

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

Prospecção de pigmentos produzidos por cochonilhas *Ceroplastes* spp. para aplicação em alimentos

Rosane Lopes Crizel

Pelotas, 2017

Rosane Lopes Crizel

Prospecção de pigmentos produzidos por cochonilhas *Ceroplastes* spp. para aplicação em alimentos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Fábio Clasen Chaves

Coorientador: Prof. Moises João Zotti

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C928p Crizel, Rosane Lopes

Prospecção de pigmentos produzidos por cochonilhas
Ceroplastesspp. para aplicação em alimentos. / Rosane
Lopes Crizel ; Fabio Clasen Chaves, orientador ; Moises
João Zotti, coorientador. — Pelotas, 2017.

62 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de
Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,
2017.

1. Inseto. 2. Corantes. 3. Ceras. 4. Cromatografia. 5.
Espectrometria de massas. I. Chaves, Fabio Clasen, orient.
II. Zotti, Moises João, coorient. III. Título.

CDD : 664

Rosane Lopes Crizel

Prospecção de pigmentos produzidos por cochonilhas *Ceroplastes* spp. para aplicação em alimentos

Data da defesa: 20 de fevereiro de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira. Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.

Dr^a. Leticia Neutzling Rickes. Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a. Luciana Prietto. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar meus passos na direção correta.

Aos meus pais, Reginaldo e Celeida e irmãos Renato e Carina pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu namorado Lazaro, pela presença amorosa, paciência, cuidado, preocupação e por me incentivar a ser sempre melhor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio Chaves, pela orientação, paciência e ensinamentos, que desde a graduação vem contribuindo grandemente com meu crescimento profissional e pessoal. Deixo aqui minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Moises Zotti, pela disponibilidade do laboratório e orientações. À Leticia Rickes e Ciro Guidotti, pelo auxílio nas análises moleculares, amizade e momentos de descontração.

À Dr. Ana Peronti, pela gentileza e disposição na identificação dos insetos.

As colegas de laboratório Jessica Hoffmann, Bianca Camargo, Marcela Garcia e estagiários Nathan Lobler e Francine Bonemann pela ajuda, amizade e momentos de descontração. À Nathalia Madruga, minha companheira de jornada, pela amizade, companheirismo e principalmente por dividir comigo as alegrias e angustias durante este período.

As colegas do departamento, Giovana Zandoná, Mariana Antunes, Franciene Vilanova, Graziela Bruni, Jarine Amaral e Luciana Prietto pela amizade e apoio.

As minhas amigas Ellen Perin, Joyce Borowski e Giseli Crizel pela amizade e pelo apoio nas mais diversas situações.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa.

E, finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

Resumo

CRIZEL, Rosane Lopes. **Prospecção de pigmentos produzidos por cochonilhas *Ceroplastes* spp. para aplicação em alimentos**. 2017. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O extrato de cochonilha, ou carmim, é um corante produzido por *Dactylopius coccus* (Costa) (Hemiptera: Dactylopiidae) amplamente utilizado pelas indústrias alimentícias, cosméticas e têxteis. Entretanto existem outras espécies de insetos que também produzem produtos naturais incluindo pigmentos com potencial para aplicação comercial. Porém, as informações sobre o conteúdo de metabólitos especializados destas espécies ainda são limitadas. Nesse sentido, técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas, podem ser utilizadas a fim de identificar e quantificar estes compostos. Com isso, objetivou-se identificar duas espécies de cochonilhas de ocorrência no Sul do Brasil e caracterizá-las quimicamente por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Foram utilizadas análises de características moleculares e morfológicas para identificação dos insetos. Os extratos semi-polares foram avaliados por LC-MS, enquanto que a GC-MS foi utilizada para avaliação da fração lipofílica. A identificação molecular revelou que ambos os insetos coletados pertencem à família Coccidae e com o uso de uma chave taxonômica, foi inferido que as espécies são *Ceroplastes glomeratus* e *Ceroplastes grandis*. A análise por LC-MS demonstrou diferenças majoritariamente quantitativas entre as espécies. Em *C. grandis* o principal constituinte do extrato semi-polar foi o ácido ceroalbolínico, enquanto que para a espécie *C. glomeratus* foi o ácido carmínico - o principal composto presente no carmim produzido por *D. coccus*. A análise por GC-MS do material ceroso também distinguiu as duas espécies. Em *C. grandis* hidrocarbonetos foi o grupo predominante enquanto em *C. glomeratus* predominaram açúcares. Com base nos resultados, pode-se concluir que a espécie *C. glomeratus* é uma potencial fonte de extrato de vermelho carmim, no entanto, a extração e o rendimento do composto podem ser limitados devido à grande quantidade de camada cerosa no corpo dos insetos.

Palavras-chave: inseto, corantes, ceras, cromatografia, espectrometria de massas.

Abstract

CRIZEL, Rosane Lopes. **Prospecting pigments produced by scale insects *Ceroplastes* spp. for application in food.** 2017. 62p. Dissertation (Masters in Food Science and Technology) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Cochineal extract, or carmine, is a dye produced by *Dactylopius coccus* (Costa) (Hemiptera: Dactylopiidae) widely used by the food, cosmetic, and textile industries. However, there are other insect species that also produce natural products including pigments with potential for commercial application. Information on the content of specialized metabolites of these species is still limited. In this context, chromatography techniques coupled with mass spectrometry can be used to identify and quantify these compounds. The objective of this study was to identify two cochineal species in southern Brazil and characterize them chemically by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Molecular and morphological characteristics were analyzed to identify the insects. Semi-polar extracts were evaluated by LC-MS, while GC-MS was used to evaluate the lipophilic fraction. Molecular identification revealed that both insects collected belong to the Coccidae family and using a taxonomic key it was inferred that the species were *Ceroplastes glomeratus* and *Ceroplastes grandis*. LC-MS analysis showed mostly quantitative differences between species. In *C. grandis*, the main constituent of the semi-polar extract was ceroalbolinic acid, whereas for *C. glomeratus* species it was carminic acid - the main compound in carmine produced by *D. coccus*. GC-MS analysis of the waxy material also distinguished the two species. In *C. grandis* hydrocarbons was the predominant group whereas in *C. glomeratus* predominated sugars. Based on these results, it can be concluded that *C. glomeratus* is a potential source of red carmine, however, extraction and yield of the compound may be limited due to the large amount of waxy layer covering the body of the insects.

Keywords: insect, dye, wax, chromatography, mass spectrometry.

Lista de Figuras

Figura 1 – Fórmula estrutural do Ácido Carmínico	15
Figura 2 – Estrutura química da Laca de Carmim	16
Figura 3– Fórmulas estruturais dos ácidos quermésico, ceroalbolínico e lacaico.	17
Figura 4 - Via de biossíntese de antraquinonas em insetos. Adaptado de SHAMIM et al., 2014.....	21
Figura 5 - Estrutura química do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (2,2-azinobis,3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).	23
Figura 6- Espécies de cochonilhas coletadas em seus respectivos hospedeiros, (A) Cochonilha 1 em <i>Schinus terebinthifolius</i> . (B) Cochonilha 2 em <i>Caliandra brevipes</i> benth.....	25
Figura 7- Eletroforese em gel de agarose realizada com o cDNA de C1 e C2 e com primers de seis espécies de cochonilhas com base em genes disponíveis no NCBI.....	34
Figura 8- Características anatômicas distintivas de <i>Ceroplastes grandis</i> (fotos à esquerda) e <i>Ceroplastes glomeratus</i> (fotos à direita).....	36
Figura 9-Cromatogramas de íons extraídos dos compostos ácido ceroalbolínico m/z 329,0294 e ácido carmínico m/z 491,0903, ácido lacaico m/z 313,0391 e ácido quermésico m/z 329,0375 de <i>C. grandis</i> , <i>C. glomeratus</i> e corante comercial.	38
Figura 10- Espectros de massas de alta resolução dos compostos ácido carmínico m/z 491,0903 (A) (34,6 eV), ácido ceroalbolínico m/z 330,0375 (B) (26,5 eV), ácido lacaico m/z 314,0426 (C) (25,7 eV) e ácido quermésico m/z 329,0375 (26,5 eV) encontrados em cochonilha	40
Figura 11- Proposta de fragmentação dos compostos ácido carmínico m/z 491,0903, ácido ceroalbolínico m/z 330,0375, ácido lacaico m/z 314,0426 e ácido quermésico m/z 329,0325.	41
Figura 12- Capacidade antioxidante de extratos polar de <i>C. grandis</i> , <i>C. glomeratus</i> e do corante comercial.	42
Figura 13- Cromatograma da fração não-derivatizada de <i>C. grandis</i> (a), <i>C. glomeratus</i> (B) e da fração derivatizada de <i>C. grandis</i> (C) e <i>C. glomeratus</i> (D).	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Primers utilizados para a identificação molecular das cochonilhas	27
Tabela 2- Quantificação em relação ao padrão interno dos compostos ácido carmim, ácido ceroalbolínico e ácido D-lacaico de <i>Ceroplastes grandis</i> e <i>C. glomeratus</i> e corante comercial.....	39
Tabela 3- Metabólitos identificados em cochonilhas <i>Ceroplastes grandis</i> , <i>C. glomeratus</i> e no corante comercial pó e líquido.	44
Tabela 4- Compostos identificados por GC-MS em extratos não derivatizados de <i>C. grandis</i> e <i>C. glomeratus</i>	49
Tabela 5- Compostos identificados por GC-MS nos extratos derivatizado de <i>Ceroplastes grandis</i> e <i>C. glomeratus</i>	51

Sumário

1 Introdução	10
2. Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 Revisão da literatura	13
3.1 Corantes.....	13
3.2 Corantes produzidos por insetos.....	14
3.3 Biossíntese.....	19
3.4 Atividade antioxidante	21
3.5 Espectrometria de massas em produtos naturais	23
4 Material e métodos.....	25
4.1 Material.....	25
4.2 Identificação dos insetos	25
4.2.1 Identificação molecular.....	25
4.2.2 Identificação morfológica.....	28
4.3 Análise cromatográfica por LC-MS.....	29
4.3.1 Preparo dos extratos	29
4.3.2 Instrumentação e condições analíticas.....	29
4.3.3 Processamento dos dados e identificação dos metabolitos	30
4.3.4 Potencial antioxidante pelo método de captura dos radicais DPPH e ABTS....	30
4.4 Análise cromatográfica por GC-MS.....	31
4.4.1 Preparo dos extratos	31
4.4.2 Instrumentação e condições para GC-MS.....	32
4.4.3 Processamento dos dados e identificação dos metabólitos	32
5 Resultados e discussão.....	33

5.1 Identificação dos insetos	33
5.1.1 Identificação molecular	33
5.1.2 Identificação morfológica	35
5.2 Análise cromatográfica por LC-MS	36
5.3 Análise cromatográfica por GC-MS	45
6 Considerações finais	53
7 Referências	54

1 Introdução

A aparência dos alimentos é tão importante quanto seu sabor e portanto a indústria alimentícia vem ampliando a utilização de corantes para tornar alimentos mais atraentes e com aspecto mais próximo ao natural (GONZÁLEZ et al., 2002; GIMÉNEZ et al., 2015). No entanto, os consumidores estão cada vez mais considerando os corantes sintéticos como indesejáveis ou prejudiciais. Além disso, a organização mundial da saúde (OMS) e a agência europeia de segurança alimentar (EFSA) tem restringido a utilização de corantes sintéticos como aditivos alimentares (WROLSTAD; CULVER, 2012). Com isso, têm se aumentado a necessidade de utilização de pigmentos provenientes de recursos naturais.

O vermelho carmim é um corante natural obtido de fêmeas adultas de cochonilhas *Dactylopius coccus* Costa, que se alimentam de cactos selvagens e são produzidas no Peru, México, Bolívia, Chile e Espanha (Ilhas Canárias) (BORGES et al., 2012). Também conhecido como extrato de cochonilha ou carmim, este corante é utilizado em vários produtos alimentícios tais como iogurtes, *smoothies*, bebidas de fruta, biscoitos, doces e suplementos alimentares (GONZÁLEZ; GARCÍA; NAZARENO, 2010). O principal pigmento presente no extrato desta cochonilha é o ácido carmínico, porém já foram encontrados nesta espécie outros compostos análogos, como: ácido quermésico, ácido ceroalbolínico e diferentes formas do ácido lacáico (LLOYDE, 1980; GONZÁLEZ et al., 2002).

Outro gênero de cochonilhas que apresenta importância econômica e vasta riqueza de espécies é o *Ceroplastes* spp., que se encontra distribuído principalmente na África e na América do Sul (PERONTI; SOUSA-SILVA; WILLINK, 2008; CAMACHO; CHONG, 2015). Por sua capacidade de infestação em culturas agrícolas e hortícolas, florestais e plantas ornamentais, aliado aos danos causados e sua característica de construir grandes populações em uma planta, estes insetos são considerados pragas econômicas graves (ROSA et al., 2016). No entanto, existem poucos estudos sobre sua composição química, e uma das informações conhecidas é que um dos principais compostos presente em espécies deste gênero é o ácido ceroalbolínico (LLOYDE, 1980). Logo, mais estudos que caracterizem quimicamente essas espécies podem contribuir tanto para identificação e possível aplicação tecnológica de compostos dessas espécies como para compreensão de suas relações ecológicas e facilitação do seu manejo.

Para a investigação e a caracterização desses compostos, primeiramente é

necessária a separação dos compostos de um extrato bruto por métodos cromatográficos como por cromatografia líquida (LC) e/ou cromatografia gasosa (GC), para posteriormente analisar a composição química por métodos espectroscópicos, como espectrofotometria em comprimentos de onda da região do ultravioleta e visível, espectrometria de massas (MS), e/ou ressonância magnética nuclear (RMN). Com os recentes avanços nas técnicas analíticas, as cromatografias líquida e gasosa acopladas à espectrometria de massas (LC-MS e GC-MS), tem a capacidade de proporcionar um perfil detalhado da amostra, sendo possível obtenção de informações sobre a massa exata dos compostos, seu perfil de fragmentação e, conseqüentemente, informações sobre as suas fórmula molecular e estrutural (HALKET et al., 2005).

Contudo, abordagens analíticas sobre extratos de *Ceroplastes* spp., visando a caracterização de metabólitos, efetuando a prospecção de novos compostos pela utilização de técnicas eficientes de identificação, podem trazer vantagens não só pela identificação de novos compostos, mas bem como identificar compostos de potencial uso como corantes naturais.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Identificação de cochonilhas de ocorrência na região de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil e a caracterização dos compostos produzidos por estes insetos visando à prospecção de fontes alternativas de compostos com potencial para utilização como corantes naturais em alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar a identificação molecular das espécies
- b) Realizar a identificação morfológica das espécies
- c) Avaliar os compostos semi-polares por LC-MS
- d) Avaliar os compostos apolares por GC-MS
- e) Identificar compostos com potencial para utilização como corantes naturais em alimentos.

3 Revisão da literatura

3.1 Corantes

Desde o início das civilizações, corantes são utilizados para tornar alimentos mais atraentes. As cores desempenham papel crucial na aceitação dos produtos, podendo exercer efeito estimulante ou inibidor de apetite (GIMÉNEZ et al., 2015). Dessa forma, a indústria alimentícia vem ampliando a utilização de corantes para obtenção de produtos que satisfaçam as exigências dos consumidores (CONSTANT, STRINGHETA, SANDI, 2002). Além disso, a utilização dos corantes não se restringe somente a área alimentícia, mas podem também ser empregados na coloração de têxteis, cosméticos, plásticos e medicamentos (ANTONIO-CISNEROS et al., 2015).

Na área alimentícia, corantes são todas as substâncias adicionadas que visam conferir, restaurar e/ou intensificar a cor dos alimentos (BRASIL, 1977). De acordo com a resolução nº 44/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde, os corantes permitidos em alimentos são classificados em: corantes orgânicos naturais, obtidos de vegetais ou animais; corantes orgânicos sintéticos, obtidos por síntese orgânica; corantes artificiais, corantes orgânicos sintéticos não encontrados em produtos naturais; corantes orgânicos sintéticos idênticos ao natural que apresentam estrutura química semelhante aos corantes orgânicos naturais; corantes inorgânicos, obtidos a partir de substâncias minerais; e caramelo, obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.

A utilização de corantes em alimentos além de estar relacionada a aspectos de qualidade sensorial, também está associada à benefícios à saúde e à segurança dos consumidores. A organização mundial da saúde (OMS), a agência europeia de segurança alimentar (EFSA), a agência dos Estados Unidos que regulamenta alimentos e medicamentos (FDA) e outras instituições tem restringido a utilização de corantes sintéticos em alimentos ou bebidas, por suspeita ou confirmação de associações com reações alérgicas e/ou efeitos tóxicos (GAMARRA et al., 2009; MARTELLI et al., 2014; GIMÉNEZ et al., 2015). Além disso, há estudos que relatam a possível ligação entre o consumo dos corantes artificiais tartrazina, amarelo quinolina, amarelo crepúsculo, azorrubina, ponceau 4R e vermelho 40 e do

conservante benzoato de sódio com o aumento da hiperatividade em crianças (McCANN, et al., 2007).

