

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS - FARMANGUINHOS

Lívia Abreu Santos

Abordagem multidisciplinar do látex medicinal de *Euphorbia umbellata* (Euphorbiaceae) para sua aplicação como matéria-prima farmacêutica

Rio de Janeiro
2020

Lívia Abreu Santos

**Abordagem multidisciplinar do látex medicinal de *Euphorbia umbellata*
(Euphorbiaceae) para sua aplicação como matéria-prima farmacêutica**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Siani

2º Orientador: Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Rio de Janeiro

2020

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

S237a Santos, Livia Abreu

Abordagem multidisciplinar do látex medicinal de *Euphorbia umbellata* (Euphorbiaceae) para sua aplicação como matéria-prima farmacêutica. / Livia Abreu Santos. – Rio de Janeiro, 2020.

viii, 135 f.; 30 cm.

Orientadores: Antonio Carlos Siani e Helvécio Vinícius Antunes Rocha.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2020.

Bibliografia: f. 118-135

1. *Euphorbia umbellata*. 2. Euphorbiaceae. 3. Terpenoides. 4. Ésteres de Forbol. 5. Látex. I. Título.

CDD 615.1


Lívia Abreu Santos

**Abordagem multidisciplinar do látex medicinal de *Euphorbia umbellata*
(Euphorbiaceae) para sua aplicação como matéria-prima farmacêutica**


Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em 17 de março de 2020.

Banca Examinadora:



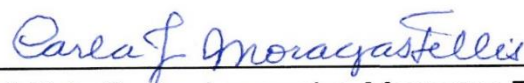
Prof. Dr. Antonio Carlos Siani
Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos – FIOCRUZ
(orientador)



Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha
Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos – FIOCRUZ (2º
orientador)



Prof.^a Dr.^a Erika Martins de Carvalho
Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos – FIOCRUZ



Prof.^a Dr.^a Carla Junqueira Moragas Tellis
Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos – FIOCRUZ



Prof. Dr. Luiz Antônio D'Avila
Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro – EQ/UFRJ

Rio de janeiro
2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que
buscam evoluir através do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Serafim e Regina, por todo amor, paciência, incentivo em todos os momentos, mas principalmente por acreditarem na minha capacidade para realização dessa importante etapa de minha formação profissional.

À minha família, pelo apoio e pela compreensão de minha ausência em muitas comemorações e reuniões. Em especial ao meu parceiro, companheiro e grande amor Elton Macedo, por toda paciência, carinho e dedicação para que eu pudesse realizar essa conquista, se eu consegui foi graças ao seu apoio incansável. Agradeço imensamente ao meu irmão Bruno e minha cunhada Roberta por me acolherem com tanto carinho e por todos os conselhos oferecidos durante essa jornada.

Aos meus orientadores, Dr. Antonio Carlos Siani e Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha, pela confiança, apoio, dedicação, aprendizado, ensinamentos e orientação para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. José Luiz Mazzei pela ajuda inestimável na realização das análises e discussão de resultados.

Ao Dr. João Tostes pelo fornecimento de substâncias isoladas, e principalmente por todo apoio, dedicação e transmissão do conhecimento para o desenvolvimento do estudo.

A toda equipe do laboratório Tec4Bio de Farmanguinhos, Marcos Jun, Elizete Lima, Gabrielle e Andressa, pelas horas de dedicação e carinho; sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria possível, foi um prazer trabalhar com vocês.

Ao Laboratório de Micro e Nanotecnologia (LMN) pela disponibilidade e orientação do uso dos equipamentos, e principalmente pela atenção e ajuda para a discussão dos resultados.

À Dra. Raquel E. da Silva Lopez e sua equipe pela valiosa colaboração com a prospecção proteica, o que possibilitou o conhecimento nesta área no estudo.

Ao laboratório de Virologia Molecular da UFRJ, liderado pelo Dr. Amílcar Tanuri, pelos ensaios de atividades *in vitro*, que nortearam a pesquisa.

Ao Serviço de Métodos Analíticos (SMA) e ao Laboratório de Estudos do Estado Sólido (LEES) de Farmanguinhos/FIOCRUZ pela disponibilidade de utilização de equipamentos e colaboração na realização de análises.

À minha turma de mestrado. Foi um prazer conhecê-los e poder dividir este período com vocês. Obrigado por todos exemplos e contribuições, não so na vida profissional, mas também pessoal. Em especial a turma de pesquisa, meus amigos,

Andressa, Luiz e Thalita, pelo companheirismo, incentivo, conselhos, carinho e amizade nestes dois anos, essa conquista é nossa.

Aos Funcionários do Departamento de Pesquisa em Produtos Naturais de Farmanguinhos/FIOCRUZ por toda a ajuda na realização deste trabalho.

A FIOTEC, pelo apoio financeiro.

“Se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

RESUMO

SANTOS, Livia Abreu. *Abordagem multidisciplinar do látex medicinal de Euphorbia umbellata (Euphorbiaceae) para sua aplicação como matéria-prima farmacêutica* 2020. 135f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

O látex medicinal da Euphorbiaceae *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (jamaúba) é usado popularmente para tratar diversas enfermidades. Foram coletadas oito amostras de látex em dois locais distintos (Barretos (BA) e Nova Friburgo (NF)). Após liofilização direta e extração com EtOH 80%, seus perfis químicos foram empiricamente otimizados em CCD, CLAE-DAD (gradiente CH₃CN-H₂O) e CG. A separação entre grupos de triterpenos (T) e diterpenos (D) foi ensaiada com o látex liofilizado por (i) extração em fase sólida (EFS) em mini-colunas (RP-18, CH₃CN) e (ii) partição por solubilidade em misturas de CH₃CN-H₂O. Os conteúdos de T e D foram obtidos por CG-DIC, considerando-se os sinais previamente caracterizados por CG-EM nas frações separadas. O conteúdo proteico do látex foi investigado pelo método de Bradford, atividade enzimática e eletroforese. A atividade proteolítica foi avaliada sobre os substratos gelatina, caseína, hemoglobina e BSA, e a inibição enzimática utilizou os inibidores específicos das principais classes de proteínas BZA, E-64, EDTA e pepstatina. Para o látex liofilizado (BA e NF) foram determinados umidade, ponto de fusão, TGA, DSC. Foram avaliados a granulometria, densidade aparente (D_a) e compactada (D_c), fluxo por orifício e ângulo de repouso, razão de Hausner (RH), índice de Carr (IC), área superficial (BET), MEV e DRX. A separação eficiente (T x D) em TLC foi estabelecida com 5% de Et₂O ou Me₂CO em CHCl₃ (sílica gel) e CH₃CN na fase reversa. Apesar do viés da baixa pureza dos sinais, a técnica de CG revelou-se como a mais adequada para detectar os constituintes triterpenoides e isoprenoides, enquanto CLAE foi adequada para os diterpenos. Todas as amostras de látex apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, com variações ocasionais na abundância de constituintes específicos. EFS foi o processo mais eficiente e seletivo para separar grupos de T e D, além de permitir o aumento de carga em 5x na mesma coluna. O látex fresco mostrou possuir 3,45 mg/mL (BA) e 4,59 mg/mL (NF) de proteínas totais, cujas massas foram indicadas por eletroforese como 149, 94, 75, 48, 36, 30, 25, 16, 15, 14 e 12 kDa. Serino- e cisteínoproteases foram as principais classes de proteínas nos látices de ambas origens. Os látices apresentaram umidade média de 3% (BA) e 4% (NF) e faixas de fusão de 95-105 °C e 190-210 °C, respectivamente, com amostras semicristalinas e morfologia heterogênea. DSC mostrou um pico endotérmico de entalpia em 15,33 J/g na faixa de 49,96-57,30 °C (BA) e 13,09 J/g na faixa de 47,06-54,09 °C (NF). TGA indicou perda de massa (3-4%) até 100 °C, com efeito mais pronunciado a partir de 250 °C até próximo de 500 °C para BA e NF. As propriedades de fluxo e processabilidade foram diferentes: D_a 0,50 g/mL, D_c 0,57 g/mL, RH 1,14, IC 12,28%, ângulo de repouso 15,6°, fluxo por orifício 45 s/100g (BA) e (D_a 0,29 g/mL, D_c 0,38 g/mL, RH 1,31, IC 23,68%, ângulo de repouso 18,2°, fluxo por orifício 0,10 s/g (NF). Os resultados obtidos ampliaram o conhecimento sobre o látex de *E. umbellata* e estabeleceram uma base informacional para subseqüentes avanços químicos e farmacotécnicos com essa matéria-prima.

Palavras-chave: 1. *Euphorbia umbellata* 2. Euphorbiaceae 3. Terpenoides 4. Ésteres de forbol 5. Látex.

ABSTRACT

The medicinal latex of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyins (Euphorbiaceae) (janaúba) is popularly used to treat various diseases. Eight latex samples were collected in two different locations (Barretos (BA) and Nova Friburgo (NF)). After direct lyophilization or extraction with 80% EtOH, their chemical profiles in TLC, HPLC-PDA and GC were empirically optimized. Separation between groups of triterpenes (T) and diterpenes (D) was assayed on the lyophilized latex by (i) solid phase extraction (SPE) in mini-columns (RP-18, CH₃CN), and (ii) partitioning in CH₃CN-H₂O mixtures. T and D contents were obtained by CG-FID, considering the signals previously identified by GC-MS. The protein content of latex was investigated by the Bradford method, enzymatic activity and electrophoresis. The proteolytic activity was assessed on the substrates: gelatin, casein, hemoglobin and BSA, and enzymatic inhibition employed the specific inhibitors from the main classes of proteins: BZA, E-64, EDTA and pepstatin. For lyophilized latex (BA and NF), the moisture, melting point, TGA, DSC were determined. Granulometry, bulk (D_{bulk}) and tapped (D_{tapped}) densities, flow through orifice and angle of repose, Hausner ratio (RH), Carr index (IC), surface area (BET), SEM and XRPD were evaluated. The efficient separation (T x D) in TLC was established with 5% Et₂O or Me₂CO in CHCl₃ (silica gel) and CH₃CN in reverse phase. Despite the bias from the low purity of the signals, the CG technique proved to be the most adequate to detect the triterpenoid and isoprenoid constituents, while HPLC was suitable for the diterpenes. All latex presented similar chromatographic profiles, with occasional variations in the abundance of specific constituents. SPE was the most efficient and selective process for separating T and D groups, in addition to allowing a 5x load increase in the same column. Fresh latex was found to have 3.45 mg/mL (BA) and 4.59 mg/mL (NF) of total proteins, whose masses were indicated by electrophoresis as 149, 94, 75, 48, 36, 30, 25, 16, 15, 14 and 12 kDa. Serine- and cysteine-proteases were the main protein classes in the lattices of both origins. The latex showed an average humidity of 3% (BA) and 4% (NF) and melting ranges of 95-105 °C and 190-210 °C, respectively, with semi-crystalline samples and heterogeneous morphology. DSC showed an enthalpy endothermic peak of 15.33 J/g in the range of 49.96-57.30 °C (BA) and 13.09 J/g in the range of 47.06-54.09 °C (NF). TGA indicated loss of mass (3-4%) up to 100 °C, with a more pronounced effect from 250 °C to close to 500 °C to both BA and NF. The flow and processability properties were different: D_{bulk} 0.50 g/mL, D_{tapped} 0.57 g/mL, RH 1.14, CI 12.28%, angle of repose 15.6°, flow through orifice 45 s/100g (BA) e D_{bulk} 0.29 g/mL, D_{tapped} 0.38 g/mL, RH 1.31, CI 23.68%; angle of repose 18.2°, flow through orifice 0.10 s/g (NF). The results obtained expanded the knowledge about *E. umbellata* latex and established an informational basis for subsequent chemical and pharmacotechnical advances with this raw material.

Keywords: 1. *Euphorbia umbellata* 2. Euphorbiaceae 3. Terpenoids. 4. Phorbol ester. 5. Latex.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: 12-O-tigloil-4-desoxiforbol-13-isobutirato isolado de *Euphorbia umbellata* (KINGHORN, 1980). Fonte: elaboração própria (2019). ----- 9
- Figura 2: *Euphorbia umbellata* cultivada município de Barretos, SP (A) e Itatiba, SP (B e C).----- 11
- Figura 3: Isopreno e ligação cabeça cauda de unidades isoprênicas. Fonte: elaboração própria (2019). ----- 20
- Figura 4: Esqueleto básico de tipos frequentes de diterpenos em Euphorbiaceae: Latirano = diterpeno tricíclico com um macrociclo de 11 membros e um ciclopropano; Dafnano = diterpenos tricíclico com um sistema anular triciclo [9.3.0.0] tetradecano; Tigliane = diterpeno tricíclico com um sistema anular triciclo [9.3.0.0] tetradecano e um ciclopropano gem-dimetílico ligado ao anel de 6 membros; Ingenano = Sistema anular definido por um bicyclo[4.4.1]undecano. Fonte: elaboração própria (2019). ----- 21
- Figura 5: Esqueleto carbônico do tigliano (I). II = estrutura básica do forbol (C-4 β). III = 4 α -forbol; IV = 4-desoxiforbol. Fonte: elaboração própria (2019). ----- 22
- Figura 6: Ésteres forbólicos presentes no látex de *E. umbellata* (Pax) Bruyns (*S. grantii* Hook. f.). Fonte: elaboração própria (2019) baseado em KINGHORN, 1980; BAGAVATHI *et al.*, 1988; HARTMANN *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2016. As estruturas destacadas representam as variações mais comuns do núcleo forbólico. ----- 23
- Figura 7: Triterpenos e esteroides descritos na constituição do látex de *E. umbellata* (Pax) Bruyns (sin. *S. grantii* Hook. f.). Fonte: elaboração própria (2019) sobre referências: NIELSEN *et al.*, 1979; DAWIDAR *et al.*, 2011; GIARDINI, 2012.----- 24
- Figura 8: Coleta do látex de *Euphorbia umbellata* de plantas cultivadas no município de Barretos (SP). Foto de Wilson Barros, 2018.----- 43
- Figura 9: Esquema dos processamentos realizados com o látex de *E. umbellata* e obtenção dos extratos secos. As variações do processo foram inteiramente monitoradas por CCD.----- 43
- Figura 10: Látex após descongelamento e látex após homogeneização, respectivamente. ----- 57
- Figura 11: Extrato hidroetanólico (fração solúvel ESNF1) e Extrato hidroetanólico (fração insolúvel, EIBA1).----- 59
- Figura 12: Cromatografia em Camada delgada (CCD), Fase estacionária: A (gel sílica) B: Fase reversa (RP-18); Fase móvel: A: CHCl₃:éter etílico (95:5); B: CH₃CN (100%). LLBA1 = látex liofilizado Barretos; EIBA1 = extrato EtOH 80% 01/17. Concentração das amostras: 5 mg/mL (10 μ L aplicados em cada spot). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico em metanol a 105 °C (estufa por 10 min). ----- 60
- Figura 13: Cromatografia em Camada delgada (CCD) dos látices liofilizados (LLBA1; LLBA2) e dos extratos etanólicos (EIBA1; EIBA2) Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 5% de acetona em CHCl₃. Concentração das amostras: 5mg/mL (10 μ L aplicados em cada spot). Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, aquecimento a 105 °C.----- 60
- Figura 14: Cromogramas CLAE-DAD dos extratos do caule de *E. umbellata* (*S. grantii*) obtidos nas 4 estações. Leitura em 210 nm. Fonte: CAMPOS, 2015. ----- 61
- Figura 15: Cromogramas CLAE-DAD dos látices liofilizados. LLBA: Látices liofilizados de Barretos LLNF = Látices liofilizados de N. Friburgo. Todas as análises foram feitas nas mesmas condições operacionais e obtidas com os mesmos parâmetros gráficos. ----- 62
- Figura 16: (a) UV representativo de éster de forbol. (b) UV representativo de triterpeno/esteroide. -- 63
- Figura 17: Cromogramas CLAE-DAD de EIBA: extrato etanólico insolúvel Barretos, ESBA: extrato hidroetanólico solúvel Barretos e ESNF: extrato hidroetanólico solúvel N. Friburgo. As análises foram todas feitas nas mesmas condições operacionais e com os mesmos parâmetros gráficos. Condições de análise: item 5.8.----- 64
- Figura 18: Cromogramas expandidos de CG-DIC dos látices liofilizados, destacando os sinais mais relevantes. LLBA: Látices liofilizados de Barretos LLNF = Látices liofilizados de N. Friburgo. Condições de análise: ver item 5.10. ----- 67
- Figura 19: Cromogramas expandidos de CG-EM dos látices liofilizados, destacando os sinais mais relevantes. LLBA: Látices liofilizados de Barretos LLNF = Látices liofilizados de N. Friburgo. Condições de análise: ver item 5.9.----- 68

