



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCIMAURO SOUSA MORAIS

POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO LATEX DE
Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel

FORTALEZA

2020

FRANCIMAURO SOUSA MORAIS

POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO LATEX DE
Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Recursos naturais.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M825p Morais, Francimauro Sousa.
 Potencialidades e aplicações biotecnológicas do latex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel /
Francimauro Sousa Morais. – 2020.
 142 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2020.
 Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
1. Latex. 2. Bioinseticida. 3. Antidiabética. 4. Enzimas. 5. Iridoides Glicosilados. I. Título.
- CDD 660.6
-

FRANCIMAURO SOUSA MORAIS

POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO LATEX DE
Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Recursos naturais.

Aprovada em: 27/03/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Ayrles Fernanda Brandão da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Antônio Eufrásio Vieira Neto
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tão grandioso e infinitamente misericordioso por nos permitirmos nascer e sobreviver no mundo de hoje, onde a maioria das pessoas só pensa no capital, por me mostrar o caminho que devo seguir e sempre respeitando o ser humano.

A minha mãe, Teresinha Sousa Morais, pelas batalhas que travou para criar a mim e aos meus irmãos, proporcionando o máximo que ela podia, em especial nos oportunizando a educação, que é o bem mais importantes que os pais podem fornecer aos filhos.

Aos meus avós maternos, Edith Barbosa Maciel e João Barbosa quem em um momento importante da minha vida foi que me proporcionaram muitas alegrias e carinhos.

Aos meus irmãos, Francileide Morais, Francisca Bethânia, Jefferson Pádua e Alba Tereza, pelas brigas que tivemos quando crianças e muitas alegrias que temos até hoje. Pelas reuniões que sempre fazemos pelo menos uma vez no ano, onde todos se encontram, compartilhamos todas as alegrias, tristezas de cada um e assim crescermos juntos.

Aos meus queridos sobrinhos, Rafael, Theo, Manu, João Pedro, José Irlan, João Heitor, que nos mostram que a vida é muito bela e que nos proporcionam momentos felizes.

A minha esposa, Maria do Socorro Morais pela paciência que sempre teve, pela coragem de sempre me acompanhar e trabalharmos juntos para buscarmos os sonhos que sonhamos e pela ótima mãe que é para nossos filhos.

Aos meus filhos, Francimauro Filho e Mayrton Morais que sem saberem, me transformaram em uma pessoa melhor, pois são a razão da minha vida, pois por eles que sempre estou em buscar de melhores oportunidades para nossas vidas, para que não precisem terem tantas dificuldades como tive.

Ao meu orientador, Professor Dr. Márcio Viana Ramos que sem nem me conhecer, me recebeu em seu laboratório como aluno de Doutorado. Foi uma grata surpresa que, além de ter um orientador que me deu todo o apoio científico e intelectual, encontrei uma pessoa humana, um ótimo pai, um excelente filho e além de tudo um amigo. É uma pessoa em que sempre vou me espelhar, que contribuir muito na minha formação acadêmica e principalmente no pessoal. Por isso que agradeço a Deus, por colocar pessoas como ele no meu caminho e que Deus continue iluminando sua vida.

Aos pesquisadores Drs. Kirley Canuto e Paulo Riceli, que considero como amigos e que sem eles, não teria como desenvolver minha pesquisa, pois nos permitiu utilizar a ótima estrutura

dos laboratórios da Embrapa, que em alguns momentos além de fazerem as análises, as mesmas eram realizadas prontamente até mesmo nos fins de semana.

Ao Alisson Batista, que foi uns dos amigos que fiz aqui em Fortaleza. É uma pessoa muito inteligente e solícito, que me ajudou muito nas resoluções e identificações das substâncias do trabalho, vindo muitas vezes em feriados e fins de semanas trabalhar comigo até altas horas na purificação de moléculas no laboratório da química. Torço muito por ele, que consiga conquistas seus sonhos, pois é pessoa bastante batalhadora.

A Professora Dra. Ótilia Deusdenia Loiola Pessoa, pela disponibilidade prontamente de liberar a utilização do seu laboratório e equipamentos, além de ser uma pessoa muito maravilhosa, uma ótima mãe e ser uma professora admirável.

Ao senhor Aluísio Saraiva, que era uma pessoa maravilhosa que coletava o latex todo mês e que infelizmente veio a falecer no dia 24.06.2019 na parte da tarde desta mesma data. Na parte da manhã ela havia feito uma coleta de látex de janaguba que não era comum naquela data, pois sempre coletava no primeiro dia de cada Mês.