A tendência dos fabricantes de alimentos é ir progressivamente em direção à utilização dos corantes naturais, por serem mais aceitos internacionalmente e por alguns deles também apresentarem potencial funcional e nutricional (WROLSTAD; CULVER, 2012). As principais fontes para obtenção de corantes naturais são plantas (folhas, flores e frutos), insetos e micro-organismos (fungos e bactérias) (MENDONÇA, 2011). A pesquisa em relação aos corantes se concentra em três principais áreas: tecnologia de formulação, tecnologia de processamento e fontes alternativas de pigmentos. Essas pesquisas mostram-se bem sucedidas e estão contribuindo para o aumento da utilização de corantes naturais na indústria de alimentos e bebidas (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

3.2 Corantes produzidos por insetos

Os insetos são considerados o maior grupo de animais, com mais de 800.000 espécies identificadas. Os insetos têm a capacidade de sintetizar ou adquirir diversos compostos para sua defesa e/ou comunicação incluindo uma variedade de metabólitos especializados (SHAMIM et al., 2014). Insetos já são tradicionalmente consumidos em 113 países e mais de 2.000 espécies são consideradas comestíveis. Os insetos tem grande potencial para utilização como alimentos, visto que são altamente nutritivos, apresentam elevado teor de gordura, proteínas, minerais e vitaminas. Além da produção de seda, cera e corantes, vários produtos derivados de insetos são utilizados como ingredientes alimentares ou são consumidos para fins medicinais. Estes incluem, por exemplo, mel de abelha, corante alimentar (vermelho de cochonilha) e produtos farmacêuticos, como: própolis, geleia real e veneno de abelhas (RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013).

Dentre os principais grupos de insetos, encontram-se as cochonilhas, que pertencem à ordem Hemiptera e são consideradas pragas em diversos sistemas de produção. Tendo em vista a sua importância, dentre os gêneros de cochonilha, pode-se destacar *Dactylopius* spp. e *Ceroplastes* spp., pertencentes às famílias Dyctilopiidae e Coccidae, respectivamente.

Insetos pertencentes ao gênero *Dactylopius* ocorrem no México e nos países andinos, como Equador, Peru e Bolívia e se desenvolvem em diferentes espécies de

cactos, principalmente *Opuntia* e *Nopalea* (PÉREZ QUIROZ, 2014).

As cochonilhas do gênero *Dactylopius coccus* produzem o pigmento denominado corante vermelho carmim, amplamente utilizado pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosmética e têxteis (PERKIN, 2016). O corante é obtido a partir da extração de fêmeas dessecadas dos insetos e o principal constituinte é o ácido carmínico, que apresenta fórmula molecular $C_{22}H_{20}O_{13}$ e nomenclatura oficial pela IUPAC ácido 7-D-glucopiranosil-7-D-glucopiranosil-9,10-dihidroxi-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxi-2-antraceno-carboxílico (Figura 1) (ALVAREZ, 2003).

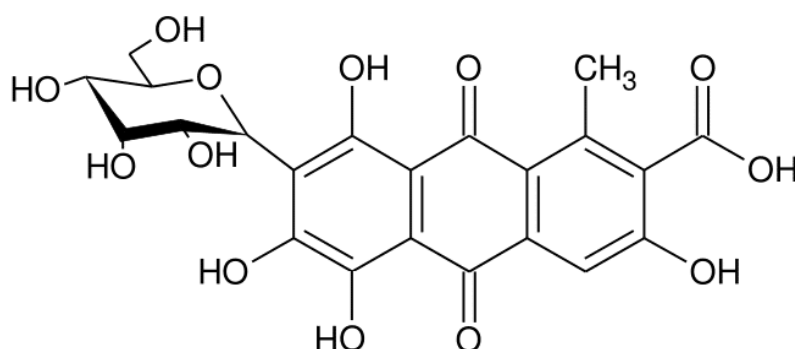


Figura 1 – Fórmula estrutural do Ácido Carmínico

Este corante natural é considerado seguro para a saúde humana e é aprovado por diferentes agências internacionais incluindo a agência reguladora dos Estados Unidos (FDA), a União Europeia e o comitê internacional de especialistas em aditivos alimentares (JECFA) administrado pela FAO/OMS (PÉREZ QUIROZ, 2014). No entanto, casos de asma e alergia alimentar envolvendo extrato de cochonilha foram relatados (BURGE et al., 1979; CHUNG et al., 2001). Essas reações alérgicas são supostamente causadas por proteínas derivadas do inseto que se complexam ao ácido carmínico (CHUNG et al., 2001). A principal proteína alergênica identificada em cochonilhas é a CC38K, que é uma fosfolipase já conhecida como alergênica em outros insetos (OHGIYA et al., 2009). Em função disso, a agência reguladora dos Estados Unidos (FDA) exige que todos os alimentos e cosméticos contendo extrato de cochonilha ou vermelho carmim apresentem nos seus rótulos a presença desses corantes (FERRER et al., 2005).

O ácido carmínico é solúvel em água e a sua coloração é dependente do pH do meio, em soluções ácidas é laranja e em soluções alcalinas é violeta, no entanto sua intensidade de cor é relativamente baixa, o que restringe sua aplicação

isoladamente, sendo necessário realizar a complexação com metais (ALVAREZ, 2003). A complexação do ácido carmínico com sais de metais como o cálcio ou alumínio, forma a “laca de carmim” (Figura 2). A laca de carmim contém 50% de ácido carmínico e sua solubilidade em soluções alcalinas é elevada, enquanto que em água quente e ácidos diluídos é pouco solúvel (VASQUES et al., 2000).

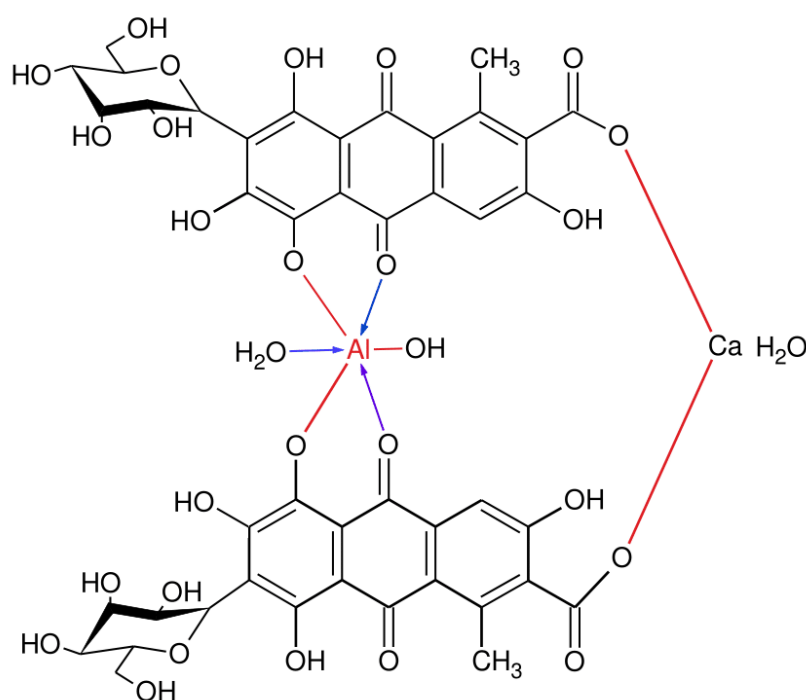


Figura 2 – Estrutura química da Laca de Carmim

Os complexos de ácido carmínico com metais produzem tons de vermelho brilhante e estáveis e são utilizados pelas indústrias têxteis, de cosméticos e alimentícias. Os processos de preparação da laca de carmim são geralmente patenteados e/ou mantidos em segredo pelos fabricantes (ALVAREZ, 2003).

Em 1995 eram produzidos 560 toneladas de cochonilhas, aumentando para 1.045 toneladas em 2000 e no ano de 2006 a produção alcançou 2.700 toneladas. Durante o período de 1995 a 2006 o Peru liderou a produção mundial com 85%, seguido do Chile, com 8%, Espanha (Ilhas Canárias), com 5% e Equador e Bolívia somados totalizando 2% (SANTOS, 2014).

Em 2011 e 2012, de acordo com o Sistema de Informação de Comércio Exterior (SIICEX) do Peru, o país exportou grande quantidade de insetos e do próprio carmim. O principal importador desses insetos é o Estados Unidos, com 53%, seguido do Japão com 28% e de outros países que somados representam 19%. Em relação ao carmim de cochonilha, o principal importador é a Alemanha,

com 19%, seguido do Brasil com 10% (SANTOS, 2014).

Apesar do ácido carmínico ser o principal constituinte do corante vermelho carmim, produzido por *Dactylopius coccus*, outros compostos análogos também já foram elucidados nesta espécie, como o ácido quermésico, o ácido ceroalbolínico e o ácido lacaico (Figura 3) (LLOYDE, 1980). King e Meinwald (1996) propuseram que esses compostos são produzidos como forma de proteção do inseto. O ácido carmínico por exemplo funcionaria como um fator de dissuasão do seu consumo por formigas. Além disso, outros insetos como o besouro coccinelídeo são conhecidos por se alimentar de cochonilhas e usar o ácido carmínico adquirido para sua própria defesa (KING; MEINWALD, 1996).

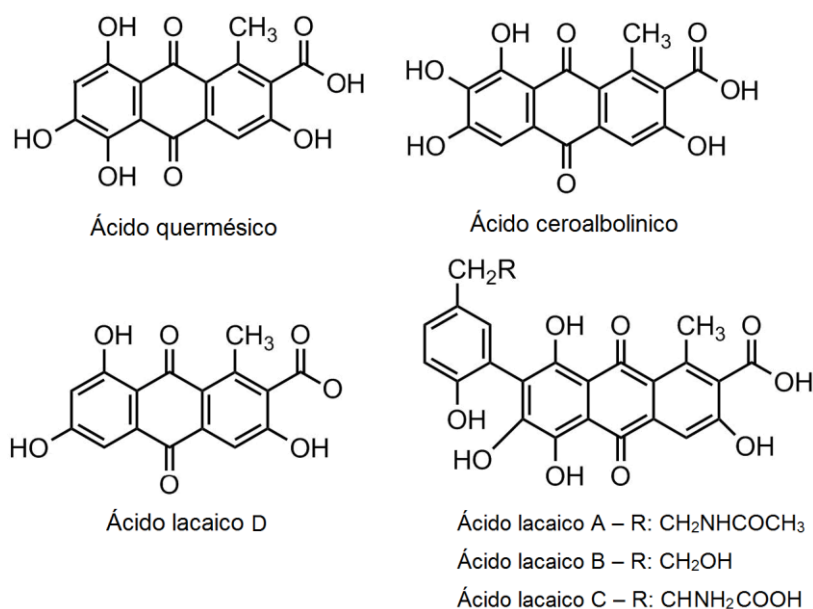


Figura 3– Fórmulas estruturais dos ácidos quermésico, ceroalbolínico e lacaico.

Outro gênero de cochonilhas que apresenta importância econômica e vasta riqueza de espécies é o *Ceroplastes* spp., popularmente conhecidas como cochonilhas cerosas, são diferenciadas das demais por apresentarem espessa carapaça cerosa que recobre o corpo das fêmeas adultas. A cera geralmente apresenta-se dividida em placas que se desenvolvem ao redor de núcleos centrais, variando conforme a espécie, em forma, consistência, cor e tamanho (PERONTI; SOUSA-SILVA; WILLINK, 2008).

As secreções de cera têm a finalidade de proteger as cochonilhas contra a perda excessiva de água (dessecação), condições de excesso (chuvas), ataque de inimigos naturais, entrada de produtos químicos e contaminantes (FERREIRA et al., 2005). As ceras também apresentam importância econômica, na China, por

exemplo, são cultivados insetos para produção de ceras, que são utilizadas para elaboração de velas, revestimento de comprimidos, para realçar brilho de produtos de couro e pneus, entre outros (KONDO et al., 2008). No Brasil, os açúcares presentes na cera de cochonilhas *Stigmacoccus* spp. são utilizados por abelhas para produção de mel, que é exportado para Alemanha, com preço até 20% superior ao mel floral orgânico (BOGO; MANTLE, 2000).

As cochonilhas são bastante semelhantes nas primeiras fases (ovo e ninfa) e a diferenciação começa quando as fêmeas movem-se para tornar-se adultos. Ninfas recém-nascidas possuem uma coloração levemente rosada e permanecem próximo a mãe até seu corpo ser coberto por cera. Elas podem ter uma mobilidade de um a cinco dias e em seguida se fixam para se alimentar, permanecendo nessa posição até a conclusão do desenvolvimento. O período de oviposição pode variar de 30 a 50 dias e as fêmeas põem de 100 a 350 ovos. Subsequentemente seu corpo encolhe até que ocorra a morte. O ciclo de vida e o comportamento dependem de diferentes fatores ambientais como: umidade, luz e temperatura (ALVAREZ, 2003).

A identificação da grande maioria das cochonilhas só pode ser realizada através das suas características morfológicas e em muitos casos é bastante difícil, devido seu tamanho pequeno e elevado grau de semelhança, só sendo possível identificação de fêmeas em seu estado de desenvolvimento adulto (PARK et al., 2011). O método tradicional utilizado para esta identificação morfológica é um exame microscópio montado em slides, que exige uma preparação adequada da amostra e análise por taxonomista treinado. Outra técnica também utilizada que não é dificultada pelo polimorfismo, sexo ou grau de desenvolvimento é a identificação por análise molecular (DENG et al., 2013; ZHANG et al., 2012). No entanto, as sequências disponíveis em bancos de dados (NCBI, Boldsystems) ainda são bastante restritas, estando disponíveis apenas sequências de poucas espécies, e na sua maioria, apenas o gene do DNA mitocondrial que codifica para a subunidade 1 da enzima citocromo C oxidase (CO1).

As cochonilhas *Ceroplastes* encontram-se distribuídas por todas as regiões zoogeográficas, principalmente na África e na América do Sul, onde concentram os maiores registros de espécimes 36% e 37%, respectivamente (PERONTI; SOUSA-SILVA; WILLINK, 2008).

Segundo Carvalho (2003) nas praças e ruas de Curitiba, PR, 31% das árvores foram atacadas por cochonilhas cerosas. Normalmente, estes insetos vivem

agregados nos ramos, podendo cobri-los totalmente e raramente são encontrados nas folhas. Sua ocorrência vai do final do outono ao final da primavera. Estes insetos sugam a seiva dos ramos, deixando-os debilitados e eliminam substâncias açucaradas que são utilizadas como alimentos por algumas formigas. Essas formigas podem disseminar esporos de um fungo da família Perisporaceae, causando a doença denominada “fumagina”, caracterizada por um pó preto que cobre, principalmente, as folhas e os ramos das plantas. Com isso, plantas atacadas sofrem sérios prejuízos, chegando até mesmo a morte, devido fotossíntese, respiração e a transpiração serem prejudicados pela retirada da seiva e presença de fumagina (IEDE; MACHADO, 1989).

Segundo Lloyd (1980) e Ríos (1966), o principal constituinte de *Ceroplastes albolineatus* é o ácido ceroalbolínico, no entanto, ácido carminico, ácido quermésico e diferentes formas de ácido lacaico também foram encontradas nessa espécie. Komura et al. (1982) ao investigarem a composição de diferentes espécies de *Ceroplastes* que se desenvolvem no Japão (*C. ceriferus*, *C. floridense* e *C. rubens*) também identificaram o ácido ceroalbolínico como principal constituinte destas espécies. A composição de espécies do gênero *Ceroplastes* de ocorrência no Brasil, ainda não foi estudada.

O conhecimento da composição das ceras de espécies do gênero *Ceroplastes* spp. também é bastante limitado. Uma das poucas informações que se tem é sobre a composição da cera de *Ceroplastes pseudoceriferus*, descrita por Tamaki (1964). As ceras cuticulares de insetos podem conter as seguintes classes de compostos: hidrocarbonetos, ácidos graxos, álcoois, ésteres de cera, aldeídos e triacilgliceróis (GOLEBIOWSKI et al., 2010). A identificação e análise da composição das ceras são primordiais para desenvolvimento de métodos de controle e para elucidação da qualidade da cera produzida e avaliação de potenciais aplicações (SZAFRANEK et al., 2012).