Figura 20: Fragmentação típica de triterpenos do tipo lanosterol/eufol. -----	70
Figura 21: Fragmentação típica de substâncias isoprenoides com cadeia carbônica saturada. -----	71
Figura 22: Comparação entre as áreas (%) dos referentes ao somatório dos sinais majoritários 4 e 6 (eufol + lanosterol) e 1 (isoprenoide acíclico) dos cromatogramas dos látices liofilizados. Condições de análise: ver item 5.10. -----	72
Figura 23: Cromatogramas expandidos de CG-DIC com LLBA1, ESBA1 e EIBA1. A numeração dos picos foi baseada nos cromatogramas de CG-EM das mesmas amostras (não mostrado). -----	74
Figura 24: A: Cromatograma CLAE-DAD das frações ricas em diterpenos (F1+F2) e rica em triterpenos (F4), provenientes da EFS (Tabela 5). F3 não analisada (pouco rendimento). Condições de análise: ver item 5.8. B: CCD em RP-18 das frações recolhidas de EFS do lote de látex liofilizado. Padrão= Látex liofilizado (LLBA2), F1+F2: Fração rica em Diterpenos, F3: Mistura de diterpeno + triterpeno, F4: fração rica em triterpenos. Eluente: 100% CH ₃ CN. Concentração das amostras 5 mg/mL (10 µL aplicados em cada spot). Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico. -----	80
Figura 25: Cromatograma CLAE-DAD expandido de F1+F2, mostrando os sinais referentes a Ph1, Ph2 e Ph3. Estes foram cedidos pelo Dr. J. B. Tostes (Farmanguinhos/Fiocruz), e foram isolados e identificados como ésteres de forbol (resultados não mostrados).-----	81
Figura 26: A = Cromatogramas obtidos por CG-DIC das frações F1+F2 e F4. Fragmentações por CG-EM: B = t _R : 31,397 de F1+F2 EFS, C = t _R : 31,363 de F4 EFS, D = t _R : 34,716 de F1+F2 EFS, E = t _R : 34,716 de F4 EFS. -----	82
Figura 27: Ph1 foi cedido pelo Dr. J. B. Tostes (Farmanguinhos/Fiocruz). Foi isolado e identificado como éster de forbol (resultado não mostrado). -----	83
Figura 28: Resumo dos experimentos de separação entre forboloides x triterpenoides do látex de <i>E. umbellata</i> por partição entre H ₂ O e CH ₃ CN (experimental: item 5.6.1). -----	84
Figura 29: CCD em gel de sílica das frações recolhidas dos experimentos de partição em água-CH ₃ CN do lote de látex liofilizado LLBA2. FS = Frações solúveis. FI = Frações Insolúveis (FI) (detalhe das letras na Figura 28). P = Látex íntegro. Eluente: 5% de éter etílico em CHCl ₃ . Concentração das amostras 5 mg/mL (10 µL aplicados em cada spot). Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico. ---	84
Figura 30: Comparação do enriquecimento de forbólis nas frações F1+F2 da EFS (eluída com CH ₃ CN, fase reversa) e FS-C: fração solúvel da partição por solubilidade (CH ₃ CN:H ₂ O 1:1, RSS 1:100); LLBA2: Látex liofilizado de Barretos (material de partida de ambos os ensaios de separação). Por conveniência, as áreas precisas estão acima de cada barra. -----	87
Figura 31: Comparação do enriquecimento de triterpenos na fração F4 da EFS (eluída com CHCl ₃ , fase reversa) e FI-C: fração insolúvel da partição por solubilidade (CH ₃ CN:H ₂ O 1:1, RSS 1:100); LLBA2: Látex liofilizado de Barretos (material de partida de ambos os ensaios de separação). Por conveniência, as áreas precisas estão acima de cada barra. -----	88
Figura 32: Espectro de infravermelho do látex liofilizado LLBA2 e do LLNF1+2. Em destaque bandas descritas no texto. -----	90
Figura 33: Curvas de calibração com a albumina de soro bovino (BSA). -----	91
Figura 34: Avaliação da progressão da atividade peptidásica das proteases dos soros dos látices de <i>E. umbellata</i> usando L-TAME como substrato. SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo. -----	93
Figura 35: Atividade proteolítica do látex de <i>E. umbellata</i> . SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo, SLLBA: Sobrenadante do látex Liofilizado Barretos, SLLNF: Sobrenadante do látex Liofilizado N. Friburgo. -----	94
Figura 36: Influência do pH na atividade das proteases presentes nos soros dos látex de <i>E. umbellata</i> . SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo. -----	95
Figura 37: Influência de inibidores de proteases na atividade dos soros dos látices de <i>E. umbellata</i> . SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo, Bza: benzamidina; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; E-64: trans-2,3-epoxi-propil-leucilamido (4-guanidino)-butano. A seta vermelha indica ausência de inibidor de pepstatina.-----	97
Figura 38: SDS-PAGE em condições não-redutoras do perfil proteico e proteolítico das amostras de látices de <i>E. umbellata</i> . (A) SDS-PAGE 12% corado com <i>Coomassie Brilliant Blue</i> e (B) SDS-PAGE-	

gelatina 10% lavado com Triton X-100 (2,5%) incubado <i>overnight</i> (tampão Tris HCl 100 mM pH 7,0). -----	99
Figura 39: Látex liofilizado de <i>E. umbellata</i> . LLBA2 e LLNF1+2, respectivamente.-----	102
Figura 40: Curvas de DSC dos látices liofilizados LLBA2 e LLNF1+2.-----	102
Figura 41: Curvas de termogravimetria dos látices liofilizados LLBA2 e LLNF1+2.-----	103
Figura 42: Padrão de difração do látex liofilizado LLBA2 e do LLNF1+2. -----	104
Figura 43: Micrografia dos látices liofilizados LLBA2 (A) e (B) LLNF1+2, com magnitudes de aproximação de 150 (A1), 400(A2), 1000 (A3) e 190 (B1), 500 (B2), 1000 (B3) vezes.-----	105
Figura 44: Distribuição do tamanho da partícula, massa retida e frequência acumulada do látex liofilizado de <i>E. umbellata</i> (LLBA2) obtido no ensaio de tamisação-----	106
Figura 45: Curvas de fluxo de pó por orifício das amostras do látex liofilizado, LLBA2 e LLNF1+2 --	108
Figura 46: Capacidade de reativação viral <i>in vitro</i> do HIV em células infectadas. Células J-Lat 10.6 (linhagem de linfoblastos de células T humanas contendo o genoma completo do HIV-1) foram semeadas em placas de 96 poços (5.104 células/poço) e cultivadas com meio RPMI (Thermo Scientific) na presença do látex e frações sob diferentes concentrações. Quando ativadas, as células J-Lat expressam o HIV-1 juntamente com a proteína GFP (<i>green fluorescent protein</i>), que serve como marcador de latência obtida nesta linha celular. Como controle positivo para a ativação, o forbol 12-miristato 13-acetato (TPA; em inglês PMA - Sigma-Aldrich) foi usado em uma concentração final de 1 mM. As células foram mantidas em cultura por 24 h e, em seguida, foram colhidas para avaliação da expressão de GFP por análises de citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos pelas porcentagens de células positivas para GFP. Fonte: construção a partir dos dados cedidos pelo Dr. Átila Duque Rossi (laboratório de Virologia Molecular da UFRJ). -----	111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Atividades biológicas descritas para <i>E. umbellata</i> (Pax) Bruyns, sin. <i>Synadenium umbellatum</i> Pax, sin. <i>Synadenium grantii</i> Kook f. -----	12
Quadro 2: Exemplos de análise de ésteres diterpênicos em Cromatografia em Camada Delgada.---	27
Quadro 3: Análises por CLAE de forboloides em látex de espécies ¹ de Euphrobiaceae contendo tiglianos ou análogos. -----	29
Quadro 4: Exemplos de análise de ésteres forboloides por Cromatografia Gasosa-----	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Data de coleta, procedência, quantidade coletada e códigos de látices de <i>E. umbellata</i> . --	56
Tabela 2: Massa utilizada para o processo de liofilização e massa final obtida do látex liofilizado. ---	57
Tabela 3: Massa utilizada e rendimento da extração hidroetanólica. -----	58
Tabela 4: Fragmentações correspondentes aos sinais mais relevantes em CG-EM e CG-DIC dos látices liofilizados e extratos hidroetanólicos -----	75
Tabela 5: Aumento de carga utilizada e rendimento do Fracionamento por Extração em Fase Sólida (EFS).-----	80
Tabela 6: Evidência da linearidade para as correlações entre área do sinal x concentração da amostra, considerando-se 16 componentes do látex liofilizado de <i>E. umbellata</i> .-----	86
Tabela 7: Considerações sobre as técnicas testadas para análise do látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	89
Tabela 8: Quantificação de proteínas presentes no látex de <i>Euphorbia umbellata</i> através do método de Bradford. -----	91
Tabela 9: Serino proteases isoladas do látex de espécies da família Euphorbiaceae -----	100
Tabela 10: Resultados densidade, fluxo de pó por orifício e ângulo de repouso das amostras do látex liofilizado, LLBA2 e LLNF1+2-----	107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E ESPÉCIES PRODUTORAS DE LÁTEX	5
2.2 A ESPÉCIE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i> (EUPHORBIACEA)	7
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i> (PAX) BRUYNS	11
2.4 ESTUDOS QUÍMICOS COM A ESPÉCIE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i> (PAX) BRUYNS	20
2.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS TERPENOS DO LÁTEX DE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i>	25
2.6 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA Da MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	31
2.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	33
3. JUSTIFICATIVA	37
4. OBJETIVOS	39
4.1 OBJETIVO GERAL	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES	40
5.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	41
5.3 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA: LÁTEX DE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i>	42
5.4 PROCESSAMENTO PRIMÁRIO: LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DO LÁTEX	43
5.4.1 Liofilização	44
5.4.2 Extração hidroetanólica	44
5.5 FRACIONAMENTO DO LÁTEX LIOFILIZADO E DO EXTRATO HIDROETANÓLICO INSOLÚVEL DE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i> POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS) UTILIZANDO SÍLICA DE FASE REVERSA	44
5.6 ENSAIO DA SEPARAÇÃO DE CLASSES DE TERPENOS UTILIZANDO PARTIÇÃO POR SOLUBILIDADE (ACETONITRILA : ÁGUA)	45
5.6.1 Fracionamento do lote único liofilizado (LLBA2) através de partição por solubilidade	45
5.7 PERFIL DO LÁTEX E DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA SEPARAÇÃO INICIAL POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	46
5.8 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)	46
5.9 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)	46
5.10 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM DETECTOR POR IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)	47
5.11 QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LÁTEX POR CG-DIC	47
5.12 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)	48
5.13 ESTUDO DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i>	48
5.13.1 Preparo das amostras	48
5.13.2 Quantificação proteica	48
5.13.3 A atividade peptidásica dos soros dos látex	49
5.13.4 Eletroforese de proteínas	49
5.13.5 Determinação do pH ótimo das proteases dos soros dos látex	50

5.13.6 Avaliação da atividade proteolítica em diferentes substratos-----	50
5.13.7 Influência de inibidores de proteases na atividade enzimática dos soros dos látex -----	51
5.14 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LÁTEX LIOFILIZADO DE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i> -----	51
5.14.1 Determinação do teor de umidade -----	51
5.14.2 Determinação do ponto de fusão -----	51
5.14.3 Análises térmicas -----	52
5.14.4 Difração de raios X de pó (DRX) -----	52
5.14.5 Análise granulométrica por tamisação -----	52
5.14.6 Densidade aparente e compactada -----	53
5.14.7 Fluxo por orifício -----	53
5.14.8 Ângulo de repouso -----	53
5.14.9 Área superficial específica -----	54
5.14.10 Microscopia eletrônica de varredura -----	54
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	55
6.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA -----	55
6.2 PROCESSAMENTO PRIMÁRIO: LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DO LÁTEX -----	57
6.3 PERFIL EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) DO LÁTEX E DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA SEPARAÇÃO INICIAL -----	59
6.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD) -----	60
6.5 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA -----	65
6.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ANÁLISES POR CCD, CLAE E CG-----	77
6.7 SEPARAÇÃO DOS ÉSTERES DITERPÊNICOS X TRITERPENOS E ESTEROIDES -----	78
6.7.1 Separação de forboloides x triterpenoides por extração em fase sólida -----	79
6.7.1.1 Comparação dos perfis das frações separadas em CG -----	81
6.7.2 Separação de forboloides x triterpenoides por partição por solubilidade em mistura de solventes -----	83
6.8 QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LÁTEX POR CG-DIC -----	85
6.8.1 Quantificação dos constituintes forbólicos separados por extração em fase sólida e partição por solubilidade -----	87
6.8.2 Considerações gerais sobre a separação diterpenos x triterpenos-----	88
6.9 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV) -----	89
6.10 ESTUDO DE PROTEÍNAS PRESENTES NO LÁTEX DE <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i> -----	90
6.10.1 Eletroforese -----	98
6.11 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA PARA O LÁTEX LIOFILIZADO DE <i>E. UMBELLATA</i> --	101
7. TESTES BIOLÓGICOS -----	110
8. CONCLUSÕES -----	112
9. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS -----	116
10. REFERÊNCIAS -----	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BA	Barretos-SP
BET	Brunnauer-Emmett-Teller
BSA	Albumina do Soro Bovino (bovine serum albumin)
Bza	Benzamidina
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada com Detector por Ionização de Chamas
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada com Espectroscopia de Massa
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diodo
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Espectroscopia de Massa
D _a	Densidade aparente
D _c	Densidade compactada
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DSS	Dodecilsulfato de sódio
DTA	Análise termogravimétrica derivada
E-64	L-trans-epoxisuccinyleucilamido- (4-guanidino) butano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIBA1	Extrato Insolúvel Barretos Lote 1
EIBA1	Extrato Solúvel Barretos Lote 1
EIBA2	Extrato Insolúvel Barretos Lote 2
EINF1	Extrato Solúvel Nova Friburgo Lote 1
Et ₂ O	Éter etílico
FDA	Food and Drug Administration
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>human immunodeficiency virus</i>)
IFAV	Ingrediente farmacêutico ativo vegetal
LBA	Látex Barretos (<i>in natura</i>)
LLBA1	Látex Liofilizado Barretos Lote 1
LLBA2	Látex Liofilizado Barretos Lote 2
LLBA3	Látex Liofilizado Barretos Lote 3
LLNF1	Látex Liofilizado Nova Friburgo Lote 1
LLNF2	Látex Liofilizado Nova Friburgo Lote 2
LLNF3	Látex Liofilizado Nova Friburgo Lote 3
LLNF4	Látex Liofilizado Nova Friburgo Lote 4
LNF	Látex Nova Friburgo (<i>in natura</i>)
L-TAME	Substrato peptídico N- α - ρ -Tosil-L-arginil metil éster
Me ₂ CO	Acetona
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NF	Nova Friburgo-RJ
OMS	Organização Mundial da Saúde
pep	Pepstatina
PET	Politereftalato de etileno
PM	Peso Molecular
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SLBA	Soro Látex Barretos
SLLBA	Sobrenadante Látex Liofilizado Nova Friburgo
SLLNF	Sobrenadante Látex Liofilizado Barretos
SLNF	Soro Látex Nova Friburgo
SMA	Serviço de Métodos Analíticos
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido tricloroacético
TGA	Análise Termogravimétrica
TPA	12-O-tetradecanoil-13-acetilforbol
t _R	Tempo de Retenção
U	Unidade de atividade enzimática
USP	Farmacopeia Americana (United States Pharmacopeia)

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito da etapa químico-farmacêutica do desenvolvimento de fitoterápicos. Enquadra-se na linha de pesquisa institucional “Pesquisa e Desenvolvimento de fitoterápicos”, definida na seção 26.1 da área Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos” (FIOCRUZ, 2018), que trata de *estudos multidisciplinares voltado para a resolução de problemas em saúde pública*. O tema de pesquisa aborda o estudo do látex da espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiceae) e propõe investigar sobre vários aspectos físico-químicos deste material, ampliando o conhecimento químico e avaliando aspectos que têm impacto em seu potencial como gerador de produtos farmacêuticos.

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia para Biodiversidade em Saúde (Tec4Bio), o qual desenvolve pesquisas na área de Produtos Naturais (Dr. Antonio C. Siani, orientador), e no Laboratório de Micro e Nanotecnologia (Dr. Helvécio Antunes Rocha, orientador); ambos do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Ainda, no âmbito do desenvolvimento de um produto, o projeto mais amplo tem colaboração com o Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (Dr. Amílcar Tanuri), onde se realizam os testes sobre a capacidade do látex em reativar *in vitro* células humanas infectadas com HIV, e também em atuar como agente imunomodulador. Dentro do escopo da prospecção sobre a composição do látex, o projeto ainda contou com a interveniência do Laboratório de Bioquímica de Farmanguinhos, Fiocruz (Dra. Raquel E. da Silva Lopez) na investigação do conteúdo proteico do látex.

O estudo proposto abarca uma primeira abordagem do látex, dentro da ideia central de fornecer subsídios sobre as principais características do material, relacionadas a: (i) composição e conteúdo em substâncias terpenoídicas que representam os principais metabólitos secundários presentes no látex; (ii) a presença de classes específicas de proteínas; e (iii) a caracterização preliminar dos parâmetros físico-químicos dos pós gerados no processo de secagem do látex. Em conjunto, espera-se que os resultados desse estudo, projetado de maneira horizontal e multidisciplinar, descortine os desafios para desenvolver o potencial farmacêutico do látex de *E. umbellata*.

Definido esse escopo, a primeira atividade foi estabelecer o estado da arte para a espécie em foco e organizar as informações de suporte às atividades programadas; isso também com o propósito de servir de apoio aos trabalhos subsequentes do grupo de pesquisa. Nessa compilação, foram organizados os estudos com a espécie *E. umbellata*, relacionados a (i) condições experimentais dos métodos de análises disponíveis sobre o conteúdo terpênico do látex e outras partes da planta, (ii) o conjunto de atividades farmacológicas descritas até o presente momento para a espécie e (iii) dados sobre o comportamento físico-químico do látex como um possível insumo farmacêutico; complementados com (iv) informações sobre o conteúdo proteico do látex.

As atividades técnicas que se seguiram desenrolaram-se dentro de distintos focos de interesse, e tiveram um forte componente exploratório, dados os escassos estudos disponíveis sobre esse material. O primeiro bloco de experimentos objetivou estabelecer condições cromatográficas, por diferentes técnicas, que contribuíssem para o monitoramento de futuros processos de separação e de biomonitoramento. Uma vez testadas e consideradas adequadas e suficientes aos objetivos de análise, o látex foi avaliado quanto ao teor relativo de classes de terpenos presentes, em especial quanto aos diterpenos, aos quais se atribuem as propriedades antivirais. Estes procedimentos permitiram obter um perfil de terpenoides e comparar preliminarmente os látices de duas origens geográfica distintas.

O segundo bloco de atividades foi direcionado à composição proteica do látex, que incluiu a determinação e caracterização bioquímica dos principais tipos de proteína presentes na composição, comparando-as com resultados da literatura.

O terceiro bloco experimental explorou os primeiros experimentos relacionados ao potencial do látex para constituir formulações farmacêuticas, quando se utilizaram técnicas físico-químicas e termoquímicas básicas para caracterizar o látex liofilizado.

Complementarmente, o látex íntegro e algumas de suas frações foram enviados para os testes de eficácia *in vitro*, direcionados para interromper a latência do HIV em células infectadas. Alguns exemplos de látices de outras espécies da família Euphorbiaceae têm sido descritos como possuindo em sua composição substâncias capazes de promover essa reativação. Do ponto de vista farmacológico e clínico, essa atividade apresentada por algumas moléculas específicas, pode abrir portas para uma terapia de eliminação do vírus do organismo, mesmo em seus portadores assintomáticos.