Aos meus amigos, alunos, colegas do laboratório e a todas as pessoas que me incentivaram e ajudaram de alguma forma.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Selene Maia de Moraes, Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira e Prof. Dr. Antônio Eufrásio Vieira Neto, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Á FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

Substâncias naturais ativas podem ser obtidas através da medicina popular. Devido à grande procura por medicamentos fitoterápicos que são mais acessíveis à população mais carente e grande utilização destas plantas na região nordeste do Brasil para fins terapêuticos diversos, torna-se importante verificar a composição química e tentar comprovar os efeitos biológicos e ações farmacológicas atribuída a plantas medicinais. O objetivo deste trabalho foi de comprovar os efeitos do latex e seus constituintes químicos frente as enzimas α -amilase e α -glucosidase além do potencial bioinseticida dos compostos identificados no latex de *Himatanthus drasticus*. A identificação fitoquímica dos compostos presentes na fração etanólica (FHDHA) do latex de *H. drasticus* foi possível pela análise por espectroscopia RMN ^1H , ^{13}C , espectrometria de massa e comparação com dados da literatura. Os compostos identificados foram: α -etil-glicosídeo, ácido protocatecuico, ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido 15-desmetilplumierido, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, ácido cafeico, ácido vanílico, plumierídeo e catequina. Os resultados de IC_{50} obtidos da fração FHDHA oriunda do fracionamento líquido-líquido com solventes de polaridades crescente, da subfração etanólica FHDHA1 oriunda da separação em SPE C18 eluída com MeOH: H₂O (0:100) e do plumieride oriundo do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 da subfração etanólica FHDHA3 eluída com MeOH contra a enzima α -amilase foram 36,46, 72,61, 33,87 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Essas enzimas estão envolvidas no processo de absorção de glicose. A presença de substâncias com ação inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase, possibilitou verificar atividade bioinseticida frente ao *Callosobruchus maculatus*, que é uma das pragas mais nocivas de armazenamento do feijão-caupi e outras leguminosas. Os resultados da fração FHDHA e o plumierídeo apresentaram concentrações letais LC_{50} muito próximas FHDHA (0,109) e plumierídeo (0,106), respectivamente. A fração FHDHA e o plumierídeo na concentração de 0,25%, não houve desenvolvimento de larvas e a mortalidade larval foi de 100%. O plumierídeo (composto majoritário) danificou as células intestinais das larvas, visto que nenhuma larva conseguiu se desenvolver nos feijões artificiais. Os resultados dos bioensaios realizados por aplicação direta nas sementes de feijão da fração FHDHA mostrou uma diminuição percentual na perda de massa e para as amostras tratadas com FHDHA (2,00%) conseguiu proteger os feijões da infestação por *C. maculatus*, o que demonstra sua ação bioinseticida e seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Latex. Bioinseticida. Antidiabética. Enzimas. Iridoides Glicosilados.

ABSTRACT

Active natural substances can be obtained through folk medicine. Due to the great demand for herbal medicines that are more accessible to the poorest population and the great use of these plants in the northeast region of Brazil for different therapeutic purposes, it is important to check the chemical composition and try to prove the biological effects and pharmacological actions attributed to plants medicines. The objective of this work was to prove the effects of latex and its chemical constituents against the enzymes α -amylase and α -glucosidase in addition to the bioinsecticidal potential of the compounds identified in the latex of *Himatanthus drasticus*. The phytochemical identification of compounds presents in the ethanolic fraction (FHDHA) of *H. drasticus* latex was made possible by analysis by ^1H , ^{13}C NMR spectroscopy, mass spectrometry and comparison with literature data. The identified compounds were: α -ethyl-glycoside, protocatechuic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 15-demethylplumieride acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, caffeic acid, vanillic acid, plumieride and catechin. IC_{50} results obtained from the FHDHA fraction from liquid-liquid fractionation with solvents of increasing polarity, from the ethanolic subfraction FHDHA1 from the separation in SPE C18 eluted with MeOH: H_2O (0: 100) and from the plumieride from fractionation in Sephadex column LH-20 of the ethanolic subfraction FHDHA3 eluted with MeOH against the α -amylase enzyme were 36.46, 72.61, 33.87 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These enzymes are involved in the glucose absorption process. The presence of substances that inhibit the α -amylase and α -glucosidase enzymes, made it possible to verify bioinsecticidal activity against *Callosobruchus maculatus*, which is one of the most harmful storage pests of cowpea and other legumes. Results of the FHDHA fraction and the plumieride showed LC_{50} lethal concentrations very close to FHDHA (0.109%) and plumieride (0.106%), respectively. The FHDHA fraction and the plumieride at a concentration of 0.25%, there was no development of larvae and larval mortality was 100%. Plumieride (major compound) damaged the intestinal cells of the larvae, since no larvae managed to develop in the artificial beans. The results of the bioassays carried out by direct application to the bean seeds of the FHDHA fraction showed a percentage decrease in mass loss and for the samples treated with FHDHA (2.00%) managed to protect the beans from infestation by *C. maculatus*, which demonstrates its bioinsecticidal action and its biotechnological potential.