3.3 Biossíntese

Os pigmentos produzidos por coccídeos pertencem à classe das antraquinonas, que são constituídas estruturalmente de um anel antraceno (tricíclico aromático) (SHAMIM et al., 2014). As antraquinonas são as principais representantes das quinonas naturais, cuja ocorrência além dos insetos são

encontradas também em algumas plantas (aloe, senna, rhubarb) e fungos. Há uma riqueza de estruturas conhecidas com variação no número de hidroxilas e outros substituintes (VELIŠEK; DAVÍDEK; CEJPEK, 2008).

Antraquinonas que ocorrem em diferentes coccídeos são utilizados como corantes. O pigmento vermelho veneziano, um dos mais antigos corantes, é composto por ácido quermésico produzido por *Kermococcus ilicius*, que se alimenta de carvalho. O corante vermelho carmim, produzido por cochonilhas *Dactylopius coccus* que se alimentam de cactos, é rico em ácido carmínico (SHAMIM et al., 2014). O corante laca, é um corante natural extraído da secreção do inseto *Coccus laccae* e a sua cor vermelha é derivada dos ácidos lacaico A, B, C e E (OKA et al., 1998). *Ceroplastes albolineatus*, *C. ceriferus*, *C. floridense* e *C. rubens* possuem coloração devido a presença majoritariamente de ácido ceroalbolínico (KOMURA; MIZUKAWA; MINAKATA, 1982; LLOYDE, 1980). Estes pigmentos são poli-hidroxi-antraquinonas muito semelhantes em estrutura química.

A resina de revestimento de vários insetos pigmentados, possui coloração amarelada também devido a presença de antraquinonas como desoxieritrolacim, eritrolacim e isoeritrolacim (PAUL, 2002).

Existem revisões das principais rotas metabólicas para biossíntese de antraquinonas (VAN DEN BERG, 1991; HAN; HEIJDEN; VERPOORTE, 2001; PAUL, 2002; SHAMIM et al., 2014) . As antraquinonas em insetos são formadas a partir da rota do acetato por ação de poliketídio sintases. Há inicialmente a formação de uma cadeia poliketídica a partir da condensação de um acetil-CoA e sete malonil-CoA que por descarboxilação de cada unidade malonil resulta em uma cadeia octacetídica. A cadeia poliketídica cicliza para uma antrona, que é novamente oxidada a uma antraquinona. Em alguns casos as enzimas glicosiltransferases transferem grupamentos açúcares para antraquinonas (HAN; HEIJDEN; VERPOORTE, 2001). A via poliketídica para a biossíntese de antraquinonas em insetos esta apresentada na figura 4.

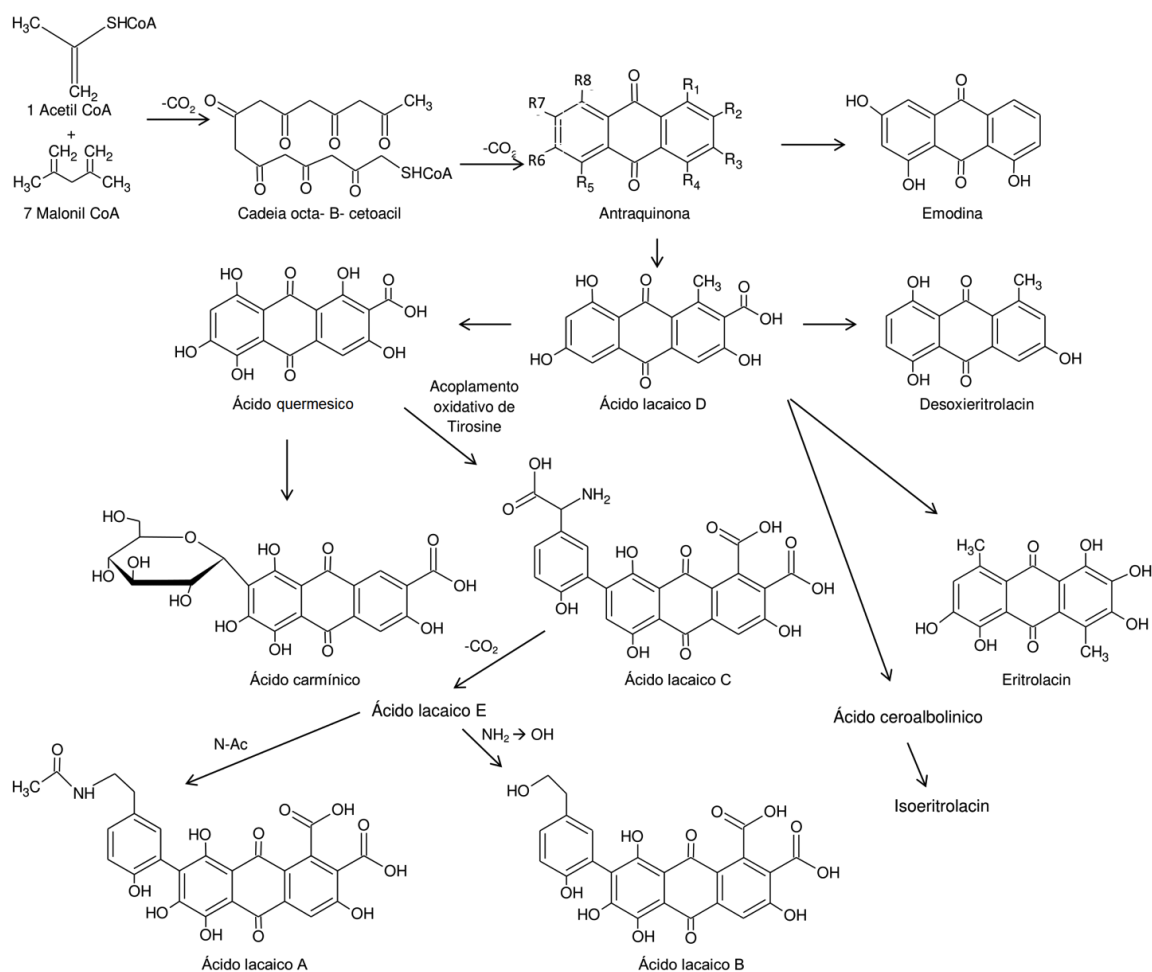


Figura 4 - Via de biossíntese de antraquinonas em insetos. Adaptado de SHAMIM et al., 2014.

3.4 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir os processos oxidativos biológicos, oriundos do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre, cloro, complexo de metais de transição e a remoção destes pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante (RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006).

O ácido carmínico, presente em extratos de cochinilhas é considerado um composto antioxidante, com uma variedade de atividades biológicas. Essas atividades são atribuídas principalmente às suas propriedades redox, que lhe possibilitam atuar como agente redutor, doador de hidrogênio e supressor de oxigênio singlete (LI; LIU; WU, 2009). Além disso, esse composto também possui capacidade de complexação com íons metálicos e de inibição de enzimas

responsáveis pela formação de espécies reativas (GONZÁLEZ; GARCÍA; NAZARENO, 2010).

O ácido carmínico apresenta também ação antitumoral (TUTEM; APAK; SOZGEN, 1996). Em estudos realizados por Kemmochi et al. (2012 a, b) foi observado que extratos de cochonilhas que contêm ácido carmínico e ácido lacáico inibem o desenvolvimento de carcinomas de tireóide em ratos e que extratos que contêm maior concentração de ácido carmínico (superior a 50%) tem efeito mais pronunciado. De acordo com Li et al. (2009), dependendo da concentração, o ácido carmínico protege o DNA e os eritrócitos contra a oxidação e apenas uma molécula pode capturar até três radicais peróxido na proteção de eritrócitos.

O potencial antioxidante de antraquinonas é influenciado pela posição e caráter dos substituintes. Em estudo realizado por Machatova et al. (2016) as antraquinonas alizarina, purpurina e 2-hidroxi-metil-antraquinona obtidas de plantas apresentaram potencial antioxidante inferior ao do ácido carmínico proveniente de cochonilhas. A capacidade antioxidante do ácido carmínico é comparável a antioxidantes conhecidos como ácido ascórbico, trolox e quercetina. Com isso, o ácido carmínico além de ser utilizado como corante alimentar, pode contribuir para preservar constituintes alimentares contra a ação oxidativa deletéria (GONZÁLEZ; GARCÍA; NAZARENO, 2010).

Dentre os métodos utilizados para avaliação do potencial antioxidante de produtos naturais, os métodos de sequestro dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazol-6-ácido sulfônico) (ABTS) são os mais utilizados. Esses métodos baseiam-se na capacidade dos compostos de sequestrar radicais livres. Ao reagir com compostos potencialmente antioxidantes e ser reduzido, o radical DPPH (Figura 5) passa de uma coloração púrpura para amarelada e dessa forma é possível medir a descoloração e estimar o potencial antioxidante dos compostos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Da mesma forma o radical ABTS (Figura 5) de coloração verde escura ao reagir com os compostos antioxidantes passa a verde claro (RE et al., 1999). Esses métodos são simples e práticos para avaliação de amostras puras e complexas e foram utilizados para avaliação de ácido carmínico e diferentes antraquinonas (GONZÁLEZ; GARCÍA; NAZARENO, 2010; MACHATOVA et al., 2016).

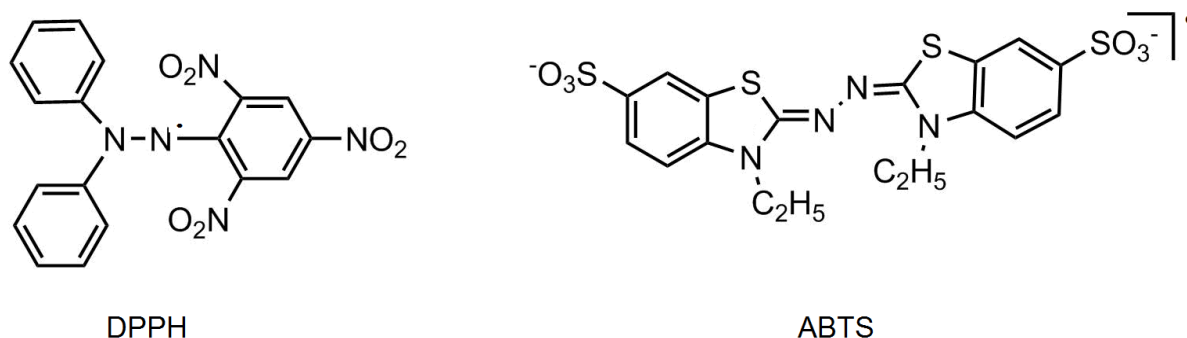


Figura 5 - Estrutura química do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (2,2-azinobis,3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

3.5 Espectrometria de massas em produtos naturais

Vários métodos analíticos têm sido empregados na elucidação da composição química de diversos produtos naturais como, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ultravioleta (UV), infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS) (PITT, 2009).

Dentre esses, destaca-se a espectrometria de massas, uma vez que apresenta elevada sensibilidade e rapidez na análise. Além disso, é possível se obter informações sobre as estruturas pelos padrões de fragmentação sem a necessidade de isolamento do composto (LOPES-DA-SILVA et al., 2002).

A utilização da MS na identificação de novos corantes naturais vem sendo bastante utilizada nos dias atuais. Entretanto, a cromatografia líquida (LC) tem histórico bastante antigo nessa área. Em 1980 conforme descrito por Lloyd (1980) a LC foi utilizada para separação e identificação dos compostos presentes em cochonilhas, onde foi identificado ácido carmínico como principal composto em cochonilhas *Dactylopius*. LC-DAD foi utilizado também por Méndez, et al. (2004) para classificação de cochonilhas de diferentes origens geográficas e através da técnica de componentes principais (PCA) foi possível diferenciar amostras de cochonilhas das Ilhas Canarias e da América.

A espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida foi utilizada por Mendonça (2011) para identificar compostos corantes produzidos por actinomicetos e foi inferido que o composto presente no corante vermelho excretado pelo *Streptomyces* sp. é Balmoralmycin, um policetídeo. Sun et al. (2016) realizaram a identificação dos compostos corantes presentes em tintas de canetas utilizando LC-DAD-MS.

Lech et al. (2015) utilizaram HPLC-MS para a identificação de nove derivados desconhecidos do ácido carmínico extraídos de têxteis peruanos tingidos com extrato de cochonilha. HPLC-MS também foi utilizado por Gosetti et al. (2015) para identificar produtos de degradação de ácido carmínico em bebidas e com a metodologia desenvolvida combinando a espectrometria de massa de alta resolução com o uso de técnicas quimiométricas como análise de componentes principais (PCA) foi possível identificar os produtos de degradação do corante em um cenário complexo.

4 Material e métodos

4.1 Material

Foram coletadas duas espécies de cochonilhas, a primeira (cochonilha 1) de árvores de *Schinus terebinthifolius* Raddi Benth (Figura 6A) e a segunda de plantas ornamentais *Caliandra brevipes* George Benth (cochonilha 2) (Figura 6B), ambas do município de Pelotas (Pelotas, RS 31° 46' 19" S; 52° 20' 33" W e latitude de 10 m).



Figura 6- Espécies de cochonilhas coletadas em seus respectivos hospedeiros, (A) Cochonilha 1 em *Schinus terebinthifolius*. (B) Cochonilha 2 em *Caliandra brevipes* benth.

Também foram avaliados corantes comerciais vermelho carmim na forma pó e líquida (doação da empresa Duas Rodas, Inc.), para fins de comparação com as amostras.

4.2 Identificação dos insetos

4.2.1 Identificação Molecular

A identificação molecular foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.2.1.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada pelo método de Trizol. Para isso foram pesados 0,1g de insetos em um microtubo e adicionado 1mL do reagente Trizol, a amostra foi triturada e posteriormente a mistura foi centrifugada por 10 minutos à 12.000 x g sob refrigeração a 4 °C. Após este período, transferiu-se o sobrenadante

para um novo microtubo, deixou-se em repouso por 5 minutos. Após, foram adicionados 200µL de clorofórmio, agitado por 15 segundos e deixado por 7 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 4 °C por 15 minutos, com 12.000 x g. Novamente o sobrenadante, contendo o RNA, foi removido e colocado em um novo microtubo. Ao microtubo contendo o RNA adicionou-se 500µL de isopropanol e deixou-se 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 4° C por 10 minutos, com 12.000 x g. Para aumentar a pureza do material extraído, removeu-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com etanol 75%. O material foi centrifugado a 4 °C por 5 minutos, com 7.000 x g. Após, retirou-se o etanol e suspendeu-se o pellet em 30µL de água ultrapura. A pureza e a integridade do RNA total extraído foram avaliados pela análise de absorbância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose 1%, respectivamente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.2.1.2 Síntese de cDNA

O cDNA dupla fita foi sintetizado utilizando o kit SuperScript Double Stranded cDNA Synthesis (Invitrogen®), seguindo as recomendações de uso do produto.

Em microtubos foram misturados 1µL de RNA isolado, 1µL de oligoDT, 1µL de DNTPs e 8µL de água, sendo incubados em termociclador a 65 °C por 5 minutos.

Em seguida, foram adicionados 4µL de tampão, 2µL de oligoDT e 1µL de água, incubado a 42 °C por 2 minutos. Por fim, foi adicionado 1µL da enzima super script, incubado a 42 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos.

4.2.1.3 Desenho dos primers

Sequências de nucleotídeos de prováveis espécies de cochonilhas foram identificados nas bases de dados National Center for Biotechnology Information e (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Bold system (<http://www.boldsystems.org/>), os blasts foram copiados e foi utilizado o programa Primer3 v0.4.0 para desenhar os *primers* dos genes específicos (Tabela 1). No programa foram determinados alguns critérios: tamanho mínimo 17 pb, ótimo 20 pb e máximo 27 pb; temperatura de anelamento mínima 57 °C, ótima 60 °C, máxima 63 °C; percentual de 39 bases CG com mínima de 40, ótima de 60 e máxima de 80%. Os primers foram adquiridos da Biogen.

Tabela 1 - Primers utilizados para a identificação molecular das cochonilhas

#	Identificação	Gene	Acesso	Sequencia dos primers		Tamanho do amplicom
				Forward	Reverse	
1	<i>Dactylopius coccus</i> 1	DcCOI 1	KJ701882	TCCACTTGCAAACCAAAACA	GCTCTTGCTAGAACAGGGATTG	216
2	<i>D. coccus</i> 2	DcCOI2	KJ701933	AACAATCACCCTCATGCATTC	TGTTTTGGTTTGCAAGTGGA	242
3	<i>Ceroplastes floridences</i>	CfCOI	JQ795718	TGAACAATGTATCCACCCCTATC	CCTCTTGCTAGTACTGGAATGGAA	230
4	<i>Diaspis echinocacti</i>	De28S	DQ145318.2	CTGACGACGGACAGTAAGCA	CGTACGGGTTTCGGAAGTAA	190
5	<i>C. ceriferus</i>	Cc28S	KF824002.1	GTCGGGTCGATTGATATTT	GTCCGCGTCGAAAACAAC	167
6	<i>C. pseud.</i>	CpCOI	JQ795694	GGATGAACTCTTTATCCACCACT	TCCTCTTGCTAATACAGGGATTG	234
7	<i>C. rusci</i>	CrCOI	KJ801514	CAATAGGAAATGGAAACCCAAT	TGATGTGCTCATACAATGAATCC	208

4.3.1.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional

Para identificação da espécie de cochonilha, cada reação foi composta por 1µL de tampão e 0,3µL de MgCl₂, 0,2µL de dNTP, 0,7µL de cada *primer*, 0,05µL de Taq DNA polimerase e 0,4µL de amostra de cDNA, e água ultrapura até completar o volume de 12µL.