O desenvolvimento desse projeto teve, portanto, um caráter essencialmente pragmático. No contexto acadêmico-profissional, o problema a ser resolvido, conforme apontado pelas buscas realizadas em período pré-projeto, esteve representado pela escassez de dados sobre o tema proposto. Já os fundamentos técnicos desenvolvidos na abordagem do látex de *E. umbellata* deverão, em seu conjunto, subsidiar a evolução dos principais eixos de desenvolvimento do projeto mais amplo, traduzido nas diversas frentes planejadas em busca do fitoterápico idealizado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é líder mundial em diversidade vegetal com entre 350-550 mil espécies estimadas, das quais cerca de 55 mil estão catalogadas. Dentre estas, estima-se que 10 mil apresentam alguma utilidade, atrelada às suas propriedades como aromática ou medicinal (BORGES *et al.*, 2003). As plantas medicinais constituem uma importante e variada fonte de substâncias bioativas ainda com potencial industrial pouco explorado.

Como recurso terapêutico, as plantas medicinais vêm ganhando aceitação pela população e também lentamente se fortalecendo nas comunidades médicas, desde que a comprovação da eficácia e a segurança de uso tenham sido cientificamente investigadas (YUNES *et al.*, 2001). Nesse contexto, a abordagem etnobotânica, ou seja, o estudo dessas plantas a partir de seu emprego medicinal por uma dada população, constitui um fundamento útil na elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos, por já estarem consagradas pelo uso contínuo (AMOROZO, 1996).

O desenvolvimento de produtos farmacêuticos a partir de plantas é pautado pelo suporte metodológico que se baseia na tríade Eficácia, Segurança e Estabilidade Farmacêutica. Cada abordagem deste fundamento congrega conjuntos de testes que devem ser realizados no sentido de comprovar e assegurar amplitudes de validade para cada parâmetro; assegurados por métodos igualmente validados para aplicação tanto durante o processo de desenvolvimento quanto ao produto final que se planejou elaborar (SONAGLIO *et al.*, 2007). No processo de transformar insumos naturais em produtos farmacêuticos, a legislação atual na área (RE 26 08/05/2014 da ANVISA) reconhece a existência do conhecimento popular no uso medicinal das plantas; argumento usualmente associado ao caráter multicultural do país (HASENCLEVER *et al.*, 2017). Nesse caso, evidências crescentes de uso prolongado de uma planta pela população podem abreviar os trâmites envolvidos no registro de um fitoterápico dela derivado, nos órgãos reguladores (ANVISA, 2014), uma vez preservados o alvo terapêutico tradicional e, em termos, a forma de administração (maneira do preparo, posologia etc). Neste contexto, o presente estudo aborda o látex da espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (sin. *Synadenium grantii* Hook f.), pertencente à família Euphorbiaceae. Para efeitos regulatórios, o látex poderia ser considerado um derivado vegetal, uma vez que consiste num extrativo da planta *in natura* (ANVISA, 2014).

O foco do estudo é a etapa de caracterização química do látex, incluindo ensaios para estabelecer condições, em escala laboratorial, para separar grupos distintos de constituintes. Isto será complementado com a obtenção de medidas de caracterização físico-química do látex, visando estabelecer o grau de versatilidade dessa matéria-prima para futuras aplicações tecnológicas.

2.1 A FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E ESPÉCIES PRODUTORAS DE LÁTEX

A família Euphorbiaceae Juss. apresenta distribuição cosmopolita, alcançando maior diversidade nos trópicos, constituindo árvores, arbustos e ervas, com folhas alternadas, em geral com estípulas, latescentes ou não (JOLY, 1977). A família possui cerca de quase 300 gêneros que incluem entre 6.550 e 7.500 espécies (MABBERELY, 1997; THE PLANT LIST, 2013). A maioria dos representantes da família constitui ervas, arbustos ou árvores; podendo ainda ser suculentas ou cactiformes (BURGER, HUFT, 1995).

As espécies de Euphorbiaceae têm grande destaque na atividade econômica, através da agricultura e alimentação humana bem como na medicina popular (BAGAVATHI *et al.*, 1988). Exemplos disso constituem a mandioca (*Manihot esculenta*), a mamona (óleo de rícino) (*Ricinus communis*), o pinhão manso (*Jatropha curcas*), o quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) e a borracha do Pará (seringueira) (*Hevea brasiliensis*). Muitas são cultivadas como plantas ornamentais, como a poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) e sebo chinês (*Triadica sebifera*) (HOFFMANN, MCPHERSON, 2007). Euphorbiaceae é a única família botânica a apresentar espécies com a combinação de glândulas secretoras e produção de látex (SECCO, 2005).

No Brasil cerca de 1100 espécies dessa família são nativas ou aclimatadas (SILVA, 2002). Apesar dessa ampla distribuição, muitas ainda carecem de estudos quanto à fenologia, composição química e efeitos biológicos. Fora as espécies mais relevantes como a borracha (indústria de veículos), mandioca (alimentação) e pinhão-manso (potencial biocombustível), o acúmulo de conhecimento sobre essa família vegetal tem sido gerado por estudos etnobotânicos ou taxonômicos.

Morfologicamente, muitas espécies de Euphorbiaceae ainda não estão devidamente classificadas. Por outro lado, elas constituem um potencial valioso para a busca de produtos bioativos (SECCO, 2005), desde que os estudos químicos com diversas partes de espécies variadas dessa família revelaram conter flavonoides,

saponinas, terpenos (diterpenoides e triterpenoides), alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (SOUZA *et al.*, 2005; RAJESH *et al.*, 2006, ROGERIO, 2007, VANDRESEN, 2007).

O gênero *Euphorbia* L. é um dos mais importantes na família, com aproximadamente 2000-2500 espécies (MABBERELY, 1997; VALADARES *et al.*, 2007), dispersando-se a partir dos trópicos, em especial os continentes africano e americano (ORTÊNCIO, 2012). O gênero *Euphorbia* deve o seu nome ao rei Juba II da Mauritânia (ano 25 a.C.), que utilizou um remédio produzido a partir do látex de uma planta suculenta e, dado o seu poder curativo, nomeou-o sugestivamente de *euphorbium*, em homenagem ao seu médico romano, Euphorbius, que era igualmente corpulento (*Euphorbio* = bem nutrido em grego antigo) (NOTHIAS-SCAGLIA *et al.*, 2015a). O *euphorbium* era retirado do látex da planta que mais tarde foi classificada como *Euphorbia resinifera*. Seu princípio ativo, a resiniferatoxina, possui alta capacidade de aliviar dores neuropáticas provocadas por diabetes, e sua estrutura química, elucidada em 1975, revelou ser análoga à capsaicina. O estudo do mecanismo de ação da resiniferatoxina foi responsável por um enorme avanço sobre o conhecimento do papel dos receptores vaniloides na nocicepção (APPENDINO, SZALLASI, 1997).

Por sua vez, o gênero *Synadenium* Boiss congrega entre 13 e 19 espécies (MABBERELY, 1997). A espécie *Synadenium grantii* é descrita como nativa da Tanzânia, de onde espalhou-se para os países fronteiriços do Leste da África e Índia; sendo mais tarde introduzida na Europa e Américas, incluindo o território brasileiro (BRUNETON, 1999; NEUWINGER, 1996). É uma importante planta na etnomedicina de países africanos (WEBSTER, 1994).

Na metade da primeira década dos 2000s, estudos genéticos liderados por Bruyns (2006), com base em algumas espécies-chave africanas, levaram ao reposicionamento, ainda dentro da mesma família, do gênero *Synadenium*. Assim, este foi incorporado ao gênero *Euphorbia*. *Synadenium grantii* Hook f. foi uma dessas espécies, então rebatizada como *Euphorbia pseudograntii* Bruyns e, em seguida, como *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (vigente). Todavia, até bem recentemente, a maioria dos estudos com essa espécie, fora da área da Botânica, ocorreram ainda com a nomenclatura de *Synadenium*. Por exemplo, na medicina popular, o látex dessa espécie tem chamado a atenção devido ao seu uso popular para tratar alergias, distúrbios gástricos e, principalmente, diversos tipos de câncer, além de agir sobre a

infecção por HIV. (OLIVEIRA *et al.*, 2005; ORTÊNCIO, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Então, qualquer levantamento bibliográfico sobre essa espécie deve levar em conta suas variações os seus sinônimos botânicos, pois a maioria das publicações ainda menciona sinonímias antigas.

No presente estudo, para simplificar a notação da espécie no texto, adotou-se o binômio mais recente *Euphorbia umbellata*, ainda que a referência de apoio mencione qualquer outro de seus sinônimos (exceto quando as informações levantadas são apresentadas em forma de tabela).

2.2 A ESPÉCIE *EUPHORBIA UMBELLATA* (EUPHORBIACEA)

Euphorbia umbellata é um arbusto de grande porte nativo da região Leste da África (BRUNETON, 1999). Tem a casca acinzentada e chega a atingir 10 m de altura, com muitas ramificações a partir da base. O diâmetro do caule principal varia entre 12-15 cm. Os ramos jovens, com 1-2 cm de diâmetro, são tenros, às vezes carnudos e verde amadeirado quando velhos. A planta é de rápido crescimento, formando arbustos volumosos (NEUWINGER, 1996). Por este motivo foi muito usada na Índia como ornamental e para compor sebes (Figura 2, pag. 11).

A exemplo de muitas espécies congêneres, essa planta produz abundante látex que exsuda dos caules e folhas, quando estimulados, principalmente por algum dano físico. Por este motivo seu nome na África corresponde ao termo *bushmilk* em inglês. Aclimatada na maioria do território brasileiro, a planta é chamada de leiteira ou janaúba, entre uma dúzia de outros nomes (ORTÊNCIO, 2012).

Esses látices são tóxicos de alguma maneira, principalmente ao contato com a pele, quando produzem variados graus de irritação (UZABAKILIHU *et al.*, 1987). No caso da *E. umbellata*, os efeitos tóxicos desse látex foram descritos na etnobotânica de Uganda, onde os nativos africanos o utilizavam como ingrediente dos venenos com as quais embebiavam suas flechas (ANGENOT, 1978). As intensas reações locais em humanos e animais de criação, provocadas pelo látex de *Euphorbia umbellata*, levaram-na a ser classificada como tóxica, logo após sua introdução na Europa e América do Norte. Houve relatos de acidentes causadores de eritema da face que eventualmente progredia para a formação de bolhas, edema da boca e dos lábios, podendo ocorrer disfagia em 24-48 horas. O tratamento indicado consistia em limpar as áreas afetadas e, se necessário, administrar analgésicos (SPOERKE *et al.*, 1985).

As substâncias responsáveis por esses efeitos são ésteres de diterpenos hidroxilados, com configurações moleculares particulares. Um dos primeiros representantes dessa classe de substâncias é o tigliano penta-hidroxilado, isolado em 1934 pela hidrólise do 'óleo de cróton' (*Croton tiglium*), quando recebeu a denominação de 'forbol' (FLASCHENTRÄGER, FALKENHAUSEN, 1934). Estudos subsequentes com outras espécies da família Euphorbiaceae levaram ao isolamento de uma ampla variedade de ésteres do forbol.

Os ésteres forbólicos são constituintes característicos de *E. umbellata*, contudo são os triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos e esteroides que perfazem a maior parte das substâncias no látex dessa espécie; o qual inclui, em menores teores, poliisoprenoides, ácidos graxos, ceras e lectinas (PREMARATNA *et al.*, 1981; UZABAKILIHU *et al.*, 1987).

Com o avanço dos estudos, a presença de determinadas classes de diterpenos nos látices em muitas espécies de *Euphorbia* levou a um progressivo abandono do uso medicinal pela população. Contudo, nem todos os membros da família Euphorbiaceae são necessariamente venenosos. Por exemplo, *Euphorbia hirta* L., que é um remédio popular na Índia, chegou a ser incluída na *British Herbal Pharmacopoeia* (EVANS, 1986) para o tratamento de bronquite, espasmo laríngeo, catarros nas vias respiratórias superiores e amebíase intestinal. Ainda, a essa droga vegetal são atribuídas propriedades antiasmática espasmolítica e expectorante. Quando investigada para a presença de diterpenos tumorigênicos, o resultado foi negativo (KINGHORN, EVANS, 1975).

A capacidade do látex em irritar a pele e outros órgãos sensíveis deu origem aos primeiros estudos sobre a sua composição (ROOK, 1965; FÜRSTENBERGER, HECKER, 1977), o que levou a apontar alguns ésteres diterpênicos específicos como os responsáveis por esta ação (KINGHORN, 1980; HICKEY *et al.*, 1981). Assim, o impulso mais importante no estudo químico do látex de espécies de Euphorbiaceae – pertencentes a diversos gêneros – originou-se da investigação sobre a natureza dos princípios irritantes da pele contidos nesse tipo de exsudato (ROOK, 1965). Álcoois diterpênicos poli-esterificados foram os primeiros a serem reconhecidos como sendo os responsáveis por essa propriedade na espécie *Euphorbia tirucalli* (aveloz, *pencil tree*) (FÜRSTENBERGER, HECKER, 1977). Em 1980, Kinghorn isolou o isobutirato de 12-O-tigloil-4-desoxiforbol (12-O-tigloil-4-deoxiphorbol-13-isobutirate) (Figura 1)

como a molécula causadora desse efeito no látex de *E. umbellata*, via monitoramento por testes de inflamação em orelhas de camundongo.

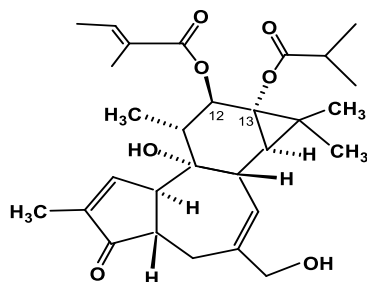


Figura 1: 12-O-tigloil-4-desoxiforbol-13-isobutirato isolado de *Euphorbia umbellata* (KINGHORN, 1980). Fonte: elaboração própria (2019).

Apesar dos efeitos deletérios do látex quando em contato com pele e olhos, muitas espécies de Euphorbiaceae sempre tiveram ampla e variada aplicação na medicina tradicional em vários países da África (WEBSTER, 1986). Este aparente paradoxo persistiu ainda durante a intensificação dos estudos sobre as atividades biológicas dos látices e seus constituintes, em especial quanto à atividade antitumoral. Observam-se graus variáveis de toxicidade do látex, que são condicionados à espécie botânica e sua constituição química específica; tanto no esqueleto carbônico básico dos diterpenos quanto nos substituintes e grupos esterificantes presentes nas moléculas contidas no látex (UZABAKILIHU *et al.*, 1987).

Alguns resultados descritos na literatura, assim como extrapolações empíricas, permitem relacionar o potencial de irritação dérmica desses diterpenos com o grau de esterificação apresentado pela molécula (KINGHORN, 1980; HICKEY *et al.*, 1981) e, possivelmente, com a estrutura do ácido esterificante (COSTA *et al.*, 2012). Contudo, não há relação estabelecida entre o potencial de irritação dérmica com a capacidade de promover ou inibir tumores apresentada pelas moléculas (originárias de espécies diversas) (HECKER *et al.*, 1987).

Assim, os ésteres diterpênicos são reconhecidos como citotóxicos, em maior ou menor escala, dependendo da estrutura que apresentam (HASSAN *et al.*, 2012). O paradigma desta assertiva é o caso do 12-O-tetradecanoil-13-acetilforbol (TPA), extraído do óleo de *Croton*, que hoje é comercialmente consagrado como um indutor clássico de tumores em protocolos pré-clínicos (SUBBARAMAIAH *et al.*, 1998). Contudo, o TPA também apresenta atividade antitumoral, e nesse contexto, alcançou o estágio de ensaios clínicos, nos EUA, para casos de leucemia mieloide e doenças do sangue relacionadas (STRAIR *et al.*, 2002; SCHAAR *et al.*, 2006). Outro exemplo

mais recente é o ingenol, isolado de *Euphorbia peplus* L., que foi aprovado na forma do éster angelato pela FDA (*Food and Drug Administration*), pela EMA (*European Medicines Agency*) para o tratamento da queratose áctica e, recentemente, também pela ANVISA no Brasil (SARAIVA *et al.*, 2018).

Essa é, portanto, uma característica marcante desses ésteres: tanto podem induzir tumores, quanto possuir atividade antitumoral. Os critérios para definir esta fronteira ainda não estão estabelecidos e, obviamente, dependem das especificidades de cada caso e situação. Contudo, a pesquisa com estas moléculas, antes marginalizada pelos efeitos tóxicos e irritantes, tem atualmente ganhado bastante atenção (COSTA *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2018; VALADÃO *et al.*, 2018) principalmente ao considerar-se a supressão da capacidade irritante, obtida por hidrólise e transformação dos ésteres em álcoois (KINGHORN, 1980; HICKEY *et al.*, 1981), sem aparentemente influenciar – ou mesmo potencializando – a atividade antitumoral (HECKER, SCHMIDT, 1974).

O progressivo isolamento dos diterpenos levou à constatação que muitos deles têm alto potencial farmacológico, ao produzirem intensos efeitos biológicos mesmo quando em baixíssimas quantidades; este um fato bastante positivo para a modulação de janelas terapêuticas mais seguras. Este conjunto de informações têm direcionado as buscas de substâncias contidas em látices de espécies que vêm sendo utilizadas popularmente, com o objetivo de encontrar diterpenos altamente ativos, que possam ser utilizados abaixo de doses consideradas tóxicas.

A espécie em foco neste estudo, *E. umbellata* é conhecida por uma série de nomes regionais, entre eles: janaúba, leiteiro, leitossinha, tiborna, maria-mole e cola-nota. Seu látex, diluído em água, vem sendo utilizado medicinalmente no Peru e em várias regiões do Brasil, para o tratamento de diversas doenças como alergia, cólicas, diabetes, dores no corpo, distúrbios gástricos variados, etc.; além de doenças neoplásicas e acometidos da síndrome de imunodeficiência adquirida pelo vírus HIV (FLORES, 2010; ORTÊNCIO, 2012). O uso popular do látex de *E. umbellata* indica, para eficácia, a administração por ingestão de doses relativamente baixas do látex. Tradicionalmente, gotejam-se 18 gotas do látex em 1 litro de água, que é mantida refrigerada. Toma-se 1 copo da solução 3 vezes ao dia (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Atualmente, há relatos do uso de uma tintura (70-80% de etanol) preparada com látex, visando obter preparados resistentes a ação microbiana durante a armazenagem.