Keywords: Latex. Bioinsecticide. Enzymes. Glycosylated Iridoides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– <i>Himatanthus drasticus</i> , A- Caule, B-Caule, C-Folhas, Frutos e Sementes.....	16
Figura 2	– Figura 1- Garrafa contendo Latex: H ₂ O (1:1) de <i>Himatanthus drasticus</i>	17
Figura 3	– Estruturas de metabólitos secundários isolados de <i>H. drasticus</i> parte 1.....	26
Figura 4	– Estruturas de metabólitos secundários isolados de <i>H. drasticus</i> parte 2.....	27
Figura 5	– Estruturas de metabólitos secundários isolados de <i>H. drasticus</i> parte 3.....	28
Figura 6	– Fluxograma de isolamento e identificação dos compostos do latex <i>H. drasticus</i> 1-9.....	33
Figura 7	– Prospecção fitoquímica por CCD do extrato bruto e frações do latex de <i>H. drasticus</i>	37
Figura 8	– RMN ¹ H (300 MHz, CH ₃ OD) do composto 1.....	39
Figura 9	– RMN ¹³ C (75 MHz, CH ₃ OD) do composto 1.....	40
Figura 10	– RMN ¹ H (300 MHz, CH ₃ OD) do composto 2.....	41
Figura 11	– RMN ¹³ C (75 MHz, CH ₃ OD) do composto 2.....	42
Figura 12	– Espectro de massas no modo negativo [M–H] [–] do composto 2.....	43
Figura 13	– RMN ¹ H (600 MHz, CH ₃ OD) do composto 3.....	44
Figura 14	– HSQC gráfico de correlação (¹ H/ ¹³ C) do composto 3.....	45
Figura 15	– Espectro de massas no modo negativo [M–H] [–] do composto 3.....	46
Figura 16	– RMN ¹ H (600 MHz, CH ₃ OD) do composto 4.....	47
Figura 17	– HSQC gráfico de correlação (¹ H/ ¹³ C) do composto 4.....	48
Figura 18	– Espectro de massas no modo negativo [M–H] [–] do composto 4.....	49
Figura 19	– RMN ¹ H (600 MHz, CH ₃ OD) do composto 5.....	50
Figura 20	– RMN ¹³ C (150 MHz, CH ₃ OD) do composto 5.....	51
Figura 21	– RMN ¹³ C (150 MHz, CH ₃ OD) do composto 5.....	52
Figura 22	– RMN ¹ H (600 MHz, CH ₃ OD) do composto 6.....	53

Figura 23	–	RMN ^{13}C (150 MHz, CH_3OD) do composto 6.....	54
Figura 24	–	Espectro de massas no modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$ do composto 6.....	55
Figura 25	–	RMN ^1H (600 MHz, CH_3OD) do composto 7.....	56
Figura 26	–	RMN ^{13}C (150 MHz, CH_3OD) do composto 7.....	57
Figura 27	–	Espectro de massas no modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$ do composto 7.....	58
Figura 28	–	RMN ^1H (300 MHz, CH_3OD) do composto 8.....	59
Figura 29	–	RMN ^{13}C (75 MHz, CH_3OD) do composto 8.....	60
Figura 30	–	Espectro de massas no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ do composto 8.....	61
Figura 31	–	RMN ^1H (300 MHz, CH_3OD) do composto 9.....	63
Figura 32	–	RMN ^{13}C (75 MHz, CH_3OD) do composto 9.....	64
Figura 33	–	Espectro de massas no modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$ do composto 9.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Propriedades e efeitos farmacológicos de diferentes partes de <i>H. drasticus</i>	19
Tabela 2	– Metabólitos secundários identificados em <i>Himatanthus drasticus</i>	24
Tabela 3	– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto 8 em Pyridine.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	<i>Himatanthus drasticus</i>	15
3.2	Propriedades Farmacologicas	17
4	CAPITULO 1 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NO LATEX DE <i>Himatanthus drasticus</i> (MART.) PLUMEL	22
5	CAPITULO 2 - ARTIGO ACEITO	68
6	CAPITULO 3 - ARTIGO SUBMETIDO	102
7	CONCLUSÕES	135
	REFERENCIAS	136