As reações foram submetidas à amplificação em termociclador. O programa utilizado se baseou em: desnaturação inicial a 94 °C por 15 minutos, seguida de 32 ciclos de desnaturação a 94 °C por 0,5 minutos, anelamento a 50 °C por 0,5 minutos e extensão a 72 °C por 0,5 minutos, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. A temperatura de anelamento foi variada, utilizando-se 45, 50, 55 °C.

Os produtos de todas as reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), utilizando como marcador o Ladder 1kb (Invitrogen™). Foram aplicados 4µL de produto da PCR no gel, o qual foi corado com 2µL de GelRed, e visualizado em fotodocumentador.

4.2.2 Identificação morfológica

As espécies de fêmeas adultas de *Ceroplastes* spp. foram coletadas e fixadas em álcool a 70%, posteriormente enviadas para a Universidade Federal de São Carlos, onde foi realizada a identificação. A identificação foi realizada pela Dra. Ana Lucia Peronti com um microscópio estereoscópio óptico utilizando as chaves de PERONTI, SOUSA-SILVA e WILLINK (2008).

Para preparação das lâminas permanentes utilizou-se a técnica descrita por Granara de Willink (1990), que consiste basicamente em clarificação dos exemplares em solução de KOH 10%, coloração em fucsina ácida associada a solução de Essig, desidratação em série alcoólica de 70% ao absoluto, numa progressão de 10% e montagem em Bálsamo-do-Canadá.

As espécies foram identificadas, levando-se em conta principalmente características microscópicas como: distribuição das setas estigmáticas; tipos de poros e setas dorsais; comprimento das pernas e antenas; número de segmentos antenais; presença ou ausência de esclerotização túbio-tarsal; forma dos digítulos da garra; número de setas interantennais; forma e distribuição dos condutos tubulares; tipo de poro pré-opercular; comprimento e forma do

processo caudal e presença ou ausência de setas no ápice do processo caudal;

4.3 Análise cromatográfica por LC-MS

4.3.1 Preparo dos extratos

As cochonilhas foram maceradas em moinho de bolas até obtenção de um pó fino e homogêneo. Para a remoção da cera, foi realizada extração de 100g de amostra em 500mL de hexano. A mistura foi agitada em agitador magnético por 30 min e filtrada com papel filtro. Este procedimento foi repetido quatro vezes, até a remoção total da cera. O resíduo foi utilizado para extração dos metabólitos com potencial para utilização como corantes. Ao resíduo foi adicionada uma solução de etanol 30% na proporção de 1:10 (m/v), seguido de agitação durante 30 min a temperatura de 70 °C. Após a mistura foi filtrada, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a pressão reduzida e o extrato resultante foi liofilizado. Após liofilizados, os extratos foram pesados, para cálculo do rendimento. O extrato liofilizado foi ressuspensionado em água ultra-pura na concentração de 1000µg mL⁻¹. Para a análise por LC-MS, a uma alíquota de 450µL dos extratos foram misturados 50µL de reserpina (100µg mL⁻¹; padrão interno) e filtrados em filtro de seringa de nylon de 0,2µm para posterior injeção.

4.3.2 Instrumentação e condições analíticas

Dez microlitros do extrato hidroalcoólico foram injetados em cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Prominence) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de voo) (Impact HD). Os compostos foram separados em uma coluna Bidentate C18 (100 x 2,1mm) (MicroSolv Technology Corporation, Leland, NC, EUA), utilizando solução de ácido fórmico em água (0,1% v/v, eluente A) e de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B) como fase móvel. O fluxo utilizado foi de 0,2 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna de 40 °C. Para separação foi utilizado um gradiente: 0,00 min – 5% B, 0,01 – 15,00 min , 90%B, 15,00 – 18,00 min, 90% B, 18,01 – 20,00 min, 5% B, permanecendo por 6 minutos nessa condição.

O espectrômetro de massas foi operado nos modos positivo e negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de m/z 50 a 1200. Após a realização de teste, foi selecionado modo negativo para a injeção das amostras. Os parâmetros de aquisição foram: voltagem do capilar em 4 kV, pressão do gás de nebulização (N_2) de 2 bar, gás de secagem em 8 L min^{-1} , temperatura da fonte de 180°C , colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo toda a faixa de aquisição (de m/z 50 até 1200). Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizadas ajustando os valores de energia de colisão como se segue: m/z 100 , 15 eV ; m/z 500 , 35 eV; m/z 1000, 50 eV, e usando nitrogênio como gás de colisão. Os dados de MS e MS/MS foram processados por meio do software *Data analysis* 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), que forneceu uma lista de possíveis fórmulas moleculares utilizando o editor *Smart Formula* (Bruker Daltonics).

4.3.3 Processamento dos dados e identificação dos metabolitos

A tentativa de identificação dos compostos obtidos por LC-MS, foi realizada comparando os valores m/z , espectro de massas e o perfil de fragmentação (MS^n) com informações contidas em diferentes bases de dados livres disponíveis: METLIN (<https://metlin.scripps.edu/index.php>), KEGG compounds (<http://www.genome.jp/kegg/compound/>), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), Mass bank (<http://www.massbank.jp/QuickSearch.html>) com uma precisão de massa de 5 ppm. Quando disponíveis, padrões comerciais foram utilizados para confirmar a identificação dos metabólitos, sendo caracterizados pelo espectro no UV/VIS (220-800 nm), tempo de retenção relativo ao padrão externo, espectro de massas e perfil de fragmentação (MS^n).

Os metabólitos foram quantificados em relação a quantidade de padrão interno adicionado.

4.3.4 Potencial antioxidante pelo método de captura dos radicais DPPH e ABTS

O potencial antioxidante foi determinado utilizando método que mede a capacidade de inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Cem microlitros do mesmo

extrato usado para análise por LC-MS foi adicionado à 3,9mL de solução de DPPH em metanol (100 mM). A solução foi homogeneizada e os frascos mantidos no escuro. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Jenway, 6700) no comprimento de onda de 517nm após 30min de reação. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH.

O potencial antioxidante também foi determinado pelo método que mede a capacidade de inibição do radical livre 2,2-azinobis,3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) (RE et al., 1999). Trinta microlitros do mesmo extrato usado para análise por LC-MS foi adicionado à 3mL de solução de ABTS em etanol. A solução foi homogeneizada e os frascos mantidos no escuro. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Jenway, 6700) no comprimento de onda de 734nm após 6 min de reação. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical ABTS.

4.4 Análise cromatográfica por GC-MS

4.4.1 Preparo dos extratos

As ceras foram analisadas por GC-MS, o preparo dos extratos foi realizado de acordo com método descrito por Kamthan et al. (2012). Foram pesadas 400mg de ceras em tubos de polietileno tipo falcon de 15mL em triplicata. Após foram adicionados 10µL de padrão interno (antrona 1mg mL⁻¹) e 3,75mL de uma mistura de clorofórmio e metanol (1:2). A amostra foi agitada em vórtex por 10s. Em seguida foram adicionados 1,25mL de clorofórmio, agitado em vórtex por 10s. Os extratos foram sonicados por 15 minutos a uma frequência de 40kHz, em temperatura ambiente. Após foram adicionados 1,25mL de água e agitado em vórtex por 10s. A camada orgânica (inferior) foi coletada e 200µL foram separados e concentrados através da aplicação de nitrogênio gasoso.

No processo de derivatização, nesta fração concentrada, adicionou-se 100µL de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida] e agitou-se durante 60 minutos a 65 °C. A reação foi transferida para *inserts* de 100µL em vials para GC e injetadas imediatamente no GC-MS.

4.4.2 Instrumentação e condições para GC-MS

Para analisar os extratos de cera utilizou-se equipamento Shimadzu GCMS QP2010 Ultra com auto injetor AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011. Os parâmetros de injeção, cromatografia e espectrometria de massas seguiram método descrito por Kamthan et al. (2012). Injetou-se 1µL de amostra com temperatura do injetor a 300 °C, com razão de split para injeção de 1:25. O gás hélio foi utilizado como gás carreador com fluxo de 2mL.min⁻¹ e velocidade linear como modo de controle de fluxo. A coluna capilar utilizada foi Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), com programação isotérmica por 2 minutos à 80 °C, rampa de temperatura de 15 °C por minuto até 320 °C ao qual permaneceu por 6 minutos. Para os parâmetros de espectrometria de massas, as temperaturas da fonte de íons e interface foram de 250 °C, faixa de massa de m/z 70-600 e 0,2 escaneamentos por segundo. O tempo de corte do solvente foi de 2 minutos.

4.4.3 Processamento dos dados e identificação dos metabólitos

Após a integração dos picos, os dados foram normalizados de acordo com o padrão interno de cada amostra antes de serem combinados e listados.

5 Resultados e discussão

5.1 Identificação dos insetos

5.1.1 Identificação molecular

A maioria das cochonilhas só pode ser identificada morfológicamente, através da análise das características das fêmeas adultas. No entanto, mesmo quando fêmeas adultas são examinadas, as vezes é difícil distinguir entre espécies muito semelhantes e determinar ligeiras diferenças (PARK et al., 2011). Em contrapartida, a identificação molecular não é dificultada pelo polimorfismo, sexo ou grau de desenvolvimento (DENG et al., 2013; ZHANG et al., 2012). Com isso, estudos de variações em várias regiões gênicas têm sido realizados na tentativa de distinguir espécies (PARK et al., 2011).

Considerando as vantagens da identificação de cochonilhas através das técnicas moleculares, buscou-se inicialmente identificar as espécies utilizando-se essas técnicas. Primeiramente foram selecionadas sequências de *Dactylopius coccus* e *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemiptera: Diaspididae) e de diferentes espécies de *Ceroplastes* disponíveis no banco de dados NCBI (*C. floridensis*, *C. ceriferus*, *C. pseudoceriferus* e *C. rusci*) e realizou-se o desenho de *primers* e subsequentemente análise por PCR.

Para espécies utilizadas em controle biológico como parasitoides ou mesmo espécies consideradas praga, é interessante a utilização de *primers* como marcadores moleculares para se conhecer as interações tróficas que estão ocorrendo no agroecossistema. O DNA mitocondrial, neste caso referente a CO1, já foi utilizado para identificação ao nível de espécies, inclusive de parasitoides dentro de seus hospedeiros (GARIEPY; MESSING, 2012).

A partir da separação das bandas por eletroforese em gel de agarose (Figura 7), pode-se observar que para a cochonilha 1 (C1), houve amplificação do cDNA com dois dos *primers* utilizados. Sugerindo que a cochonilha 1 poderia ser *C. ceriferus* ou *C. rusci*. O tamanho de amplicon esperado para o primer de *C. ceriferus* era de 167 pares de bases (pb), enquanto que para *C. rusci* se esperava tamanho de amplicon de 208 pb, tamanho semelhante ao observado no gel C1.

Para a cochonilha 2 (C2), houve amplificação de todos *primers* do gênero *Ceroplastes* (*C. floridences*, *C. ceriferus*, *C. pseudoceriferus* e *C. rusci*). O tamanho de amplicon esperado para o primer de *C. floridences* era de 230 pb, *C. ceriferus* 167 pb, *C. pseudoceriferus* 234 pb e *C. rusci* 208 pb, tamanho semelhante ao encontrado no gel C2 (Figura 7).

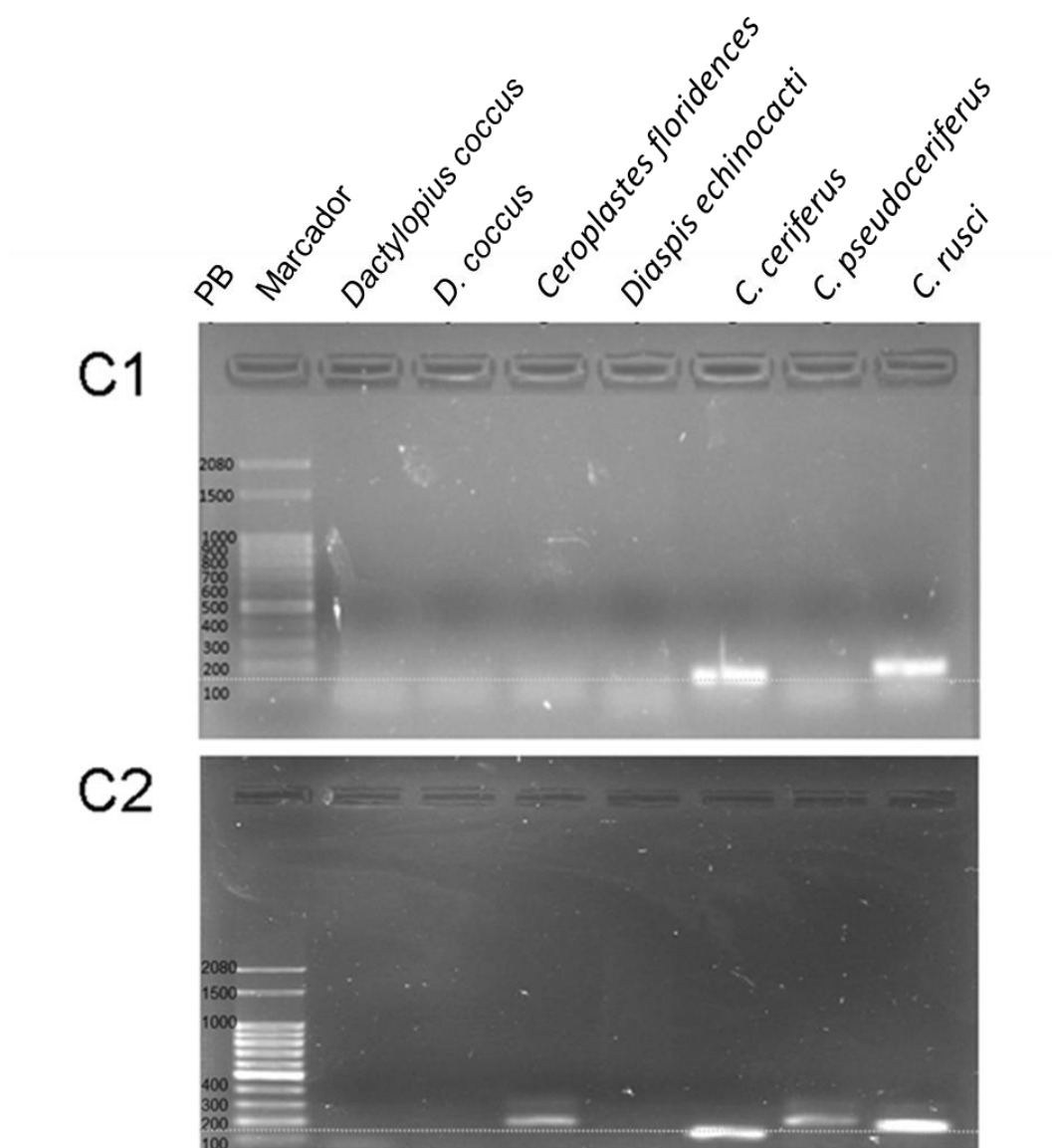


Figura 7- Eletroforese em gel de agarose realizada com o cDNA de C1 e C2 e com primers de seis espécies de cochonilhas com base em genes disponíveis no NCBI.

A amplificação dos mesmos *primers* para duas cochonilhas (C1 e C2) cujas características morfológicas evidenciam tratar-se de espécies diferentes e a amplificação de mais de um *primer* para mesma cochonilha indicam a falta

de especificidade dos *primers* utilizados em nível de espécie (Figura 7). No entanto, todos *primers* que apresentaram anelamento foram desenhados a partir de sequências de espécies da família Coccidae e gênero *Ceroplastes* um indício de que estes podem não serem específicos em nível de espécie, mas sim em nível de família e/ou gênero. Isto corrobora com estudos recentemente realizados por Gariepy, Haye e Zang (2014), em que foram desenhados *primers* dentro de CO1, específicos para as famílias Pentatomidae (Hemiptera) e Scelionidae (Hymenoptera), para identificação de interações tróficas. A vasta riqueza de espécies aliada a poucos dados disponíveis nas bibliotecas de bancos de dados, dificulta a identificação a níveis específicos através das técnicas moleculares. Como a análise molecular não foi suficiente para identificar as cochonilhas ao nível específico, procedeu-se então a realização da análise morfológica na tentativa de identificação das espécies.