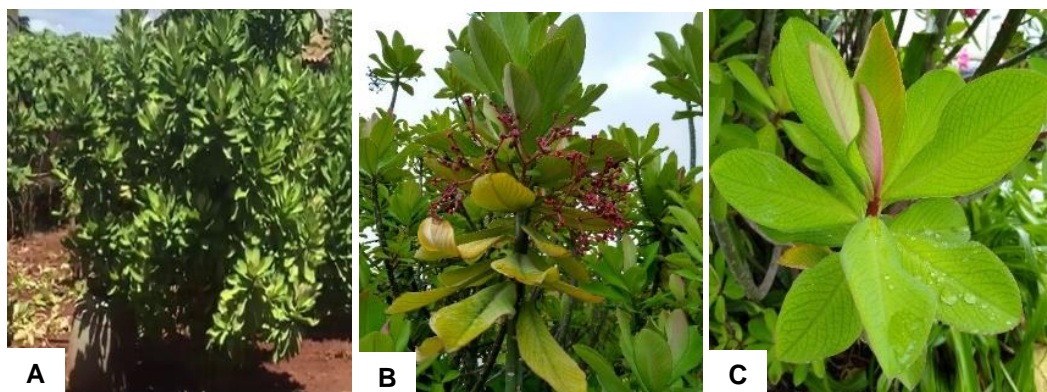


Figura 2: *Euphorbia umbellata* cultivada município de Barretos, SP (A) e Itatiba, SP (B e C).
Foto de Wilson Barros, 2018 (A) e Antonio Siani, 2019 (B e C).

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE *EUPHORBIA UMBELLATA* (PAX) BRUYNS

A diversidade estrutural e o número isolado de diterpenoides têm sido associados a uma enorme variedade de ações biológicas e farmacológicas (SHI *et al.*, 2008). O Quadro 1 descreve resumidamente as atividades biológicas dessa espécie, considerando a busca com os três sinônimos botânicos existentes. Além do látex, há estudos utilizando outras partes da planta (COSTA *et al.*, 2012), ou ainda diferentes extratos associados a diferentes perfis químicos (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Quadro 1: Atividades biológicas descritas para *E. umbellata* (Pax) Bruyns, sin. *Synadenium umbellatum* Pax, sin. *Synadenium grantii* Kook f.

Parte da planta	Preparação	Atividade medida	Modelo experimental	Resultado	Referência
<i>Euphorbia umbellata</i>					
Látex	Látex fresco diretamente fracionado em coluna flash: Hx, AcOEt e MeOH: isolamento bioguiado.	Citotoxicidade	Linhagens celulares HRT-18, HeLa e Jurkat: redução do MTT, <i>Neutral Red</i> , azul tripano; quantificação de DNA, laranja de acridina e coloração Hoechst. Análises por citometria de fluxo. Índice de seletividade. Biomonitoramento <i>in vitro</i> .	Toxicidade dependente da conc. para todos os casos, com fr Hx revelando-se a mais potente. Cl_{50} : 30.50 ± 77.42 (HeLa), 26.16 ± 79.94 (HRT-18), 1.87 ± 2.22 (Jurkat). Baixa atividade citotóxica do eufol e acetato de germanicol isolados da fr Hx.	LUZ <i>et al.</i> , 2016
Casca do caule	Maceração do material seco e moído em EtOH:H ₂ O 7:3 (1 dia, 8x); extrato <i>in natura</i> cromatografado em coluna a vácuo: Hx > CHCl ₃ > AcOEt > MeOH (MF).	Antiulcerativa	Indução <i>in vivo</i> de lesão gástrica (ratos) por etanol e indometacina (50-200mg/Kg, controle positivo ranitidina); análise histológica do estômago. Investigação de possíveis mecanismos de inibição.	MF: diminuição da área da lesão causada por etanol (43.9-89.9%); 5x < que ranitidina; bloqueio de hemorragia e edema. Redução de 88,5% na atividade antiulcerogênica. Promoção dos níveis de COX. Envolvimento do aumento de nível de NO. Provável atuação de MF nas defesas que envolvem glutathiona. Alta atividade antioxidante frente a diversos indutores.	MINNOZO <i>et al.</i> , 2016
		Antioxidante	<i>In vitro</i> (DPPH, ABTS, O ₂ , HOCl, TauCl e HRP) (x quercetina). Correspondência entre os mecanismos antiulcerativos (usando a > dose).		
		Antimicrobiana	Medidas de inibição de <i>Helicobacter pylori</i> pela fração MeOH (1024-32 µg/mL).		
Látex	Soxhlet sequencial: Hx, CHCl ₃ , AcOEt, MeOH. Fr Hx: soxhlet seq.: EP, CH ₂ Cl ₂ , EtOH, MeOH.	Citotoxicidade	Cels. Jurkat (leucemia linfóide aguda humana) e HL-60 (leucemia pró mielocítica aguda). Teste MTT <i>in vitro</i> .	Fr Hx, 72 h: Cl_{50} $0,061 \pm 1,226$ µg/mL ((Jurkat). Sub-fr CH ₂ Cl ₂ , 72 h: $0,005 \pm 0,098$ µg/mL (HL-60); $0,200 \pm 0,957$ µg/mL (Jurkat). Resultados tempo-dependentes.	CRUZ, 2017
Casca do caule	Maceração do material seco e moído em EtOH:H ₂ O 7:3 (1 dia, 8x): CBE. Cromatografia em coluna a vácuo, eluição Hx > CHCl ₃ > AcOEt > MeOH.	Citotoxicidade	MTT, azul tripano e ensaios de quantificação de DNA aplicando linhagem de células Jurkat.	Fração mais ativa: CHCl ₃ (esteroides e triterpenos); Cl_{50} (µg/mL): $29,00 \pm 1,49$ (24 h), $10,06 \pm 1,48$ (48 h), $4,83 \pm 2,25$ (72 h).	KANUNFR <i>et al.</i> , 2017
Látex	Adsorção em gel de sílica, extração sequencial em soxhlet: éter de petróleo (EP), CH ₂ Cl ₂ , EtOH, MeOH.	Citotoxicidade	Antiproliferação <i>in vitro</i> de células Jurkat (leucemia).	IC_{50} : $70,336 \pm 22,113$ (EP); $0,200 \pm 0,957$ (CH ₂ Cl ₂); $8,314 \pm 7,934$ (EtOH); $2,581 \pm 185,053$ (MeOH).	JUSTO <i>et al.</i> , 2017

(continua)

Quadro 1: Atividades biológicas descritas para *E. umbellata* (Pax) Bruyns, sin. *Synadenium umbellatum* Pax, sin. *Synadenium grantii* Kook f. (continuação)

Látex	Látex tratado com 1% H ₂ SO ₄ , insolúvel fracionado em CC eluída com grad AcOEt em Hx. Isolamento do euphol (grad 1:9).	Citotoxicidade	Eufol testado em linhagens Jyrkat, K-562 (cels leucêmicas suspendidas), B16F10 (cels leucêmicas aderentes) e HRT-18 (x célula saudável 3T3 para cálculo de IS).	Eufol (CI ₅₀ 72 h, µM): 84,3331 ± 11,7647 (Jurkat); 49,37 ± 2,76 (HL-60); 34,56 ± 2,12 µM (K-562); 53,63 ± 10,16 (B16F10).	CRUZ <i>et al.</i> , 2018
Casca do caule	Extrato hidroetanólico (EE, EtOH:H ₂ O 7:3) obtido por homogeneização exaustiva (4 x 2 dias) do material seco e fragmentado. EE suportado em quitosana (50% e 100%).	Antioxidante	Supressão de radicais livres por DPPH•e ABTS• ⁺ .	CIM = 0.125 mg/mL (<i>S. aureus</i>); 1 mg/mL (<i>E. coli</i>).	LEMES <i>et al.</i> , 2018
		Antimicrobiana	Medida de CIM: EE x <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i> (difusão em ágar, 1-100x).	Inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> em pH 5,5 ao 100% de incorporação do EE na membrana polimérica. Correspondência com liberação de fenólicos.	
Látex	Látex em 80% EtOH (1:10 v/v), filtração, fração solúvel seca e utilizada (EE).	Antirretroviral	Reativação <i>in vitro</i> do HIV latente em linfócitos CD4 primários humanos após (i) viabilidade celular, ativação de NF-κβ, (iii) marcadores de superfície e produção de citocinas.	EE foi potente na reativação latente da transcrição do HIV, mesmo em conc. abaixo de 0,01 µg/mL.	VALADÃO <i>et al.</i> , 2018
<i>Synadenium grantii</i>					
Látex	Precipitação com acetona das lectinas do soro do látex diluído em água (1:20) e centrifugado. Cromatografia em sepharose-6B, eluída com salina, seguida de galactose 0,1M.	Hemoaglutinação pela ação da lectina do látex	Eritrócitos de animais e humanos (tipos A, B, O). Testes de inibição da aglutinação com açúcares diversos.	Humanos: grupo O aglutina mais fortemente que A e B a 2 µg/mL. Eritrócitos de cobaia, coelho e rato precisam de maiores concentrações de lectina; enquanto os de cães, ovelhas e vacas não aglutinam. Galactose, lactose, rafinose e melibiose revertem a ação da lectina.	PREMARATNA <i>et al.</i> , 1981, PREMARATNA <i>et al.</i> , 1984
Látex	Diluído em EtOH (1:2), agitado e decantado. Resíduo extraído mais 2x com EtOH. Total evaporado e diluído em EtOH para atingir 100 mg/mL (estoque, EE).	Ação hipotérmica	Solução estoque em salina: fina suspensão das doses i.p. para LD50 em camundongos = 51,3 mg/Kg. Medida de hipotermia após indução de febre por pirogênio em ratos albinos (M/F, Farmacopeia Britânica; medida de temperatura retal (30-150min).	LD50 = 51,3 mg/Kg. EE (i.p.): 1-20 mg/Kg com controle. Notável atividade hipotérmica para todas as doses testadas, com dose-dependência.	UNNIKRISHNAN <i>et al.</i> , 1987

(continua)

Quadro 1: Atividades biológicas descritas para *E. umbellata* (Pax) Bruyns, sin. *Synadenium umbellatum* Pax, sin. *Synadenium grantii* Kook f (continuação)

Látex	Diluído em EtOH (1:1), agitado e centrifugado. Resíduo extraído mais 3x com EtOH. Total evaporado e diluído em EtOH para 100 mg/mL para estoque (EE).	Ação cardiovascular	Solução estoque em salina: fina suspensão das doses para LD50 em camundongos = 51,3 mg/Kg (i.p.). EE administrado i.p. em cães anestesiados. Monitoria da pressão na carótida e da vazão urinária; ECG registrado. Efeito sobre coração isolado de rãs e vários tecidos animais de diferentes origens.	LD50 = 51,3 mg/Kg. Nenhuma ação direta nos tecidos (0,02-2,56 µg). EE em baixas doses (0,1-0,4 mg/Kg) induz aumento leve na pressão sanguínea e diurese, mas nenhuma alteração na adrenalina, acetilcolina, 5HT, histamina, oclusão da carótida ou estimulação vagal. Altas doses (0.6-1,0 mg/Kg) induzem bradicardia e antidiurese, com quedas fatais de pressão e edema pulmonar.	UNNIKRISHNAN <i>et al.</i> , 1988
Raiz	Separação de lectinas (método não mencionado).	Aglutinação de sangue	Eritrócitos de pacientes com 11 tipos de câncer em contato com várias conc. de lectina, 30 min: hemoaglutinação observada a olho nu e microscópio.	Atividade hemoaglutinante significativa apenas no caso de câncer de mama. Provável envolvimento de receptores de açúcares na superfície celular.	DUGERWALE <i>et al.</i> , 2001
Látex	Glicoproteína monomérica (LGP) purificada por precipitação e cromatografia de permeação em gel.	Ação fibrinolítica, coagulação	Fibrinolítica: Incubação a 37 °C de LGP (diferentes conc.) com fibrinogênio humano. Coagulante: plasma humano fresco em meio citrato; tempo de aparecimento de coágulos; tempo de recalcificação, tempo pró-trombina, atividade similar ao fator Xa e à trombina; atividade de hidrólise do coágulo de fibrina.	Reduz o tempo de recalcificação de 165 a 30 segundos; múltiplos locais de ação no fibrinogênio. Sugere-se que LGP possui múltiplos locais de ação no fibrinogênio e diferentes da plasmina, com vistas à terapia para fim do sangramento e cicatrização de feridas.	RAJESH <i>et al.</i> , 2006
Folhas	Extrato etanólico (maceração) (EE).	Moluscicida	EE: Letalidade para <i>Biomphalaria glabrata</i> (guia OMS); controle positivo niclosamida; 100-5,0 µg/mL.	CL50 = 40,0 µg/mL (considerada boa).	HARTMANN <i>et al.</i> , 2011
Látex	Látex puro (EB1) e látex diluído (18 gotas em 1L água) (EB3).	Proteção gástrica e Toxicidade	Ratos com lesão gástrica induzida por indometacina subcutânea e etanol oral (x ranitidina e omeprazol) em ratos Wistar. Toxicidade: <i>in vivo</i> (oral em ratos) e letalidade para <i>Artemia salina</i> (amostras 1000-1 µg/mL).	EB1 e EB3 protegem 90% e 6% da lesão, respectivamente. Letalidade para <i>A. salina</i> = CL ₅₀ : 26,58 µg/mL (EB1, toxicidade alta) e 778,66 µg (EB2, toxicidade de baixa). Parâmetros bioquímicos nos animais: maior atividade enzimática nos parâmetros hepáticos para EB1. Nenhuma alteração macroscópica evidente.	COSTA <i>et al.</i> , 2012
Casca do caule	Extrato hidroalcoólico 70%, maceração do material seco (7 dias), seco por liofilização (EB2).				

(continua)

Quadro 1: Atividades biológicas descritas para *E. umbellata* (Pax) Bruyns, sin. *Synadenium umbellatum* Pax, sin. *Synadenium grantii* Kook f. (continuação)

Partes Aéreas	Material seco e moído e extraído sucessivamente (6h) em sohxlet com Hx, AcOEt, MeOH e EtOH 70%.	Antioxidante	Inibição <i>in vitro</i> de radical DPPH, superóxido e radical hidroxila, correlacionados com quantidade de polifenóis. Concentrações de 20-1280 µg/mL de amostras testadas (x ácido ascórbico).	IC ₅₀ (µg/mL) = DPPH: 424 (70% EtOH), 284 (MeOH), 211 (AcOEt), 531 (Hx), 16 µg (controle); radical HO: 420 µg (70% EtOH), 268 µg (MeOH), 195 µg (AcOEt), 390 µg (Hx); 66 µg (controle); superóxido: 401 (70% EtOH), 226 (MeOH), 298 (AcOEt), 742 (Hx), 59,3 (controle).	DASARI <i>et al.</i> , 2012
Folhas	Material seco e pulverizado macerado com CHCl ₃ (5x) (EC) > fracionamento em CHCl ₃ :MeOH > despigmentado com carvão ativado > CC gel de sílica, grad. AcOEt:Hx. Dois diterpenos (A, B) isolados por CCD preparativa.	Citotoxicidade Antiparasitária <i>P. falciparum</i> Antiparasitária: <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>T. cruzi</i>	MRC-5 (fibroblastos de pulmão) incubadas com diferentes conc. de extrato; Alamar blue. Ensaio parasita lactato desidrogenase. Testes <i>in vitro</i> (x controle): <i>P. falciparum</i> (lactase desidrogenase). <i>T. brucei</i> (tripomastigota), células sanguíneas, diferentes conc. de hemoflagelados. <i>T. cruzi</i> (intracelular amastigotas): redução de parasitas.	IC ₅₀ 26,49 µg/mL, considerada marginal. IC ₅₀ (µg / mL): 8,11 (<i>T. brucei</i>), 23,70 (<i>P. falciparum</i>), 2,21 (<i>T. cruzi</i>).	HASSAN <i>et al.</i> , 2012
Látex	(i) Garrafada: 18 gotas em 1 L de água. (ii) Amostra fresca fracionada por coluna <i>flash</i> : Hx > CHCl ₃ > AcOEt > MeOH. Hx fracionada em MeOH (FM) e Hx (FH). FH fracionada com 3 solventes; CC: citrostadienol e eufol.	Antitumoral	Atividade antriproliferativa de diferentes conc. de látex (L) e garrafada (G) sobre células B16F10 (melanoma); MTT, azul tripano (AT) e ciclo celular (citometria de fluxo). <i>In vivo</i> : ASC das células cancerígenas em camundongos C57BL6. Análise histológica dos órgãos (coloração com hematoxilina-eosina).	Inibição: 98% (G) e 100% (L) (AT, 48h); 40% (G) e 64% (L) (MTT). Morte celular dose-dependente para L. Áreas afetadas: necrose e grande número de células tumorais com hiperchromaticismo nuclear, pleomorfismo e citoplasma eosinofílico. Mitose atípica e metástese nos tecidos pulmonares.	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013
Látex	Homogeneização (0-5 °C), filtração, centrifugação. Sobrenadante = extrato enzimático <i>in natura</i> .	Hemostática	Atividades proteolíticas, protease, gelatinase, coagulação do leite e ensaio de coagulação do sangue total. <i>In vivo</i> : camundongos, teste de sangramento e tempo de coagulação de feridas induzidas.	3,53 ± 0,12 mg/g proteína no látex. Atividade de protease 9,77 ± 0,40 U/g. Atividade de coagulação do leite 39,9 ± 0,33. Ensaio de gelatina 4,04 ± 0,36 U/g. Látex reduz 4x o tempo de sangramento em camundongos.	BADGUJAR, 2014

(continua)

Quadro 1: Atividades biológicas descritas para *E. umbellata* (Pax) Bruyns, sin. *Synadenium umbellatum* Pax, sin. *Synadenium grantii* Kook f. (continuação)

