021] Internet link : http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61025212 "cited in the application"	15

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/IB2021/055774

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

(CIP) A01K 67/033, A23L 2/58, C09B 61/00, C07D 309/10 (2021.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

(CIP) A01K, A23L, C09B, C07D

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

Derwent, Patentscope, Esp@cenet, Google Patent, Google, INAPI, BEIC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	CORTES, D. "RELACIÓN DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO DE <i>Dactylopius coccus</i> COSTA (HEMIPTERA: DACTILOPIIDAE) EN LA SÍNTESIS DE ÁCIDO CARMÍNICO", TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA, CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS, UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, MEXICO, PÁGINAS 1-60, Ver todo el documento, [en línea] 31-01-2013 [recuperado 04-10-2021]. Recuperado de Internet: http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3098	15
X	CASELIN, S. et al., "CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HEMOCITOS DE LA HEMBRA DE <i>Dactylopius coccus</i> Costa (HEMIPTERA: COCCOIDEA: DACTILOPIIDAE)", <i>Agrociencia</i> , vol. 42, núm. 3, abril-mayo, 2008, páginas 349-355, Colegio de Postgraduados Texcoco, México, Ver todo el documento, [en línea] 15-05-2008 [recuperado 04-10-2021]. Recuperado de Internet: https://www.redalyc.org/pdf/302/30211245009.pdf	15

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
12/10/2021 12/octubre/2021	20/10/2021 20/octubre/2021

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile	BOBADILLA RABOY, Andres
N° de fax	N° de teléfono 56-2-28870551

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2021/055774

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	GONZALEZ M. et al, "CULTIVO in vitro DE CELULAS EMBRIONARIAS DE COCHINILLA (Dactylopius coccus Costa) A DIFERENTES pH", Nota Científica Rev. Fitotec. Mex. Vol. 25 (2), páginas 209-212, 2002, Ver todo el documento, [en línea] 2002 [recuperado 04-10-2021] Recuperado de Internet: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61025212 "Citado en la solicitud"	15