5.1.2 Identificação morfológica

A identificação morfológica foi realizada com base nas características taxonômicas das fêmeas adultas. A cochonilha 1 foi identificada como *Ceroplastes grandis* baseado nas seguintes características: cera úmida de coloração clara com manchas rosáceas e de formato, no geral, circular, além de não apresentar divisão visível de placas (Figura 8). Em relação ao corpo do inseto este é de formato, no geral, ovalado de coloração rosada com protuberâncias laterais e um prolongamento cônico e esclerotizado na porção posterior do corpo. Superfície dorsal: com 8 áreas claras, uma na região cefálica, uma na médio-dorsal e 3 pares laterais. Setas cilíndricas de dois tipos, as menores com 7- 9 µm de comprimento e ápice truncado e, as maiores com 11 a 15 µm de comprimento com ponta ou com ápice truncado lateralmente; triloculares, de contorno oval ou triangular do tipo II e tetraloculares, em maior número e, escassos pentaloculares e hexaloculares. Processo caudal com poros pré-operculares simples; placas anais com 4 setas dorsais, 3 ventrais e 4 ou 5 na borda da prega anal.

A cochonilha 2 foi identificada como *Ceroplastes glomeratus* baseado-se nos seguintes atributos: cera rija de coloração clara e com limites indefinidos, os insetos encontram-se fundidos um ao outro (Figura 8), não apresenta

divisão de placas e o núcleo dorsal é localizado ao lado da abertura do processo caudal e contém oito pequenos núcleos dispostos ao seu redor. O corpo oval de coloração rósea e prolongamento escuro formando saliências sobre o dorso do inseto (Figura 1 B). Comprimento, 2,8mm (2,5-3,5); largura, 2mm (1,4-2,5) e altura, 1,2mm (1,0-3). O processo caudal castanho-escuro formando duas corcovas sobre o dorso. Superfície dorsal: com 6 ou 8 áreas claras, uma na região cefálica, uma médio-dorsal e 2 ou 3 pares laterais. Setas cônicas de dois tipos, com ápice arredondado ou pontiagudo. Área esclerotizada do processo caudal com base ampla, estendendo-se sobre o dorso, cobrindo a área clara médio-dorsal;

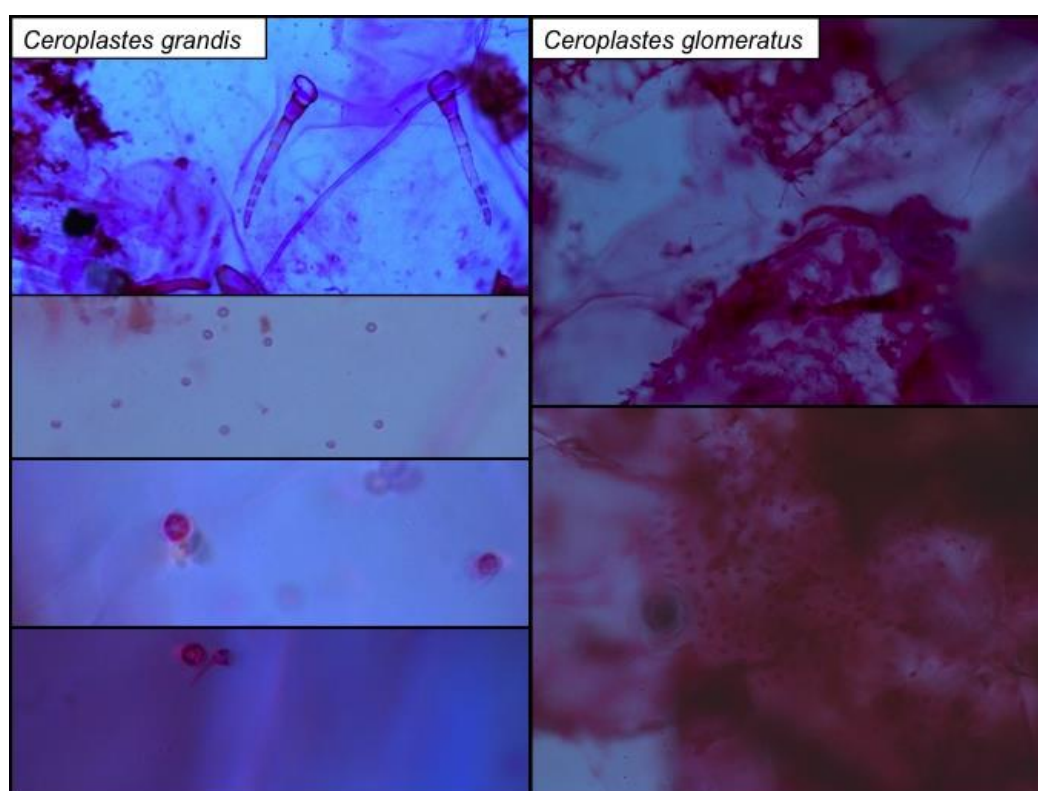


Figura 8- Características anatômicas distintivas de *Ceroplastes grandis* (fotos à esquerda) e *Ceroplastes glomeratus* (fotos à direita).

5.2 Análise cromatográfica por LC-MS

A fim de identificar e caracterizar os compostos de *C. grandis* e *C. glomeratus*, foram realizadas análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Para isso, 100g de cochonilhas moídas, foram removidas de cera e demais impurezas e extraídas com solução hidroalcoólica. Após a extração foi observado um rendimento de

aproximadamente 3% ($\pm 0,3$) para *C. grandis*, enquanto que para *C. glomeratus* foi de aproximadamente 4% ($\pm 0,5$).

No Brasil, até o momento são conhecidas 40 espécies de cochonilhas do gênero *Ceroplastes*, no entanto a composição destas espécies ainda não foi elucidada. Este é o primeiro relato dos constituintes de *C. grandis* e *C. glomeratus*.

Maior número de picos e com maior intensidade foi observado no modo negativo comparado com a ionização no modo positivo e com isso o modo negativo foi escolhido para avaliação de todas as amostras. Foram identificados e quantificados os ácido ceroalbolínico, carmínico e lacaico nos extratos polares de *C. grandis*, *C. glomeratus* e no corante comercial (Figura 9). Os teores das antraquinonas variaram entre as espécies. *C. grandis* apresentou elevado teor de ácido ceroalbolínico e baixo teor de ácido carmínico, enquanto que em *C. glomeratus* ocorreu o oposto, baixo teor de ácido ceroalbolínico e elevado teor de ácido carmínico (Tabela 2). O ácido quermésico, que tem o mesmo peso molecular que o ácido ceroalbolínico foi identificado somente no corante comercial (Figura 9).

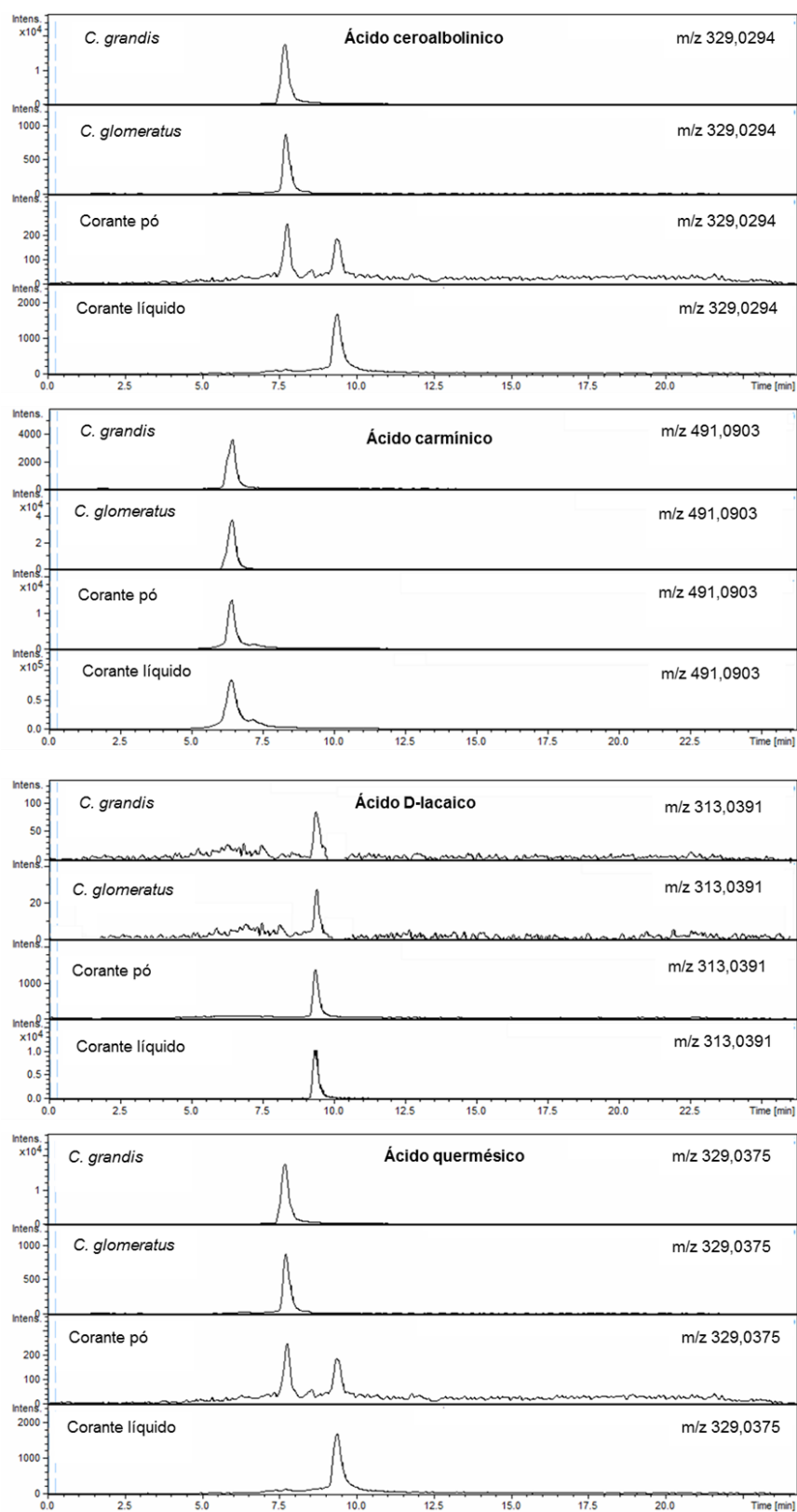


Figura 9-Cromatogramas de íons extraídos dos compostos ácido ceroalbolínico m/z 329,0294 e ácido carmínico m/z 491,0903, ácido lacaico m/z 313,0391 e ácido quermésico m/z 329,0375 de *C. grandis*, *C. glomeratus* e corante comercial.

Outras espécies do gênero *Dactylopius* foram avaliadas na tentativa de extração do corante vermelho carmim, no entanto ainda não foram encontradas espécies que apresentem ácido carmínico como principal constituinte (ALVAREZ, 2003). Dessa forma *C. glomeratus* apresenta potencial para extração do corante, pois além de apresentar ácido carmínico como principal constituinte, sua concentração no extrato foi superior aos corantes comerciais, sendo quatro vezes mais elevada que no corante comercial na forma pó (Tabela 2).

Tabela 2- Quantificação em relação ao padrão interno dos compostos ácido carmim, ácido ceroalbolínico e ácido D-lacaico de *Ceroplastes grandis* e *C. glomeratus* e corante comercial.

Compostos	<i>C. grandis</i> (mg g ⁻¹)	<i>C. glomeratus</i> (mg g ⁻¹)	Corante comercial pó (mg g ⁻¹)	Corante comercial líquido (mg mL ⁻¹)
Ácido carmínico	0,96 ± 0,02	29,80 ± 0,52	7,51 ± 0,05	27,00 ± 0,22
Ácido ceroalbolínico	4,40 ± 0,05	0,52 ± 0,03	0,05±0,01	nd
Ácido D-lacaico	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,47 ± 0,01	2,03 ± 0,02
Ácido quermésico	nd	Nd	0,09±0,01	0,51±0,02

Média ± erro padrão da media (n=6).

Algumas espécies do gênero *Ceroplastes* já foram estudadas. Komura et al. (1982) relataram que *C. ceriferus*, *C. floridensis* e *C. rubens* possuem o ácido ceroalbolínico como principal constituinte e que estas espécies também possuem ácido carmínico e ácido lacaico, os quais também foram observados neste trabalho em *C. grandis* e *C. glomeratus*.

A identificação de compostos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução permite se obter informações sobre estruturas e padrões de fragmentação sem a necessidade de isolamento dos compostos (LOPES-DA-SILVA et al., 2002). Os espectros de fragmentação MS/MS das antraquinonas encontradas em *C. grandis* e *C. glomeratus* são mostrados na figura 10.

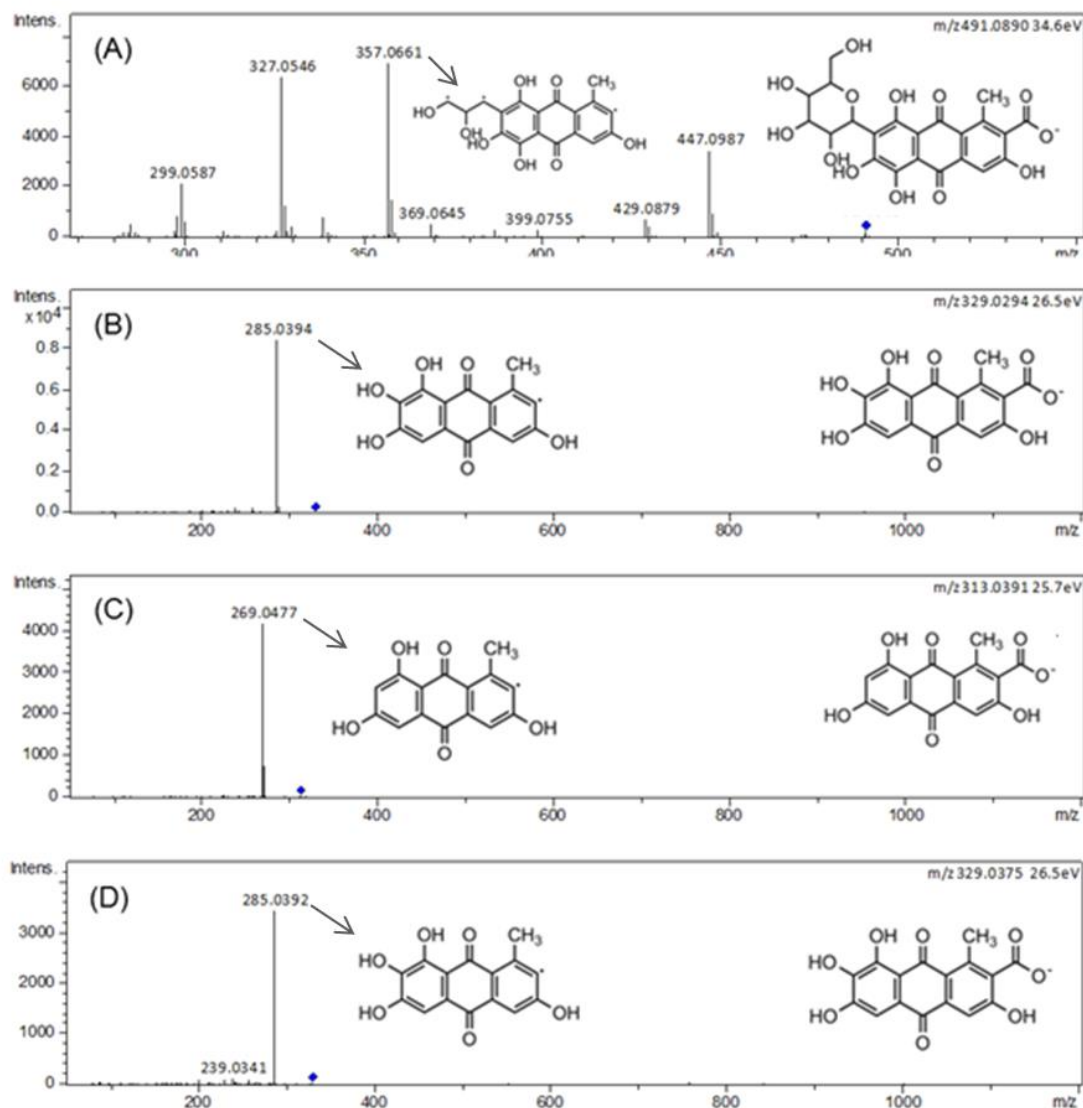


Figura 10- Espectros de massas de alta resolução dos compostos ácido carmínico m/z 491,0903 (A) (34,6 eV), ácido ceroalbolínico m/z 330,0375 (B) (26,5 eV), ácido lacaico m/z 314,0426 (C) (25,7 eV) e ácido quermésico m/z 329,0375 (26,5 eV) encontrados em cochonilha

A proposta de fragmentação para os compostos identificados está apresentada na figura 11. O ácido carmínico difere dos outros compostos pela presença de uma hexose. Na fragmentação do íon precursor (m/z 491,0903) pode ser observado uma perda de CO_2 (m/z 447), seguida de uma série de fragmentações da hexose: uma perda de OH (m/z 429), depois a abertura do anel de hexose (m/z 357) e finalmente a clivagem das cadeias laterais que conduzem aos fragmentos m/z 327 e 299. O ácido ceroalbolínico e o ácido lacaico mostram ambos uma perda de CO_2 , formando fragmentos 285 e 269, respectivamente. O ácido quermésico por possuir mesmo peso molecular que o ácido ceroalbolínico apresentou mesma fragmentação.