Casca do caule	Maceração do material seco e moído em EtOH 70% 7 x 24h (CBE): CC a vácuo (gel de sílica): Hx (I) > CHCl ₃ (II) > EtOAc (III) > MeOH (IV). Após sequência cromatográfica, II forneceu friedelina, eufol/lanosterol e friedelanol.	Antioxidante	Métodos <i>in vitro</i> : ABTS ^{•+} ; DPPH [•] ; HOCl; O ₂ ^{•-} ; (x resveratrol = R); inibição da mieloperoxidase humana (MPO); hemólise.	Alta atividade antioxidante: (3,57 x 0,50R) ABTS ^{•+} ; (12,1 x 63,4R) DPPH [•] ; (1,14 x 1,02R) HOCl; (158,1 x 143,1R) O ₂ ^{•-} ; (8,45 x 0,40R) MPO; (5,17 x 2,37R) hemólise.	MUNHOZ <i>et al.</i> , 2014
		Anti-inflamatória/ Toxicidade	<i>In vivo</i> : Edema de pata induzida por carragenina em ratas Wistar. Pletismometria (60-240 min após injeção); adm oral 50 a 300 mg/Kg CBE (x ibuprofeno). Medidas de parâmetros bioquímicos, pesagem de órgãos; checagem de lesão estomacal.	ECB efetivo para reduzir o edema na menor dose adm (50 mg/Kg), em qualquer tempo de avaliação, emulando efeito do ibuprofeno. Resultados positivos erráticos com doses maiores.	
Caule	Material fresco macerado em MeOH (7 dias), seco e suspenso em MeOH-H ₂ O 1:1; partição em CHCl ₃ (EC) e AcOEt. EC cromatografado em CC com grad. AcOEt em Hx. Frações promissoras analisadas por CLAE e testadas quanto à citotoxicidade. Isolamento de um diterpeno forbolóide (DF).	Antiproliferativa	Linhagens tumorais: U-251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário multirresistente), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), HT-29 (cólon), K562 (leucemia). Testes <i>in vitro</i> com sulfordamina B e MTT. Medidas de inibição total do crescimento (x controle doxirubicina).	Frações selecionadas: 10-100x menos ativas que o controle. DF pouco ativo, mas poderia contribuir com alguns resultados mais promissores das frações testadas.	CAMPOS <i>et al.</i> , 2016
Látex	Não mencionado; presume-se o uso do material original, sem tratamento.	Moluscicida (caramujo hospedeiro de <i>S. mansoni</i>)	Letalidade em <i>Biomphalaria glabrata</i> (BG) expostos 24 h a doses de 0,5-100 do látex. Toxicidade para <i>zebrafish</i> (ZF, <i>Danio rerio</i>): 0.5-14 mg/L (48h).	LC ₁₀ : 0,50 (BG), 4,86 (ZF); LC ₅₀ : 1,36 (BG), 7,22 (ZF); LC ₉₀ : 3,69 (BG), 10,70 (ZF) mg/L. ZF menos suscetível que BG.	PEREIRA <i>et al.</i> , 2017
Látex	Diluição (6x) em água: 0,8 a 0,025%. Água (controle positivo, CuSO ₄ controle negativo.	Mutagenicidade/G enotoxicidade e Citotoxicidade	Frequências de micronúcleos e aberrações cromossômicas em raízes de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes conc. do látex. Cálculos de índice mitótico.	Efeito mutagênico/genotóxico em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , com médias elevadas de micronúcleos em comparação ao controle. Atividade citotóxica sobre o ciclo celular das raízes.	FERNANDES <i>et al.</i> , 2018

(continua)

Quadro 1: Atividades biológicas descritas para *E. umbellata* (Pax) Bruyns, sin. *Synadenium umbellatum* Pax, sin. *Synadenium grantii* Kook f. (continuação)

Látex	Látex em 80% EtOH (1:10 v/v), filtração, fração solúvel seca e utilizada (EE).	Antirretroviral	Células mononucleares do sangue periférico tratadas com o extrato (1-0,01 µg/mL, 24 h). Medidas de produção de citocinas, replicação viral e viabilidade das células T CD4+.	A 0,1 µg/mL: várias citocinas inflamatórias produzidas, mas não IL-10; elevação de células T CD4+ e T CD8+ positivas para IFN-γ e IL-17, além de subtipos de células T produtoras de IL-21. Em resposta ao extrato, os níveis de IL-1β, IL-6 e TNF-α foram positivamente correlacionados com a taxa de replicação viral em cultura.	GONÇALVES, 2018
Látex	Soluções do látex.	Toxicidade	Sistema estático com sementes de <i>Lactuca sativa</i> (alface), <i>Raphanus sativus</i> (rabanete): conc. látex x crescimento da radícula) e <i>A. salina</i> .	Menores concentrações do extrato associadas a maior desenvolvimento germinativo (dados não mostrados).	MACHADO <i>et al.</i> , 2018
Látex	Separação sólidos x soro por centrifugação. Medida de atividade proteolítica (530 ± 46 U/mL).	Nematicida	Atividade de protease (citrato/caseína) e quitinase (citrato/quitina). Eletroforese 80 V. Letalidade contra <i>Meloidogyne incógnita</i> (MI) e <i>Panagrellus redivivus</i> (PR).	Atividade proteolítica no soro do látex (530 ± 46 U/mL). Atividade nula para quitinase. Letal para MI (100%) e PR (72%) atribuída às proteases.	GOMES <i>et al.</i> , 2018
<i>Synadenium umbellatum</i>					
Látex	Solução aquosa 1:9 v/v, seguida de diluições para atingir 10 e 20 mg/mL.	Angiogênico	Medida da razão de aumento da rede vascular da membrana corio-alantóide em ovo embrionado galinha. Método histológico com imagens.	Atividade angiogênica significativa pelo aumento da vascularidade): 49,1% e 52,9% para 10 e 20 mg/mL. Látex puro foi tóxico ao embrião.	MELO <i>et al.</i> , 2010
Látex	Diluição em água (não detalhado).	Antimutagênico	Teste de AMES em cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> (2 linhagens, cont. positivo 4-nitroquinolina e azida sódica). Doses testadas 50-500 µg.	Nenhuma dose testada apresentou efeito mutagênico até 100 µg. Doses mais elevadas atuam, em sinergia com indutores, na lesão do DNA.	BARBOSA, CHEN, 2011
Folhas e Látex	Látex <i>in natura</i> (L), Extrato EtOH de folhas e galhos (EE) (não traz detalhes).	Toxicidade	<i>In vivo</i> , <i>guidelines</i> OECD. Dose Letal Aguda (DLA): doses i.o. baixadas ½ da anterior, indicador de letalidade em camundongos. Dose Letal Mediana (DL ₅₀): dose única i.p. 74-250 mg/Kg (L), 98-375(F)/500(M) mg/Kg (EE) M: machos, F: fêmeas.	DL ₅₀ [L]: 168,95 mg/kg (M), IC 95% 146,17-195,27 mg/kg; 110,36 mg/kg (F), IC 95% 95,46-127,58 mg/kg. DL ₅₀ [EE]: 156,88 mg/kg (M), IC 95% 124,58-197,55 mg/kg); 163,68 mg/kg (F), IC 95% 127,57-210,00 mg/kg. DLA = 167 (M) e 110 mg/Kg (F).	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2005

(continua)

Quadro 1: Atividades biológicas descritas para *E. umbellata* (Pax) Bruyns, sin. *Synadenium umbellatum* Pax, sin. *Synadenium grantii* Kook f. (continuação)

Folhas	Maceração em EtOH 95% do material seco e moído (3x 1:5 m/v) (EE).	Citotoxicidade, Mutagenicidade	<i>In vitro</i> : Viabilidade (MTT): 2 x 10 ⁶ células de medula de camundongo. Incubação com EE (40-0,312 mg/mL 12-48h); idem com método do azul tripano. <i>In vivo</i> : 10-25-50 mg/Kg EE via oral; análise da medula, controle positivo (ciclofosfamida) e negativo. Análise: formação de micronúcleos.	Efeito citotóxico de EE em todos intervalos medidos: IC ₅₀ 7,9-3,6 (azul tripano)/3,6-18 mg/mL (MTT) para 12-48 h. EE aumentou (dose-dependente) o número de micronúcleos em 110% (20 mg/kg) e 121% (50 mg/kg). Menor dose não foi estatisticamente significativa.	VALADARES <i>et al.</i> , 2007
Partes aéreas	Maceração exaustiva em EtOH 95% do material seco ao ar e moído (CEE). Fracionado em CHCl ₃ (CF), Hex (HF) e MeOH-H ₂ O (ME).	Antitumoral, Antiangiogênica	<i>In vitro</i> : Viabilidade celular, citotoxicidade em células K-562 e EAT (tumor ascítico de Ehrlich) a (mg/mL): 0,018-2,32 (CF), 0,006-0,76 (HF), 0,018-2,34 (ME), 24/48 h, azul tripano e MTT. <i>In vivo</i> : EAT implantado em camundongos <i>Swiss</i> . Tratamento (após 24h): CEE (5-25 mg/Kg.dia), CF e HF, em doses equivalentes. Medido período de sobrevivência em relação a controle.	<i>In vitro</i> : CI ₅₀ 0,4 mg/mL (CEE); 0,1 mg/mL (HF) e 0,8 mg/mL (CF). <i>In vivo</i> , o melhor resultado: CEE (25 mg/kg.dia) aumentou a sobrevida, reduzindo a quantidade de células tumorais, sendo antiangiogênico, ao reduzir o fator de crescimento endotelial vascular.	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2008
Folhas	Maceração em EtOH 95% do material seco e moído (EEF).	Toxicidade aguda e subaguda	Toxicidade aguda (Guideline 423, OECD 2001) e toxicidade subaguda em ratos (Guideline 407, OECD 1995). Análise histopatológica. Medidas de peso corpóreo, pesos dos órgãos e variação de hábitos fisiológicos diários.	Doses de 2000 mg/Kg não foram letais para EEF ou LX (atóxica). Não houve alterações macroscópicas, nem nos pesos relativos dos órgãos. Congestão e infiltração leucocitária no fígado, rins e pulmão para LX, sem alterações para EEF. Sem alterações hematológicas significativas. Sem variações observadas nos hábitos.	CUNHA <i>et al.</i> , 2009.
Látex	Material <i>in natura</i> solubilizado em salina (LX).				
Partes aéreas	Maceração exaustiva em EtOH 95% do material seco ao ar e moído (EE).	Citotoxicidade/ Antitumoral	Linhagens celulares K-562 e Jurkat (leucemia). Viabilidade por azul tripano (0,007-1 mg/mL, 24 h). Alterações morfológicas por microscopia (Giemsa). Ciclo celular: + extrato, 24 h, RNase, citometria de fluxo. ROS intracelular (+ EE, 12/24 h). Potencial da membrana mitocondrial, fosfatidilserina, atividade de caspase (colorimetria para protease).	K-562 selecionada (IC ₅₀ 0,041 viabilidade). Ativação de apoptose sugerida. EE interfere de maneira oposta em diferentes fases do ciclo. EE aumenta (dose-dependente) as ROS intracelulares (111% em 24 h, com hiperpolarização da membrana mitocondrial em até 118%). Há aumento na atividade da caspase 9, sugerindo participação na apoptose.	MOTA <i>et al.</i> , 2012

(continua)

2.4 ESTUDOS QUÍMICOS COM A ESPÉCIE *EUPHORBIA UMBELLATA* (PAX) BRUYNS

Os estudos fitoquímicos prévios feito com o látex, folhas e galhos, mostram a presença de flavonoides, saponinas, terpenos, triterpenos, ésteres de forbol, alcaloides, taninos, lecitinas, antocianinas e glicoproteínas (BAGAVATHI *et al.*, 1988, ANDERSEN *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MUNHOZ *et al.*, 2014). Particularmente, os látices de espécies de Euphorbiaceae são conhecidos por conter predominantemente diterpenos e triterpenos/esteroides; com uma grande variedade de classes nos primeiros, que são derivados de um esqueleto básico com vinte carbonos. As possíveis rotas de ciclização incluem um precursor comum (tetraprenilpirofosfato) para gerar as estruturas diferenciadas e com variados centros estereoquímicos, que inicia na condensação cabeça-cauda (*head-to-tail*) entre duas moléculas de isoprenos. As incorporações subsequentes de isoprenos resultarão em cadeias moleculares múltiplas de 5, que ciclizam de muitas maneiras para formar os terpenoides; no caso dos diterpenos, o precursor imediato é o geranylgeranyl-pirofosfato (Figura 3) (BREITMAIER, 2006; NOTHIAS-SCAGLIA, 2015a).

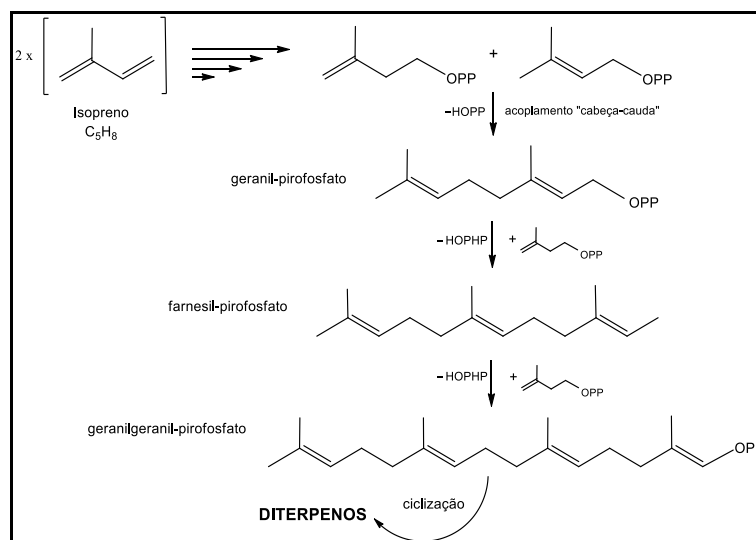


Figura 3: Isopreno e ligação cabeça cauda de unidades isoprênicas. Fonte: elaboração própria (2019).

Entre as configurações mais frequentes apresentadas pelo esqueleto básico desses diterpenos em Euphorbiaceae estão as séries latirano, dafnano, ingenano e tigliano (Figura 4) (SEIPLE, 2007).

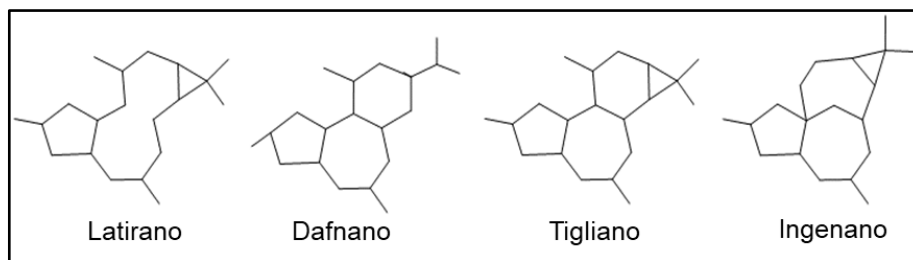


Figura 4: Esqueleto básico de tipos frequentes de diterpenos em Euphorbiaceae: Latirano = diterpeno tricíclico com um macrociclo de 11 membros e um ciclopropano; Dafnano = diterpenos tricíclico com um sistema anular triciclo [9.3.0.0] tetradecano; Tigliano = diterpeno tricíclico com um sistema anular triciclo [9.3.0.0] tetradecano e um ciclopropano gem-dimetílico ligado ao anel de 6 membros; Ingenano = Sistema anular definido por um bicyclo[4.4.1]undecano. Fonte: elaboração própria (2019).

As estruturas das substâncias, até agora isoladas e identificadas na espécie estudada, são constituídas pelo núcleo tigliano, cujo nome IUPAC é 1,1a,1b,4,4a,7a,7b,8,9,9a-Decahydro-4a,7b,9,9a-tetrahydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl-5H-cyclopropa[3,4]benz[1,2-e]azulen-5-one. Uma nomenclatura simplificada foi sugerida por Hecker e colaboradores (1967) para o núcleo forbol, como 4,9,12,3,13,20-penta-hidroxi-1,6-tigliadien-3-ona.

A primeira substância contendo este esqueleto foi isolada a partir da hidrólise do óleo das sementes de *Croton tiglium*, em 1934 (FLASCHENTRÄGER, FALKENHAUSEN, 1934). Sua estrutura constituía do núcleo diterpênico penta-hidroxilado e confirmava a presença de uma mistura de ésteres no óleo original. O núcleo carbônico foi então batizado de 'tigliano', com o poliálcool resultante da hidrólise denominado de forbol (Figura 5), o qual constituiria a base dos ésteres de forbol, conforme as variações nos grupos esterificantes (HECKER *et al.*, 1967).

Os ésteres de forbol têm sido encontrados em inúmeras espécies de Euphorbiaceae, como em *Euphorbia frankiana*, *E. cocrulescence*, *E. tirucalli*, *Sapium indicum*, *Sapium japonicum*, *Croton spareiflorus*, *Croton tiglium*, *Croton ciliatoglandulifer*, *Homalanthus nutans* e *Jatropha curcas* (BEUTLER *et al.*, 1989). No látex de *Euphorbia umbellata*, apenas ésteres forboloides (tipo tigliano) foram identificados, até o momento (BAGAVATHI *et al.*, 1988).

Na maioria dos exemplos conhecidos, a porção fundamental de álcool no esqueleto tigliano contém duas hidroxilas em carbonos vizinhos (C-12 e C-13, Figura 5) esterificadas com ácidos graxos, usualmente com cadeia entre 11 e 18 carbonos, eventualmente apresentando insaturações (KARALAI *et al.*, 1994). As diferentes posições das hidroxilas no esqueleto tigliano básico e as diferentes posições dos grupos ésteres produzem as muitas variações das estruturas derivadas do forbol.

Estes compostos são relativamente instáveis e sensíveis à hidrólise, oxidação, epimerização e transesterificação (HAAS *et al.*, 2002).