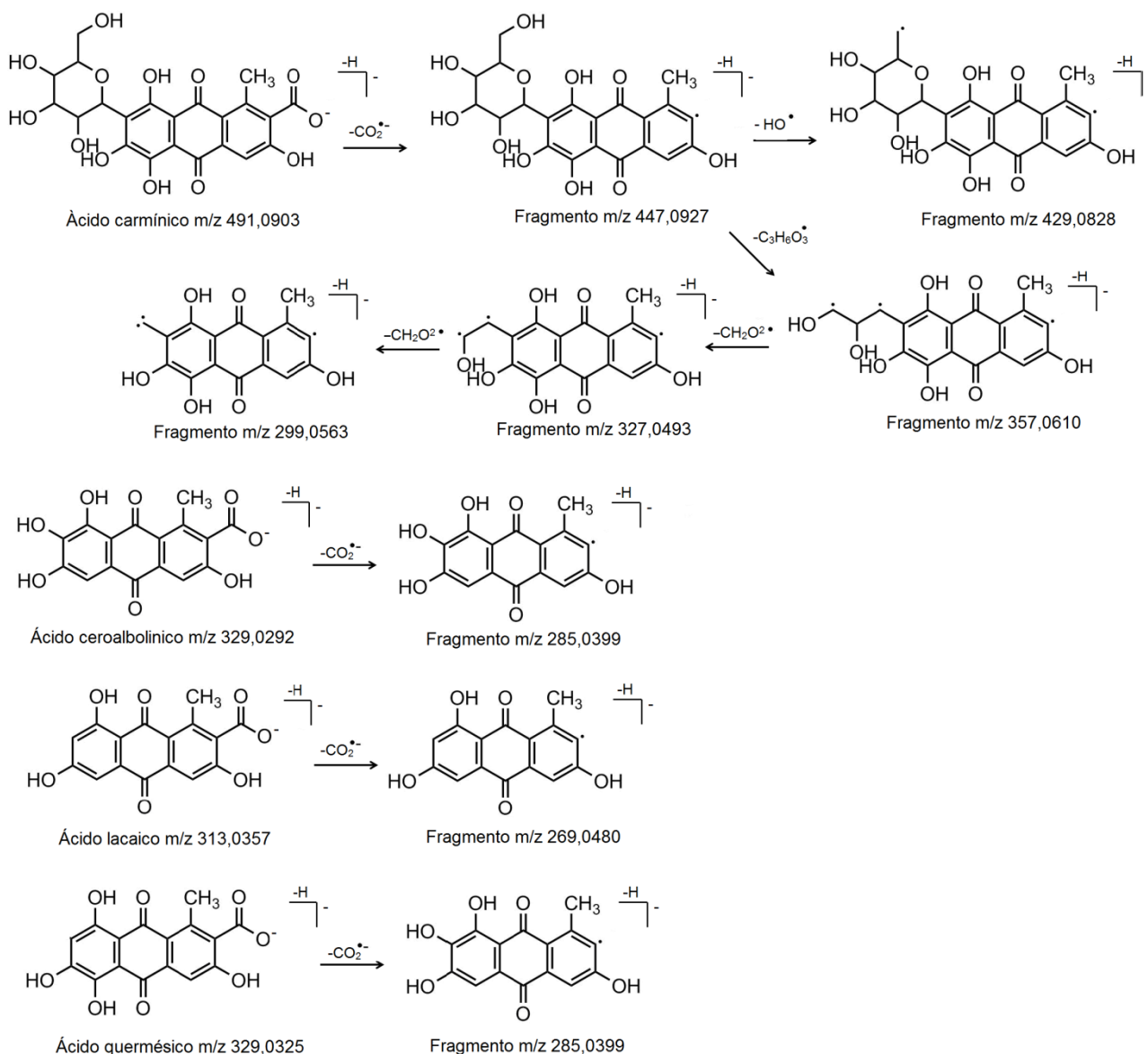


Figura 11- Proposta de fragmentação dos compostos ácido carmínico m/z 491,0903, ácido cerualbolínico m/z 330,0375, ácido lacaico m/z 314,0426 e ácido quermésico m/z 329,0325.

Os pigmentos de cochonilhas são pertencentes à classe das antraquinonas, que são estruturalmente constituídas de um anel antraceno (trícíclico aromático) com nove a dez átomos de carbono (SHAMIM et al., 2014).

O ácido carmínico tem como núcleo uma antraquinona com um ácido carboxílico, um grupo metila, quatro hidroxilas e uma hexose ligados. Devido ao posicionamento dos grupos carbonila e hidroxilas, o ácido carmínico é adequado para ligação com metais, formando o corante carmim. Este complexo produz tons vermelhos brilhantes com maior estabilidade, e por isso é utilizado pelas indústrias como corante. Os metais mais utilizados para

formação de complexos são o alumínio e o cálcio e mais raramente o ferro e o estanho (DAPSON, 2007).

Os extratos de cochonilhas são utilizados como corantes nas indústrias de alimentos e também para coloração de têxteis e objetos de arte (STATHOPOULOU et al., 2013). Além de proporcionar cor, demonstraram possuir potencial antioxidante comparável a antioxidantes, como o ácido ascórbico, o trolox e a quercetina. Dessa forma o ácido carmínico além de ser utilizado como corante alimentar, pode contribuir para preservar constituintes alimentares contra a ação deletéria de oxidantes (GONZÁLEZ; GARCÍA; NAZARENO, 2010).

O potencial antioxidante do extrato polar bem como o corante comercial na forma de pó foi testado contra a inibição radical de DPPH e ABTS. Embora os extratos de ambas as cochonilhas tenham apresentado uma inibição dos radicais mais elevada do que o corante comercial, a percentagem de inibição de radicais observada foi relativamente baixa se comparada ao que é amplamente relatado na literatura para compostos antioxidantes cujo potencial pode ultrapassar 90% de inibição (Figura 12). O fato das antraquinonas estarem presentes em pequenas quantidades nos extratos e a presença de outros compostos pode interferir na capacidade antioxidante dos extratos.

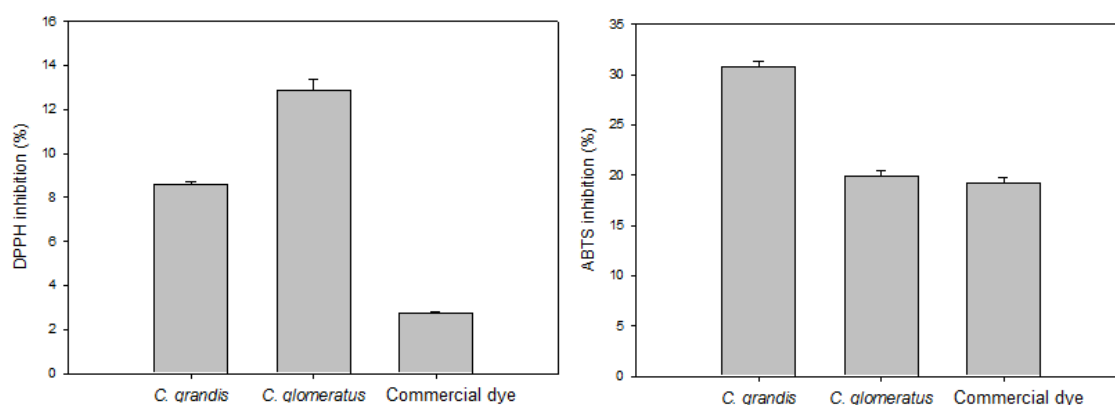


Figura 12- Capacidade antioxidante de extratos polar de *C. grandis*, *C. glomeratus* e do corante comercial.

Além dos compostos corantes, outros metabólitos semi-polares foram detectados em cochonilhas *C. grandis* e *C. glomeratus* na análise por LC-MS. Esta identificação foi realizada por correspondência dos valores m/z obtidos, espectro de massas e o perfil de fragmentação (MS^n) com as informações contidas em diferentes bases de dados gratuitas disponíveis: METLIN, KEGG

compounds, PubChem, Mass bank com uma precisão de massa de 5 ppm. Na tabela 3 estão apresentados os compostos encontrados em *C. grandis* e *C. glomeratus*.

Foram identificados metabólitos pertencentes à diferentes classes, entre elas açúcares, ácidos orgânicos e ácidos fenólicos (Tabela 3). Foram identificados dois açúcares: manitol e ribitol. Os ácidos orgânicos identificados foram: ácido málico, ácido cítrico e ácido úrico. Os ácidos fenólicos observados foram: o ácido hidroxibenzoico, o ácido siringico, o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico.

Os açúcares estão presentes na seiva das plantas e são ingeridos pelos insetos de forma inalterada ou ligeiramente modificada. Eles frequentemente são utilizados por animais como formigas, abelhas e beija-flores. O principal açúcar já encontrado em cochonilhas do gênero *Ceroplastes* é o ribitol, e em menor concentração manitol, rafinose, maltose e sacarose (BROWN, 1975).

Os ácidos orgânicos em insetos apresentam algumas funções biológicas e sua concentração varia em função do estágio de desenvolvimento, encontrando-se em maiores concentrações em estágios larvais. Os níveis de ácido cítrico nos insetos não tem correlação com os níveis de seus hospedeiros, dessa forma, o citrato de insetos é de origem endógena (LEVENBOOK; HOLLIS, 1961). A presença de ácido úrico também foi relatada em insetos (SALMINEN et al., 2004).

Os compostos fenólicos constituem uma importante classe de metabólitos especializados. Nas plantas são produzidos com função de defesa contra herbívoros, micro-organismos e outros. No entanto, os insetos tem capacidade de metabolizar estes compostos e a sua presença é dependente da composição fenólica de seu hospedeiro. Vinte e dois ácidos fenólicos e flavonóides já foram encontrados em larvas de mariposa que se alimentam de folhas de videiras (SALMINEN et al., 2004).

Tabela 3- Metabólitos identificados em cochonilhas *Ceroplastes grandis*, *C. glomeratus* e no corante comercial em pó e líquido.

#	TR [min]	<i>m/z</i> Experimental [M-H] ⁻	<i>m/z</i> Teórica [M-H] ⁻	Fórmula Molecular	Error (ppm)	mSigma	Compostos	Fragmentos	<i>C. grandis</i>	<i>C. glomeratus</i>	Corante
1	1,88	133,0137	133,0142	C ₄ H ₆ O ₅	4,0	4,8	ácido málico	115, 89, 71	+	+	-
2	1,88	181,0702	181,0704	C ₆ H ₁₄ O ₆	1,1	0,7	manitol	101, 89	+	+	-
3	1,91	191,0195	191,0197	C ₆ H ₈ O ₇	1,3	9,5	ácido cítrico	11, 87	+	+	-
4	1,93	167,0209	167,0211	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	1,1	5,9	ácido úrico	124, 96	+	+	-
5	1,95	151,0611	151,0612	C ₅ H ₁₂ O ₅	0,5	3,6	ribitol	101, 71	+	+	-
6	5,87	137,0241	137,0244	C ₇ H ₆ O ₃	2,6	0,6	ácido hidroxibenzóico		+	+	-
7	6,26	179,0332	179,0350	C ₉ H ₈ O ₄	9,8	5,6	ácido cafeico		+	+	-
8	6,38	491,0836	491,0831	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	-1,0	21,2	ácido carminico	447, 284	+	+	+
9	6,49	197,0459	197,0455	C ₉ H ₁₀ O ₅	-1,9	16,5	ácido siringico		+	+	-
10	7,26	163,0409	163,0401	C ₉ H ₈ O ₃	-5,2	15,4	ácido <i>p</i> -coumarico		+	+	-
11	7,67	193,0493	193,0506	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	7,0	8,2	ácido ferulico		+	+	-
12	7,83	329,0292	329,0303	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	3,4	20,8	ácido ceroalbolínico	285	+	+	-
13	9,34	313,0357	313,0354	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	-1,1	20,8	ácido lacaico	269	+	+	+
14	9,34	329,0325	329,0341	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	-11,4	13,6	ácido quermésico	285, 239	-	-	+

TR - tempo de retenção

mSigma - semelhança de perfil isotópico – quanto menor o valor maior a similaridade

A identificação baseou-se no padrão externo, na fragmentação MS/MS e nas comparações de bases de dados

5.3 Análise cromatográfica por GC-MS

A composição e o conteúdo da cera de insetos varia em função da espécie e do hospedeiro (GOLEBIEWSKI et al., 2010). A cera de alguns insetos pode ser usada na fabricação de velas, cápsulas de comprimidos ou para aplicação como revestimento em produtos de couro, entre outros usos (KONDO et al., 2008).

Extratos lipofílicos dos insetos foram avaliados por GC-MS. A avaliação direta do extrato sem derivatização, permitiu a identificação de compostos como hidrocarbonetos, no entanto não foi possível a identificação de outros componentes, tais como, ácidos graxos e outros compostos com grupamentos polares. Com isso, uma etapa de sililação foi realizada a fim de identificar esses compostos. Com o propósito de determinar quantitativamente cada um dos compostos analisados, a análise por GC foi realizada com padrão interno (antrona). Os cromatogramas das frações não-derivatizada e derivatizada para *C. grandis* e *C. glomeratus* estão apresentados na figura 13.

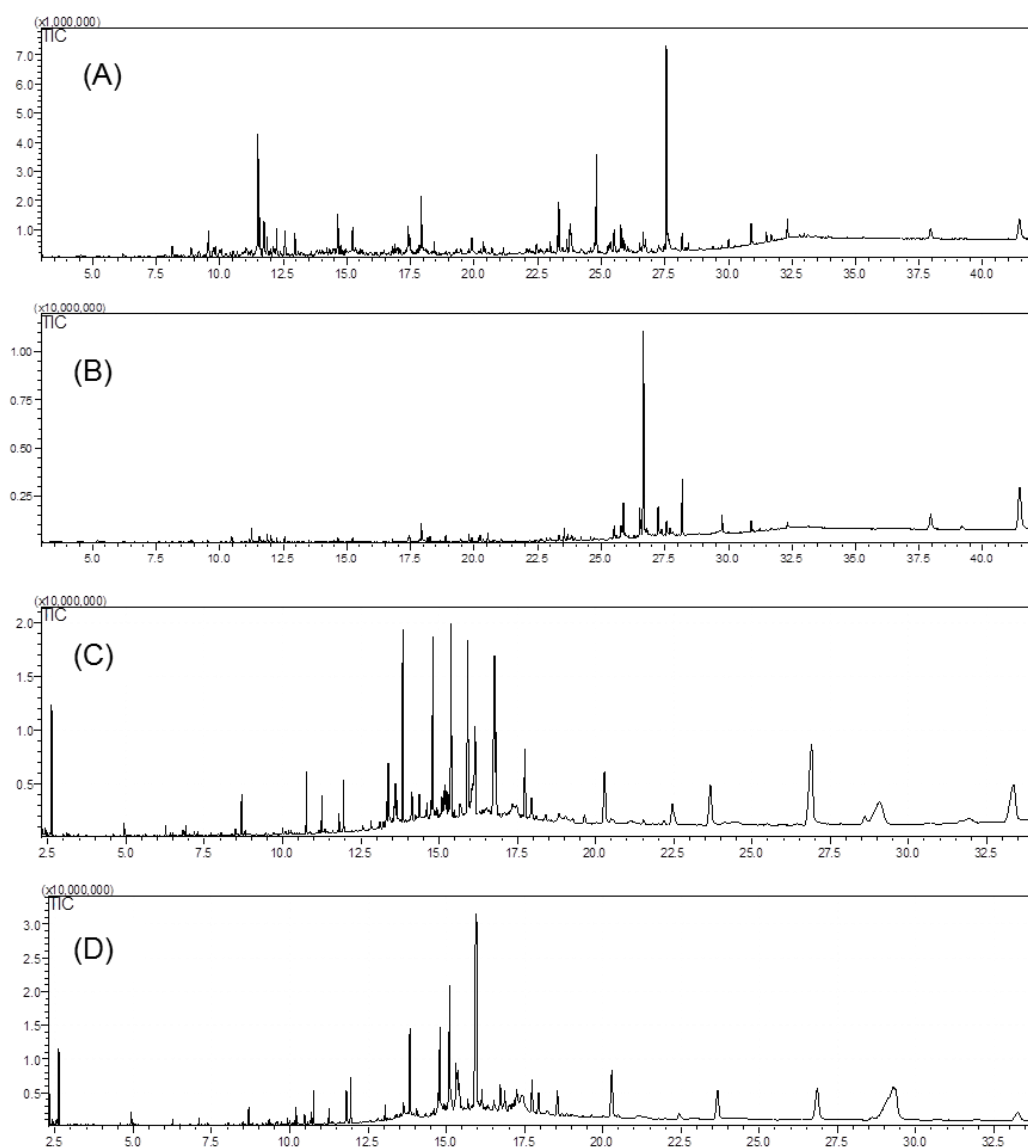


Figura 13- Cromatograma da fração não-derivatizada de *C. grandis* (a), *C. glomeratus* (B) e da fração derivatizada de *C. grandis* (C) e *C. glomeratus* (D).