Além do grau e da especificidade das esterificações, os estudos subsequentes levaram a constatações adicionais sobre algumas feições estruturais dos ésteres de forbol, quando correlacionados às atividades biológicas que demonstravam. Uma configuração importante nesses ésteres é aquela assumida pelo grupo hidroxila na junção dos anéis A e B (C-4), que podem assumir as posições α ou β (Figura 5). Ambas as formas têm propriedades lipofílicas e físico-químicas semelhantes. Todavia, a forma α é inativa para impedir a ativação de proteína kinase C (PKC) e outros receptores estruturalmente semelhantes de ésteres de forbol (ver Quadro 1, pag. 12, atividades biológicas). Já a estrutura com a hidroxila no arranjo espacial β torna a molécula ativa frente à PKC (SEARL, SILINSSKY, 1998). Isso demonstra a relevância dos grupos funcionais presentes no núcleo forbol, assim como das conformações estéricas assumidas pelo núcleo tigliano.

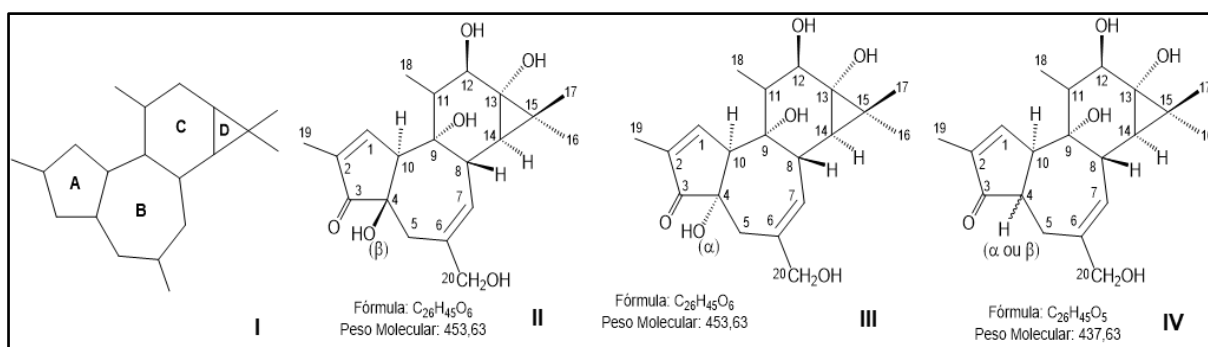


Figura 5: Esqueleto carbônico do tigliano (I). II = estrutura básica do forbol (C-4 β). III = 4 α -forbol; IV = 4-desoxiforbol. Fonte: elaboração própria (2019).

A primeira substância responsável pelo efeito irritante do látex de *E. umbellata* foi isolada e identificada como o 12-O-tigloil-13-isobutil-4-desoxiforbol (KINGHORN, 1980). Logo após, vários outros derivados do tigliano foram descritos entre os constituintes forbólicos do látex de *E. umbellata* (BAGAVATHI *et al.*, 1988; HASSAN *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2012). A Figura 6 mostra os ésteres forbólicos até agora identificados ou caracterizados no látex, caule e folhas dessa espécie.

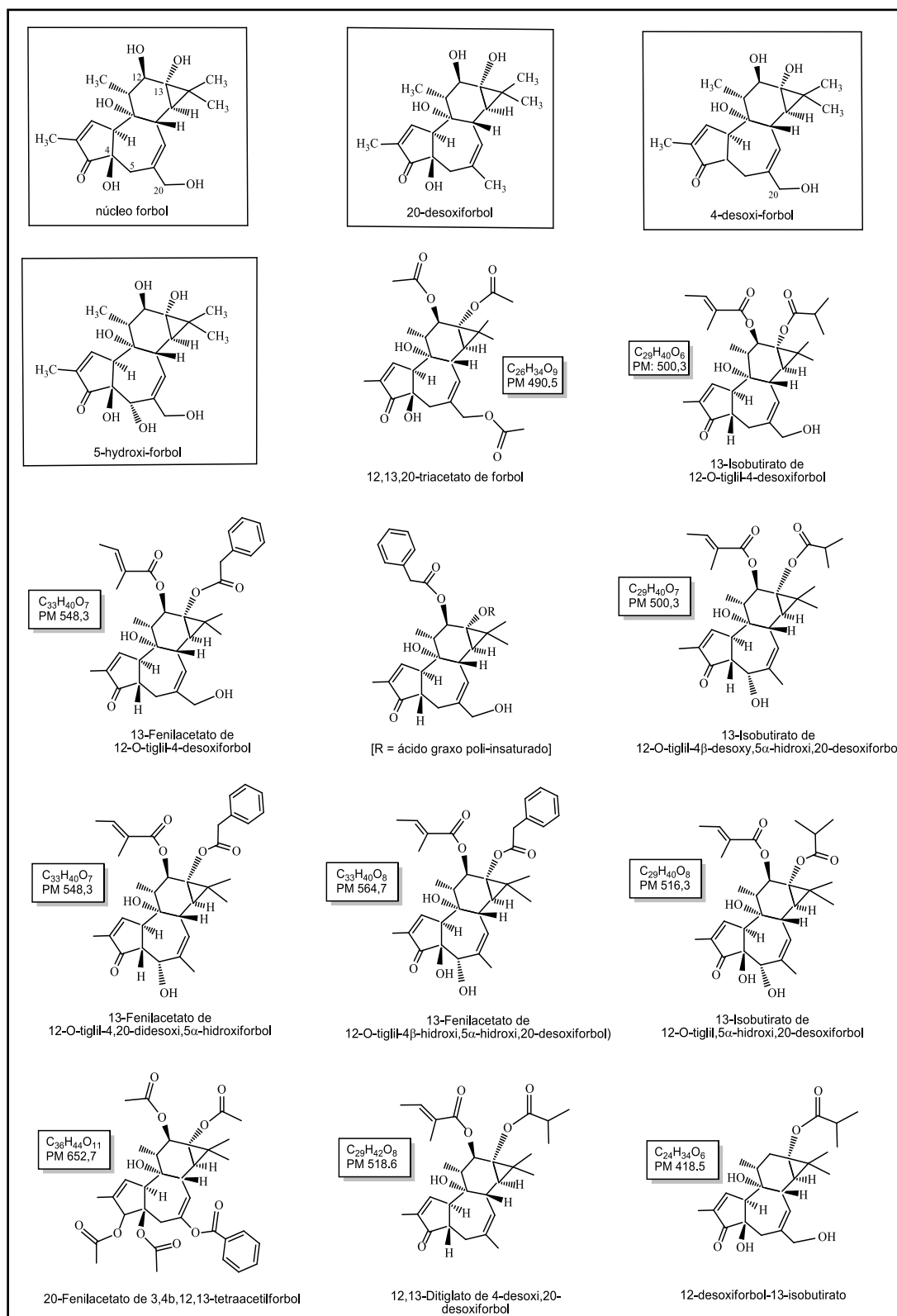


Figura 6: Ésteres forbólicos presentes no látex de *E. umbellata* (Pax) Bruyns (*S. grantii* Hook. f.).
 Fonte: elaboração própria (2019) baseado em KINGHORN, 1980; BAGAVATHI *et al.*, 1988; HARTMANN *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2016. As estruturas destacadas representam as variações mais comuns do núcleo forbólico.

A constituição diterpênica do látex de *E. umbellata* é acompanhada por uma quantidade comparativamente mais abundante de triterpenos e esteroides, (HASSAN *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MUNHOZ *et al.*, 2014). Os triterpenos e fitoesteroides, até o momento isolados ou caracterizados no látex, estão no Figura 7.

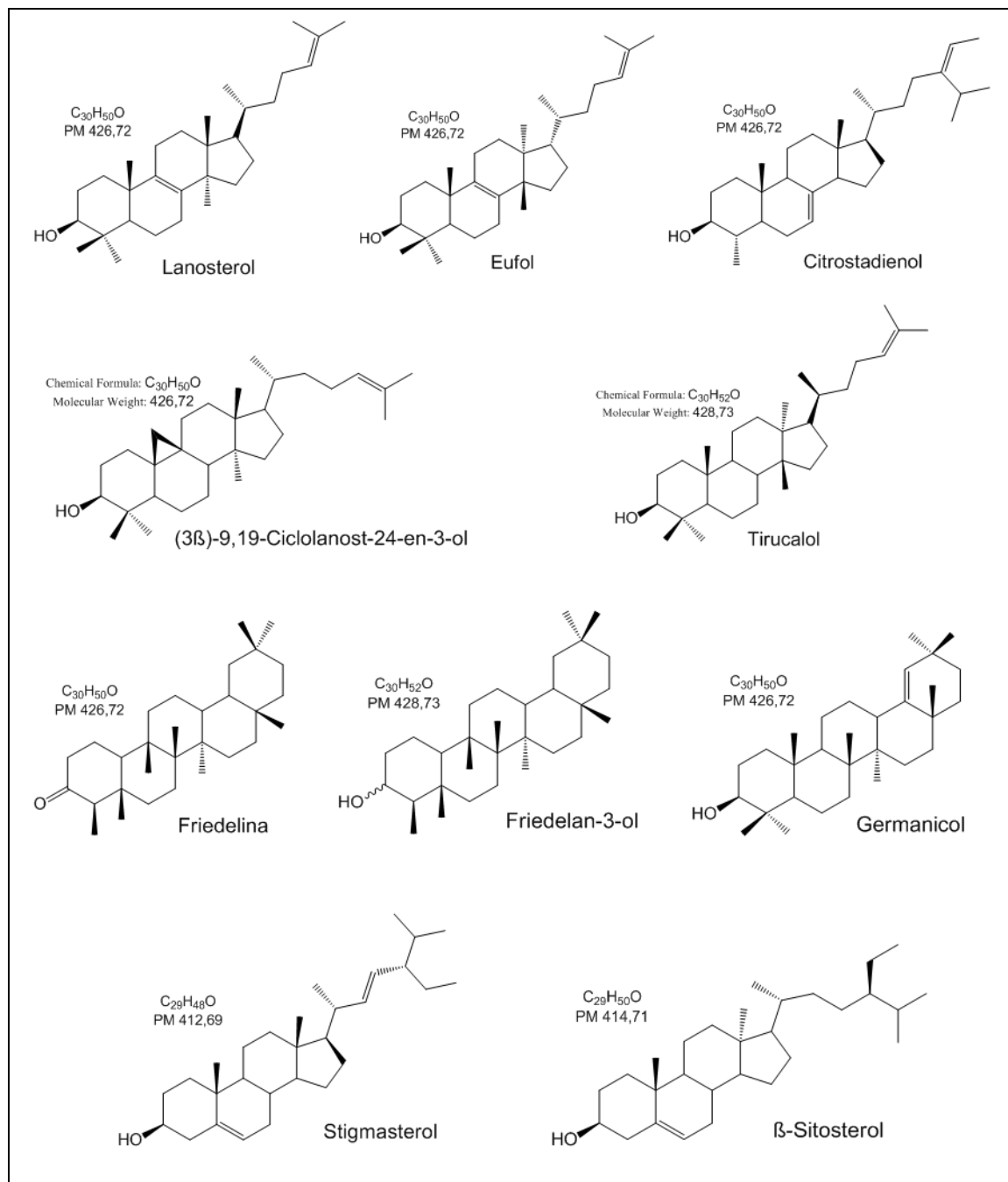


Figura 7: Triterpenos e esteroides descritos na constituição do látex de *E. umbellata* (Pax) Bruyns (sin. *S. grantii* Hook. f.). Fonte: elaboração própria (2019) sobre referências: NIELSEN *et al.*, 1979; DAWIDAR *et al.*, 2011; GIARDINI, 2012.

2.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS TERPENOS DO LÁTEX DE *EUPHORBIA UMBELLATA*

A crescente necessidade de obtenção de extratos padronizados para aplicações medicinais, cosméticas ou alimentícias, aumentou o estímulo de estudos voltados para a caracterização e quantificação de moléculas presente em produtos naturais. O isolamento e a purificação de compostos a partir de matrizes naturais são, frequentemente, processos longos, constituídos de múltiplas etapas e, em muitos casos, de alto custo.

É fundamental, inicialmente, encontrar condições cromatográficas que permitam caracterizar misturas complexas de substâncias utilizando as técnicas cromatográficas convencionais. Estas têm avançado rapidamente, tanto como recurso individual ao qual se aplicam softwares e bases de dados cada vez mais poderosos; aqui incluindo possibilidades de acoplamento entre diferentes técnicas de separação e detecção, sempre com a finalidade de garantir ganhos em termos de sensibilidade e seletividade, e também aumentar a precisão na análise estrutural dos compostos de interesse (NIERO, 2003).

O trabalho com o látex de *Euphorbia umbellata* tem seu fundamento na caracterização, isolamento e purificação do seu conteúdo de ésteres diterpênicos, à parte dos triterpenos também presentes nessa matriz específica. Os métodos gerais de isolamento e purificação de diterpenos a partir de matrizes vegetais, descritos na literatura, incluem a obtenção de extratos de folhas, cascas de caule, raiz etc. Em geral, diterpenos podem ser isolados de todos os órgãos de Euphorbiaceas, mas especialmente do látex. Os diterpenos dessa família são comumente extraídos por maceração à temperatura ambiente, usando solventes orgânicos como acetato de etila, metanol, acetona e clorofórmio ou diclorometano (VASAS, HOHMANN, 2014). Diversas técnicas de extração e separação têm sido relatadas, incluindo extrações líquido-líquido ou sólido-líquido (fase reversa C18 ou poliamida), eventualmente utilizando partições prévias, com solventes de polaridades diferentes (VASAS *et al.*, 2012). Os solventes mais utilizados na extração dos componentes ativos no látex fresco são o etanol, metanol, clorofórmio, acetato de etila e hexano. (OLIVEIRA *et al.*, 2013; ANDERSEN *et al.*, 2010).

Quase a totalidade dos processos descritos para o isolamento de diterpenos em escala laboratorial é realizada em colunas cromatográficas de sílica gel e eluição em gradiente (polaridade crescente), com mistura de solventes apróticos; em especial os

mesmos utilizados na etapa de extração, acima mencionados (VASAS, HOHMANN, 2014).

Normalmente, a purificação de constituintes diterpênicos individuais de outras espécies de *Euphorbia* é bastante trabalhosa, ocorrendo via séries de etapas cromatográficas, às vezes intercalando o uso de diferentes suportes (SiO₂, sílica RP-18) e uso de pressão (baixa, média ou alta). Numa primeira abordagem, pode-se realizar uma ou mais cromatografias a vácuo (*flash*), finalizando o isolamento por cromatografia líquida preparativa de alta eficiência (CLAE preparativo) (VASAS, HOHMANN, 2014).

Ao compilar a literatura no período de 2008 e 2012, Vasas e Hohmann (2014) apontaram 21 referências que citam sistemas de solventes utilizados para a caracterização de diterpenos por Cromatografia em Camada Delgada em espécies do gênero *Euphorbia*. Entre os eluentes utilizados estão seis misturas binárias e três misturas ternárias de solventes apróticos como: éter de petróleo, hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, acetona, além de metanol. Vale notar que estes solventes são os mesmos utilizados na partição do extrato inicial (NOTHIAS-SCAGLIA, 2015), e no fracionamento por colunas cromatográficas (VASAS e HOHMANN, 2014).

O Quadro 2 compila alguns exemplos de sistemas utilizados na análise de ésteres diterpênicos por CCD anteriores à compilação de Vasas & Homann (2014), com inclusão de algumas dissertações.

O fracionamento do látex de *E. umbellata* tem sido realizado, via de regra, em coluna ou placa de gel de sílica e eluição com misturas de solventes apróticos, como hexano, seguida de clorofórmio e acetato de etila, finalizando com metanol (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Também há descrições do uso de coluna de fase reversa, utilizando água, acetonitrila e metanol como fase móvel (CAMPOS, 2015), além de exemplos usando Sephadex G-75 quando o alvo são as proteínas (RAJESH *et al.*, 2006).

Os triterpenos têm sido descritos como componentes majoritários do látex, e a abordagem para caracterizar ou isolar esta classe de substâncias têm incluído o tratamento inicial do látex com ácido sulfúrico diluído, seguido de filtração e fracionamento do sólido insolúvel.

Quadro 2: Exemplos de análise de ésteres diterpênicos em Cromatografia em Camada Delgada.

Terpenoides separados	Fase móvel / revelador	Suporte cromatográfico	Referência
8 diterpenos hidroxilados (5 forbóis) com diferentes graus de acetilação	11 sistemas de solventes testados, contendo CHCl ₃ , éter etílico, hexano, i-PrOH, AcOEt, acetona, benzeno/H ₂ SO ₄ 60%/110 °C; vanilina sulfúrica, anisaldeído/ HOAC/H ₂ SO ₄ ; H ₂ SO ₄ :MeOH 1:1	Sílica gel com dois tamanhos de partícula (G, H); Alúmina E	KINGHORN, EVANS, 1975
13-isobutirato de 12-O-tigloil-4-desoxyforbol	CHCl ₃ :benzeno:éter etílico:AcOEt (1: 3: 3: 1); CH ₂ Cl ₂ :éter etílico:acetona (3: 1: 1)	Sílica gel G3	KINGHORN, 1980
2 ésteres diterpênicos da série latirano (synadenol)	Ciclohexano:AcOEt: éter etílico (1:1:1)	Não descrita (supõe-se sílica gel fase normal)	OLIVIER <i>et al.</i> , 1992
10 diterpenos (8 tiglianos)	CHCl ₃ /MeOH (99:1) / H ₂ SO ₄ 60% (spray), 110 °C; luz branca, UV < 365 nm	Placas 0,25 mm, SiO ₂ 60 pré-revestida (Merck GF ₂₅₄)	DIMITRIJEVIC <i>et al.</i> , 1996
3 ésteres diterpênicos derivados do ingol	Hexano:AcOEt 9:1	60 F254, 0,2 mm (Merck) com 10% AgNO ₃	DAOUBI <i>et al.</i> , 2007
Triagem para terpenoides (forboloides)	EtOAc:éter de petróleo 0,5:9,5 v/v / anisaldeído sulfúrico; UV 254-365 nm	Sílica 60 F ₂₅₄ (Merck) pré-revestidas; CCD Preparativa (PTLC) com Sílica gel GF ₂₅₄ revestida (Merck 7748) e PF ₂₅₄ (Merck)	SILVA <i>et al.</i> , 2008
Mono-, sesqui- e diterpenos	Benzeno:AcOEt 97:3 v/v / vanilina sulfúrica 2% em EtOH, 100 °C, 5 min (WAGNER, BLADT, 1996)	Sílica gel F 250 (Merck), 20 x 20 cm; Amostras MeOH + padrões, 10 µl aplicados	SOFIATI, 2009
3-angelato de ingenol	CHCl ₃ :acetona 19:1, ciclohexano:EtOAc:EtOH 60:30:1/ H ₂ SO ₄ conc./105 °C	Sílica gel (Merck) 15 µm,	VASAS <i>et al.</i> , 2012
2 diterpenos tipo tigliano esterificados com ácidos graxos	Eluente não citado / H ₂ SO ₄ 5% em EtOH v/v, aquecimento / visualização em 254 nm	Sílica gel (Qingdao) GF ₂₅₄ 10-40 mm	WANG <i>et al.</i> , 2013
Ésteres do tipo jatrophano	Eluente não citado / Coloração com molibdato sulfúrico	Sílica gel 60 F254 (SDS-França) (6-35 e 20-45 µm)	NOTHIAS-SCAGLIA <i>et al.</i> , 2014
Frações e subfrações terpenoídicas	Hexano:acetona 80:20 / UV 254 nm; anisaldeído sulfúrico 100°C	Sílica gel 60 F ₂₅₄ (Merck)	CAMPOS, 2015

Fonte: elaboração própria (2019).