A análise de extratos hexânicos não-derivatizados permitiu a identificação de 15 hidrocarbonetos que representaram 75% e 57%, três álcoois, representando 8% e 2% das áreas do cromatograma total de extratos apolares de *C. glomeratus* e *C. grandis*, respectivamente e três terpenos que representaram 40% do cromatograma total de *C. grandis* (Tabela 4).

A análise da fração derivatizada permitiu a identificação de 16 ácidos carboxílicos, que representaram 70% e 95% da área total do cromatograma para *C. glomeratus* e *C. grandis*, respectivamente, 12 açúcares, que representaram 29% e 3% da área total do cromatograma para *C. glomeratus* e

C. grandis, dois hidrocarbonetos e dois álcoois que combinados representaram 2% da área total do cromatograma de *C. grandis* (Tabela 5).

Ceroplastes glomeratus apresentou um maior número de ácidos carboxílicos e açúcares diferentes e maior conteúdo geral do que *C. grandis*, que apresentou um maior número e maior conteúdo de hidrocarbonetos. Os açúcares, possivelmente porque predominavam na camada cerosa externa, apesar de terem menor afinidade por solventes mais apolares do que por solventes polares foram também identificados no extrato lipofílico. Isso se deve também por ter sido a extração com hexano a primeira etapa na extração sucessiva seguida de extração com solução hidroalcoólica. Se a ordem fosse inversa dificilmente haveriam açúcares na fração lipofílica. Ambas espécies continham ácidos graxos saturados C₁₀, C₁₂, C₁₆, C₁₈, C₂₄, C₂₅. Os ácidos graxos de C₈ a C₁₆ foram relatados anteriormente em *Ceroplastes pseudoceriferus* Green, estudada no Japão (Tamaki, 1964).

Hidrocarbonetos, ácidos graxos, ésteres e álcoois são usados por insetos como feromônios ou semioquímicos como parte de seu sistema de comunicação. Estes compostos podem participar em interações ecológicas tais como atração, agressão, afrodisíaco, anti-afrodisíaco, reconhecimento e sinalização. Espécies de abelhas, borboletas e moscas usam feromônios lipídicos para manipular o comportamento de outros machos da mesma espécie. Para *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), por exemplo, acetato de vacenila e octacosanedienol são transferidos de machos para fêmeas durante o acasalamento para inibir outros machos de se aproximar da fêmea (YEW; CHUNG, 2015).

Os açúcares liberados pelas cochonilhas são frequentemente utilizados como alimentos por animais, como por exemplo formigas (MAJERUS et al., 2007). A composição e conteúdo de açúcar variam dependendo da espécie de planta hospedeira (BROWN, 1975). O ribitol foi o único açúcar presente em ambas as espécies de *Ceroplastes*. Estudos com *C. ceriferus*, *C. destructor* e *C. rusci*, também identificaram a ocorrência de ribitol. Ambas as espécies hospedeiras *Schinus terebinthifolius* e *Calliandra brevipes* de onde os insetos foram coletados contêm ribitol (HACKMAN; TRIKOJUS, 1952).

Foram também identificados os seguintes terpenóides: β -copaene, (+)-spathulenol, γ -elemene em *C. grandis*. Sesquiterpenos e diterpenos já foram

relatados na cera de *Ceroplastes pseudoceriferus* e *Ceroplastes ceriferus* (TOKI; OOI; KUSUMI, 1999). O γ -elemene é um sesquiterpeno com um aroma ceroso e o β -copaeno um sesquiterpeno tricíclico que já foi sugerido como um importante atrativo para a mosca das frutas *Ceratitis capitata* (NISHIDA et al., 2000). O (+)-spathulenol é um semioquímico utilizado na comunicação de *Campoletis* spp., um parasitóide de *Helicoverpa* spp. (YAN; WANG, 2006).

Tabela 4- Compostos identificados por GC-MS em extratos não-derivatizados de *C. grandis* e *C. glomeratus*

Metabólitos	Similaridade	TR (min)	MM	Íons de referência – m/z (%)	IK	Abundância relativa	
						C. grandis	C. glomeratus
Ésteres de ácido carboxílicos							
Hexadecanoato de etila	88	18,26	284	88 (100); 101 (76); 89 (16); 157 (16); M ⁺ (7)	1996	nd	2,6 ± 0,1
Octadecanoato de metila	91	19,80	298	74 (100); 87 (82); 75 (21); 143 (21); M ⁺ (10)	2131	nd	3,7 ± 0,2
Octadecadienoato de etila	87	20,20	308	95 (100); 81 (96); 96 (65); 82 (53); M ⁺ (6)	2167	nd	2,9 ± 0,2
Octadecenoato de etila	80	20,26	310	97 (100); 96 (90); 83 (87); 101 (86); M ⁺ (4)	2172	nd	2,9 ± 0,2
Hexadecanoato de etila	88	20,54	312	88 (100); 101 (81); 89 (19); 157 (17); M ⁺ (7)	2197	nd	4,8 ± 0,2
Hidrocarbonetos							
Tetradecano	93	8,12	198	71 (100); 85 (73); 99 (26); 113 (18); M ⁺ (<1)	1130	4,4 ± 0,2	nd
Heptadecano	91	8,88	240	71 (100); 85 (68); 113 (19); 99 (19); M ⁺ (<1)	1205	2,9 ± 0,1	nd
Metil-ciclohexano	83	9,18	204	121 (100); 93 (81); 107 (58); 71 (43); M ⁺ (<1)	1255	2,8 ± 0,1	Nd
Octadecano	88	11,56	254	71 (100); 85 (80); 99 (43); 113 (28); M ⁺ (<1)	1499	6,7 ± 0,6	nd
Metil-decanoato	78	12,01	214	74 (100); 87 (68); 165 (32); 135 (28); M ⁺ (<1)	1529	nd	4,6 ± 0,5
Eicosano	92	12,23	282	71 (100); 85 (81); 99 (43); 113 (28); M ⁺ (<1)	1543	5,6 ± 0,4	nd
Heneicosano	91	14,64	196	71 (100); 85 (89); 99 (51); 113 (36); M ⁺ (<1)	1713	8,1 ± 0,4	2,4 ± 0,1
Metil-hexacosano	87	15,22	380	71 (100); 85 (89); 99 (44); 113 (40); M ⁺ (<1)	1756	6,0 ± 0,3	1,8 ± 0,1
Octacosano	88	17,40	394	71 (100); 85 (89); 99 (63); 113 (42); M ⁺ (<1)	1927	5,0 ± 0,5	nd
Dotriacontano	80	19,90	450	71 (100); 174 (95); 85 (89); 99 (65); M ⁺ (<1)	2140	4,1 ± 0,3	nd
Tetrapentacontano	85	25,50	758	71 (100); 85 (85); 99 (53); 113 (31);	2703	7,4 ± 0,5	7,1 ± 1,1
Acetato de tetracosila	85	26,51	396	97 (100); 83 (62); 111 (59); 71 (33); M ⁺ (<1)	2817	1,6 ± 0,2	9,9 ± 2,1
Hexatriacontano	90	27,23	506	71 (100); 85 (89); 99 (56); 113 (34); M ⁺ (<1)	2903	nd	20,3 ± 2,7
Acetato octacosila	87	28,18	452	97 (100); 83 (57); 111 (57); 71 (34); M ⁺ (<1)	3017	4,1 ± 0,5	35,6 ± 3,5
Acetato triacontrila	85	29,75	480	97 (100); 83 (57); 111 (57); 71 (36); M ⁺ (<1)	3204	nd	9,0 ± 0,6
Álcoois							

1-Dodecanol	92	11,25	187	97 (100); 83 (98); 70 (96); 84 (57); M ⁺ (<1)	1478	nd	8,1 ± 0,3
Acetato de 1-docosanilila	93	18,43	368	97 (100); 83 (77); 111 (55); 70 (39); M ⁺ (<1)	2011	2,7 ± 0,2	nd
1-Heptatriacotanol	82	24,58	536	109 (100); 95 (88); 93 (83); 107 (69); M ⁺ (<1)	2600	nd	2,6 ± 0,2
Terpenóides							
β-copaeno	92	11,49	204	161 (100); 105 (91); 91 (56); 119 (46); M ⁺ (12)	1495	27,7 ± 1,4	nd
(+)-spathulenol	87	11,74	204	121 (100); 93 (83); 107 (62); 105 (40); M ⁺ (2)	1511	10,0 ± 0,9	nd
γ-elemenol	84	12,95	220	119 (100); 91 (97); 105 (93); 93 (92); M ⁺ (13)	1591	4,5 ± 0,2	nd
Antraquinonas							
Antracenediona	81	18,17	208	180 (100); 208 (97); 152 (56); 76 (31); M ⁺ (<1)	1989	nd	2,3 ± 0,1

TR tempo de retenção **MM** massa molecular. **KI** Índice de Kovats. * Íons de referência (intensidade relativa, pico base = 100%). M⁺ íon molecular. nd – não detectado. Média dos resultados ± erro padrão da média (n=6), expresso em µg g⁻¹.

Tabela 5- Compostos identificados por GC-MS nos extratos derivatizados de *Ceroplastes grandis* e *C. glomeratus*

Metabólitos	Similaridade	TR (min)	MMD	Íons de referência – m/z (%)	IK	Abundância relativa	
						C. grandis	C. glomeratus
Ácido carboxílicos							
Ácido propenedioco	96	3,33	232	147 (100); 73(32); 148 (16); 217 (14);	767	nd	14,0 ± 0,7
Ácido 4-oxopentanoico	90	3,70	188	75 (100); 145 (48); 73 (42); 173 (38); M ⁺ (<1)	810	nd	17,1 ± 0,6
Ácido decanoico	82	6,49	244	117 (100); 73 (99); 75 (96); 229 (66); M ⁺ (<1)	1134	34,4 ± 13,7	16,6 ± 0,7
Ácido 4-metil benzóico	92	7,09	224	165 (100); 135 (96); 209 (65); 77 (20); M ⁺ (13)	1207	nd	78,7 ± 2,5
Ácido dodecanoico	88	8,03	272	117 (100); 257 (77); 73 (67); 75 (58); M ⁺ (1)	1329	30,2 ± 9,1	30,3 ± 1,1
Ácido tetradecanoico	86	9,45	300	117 (100); 73 (89); 285 (71); 75 (64); M ⁺ (1)	1524	nd	39,8 ± 8,9
Ácido hexadecanoico	91	10,75	328	117 (100); 313 (58); 73 (56); 75 (39); M ⁺ (3)	1719	256,8 ± 17,1	396,0 ± 15,1
Ácido linoleico	83	11,81	352	117 (100); 73 (84); 75 (77); 339 (68); M ⁺ (<1)	1893	nd	634,7 ± 14,5
Ácido octadecanoico	91	11,94	356	117 (100); 341 (55); 73 (55); 129 (32); M ⁺ (4)	1915	204,1 ± 21,4	nd
Ácido eicosanoico	88	13,03	384	117 (100); 369 (78); 73 (66); 75 (47); M ⁺ (6)	2112	nd	184,8 ± 5,4
Hexadecanoato de propila	96	13,82	474	371 (100); 73 (30); 147 (30); 372 (28); M ⁺ (<1)	2263	457,0 ± 29,4	nd
Ácido docosanoico	79	14,05	412	117 (100); 397 (73); 73 (60); 75 (45); M ⁺ (7)	2307	nd	68,5 ± 5,7
Octadecanedioato de propila	85	14,79	502	399 (100); 400 (31); 147 (25); 73 (24); M ⁺ (<1)	2454	444,4 ± 27,8	nd
Ácido tetracosanoico	75	20,27	440	117 (100); 509 (92); 73 (51); 73 (51); M ⁺ (<1)	3550	854,3 ± 29,0	1248,0 ± 52,9
Ácido pentacosanoico	71	23,63	454	117 (100); 537 (74); 73 (46); 132 (45); M ⁺ (2)	4221	833,5 ± 27,0	1111,1 ± 88,8
Ácido octadecanedioco	67	26,84	458	597 (100); 204 (73); 581 (68); 75 (53); M ⁺ (<1)	4863	2301,4 ± 73,1	1740,7 ± 78,4
Açúcares							
Ribitol	96	8,68	512	73 (100); 217 (93); 103 (89); 147 (54); M ⁺ (<1)	1414	181,9 ± 8,6	607,9 ± 22,0
β-L-mannofuranose	90	9,22	482	217 (100); 73 (98); 129 (55); 218 (49); M ⁺ (<1)	1491	nd	118,8 ± 12,5

D-Fructose (isomero 1)	93	9,30	540	73 (100); 217 (83); 147 (29); 437 (23); M ⁺ (<1)	1502	nd	190,0 ± 6,8
D-Fructose (isomero 2)	92	9,35	540	73 (100); 217 (86); 147 (29); 437 (21); M ⁺ (<1)	1510	nd	207,5 ± 8,2
β-D-galactose	93	9,56	540	217 (100); 73 (48); 129 (25); 218 (21); M ⁺ (<1)	1540	nd	18,8 ± 1,2
Metil α-D-Glucofuranosideo	90	9,59	482	217 (100); 73 (94); 129 (62); 218 (50); M ⁺ (<1)	1543	nd	112,7 ± 11,1
α-D-Mannopiranoside	95	9,92	540	204 (100); 73 (59); 191 (43); 147 (24);	1591	nd	127,4 ± 7,1
β-arabinose	84	9,95	438	73 (100); 217 (68); 147 (49); 129 (36); M ⁺ (<1)	1595	nd	23,8 ± 1,1
L-arabitol	82	10,14	452	73 (100); 147 (64); 157 (61); 205 (58); M ⁺ (<1)	1624	nd	144,1 ± 17,8
Sorbitol	91	10,20	614	73 (100); 319 (87); 205 (66); 147 (62);	1633	nd	555,5 ± 16,5
Manitol	87	10,25	614	73 (100); 147 (67); 319 (62); 217 (59);	1641	nd	36,1 ± 5,5
Glicose	96	10,46	540	204 (100); 73 (59); 191 (44); 147 (22);	1675	nd	211,6 ± 8,3
Hidrocarbonetos							
Heptadecano	91	7,17	240	71 (100); 85 (84); 99 (42); 113 (26); M ⁺ (<1)	1217	17,4 ± 1,3	nd
2-Metil octacosano	87	8,80	254	71 (100); 85 (82); 99 (56); 113 (35); M ⁺ (<1)	1431	22,2 ± 1,7	nd
Álcoois							
Glicerol	90	4,91	308	73 (100); 147 (98); 205 (66); 103 (55); M ⁺ (<1)	950	46,0 ± 3,2	nd
Hexadecanol	83	10,19	314	299 (100); 75 (42); 97 (39); 103 (30); M ⁺ (<1)	1632	23,3 ± 2,2	nd
Outros							
Adenina	81	9,73	279	264 (100); 73 (39); 265 (23); 279 (16); M ⁺ (17)	1564	nd	34,5 ± 2,8
Ácido glucônico	94	9,86	466	73 (100); 129 (41); 147 (37); 319 (22); M ⁺ (<1)	1582	nd	21,3 ± 1,3
Gluconolactona	90	9,86	466	73 (100); 129 (41); 147 (37); 319 (22); M ⁺ (<1)	1582	nd	21,3 ± 1,3

TR tempo de retenção **MMD** massa molecular derivatizada. **KI** Índice de kovats. * Íons de referência (intensidade relativa, pico base = 100%). M⁺ íon molecular. nd – não detectado. Media dos resultados ± erro padrão da média (n=6), expresso em µg g⁻¹.