Rao e colaboradores (1974) descreveram o primeiro caso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) aplicada à separação do TPA de um grupo de forbois análogos, usando coluna de Sil-X 0.5 m x 2.6 mm e eluição com isopropanol/éter dietílico/metanol, à temperatura ambiente. Três anos depois, Berry e colaboradores (1977) separaram diésteres forbólicos contendo grupos acilas com diferentes pesos moleculares; um método também aplicado na análise de forbóis metabolizados em

mamíferos. Em 1933, Girin e colaboradores reportaram a quantificação do ingenol em tinturas medicinais, usando uma coluna Spherisorb ODS-2 e mistura isocrática de metanol-água 60:40, e detecção por UV, contra um padrão comercial do diterpeno quantificado.

Não há descrições na literatura para a aplicação de CLAE na análise dos forboloides do látex de *E. umbellata* (ou *S. grantii*, ou *S. umbellatum*). Já os estudos sobre tiglianos em Euphorbiaceae estão concentrados nos forbóis das sementes de *Jatropha curcas* L.; estes essencialmente bastante lipofílicos, devido à esterificação das hidroxilas forbólicas com ácidos graxos. Isso exige o desenvolvimento de condições analíticas específicas em CLAE que não se aplicariam, ou então deveriam ser cuidadosamente adaptadas ao caso dos éteres derivados de ácidos menores que constituem a espécie do presente estudo.

Assim, excetuando-se as publicações com *Jatropha curcas*, foram levantadas na literatura as análises por CLAE relacionadas ao presente estudo, abordando:

- (i) Outras partes (que não o látex) da planta sob estudo: *Euphorbia umbellata* (ou *Synadenium grantii* ou *S. umbellatum*), contendo terpenoides (CAMPOS, 2015; CAMPOS *et al.*, 2016);
- (ii) Látex de espécies congêneres de *Euphorbia* contendo diterpenos do tipo tigliano;
- (iii) Látex de outras espécies do gênero *Euphorbia* contendo diterpenos com esqueletos correlatos aos tiglianos (ingenano, dafnano e latirano) (OLIVIER *et al.*, 1992; NASCIMENTO, ZANI, 1999; BALOCH *et al.*, 2008; SHOKOOHINIA *et al.*, 2010; FORGO *et al.*, 2011);
- (iv) Látex de espécies de outros gêneros de Euphorbiaceae contendo esqueletos relacionados aos tiglianos (TRINEL *et al.*, 2018);
- (v) Látex de outras espécies do gênero *Euphorbia* (e *Synadenium*) tendo como foco outras substâncias que não diterpenoides; ou ainda análise CLAE qualitativa, sem apresentar identificação de substâncias (SILVA *et al.*, 2008; ANDERSEN *et al.*, 2010; PEREIRA, 2015).

São comuns publicações com diterpenos tipo tigliano e similares em *Euphorbia* (MARCO *et al.*, 1999; PAN *et al.*, 2011), mas poucas delas incluem CLAE. As buscas pelo critério (ii) não resultaram frutíferas. Contudo, há análises de látices de espécies de outros gêneros de Euphorbiaceae (TRINEL *et al.*, 2018). Exemplos de artigos pelos critérios (i)-(iv) estão sumarizados no Quadro 3.

Quadro 3: Análises por CLAE de forboloides em látex de espécies¹ de Euphrobiaceae contendo tiglianos ou análogos.

Objetivo da análise	Coluna cromatográfica	Eluição	Referência
Latiranos: tetraacetato de 2-metilbutanoato; pentaacetato de 2-metilbutanoato; derivados do sinadenol de <i>Synadenium compactum</i> N.E. Br.	Zorbax SIL (8-15 µm, 25 x 2,1 cm)	Hexano-THF (90:10). Amostra preparada em hexano-THF 1:1	OLIVIER <i>et al.</i> , 1992
Quantificação de milliamina (tipo ingenol) no látex de <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopilii</i> (N.E. Br.) Leandri	Coluna Shimpack DDS (250 x 4,6 mm x 5 µm)	Modo isocrático com MeOH: H ₂ O (85:15)	NASCIMENTO, ZANI, 1999
10 Diferentes ésteres isolados do tipo tigliano e dafnano	Escala analítica: coluna de aço inoxidável empacotada com Apex SI 5 µm; escala semipreparativa: Apex Prepsil (10 mm x 25 cm x 8 µm)	Eluição isocrática, fase móvel CHCl ₃ :MeOH 99:1; fluxo 1 ml/min	DIMITRIJEVIC <i>et al.</i> , 1996
Onze ésteres de 12-desoxiforbol foram separados do extrato MeOH das partes aéreas frescas de <i>Euphorbia cornigera</i>	RP-18 (250 x 2,5 cm)	H ₂ O-CH ₃ CN (gradiente 88% a 96%)	BALOCH <i>et al.</i> , 2008; VASAS, HOHMANN, 2014
Extrato EtOAc das partes aéreas secas de <i>Euphorbia macroclada</i> Boiss	Coluna LUNA (fase normal, SI60, 250 x 4 mm) (Phenomenex)	Éter de petróleo-EtOAc (7:3 e 6:4)	SHOKOOHINIA <i>et al.</i> , 2010; VASAS, HOHMANN, 2014
Dois diterpenos tipo-tigliano purificados a partir do extrato acetônico das raízes secas de <i>Euphorbia grandicornis</i> Goebel	Colunas não mencionadas: CLAE em sílica fase normal seguida de CLAE em RP-18 para purificação final	MeOH-H ₂ O 4:1	FORGO <i>et al.</i> , 2011; VASAS, HOHMANN, 2014
Variação sazonal comparativa do perfil químico das partes aéreas de <i>S. grantii</i>	Phenomenex Sinergy 4 µm Hydro-RP 80 Å (150 x 4,60 mm)	Água ultrapura (A), CH ₃ CN (B), metanol (C). Início: 90% A, 8% B, 2% C (10 min); 58% A, 40% B, 2% C (10-20 min); 8% A, 90% B, 2% C (20-37 min)	CAMPOS, 2015
Variação sazonal da composição das partes aéreas de <i>S. grantii</i> com referência ao marcador 20-fenilacetato de 3,4,12-13-tetraacetilforbol	C18 Luna Phenomenex (250 x 4,6 mm x 0,5 µm e 100 Å)	CH ₃ CN (A), água (pH 2,5 H ₃ PO ₄) (B). Início: 2% A (0-98 min); 100% A (10 min)	CAMPOS <i>et al.</i> , 2016
² Diterpenos daphnanos e cerebrosídeos no látex de <i>Hura crepitans</i> L.	Coluna Waters C18 de (150 mm x 2,1 mm x 1,7 µm), coluna de guarda VanGuard™ BEH C18 1,7 µm Waters	Água milliQ (A) e CH ₃ CN (B) + 0,1% de H ₂ CO ₂ ; Eluição: 90% B (2 min); grad. linear 90-100% B (20 min); isocrática 100% B	TRINEL <i>et al.</i> , 2018

¹A menção da sinonímia botânica foi mantida como na publicação original. ²A última linha, referente a uma espécie fora do gênero *Euphorbia*, foi mantida na tabela a título de ilustração de condições de análise de diterpenos em uma matriz de natureza similar à do presente estudo (látex, critério iv acima).
Fonte: elaboração própria (2019).

A técnica de CG-EM tem sido utilizada para obter uma primeira indicação dos tipos de ésteres diterpênicos presentes (COSTA *et al.*, 2012), sendo complementada nas análises dos perfis químicos dos extratos e frações por CG com detecção por Ionização de Chama (CG-DIC) (OLIVIER *et al.*, 1992). O Quadro 4 resume as condições de separação dos ésteres diterpênicos em CG encontradas na literatura para analisar o conteúdo forbólico do látex de algumas espécies de Euphorbiaceae.

Quadro 4: Exemplos de análise de ésteres forboloides por Cromatografia Gasosa

Substâncias separadas	Equipamento / Coluna	Condições descritas	Referência
13-acetato de 12-O-undecadienoilforbol; ostodina (artefato forbólico) de caule e frutos de <i>Ostodes paniculata</i>	Espectrofotômetro de massas Varian MAT-112S, com um sistema de dados Varian 166, acoplado a um cromatógrafo de gás Varian Mod. 1440; 70 eV / 15% Reoplex 400 em fase estacionária Chromosorb W (100-120 mesh)	Temperatura: 120-160 °C, 4 °C/min, fluxo de hélio 18 mL/min. Injetor a 210 °C; interface a 220 °C, registros dos espectros com 6 s entre scans	HANDA <i>et al.</i> , 1983
Constituintes insaponificáveis e saponificáveis do extrato acetônico do látex de <i>Synadenium grantii</i> , 2-metilbutanoato tetraacetato e 2-metilbutanoate, pentacetate do synadenol do látex de <i>Synadenium compactum</i>	CG-DIC: coluna capilar WCOT SE 52 25 m x 0,32 mm id. CG-EM: coluna WCOT CPSi15	Temperatura: 100-250 °C, 4 °C/min (hidrocarbonetos); 2 °C/min (terpenoides e saponificáveis); 70 eV, temp. fonte 150 °C, Software Nermag-Sidar.	UZABAKILHIHO <i>et al.</i> , 1987
12-desoxiforbol-13-(2-metilpropanoato); 12,13,20-triacetato de forbol do látex de <i>Synadenium grantii</i>	Cromatógrafo Perkin-Elmer Sigma-3 / coluna capilar OV-1 39 m x 0,25 mm	T forno 280 °C, T injetor/detector 300 °C	OLIVIER <i>et al.</i> , 1992
Frações separadas enriquecidas em triterpenos x forboloides do látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	CG Varian Saturn 2000R / coluna DB-225-MS; aquisição de dados foi realizada com o software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems).	T inicial 50 °C (2 min.), prog. 20 °C/min até 90 °C (1 min), seguido de 5 °C/min até 280 °C. Injeção de 0,1 mL. Temp. injetor 250 °C; ion trap 200 °C; fluxo de He 1 mL/min; detecção de massas a 70 eV, espectroteca NIST 12. T forno 150 °C a 340 °C a 4 °C/min (17 min); fluxo de hélio 1,0 mL/min com pressão de entrada 3,14 psi; split/splitless 10:1; IE 70 eV; dados processados por MSD Productivity Chem Station Software com fonte de íons a 250 °C	COSTA <i>et al.</i> , 2012
	Cromatógrafo Agilent 6890N / coluna capilar DB-17HT (30 m x 0,25 mm x 0,15 µm de espessura do filme) (Palo Alto, CA)		VALADÃO <i>et al.</i> , 2018

Fonte: elaboração própria (2019).

Por fim, a caracterização e identificação dos ésteres diterpênicos são normalmente realizadas por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e

2D, infravermelho e espectroscopia de massas (ZHANG *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2010); utilizando-se também abordagens combinadas de métodos espectrométricos (ex.: massas de alta resolução) (NOTHIAS-SCAGLIA, 2015b).

2.6 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

O estudo de proteínas, de forma geral, faz-se através da análise da atividade das enzimas proteolíticas ou proteases. Estas enzimas clivam as ligações peptídicas de proteínas e peptídeos, liberando aminoácidos livres e peptídeos de tamanhos variados. Elas são encontradas em todas as organelas celulares de todos os organismos vivos, mediando e regulando uma grande diversidade de reações químicas cruciais para a fisiologia, patologia e morte destes organismos (RAWLINGS, BATEMAN, 2019).

As enzimas proteolíticas presentes em plantas estão envolvidas em quase todos os aspectos do desenvolvimento e crescimento, como por exemplo a germinação e a morte celular programada. O látex presente em diversas espécies de plantas é uma fonte importante de proteases, que são utilizadas na medicina tradicional e embasam produtos da indústria (CRAIK, 2011; SILVA-LÓPEZ, GONÇALVES, 2019). Vale ressaltar também que as enzimas proteolíticas oriundas de vegetais são muito atrativas para a indústria farmacêutica, não somente por suas atividades biológicas, mas também por suas características de estabilidade físico-químicas em altas temperaturas e em ambientes químicos variados (FEIJOO-SIOTA, VILLA, 2011; RAWLINGS, BARRETT, 2014; ABARCA *et al.*, 2019).

Um grande número de proteases tem sido isolado de frutos e de látices de várias plantas. Das inúmeras proteínas identificadas, as cisteíno-proteases, serino-proteases, quitinases, lectinas, inibidores de protease e oxidases são as mais relatadas na literatura. Essas proteínas desempenham muitos papéis fisiológicos, como transdução de sinais celulares e defesa oxidativa (GULSEN *et al.*, 2010; PINTUS *et al.*, 2010; USHA-RANI, JYOTHSNA, 2010).

No látex, as proteases são sintetizadas nas suas formas inativas e são ativadas após a planta sofrer uma agressão mecânica. Sendo assim, as enzimas proteolíticas parecem estar relacionadas com o processo de coagulação do látex, possuindo, portanto, um papel indireto na defesa da planta (HIVAPRASAD *et al.*, 2010; KONNO, 2011; ABARCA *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2019). Por exemplo, a capacidade antifúngica do látex de *Euphorbia tirucalli* foi atribuída à presença de proteínas

(SOUZA *et al.*, 2011). Ainda, o látex é considerado um meio de transportar, de maneira imediata, substâncias químicas defensivas, e assim aumentar suas concentrações nas partes da planta que foram atacadas ou sofreram algum dano (KONNO, 2011). Sytwala e colaboradores (2015) prospectaram a atividade de quitinase e lisozimas em 110 espécies do gênero *Euphorbia*, relacionando-as ao arsenal de defesa das plantas contra patógenos.

No reino vegetal, muitas plantas são relacionadas como produtoras de látex, e dentre as famílias botânicas destaca-se Euphorbiaceae, que possui o maior número de espécies com a capacidade de exsudar látex. Isso tem despertado o interesse dos pesquisadores em estudar possíveis enzimas proteolíticas que atuem na defesa da planta em seus látices (DOMSALLA, MELZIG *et al.*, 2008).

O papel das enzimas na coagulação do látex foi investigado em *Hevea brasiliensis*, uma das espécies presentes na família Euphorbiaceae. Proteínas com propriedades anticoagulantes foram identificadas e fornecem um modelo importante para abordagem da estabilidade coloidal do látex (GIDROL *et al.*, 1994; WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2008; PINTUS *et al.*, 2010). No estudo feito por Wahler e colaboradores (2009), os autores realizaram uma análise abrangente das principais proteínas do látex das espécies *Taraxacum officinale* e *T. kok-saghyz* (Asteraceae), terminando por propor o agente responsável pelo escurecimento do látex.

A avaliação da atividade proteolítica também foi estudada no látex de *Carica papaya* (mamoeiro, Caricaceae). Neste estudo os autores estabeleceram a atividade da enzima amidásica durante a coagulação do látex. Os autores observaram que esse processo de coagulação é similar ao do sangue humano, já que o coágulo é formado de proteínas; enquanto que no caso da seringueira, a agregação se dá por partículas de borracha, compostas de isoprenoides (MOUTIM *et al.*, 1999).

Algumas proteases presentes em látices são atualmente comercializadas tendo em vista suas atividades biológicas como no caso da papaína (*Carica papaya*) e ficina (*Ficus glabrata*) que atuam como agentes terapêuticos em insuficiências respiratórias e digestivas, infecções parasitárias, desbridamento de tecidos e cicatrização de feridas, dentre outras aplicações (CRAIK, 2011; SILVA-LÓPEZ, GONÇALVES, 2019).

A espécie *E. umbellata*, vem sendo estudada devido às suas atividades biológicas relacionadas à presença de glicoproteínas e proteases em seu látex (MENON *et al.*, 2002; RAJESH *et al.*, 2006). As atividades encontradas para as proteases são referentes às ações anticoagulante e fibrinogênica (RAJESH *et al.*,

2006; MISHRA *et al.*, 2017). Uma lectina também foi isolada do látex desta espécie e apresentou atividade de hemaglutinação, como todas as lectinas; ainda observando que a lectina de *E. umbellata* suprimia o crescimento tumoral de fibrossarcoma, além de inibir a síntese de proteínas em células de tumor de Yoshida (PREMARATNA *et al.*, 1981, 1984; DURGAWALE *et al.*, 2001). Um estudo recente descreve a atividade nematicida das proteases presentes no látex (GOMES *et al.*, 2018).

2.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

A pré-formulação é uma das primeiras etapas no desenvolvimento de formas farmacêuticas. Durante esta etapa as características físicas e químicas do fármaco e dos excipientes que impactam diretamente na estabilidade e biodisponibilidade são estudadas (ALDERBORN, 2016; GAISFORD, 2016).

Os principais parâmetros avaliados na etapa de pré-formulação são: estudos de solubilidade, densidade, tamanho de partícula, coeficiente de partição, morfologia, estabilidade da estrutura cristalina e compatibilidade. A reunião destas informações norteia o processo racionalizando o desenvolvimento farmacêutico. A importância da investigação dessas propriedades está diretamente ligada à sua influência sobre atributos de qualidade do produto final, uma vez que impactam em propriedades como: (i) o fluxo, que está diretamente associada à processabilidade, e (ii) a uniformidade de conteúdo de formas farmacêuticas (ANSEL *et al.*, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2007).