6 Considerações finais

Com base nos dados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que, somente a análise molecular não foi suficiente para identificar os insetos em nível de espécie, mas foi possível inferir que ambos os insetos coletados pertencem à família Coccidae e gênero *Ceroplastes*. A análise morfológica complementou os dados moleculares e confirmou que as cochonilhas coletadas eram *Ceroplastes grandis* e *Ceroplastes glomeratus*.

A avaliação dos compostos semi-polares pela técnica de LC-MS/MS revelou distinta composição entre as espécies. O ácido ceroalbolínico foi o principal constituinte na espécie *C. grandis*, enquanto que o ácido carmínico foi o predominante na espécie *C. glomeratus* que o aponta como potencial fonte de extrato de vermelho carmim. No entanto, a extração e o rendimento do composto podem ser limitados devido à grande quantidade de camada cerosa no corpo dos insetos. Neste extrato também foram identificados nas duas espécies avaliadas a presença de três ácidos orgânicos (ácido málico, ácido cítrico e ácido úrico), dois açúcares (manitol e ribitol) e cinco ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido siringico, ácido ferulico e ácido *p*-cumárico).

Em relação a avaliação da fração cerosa dos insetos pela técnica de GC-MS, também foram observadas acentuadas diferenças entre as espécies. Em *C. grandis*, predominaram hidrocarbonetos, enquanto que em *C. glomeratus* ocorreu predominância de açúcares. Ésteres carboxílicos foram identificados somente em *C. glomeratus*, enquanto que terpenóides encontram-se presentes apenas em *C. grandes*. Estas diferenças entre as composições mostram potencial para auxiliar nas identificações taxonômicas de espécies e sugerem interações ecológicas diferenciadas para cada espécie.

7 Referências

ALVAREZ, M. M. C. Extracción, estabilización y evaluaciones analíticas del carmín. 2003. 113 f. Tese (Maestra en Ciencias en Tecnología Avanzada)- Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada, Instituto Politécnico Nacional, Mexico, 2003.

ANTONIO-CISNEROS, C. M.; DÁVILA-JIMÉNEZ, M. M.; ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. P.; GARCÍA-DÍAZ, E. Photoproducts of carminic acid formed by a composite from *Manihot dulcis* waste. **Food Chemistry**, v. 173, p. 725–732, 2015.

BOGO, A.; MANTLE, P. Oligosaccharides in the Honeydew of Coccoidea Scale Insects: *Coccus hesperidum* L. and a New *Stigmacoccus* sp. in Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 3, p. 589-596, 2000.

BORGES, M. E.; TEJERA, R. L.; DÍAZ, L.; ESPARZA, P.; IBÁÑEZ, E. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1855–1860, 2012.

BURGE, P.S.; BRIEN, I.M.; HARRIES, M.G.; PEPYS, J. Occupational asthma due to inhaled carmine. **Clin Allergy**, v. 9, p. 185-189, 1979.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BROWN, K. S. The chemistry of aphids and scale insects. **Chemical Society Reviews**, v. 4, n. 2, p. 263, 1975.

CAMACHO, E. R.; CHONG, J.-R. General biology and current management approaches of soft scale pests (Hemiptera: Coccidae). **Journal of Integrated pest Management**, v. 6, n. 1, p. 1–22, 2015.

CHUNG, K.; BAKER J.R.; BALDWIN, J.L.; CHOU, A. Identification of carmine allergens among three carmine allergy patients. **Allergy**, v. 56, n. 1, p. 73-77, 2001.

COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS (CNNPA). Resolução nº 44 de 1977 . **Diário Oficial da União**, 1977.

CONSTANT, P. B.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

DAPSON, R. W. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. **Biotechnic & histochemistry**, v. 82, n. 4, p. 173–187, 2007.

DENG, J.; WANG, X. B.; YU, F.; ZHOU, Q. S.; BERNARDO, U.; ZHANG, Y. Z.; WU, S. A. Rapid diagnosis of the invasive wax scale, *Ceroplastes rusci* Linnaeus (Hemiptera : Coccoidea : Coccidae) using nested PCR. **Journal of Applied Entomology**, v. 1, p. 1–6, 2013.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 5–22, 2000.

FERREIRA, E. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; VENTRELLA, M. C.; MARQUES, A. E.; PROCÓPIO, S. O. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 611–619, 2005.

FERRER, A.; MARCO, F. M.; ANDREU, C.; SEMPERE, J. M. Occupational Asthma to Carmine in a Butcher. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 138, p.243–250, 2005.

GAMARRA, F. M. F.; LEME, G. C.; TAMBOURGI, E. B.; BITTENCOURT, E. Extração de corantes de milho (*Zea mays* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 62–69, 2009.

GARIEPY, T. D.; MESSING, R. H. Development and use of molecular diagnostic tools to determine trophic links and interspecific interactions in aphid–parasitoid communities in Hawaii. **Biological Control**, v. 60, n. 1, p. 26–38, 2012.

GARIEPY, T. D.; HAYE, T.; ZHANG, J. A molecular diagnostic tool for the preliminary assessment of host–parasitoid associations in biological control programmes for a new invasive pest. **Molecular Ecology**, v.23, n.15, p.3912–3924, 2014.

GIMÉNEZ, P. J.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A.; ANGOSTO, J. M.; OBÓN, J. M. Published Comparative thermal degradation patterns of natural yellow colorants used in foods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 4, p. 380–387, 2015.

GOLEBIEWSKI, M.; BOGUS, M. I.; PASZKIEWICZ, M.; STEPNOWSKI, P. The composition of the free fatty acids from *Dendrolimus pini* exuviae. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 4, p. 391–397, 2010.

GONZÁLEZ, E. A.; GARCÍA, E. M.; NAZARENO, M. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extracts. **Food Chemistry**, v.119, p. 358-362, 2010.

GONZÁLEZ, M.; MEÄNDEZ, J. S.; CARNERO, A.; LOBO, M. G.; AFONSO, A. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6968–6974, 2002.

GOSETTI, F.; CHIUMINATTO, U.; MAZZUCCOA, E.; MASTROIANNI, R.; MARENGOA, E. Ultra-high-performance liquid chromatography/tandem high-resolution mass spectrometry analysis of sixteen red beverages containing carminic acid: Identification of degradation products by using principal component analysis/discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 454–462, 2015.

GRANARA DE WILLINK, M. C. Conociendo nuestra fauna I. Superfamilia Coccoidea (Homoptera: Sternorrhyncha). 1990. 43f (Monográfica y Didáctica) - Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidade Nacional de Tucumán, Argentina.

HACKMAN, R. H.; TRIKOJUS, V. M. The composition of the honeydew excreted by Australian coccids of the genus *Ceroplastes*. **Biochemical Journal**, v. 51, n. 5, p. 653–656, 1952.

HALKET, J. M.; WATERMAN, D.; PRZYBOROWSKA, A. M; PATEL, R. K. P.; FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 219–243, 2005.

HAN, Y. S.; HEIJDEN, R. V.; VERPOORTE, R. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae. **Plant Cell**, v. 67, p. 201–220, 2001.

IEDE, E. T.; MACHADO, D. C. Pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill.) e seu controle. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 18, p. 51-60, 1989.

KAMTHAN, A.; KAMTHAN, M.; CHAKRABORTY, N.; CHAKRABORTY, S.; DATTA, A. A simple protocol for extraction, derivatization, and analysis of tomato leaf and fruit lipophilic metabolites using GC-MS. **Protocol Exchange**, p. 4–8, 2012.

KEMMOCHI, S.; SHIMAMOTO, K.; SHIRAKI, A.; ONDA, N.; HASUMI, K.; SUZUKI, K.; MITSUMORI, K.; SHIBUTANI, M. Promoting effects of carminic acid-enriched cochineal extracts on capsular invasive thyroid carcinomas through targeting activation of angiogenesis in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 37, n. 3, p. 475–482, 2012a.

KEMMOCHI, S.; YAMAMICHI, S.; SHIMAMOTO, K.; ONDA, N.; HASUMI, K.; SUZUKI, K.; MITSUMORI, K.; SHIBUTANI, M. Lac color inhibits development of rat thyroid carcinomas through targeting activation of plasma hyaluronan-binding protein. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 728–738, 2012b.

KING, A. G.; MEINWALD, J. Review of the defensive chemistry of Coccinellids. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 1105-1122, 1996.

KOMURA, H.; MIZUKAWA, K.; MINAKATA, H. Ceroalbolinic acid, a common body pigment of three *Ceroplastes* scale insects in Japan. Confirmation of structure. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 55, p. 3053–3054, 1982.

KONDO, T.; GULLAN, P. J.; WILLIAMS, D. J. Coccidology. The study of scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 9, n. 2, p. 55–61, 2008.

LECH, K.; WITKOŚ, K.; WILEŃSKA, B.; JAROSZ, M. Identification of unknown colorants in pre-Columbian textiles dyed with American cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 855–867, 2015.

LEVENBOOK, L.; HOLLIS, V. W. Organic acid in insect-I Citric acid. **Journal of Insect Physiology**, v. 6, p. 52–61, 1961.

LI, G. X.; LIU, Z. Q.; WU, D. Carminic acid: An antioxidant to protect erythrocytes and DNA against radical-induced oxidation. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 22, n. December 2008, p. 883–887, 2009.

LLOYDE, A. G. Extraction and chemistry of cochineal. **Food Chemistry**, v. 5, p. 91–107, 1980.

LOPES-DA-SILVA, F.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J.; SANTOS-BUELGA, C. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 3, p. 248–253, 2002.

MACHATOVA, Z.; BARBIERIKOVÁ, S.; POLIAK, P.; JANCOVICOVÁ, V.; LUKES, V.; BREZOVÁ, V. Study of natural anthraquinone colorants by EPR and UV/vis spectroscopy. **Dyes and Pigments**, v. 132, p. 79–93, 2016.

MAJERUS, M. E. N.; SLOGGETT, J. J.; GODEAU, J. F.; HEMPTINNE, J. L. Interactions between ants and aphidophagous and coccidophagous ladybirds. **Population Ecology**, v. 49, n. 1, p. 15–27, 2007.

MARTELLI, G.; FOLLIB, C.; VISAIC, L.; DAGLIAE, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 154–159, 2014.

McCANN, D.; BARRETT, A.; COOPER, A.; CRUMPLER, D.; DALEN, L.; GRIMSHAW, K.; KITCHIN, E.; LOK, K.; PORTEOUS, K.; PRINCE, E.; SONUGA-BARKE, E.; WARNER, J. O.; STEVENSON, J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 370, p. 1560–1567, 2007

MENDONÇA, J. N. Identificação e Isolamento de Corantes Naturais produzidos por Actinobactérias. 2011. 121f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

NISHIDA, R.; SHELLY, T. E.; WHITTIER, T. S.; KANESHIRO, K. Y. α -copaene, a potential rendezvous cue for the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*? **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 1, p. 87–100, 2000.

OHGIYA, Y.; ARAKAWA, F.; AKIYAMA, H.; YOSHIOKA, Y.; HAYASHI, Y.; SAKAI, S.; ITO, S.; YAMAKAWA, Y.; OHGIYA, S.; IKEZAWA, Z.; TESHIMA, R. Molecular cloning, expression, and characterization of a major 38-kd cochlear allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, p.1157-1162, 2009.

OKA, H.; ITO, Y.; YAMADA, S.; KAGAMI, T.; KAYAKAWA, J.; HARADA, K.; ATSUMI, E.; SUZUKI, M.; SUZUKI, M.; ODANI, H.; AKAHORI, S.; MAEDA, K.; TANAKA, T.; MIZUNO, M. Identification of lac dye components by electrospray high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry Society Japan**, v. 46, n.1, p. 63-68, 1998.

PARK, D.; SUH, S. J.; HEBERT, P. D. N.; OH, H. W.; HONG, K. J. Biological DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera : Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera : Diaspididae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 101, p. 429-434, 2011.

PAUL, M. D. **Medicinal Natural Products**. 2. ed. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 2002. 486 p.

PÉREZ QUIROZ, M. A. Estudio Técnico para la implementación de una planta procesadora de cochinilla para la obtención del carmín. 2014. 107f. Tese (Ingeniero Industrial) - Facultad De Ciencias e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica del Perú, Peru, 2014.

PERKIN, W. H. Os Corantes Alimentícios. **Aditivos & Ingredientes**, p. 28–39, 2016.

PERONTI, A. L. B.; SOUSA-SILVA, C. R. .; WILLINK, M. C. Revisão das espécies de Ceroplastinae Atkinson (Hemiptera, Coccoidea, Coccidae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 2, p. 139–181, 2008.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. The **Clinical Biochemist Reviews**, v. 30, n. 1, p. 19–34, 2009.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 222–239, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

RÍOS, T. Ceroalbolinic acid a new anthraquinone pigment isolated from *Ceroplastes albolineatus*. **Tetrahedron**, v. 22, n. 4, p. 1507–1512, 1966.

ROSA, K. C. C.; PERONTI, A. L. B. G.; HODGSON, C. J.; SOUSA-SILVA, C. R. Morphology of the immature female stages and the wax test of ten species of *Ceroplastes* (Hemiptera: Coccoomorpha: Coccidae: Ceroplastinae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 4136, n. 2, p. 247–308, 2016.

RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 17, p. 1–11, 2013.

SALMINEN, J.; LAHTINENA, M.; LEMPAB, M.; KAPARIB, L.; HAUKIOJAB, E.; PIHLAJA, K. Metabolic modifications of birch leaf phenolics by an herbivorous insect : detoxification of flavonoid aglycones via glycosylation. **Z. Naturforsch**, v. 59, p.437-444, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTOS, I. H. Formulación del proyecto de una empresa productora de grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa). 2014. 113 f. Tese (Ingeniero en restauración forestal) - Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, 2014.

SHAMIM, G.; RANJAN, S. K.; PANDEY, D. M.; RAMANI, R. Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. **European Journal of Entomology**, v. 111, n. 2, p. 149–164, 2014.

STATHOPOULOU, K.; VALIANOU, L.; SKALTSOUNIS, A. L.; KARAPANAGIOTIS, I.; MAGIATIS, P. Structure elucidation and chromatographic identification of anthraquinone components of cochineal (*Dactylopius coccus*) detected in historical objects. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 264–272, 2013.

SUN, Q.; LUO, Y.; YANG, X.; XIANG, P.; SHEN, M. Detection and identification of dyes in blue writing inks by LC-DAD-orbitrap MS. **Forensic Science International**, v. 261, p. 71–81, 2016.

SZAFRANEK, B.; PASZKIEWICZ, M.; GOŁĘBIOWSKI, M.; STEPNOWSKI, P. Gas chromatographic analysis of plant and insect surface compounds: cuticular waxes and terpenoids. In. Gas Chromatography in Plant Science Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications, 2012. Intech, ISBN:978-953-51-0127-7

TAMAKI, Y. Carbohydrates in the honeydew excreted by *Ceroplastes pseudoceriferus* (Green). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v. 8, n. 3, p. 227-234, 1964.

TOKI, M.; OOI, T.; KUSUMI, T. Sesterterpenoids and diterpenoids of the wax excreted by a scale insect, *Ceroplastes pseudoceriferus*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 11, p. 1504–1509, 1999.

TUTEM, E.; APAK, R.; SOZGEN, K. The interaction of antitumor-active anthraquinones with biologically important redox couples .1. Spectrophotometric investigation of the interaction of carminic acid and mitoxantrone with the iron (II,III) and copper (I,II) redox couples. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 79–96, 1996.

VAN DEN BERG, A. J. Biotechnology and biosynthesis of quinones. **Pharmaceutisch weekblad. Scientific edition**, v. 13, n. 2, p. 74–77, 1991.

VELIŠEK, J.; DAVÍDEK, J.; CEJPEK, K. Biosynthesis of food constituents: Natural pigments. Part 2 - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 2, p. 73–98, 2008.

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to those artificial FD&C food colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 59–77, 2012.

YAN, Z. G.; WANG, C. Z. Identification of *Mythmna separata*-induced maize volatile synomones that attract the parasitoid *Campoletis chloridae*. **Journal of Applied Entomology**, v. 130, n. 4, p. 213–219, 2006.

YEW, J. Y.; CHUNG, H. Insect pheromones : An overview of function, form, and discovery. **Progress in Lipid Research**, v. 59, p. 88–105, 2015.

ZHANG, G. F.; MENG, X. K.; MIN, L.; QIAO, W. N.; WAN, F. H. Rapid diagnosis of the invasive species, *Frankliniella occidentalis* (Pergande): a species-specific COI marker. **Journal of Applied Entomology**, v. 136, p. 410–420, 2012.