A padronização de insumos farmacêutico de origem vegetal (IFAV) constitui uma etapa fundamental no desenvolvimento de fitoterápicos, contribuindo para agregar valor tecnológico a esses ativos. Assim, esta padronização é de suma importância para se obter um produto final estável e eficaz, uma vez que a constância das propriedades relativas a essa matriz tem efeitos sobre a manutenção da disponibilidade fisiológica e da estabilidade física e química (LAPA *et al.*, 2007; KLEIN *et al.*, 2009; YORK, 2016).

A identificação de marcadores e o desenvolvimento de métodos, que permitam a qualificação e quantificação de grupos químicos relacionados a constituintes da matriz antes, durante e após o processo, são etapas desafiadoras no contexto de padronização destes ativos vegetais. Adicionalmente, os IFAV geralmente são mais suscetíveis às alterações em função do pH, temperatura, polaridade de solventes e

interações entre excipientes ou veículos utilizados, ao formular um produto (ANSEL *et al.*, 2000; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006).

As características físico-químicas podem ser avaliadas através de diversas metodologias, dentre elas: ensaio de solubilidade, análise granulométrica, densidade aparente e compactada, área superficial específica, ângulo de repouso, difração de raios X (DRX), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e análises térmicas (TGA, DTA e DSC) (VILA JATO, 2001).

A caracterização físico-química pode ser bem exemplificada pelo estudo de Santos e colaboradores (2018) sobre propriedades do extrato liofilizado da flor de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) em diferentes formulações. Neste, foram determinados os parâmetros de solubilidade, densidade aparente e compactada, as propriedades de fluidez (índice de Carr) e coesividade (fator de Hausner) e a higroscopicidade, ao aumentar a percentagem de maltodextrina na formulação.

Diversas técnicas são aplicadas na determinação da morfologia e do aspecto superficial das partículas da matéria-prima vegetal seca, dentre elas a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Um exemplo de sua utilização é o estudo com extrato de *Aleurites moluccana*, no qual se realizou a padronização e uma avaliação morfológica da reprodutibilidade e de diferentes lotes (QUINTÃO *et al.*, 2011). Petrovick e colaboradores (2010) apontaram diferenças significativas entre o pó obtido por *spray-drying* e o granulado do extrato seco de *Achyrocline satureioides* utilizando a mesma técnica.

As análises térmicas são empregadas para a caracterização da matéria-prima vegetal, visto que a determinação dos teores de umidade e cinzas, o estudo da estabilidade e da cinética de degradação podem ser obtidos ao empregar as técnicas termoanalíticas. Na literatura são encontrados alguns estudos utilizando as técnicas de análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a análise térmica diferencial (DTA) para avaliar o extrato liofilizado de *Vismia guianensis* (CAMELO, 2010), o comportamento térmico dos extratos de raízes e folhas de *Cissampelos sympodialis* (milona) (ARAGÃO *et al.*, 2002), a padronização de extratos nebulizados e liofilizados de *Symphytum officinale* L (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006), estabilidade do pó e do extrato liofilizado de *Arrabidaea chica* (ALVES, 2008), e o estudo do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* (NUNES, 2008).

Estudo recente de Lemes e colaboradores (2018) demonstraram a importância das técnicas de caracterização mencionadas no contexto do desenvolvimento de formulações contendo matrizes de origem vegetal. Tais técnicas viabilizaram aos autores avaliar as características físico-químicas de membranas de quitosana contendo frações ricas em compostos fenólicos obtidas a partir de extração metanólica em cascas do caule da espécie *E. umbellata* que apresentavam potencial antioxidante e antimicrobiano.

À parte desse estudo avaliando propriedades físico-químicas de extrato de caule da espécie-alvo do presente estudo, não são comuns este tipo de estudos com látices de espécies do gênero ou mesmo da família Euphorbiaceae. Os poucos estudos disponíveis datam de mais de 70 anos atrás. Foram realizados por Kopaczewski e abordavam apenas a caracterização das propriedades organolépticas, físico-químicas/estabilidade e estudos incipientes sobre a composição química. Em alguns estudos, como exemplificado com a espécie *Euphorbia tirucalli*, essas análises foram complementadas com um estudo de toxicidade, utilizando camundongos e diferentes concentrações de látex (KOPACZEWSKI, 1947ab; KOPACZEWSKI, 1950).

Ao estender um estudo da estabilidade do látex de *Euphorbia helioscopia* para verificar a ação de vários agentes químicos e físicos, foi observada a formação de diferentes cristais ao se dissolver o látex em metanol absoluto ou tricloroetileno (KOPACZEWSKI, 1946ab). O mesmo estudo abordou também o látex de *Euphorbia resinifera* onde, além da caracterização organoléptica, propriedades físico-químicas (densidade, viscosidade, tensão superficial, condutividade elétrica, pH etc.) e estudos de estabilidade físico e químico, Kopaczewski (1946ab) também caracterizou a estrutura microscópica do látex.

A caracterização física de látices de origem vegetal, quando realizada, inseriam-se, quase sempre, no propósito de apontar alternativas para a produção de borracha. Por exemplo, esse foi o escopo para os estudos comparativos sobre o tamanho de partícula de látex de *Euphorbia amygdaloides*, *E. characias* e *E. myrsinites*, quando foram utilizadas difração de laser e a visualização das partículas em microscópio eletrônico de varredura criogênica (crio-MEV). Os tamanhos das partículas do látex das três espécies foram semelhantes entre si, além da constatação de que elas apresentavam forma esférica (BAUER *et al.*, 2014).

Um estudo feito com diferentes espécies de *Euphorbia*, incluindo *E. milii*, *E. hirta*, *E. ingens*, *E. lactea* e *E. franckiana* utilizou o látex liofilizado e nitrato de prata aquoso

para sintetizar nanopartículas de prata, que foram testadas quanto à atividade antimicrobiana. Todas as nanopartículas sintetizadas com látex exibiram potencial antibacteriano, destacando-se os látices de *E. milii* e três plantas de outros gêneros (*Jathropa curcas*, *J. gossypifolia*, *Pedilanthus tithymaloides*), que apresentaram atividade comparativamente alta contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (PATIL *et al.*, 2012).

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura convencional (MEV), MEV com canhão de emissão de campo (MEV-FEG), crio-MEV e microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram utilizadas para comparar as partículas de *Euphorbia lactiflua*, *Hevea brasiliensis*, *Parthenium argentatum* e *Ficus elastica*. Da mesma maneira que o encontrado posteriormente por Bauer e colaboradores (2014), as partículas encontradas eram esféricas, com variações de tamanho (WOOD, CORNISH, 2000).

3. JUSTIFICATIVA

A presente proposta desenvolve-se no âmbito do desenvolvimento químico-farmacêutico e visa contribuir com a obtenção de um protótipo de medicamento anti-HIV. Aborda a parte prospectiva de um projeto maior, o qual está inserido na linha institucional da Fiocruz “Inovações em Fármacos e Medicamentos”.

O potencial do látex de *Euphorbia umbellata* para gerar um fitoterápico anti-HIV tem base científica na capacidade que possuem alguns constituintes de espécies de Euphobiaceae em provocar a expulsão do HIV latente nos reservatórios celulares, forçando-os a circular novamente na corrente sanguínea, onde ficariam sujeitos à terapia com os antirretrovirais de uso corrente. Ao exaurir o HIV das células infectadas, essa quimioterapia combinada acena para uma eliminação total do vírus, abrindo uma possibilidade para a cura e fundamentando uma terapia antirretroviral complementar inovadora. Este aspecto traduz a relevância dos resultados, em caso de sucesso do projeto. Uma nova terapia, que introduz uma possibilidade de cura da infecção pelo HIV, traduz um ganho socioeconômico inestimável, pois contribui com a redução da morbidade e mortalidade de pessoas infectadas, e com as despesas do erário público com antivirais comprados pelo SUS. Há quase 40 milhões de pessoas vivendo com a infecção por HIV no mundo, com 900.000 deste total no Brasil.

Paralelamente, deve-se considerar também o ganho acadêmico da presente proposta, constituído pelo fortalecimento das parcerias multidisciplinares que envolve o potencial em gerar novas dissertações e teses em áreas diversas e complementares do desenvolvimento de fármacos e medicamentos. O projeto mais amplo está inserido no contexto de uma colaboração científica entre o laboratório Tec4Bio de Farmanguinhos/Fiocruz, liderado pelo Dr. Antonio C. Siani; o Laboratório de Micro e Nanotecnologia de Farmanguinhos, liderado pelo Dr. Helvécio V. Antunes Rocha; e o laboratório de Virologia Molecular da UFRJ, liderado pelo Dr. Amílcar Tanuri. O Tec4Bio desenvolve pesquisas na área de Produtos Naturais e tem suas competências organizadas para executar atividades prospectivas e tecnológicas na área químico-farmacêutica, apoiando as descobertas e o desenvolvimento de fitoterápicos. Ressalte-se que até o momento não existem estudos de caracterização físico-química com o material. O grupo de virologia vem investigando o látex de *E. umbellata* quanto à capacidade de atuar como imunomodulador, incluindo os mecanismos que reativam *in vitro* células humanas infectadas com HIV. Além disso,

o estudo das proteínas do látex conta com o suporte da Dra. Raquel E. da Silva Lopez, do laboratório de Bioquímica de Farmanguinhos-Fiocruz. Recentemente, o estudo foi ampliado para medidas de toxicologia, realizada em primatas não humanos, com a parceria do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fiocruz.

Por fim, a amplitude do projeto de obtenção de um protótipo de fitoterápico induz a se considerar os investimentos já realizados nas diversas áreas do conhecimento científico como argumento plausível para justificar a execução das etapas multidisciplinares, nas quais se insere a proposta da presente dissertação.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com o conhecimento composicional do látex medicinal de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, abordando os terpenoides e as proteínas de sua composição, e caracterizar as propriedades físico-químicas básicas, que darão suporte aos futuros ensaios de formulações farmacêuticas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Elaborar uma compilação sobre o látex de *Euphorbia umbellata*, com foco nos métodos convencionais de análise (CCD, CLAE e CG) para seu conteúdo terpenoídico, e de suas propriedades biológicas e farmacológicas descritas na literatura.
- b) Aplicar técnicas de CCD, CLAE-DAD, CG-DIC e CG-EM para, simultaneamente, verificar a adequabilidade da aplicação de cada uma ao látex liofilizado e seu extrato hidroetanólico, e caracterizar os perfis terpenoídicos do látex de *E. umbellata* originário de duas fontes distintas.
- c) Estabelecer um método viável e escalonável para a separação das principais classes de terpenoides do látex de *E. umbellata*, orientado pelo enriquecimento de frações concentradas nos constituintes triterpênicos e ésteres diterpênicos.
- d) Estimar a relação entre os conteúdos triterpenoides e diterpenoides no látex de *E. umbellata*, com base na análise das frações separadas.
- e) Prospectar e caracterizar as proteínas contidas no látex *in natura* e liofilizado, através de técnicas (quando cabíveis) de quantificação, inibição enzimática, atividade peptidástica, eletroforese, pH ótimo e atividade proteolítica.
- f) Aportar dados iniciais sobre a maneabilidade do látex liofilizado e seu potencial como matéria-prima e como IFAV, a partir dos parâmetros físico-químicos obtidos para o escoamento de pós, microscopia eletrônica de varredura, análises térmicas e área superficial.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES

- Acetona 99% grau CLAE/UV (Tedia, Fairfield).
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10 mM.
- Ácido tricloroacético (TCA) a 10%.
- Água ultrapura com resistividade 18,1 MΩ/cm (Millipore).
- Álcool etílico 99,5% grau CLAE/UV (VETEC).
- Álcool metílico 99,8% grau CLAE/UV (Tedia, Fairfield).
- Benzamidina a 1 mM.
- Clorofórmio 99,8% grau CLAE/UV (Tedia, Fairfield).
- Cromatoplaça de gel de sílica 60F-254 (20 x 20 cm) (Merck).
- Dodecil sulfato de sódio (DSS).
- Éter etílico 99,8% (VETEC).
- Gel de sílica 60 GF-254 5-40 μm (Merck).
- Gel de sílica 60 RP-18 40-63 μm (Merck).
- Látex de *Euphorbia umbellata* (Barretos, SP e Nova Friburgo, RJ).
- L-trans-epoxisuccinyleucilamido- (4-guanidino) butano (E-64) a 1 mM.
- Mistura de β-sitosterol, stigmasterol e campesterol (Sigma-Aldrich).
- Monoestearato de glicerila (Synth).
- Padrão BIO-RAD.
- Pepstatina a 1 mM.
- Solução ácida de Azul de Coomassie G-250.
- Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M.
- Solução de azul de Coomassie brilhante R-250 a 0,2% em metanol/ácido acético/água (4:1:5).
- Solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M.
- Solução metanólica de anisaldeído sulfúrico 0,5% (p/v) (Referência do preparo: WAGNER, BLADT, 1996).
- Solução preto de amido 0,1%.
- Substrato peptídico N-α-p-Tosil-L-arginil metil éster (L-TAME).
- Tampão carbonato/bicarbonato 50 mM pH 10,0.
- Tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,5 - 6,5.

- Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5.
- Tris HCl 50 mM para valores de pH 7,0-9,5.
- Triton X-100 2,5%.

5.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Agitador orbital com incubadora IKA, modelo KS 4000 ic control.
- Analisador de área superficial Quantachrome, modelo NOVA 4200e.
- Analisador de densidade Erweka 303D.
- Analisador termogravimétrico modelo TGA 5500, TA Instruments.
- Analisador de fluxo por orifício e ângulo de repouso Granulate Tester GTB, Erweka.
- Aparelho digital de ponto de fusão MQAPF-302, Microquímica.
- Balança analítica AU220, precisão 1 mg - 220 g, Shimadzu.
- Balança analítica de determinação de umidade ID-50, sensibilidade de 0,001 g, Marte Científica.
- Balança de precisão modelo UX4200H, Shimadzu.
- Banho de ultrassom USC1800A, UNIQUE.
- Bomba a vácuo LR67161 / 1350-1620 rpm, Greiffenberger AG, Marktredwitz.
- Bomba de vácuo para Extração em Fase Sólida usando Manifold Varian, Vaccubrand RE 2.5.
- Calorímetro exploratório diferencial modelo DSC250, TA Instruments.
- Centrifuga modelo 5810 R, Eppendorf.
- Colunas cromatográficas capilares: LiChrocart Purospher Star RP-18e Merck.
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama, modelo 6890, Agilent Technologies.
- Cromatógrafo a gás modelo 6890N acoplado a espectrômetro de massas mono quadrupolar modelo 5973N, Agilent Technologies.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência: Sistema Shimadzu com detector de arranjo de diodos SPD-M10A, Shimadzu.
- Difratorômetro modelo D8 Advance, Bruker.
- Equipamento de densidade e fluxo modelo GTB, Erweka.
- Espectrofotômetro Uv 1800, Shimadzu.
- Espectrômetro de infravermelho Nicolet 6700, Thermo Fisher Scientific.

- Evaporador rotatório V-850, Büchi.
- Filtro de papel quantitativo (porosidade 8 µm) JP42, Quanta®.
- Filtro de seringa Millipore 0,22 µm de celulose regenerada, Merck.
- Filtro de seringa Millipore 0,45 µm de celulose regenerada Merck.
- Granulômetro modelo Granutest, Produtest.
- Liofilizador Christ Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ.
- Medidor de fluxo de pós por orifícios modelo Granulate flow tester, Erweka.
- Medidor de pH mPA-210, Ms Tecnopon.
- Microscópio eletrônico de varredura modelo TM3030Plus, Hitachi.
- Papel de filtro grau 42: 2,5 µm, Whatman.
- Placa de aquecimento PC-320, Corning.
- Rotaevaporador modelo: V850, Büchi.
- Sepacore X50, Büchi.
- Sistema de eletroforese Mini-protean II, Bio-Rad.
- Software Excel 2013, Microsoft Corporation.
- Software OMNIC 7.0 OMNIC™, Thermo Fisher Scientific.
- Software CLASS-VP versão 6.13 SP2, Shimadzu.
- Soprador térmico G1935/BR2, GAMA.
- Tamises 3,5-60 mesh de aço inox, Bertel.
- Ultra-turrax T-25 digital, IKA.
- Ultrassom USC1800A, UNIQUE.

5.3 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA: LÁTEX DE *EUPHORBIA UMBELLATA*

Foram realizadas oito coletas de látices de *Euphorbia umbellata*, entre 2017 e 2019. Quatro delas (janeiro/2017, duas em março/2018 e novembro/2018) foram em áreas de cultivo nos municípios de Barretos, São Paulo (latitude 20°14'30" S, longitude 48°35'22" W); e outras quatro (janeiro/2019, março/2019, maio/2019 e dezembro/2019) em Nova Friburgo, Rio de Janeiro (latitude 22°16'42.7" S, longitude 42°31'18.8" W). As plantas cultivadas foram identificadas pelo botânico Dr. Marcelo Trovó, e uma exsicata está depositada no herbário RFA da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob código Trovó M.L.O 764. A solicitação de acesso ao Patrimônio Genético está registrada no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob cadastro A37B4B7. O látex foi obtido por gotejamento direto

em um recipiente (garrafa PET), imediatamente após fatiamentos sucessivos de galhos da planta (Figura 8). O material foi eventualmente congelado e remetido via correio rápido ou transportado por veículo particular (origem de Nova Friburgo) até o Laboratório de Produtos Naturais Tec4Bio, no Instituto de Tecnologia em Fármacos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, onde foi mantido em freezer (-20 °C) até seu processamento. Após o descongelamento, o volume do lote foi medido em uma proveta graduada, assim como foi obtida a massa total correspondente.



Figura 8: Coleta do látex de *Euphorbia umbellata* de plantas cultivadas no município de Barretos (SP). Foto de Wilson Barros, 2018.

5.4 PROCESSAMENTO PRIMÁRIO: LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DO LÁTEX

Dois procedimentos foram realizados para processar o látex: (1) liofilização, e (2) extração com etanol 80%; alguns lotes foram submetidos aos dois procedimentos. O esquema da Figura 9 resume os tratamentos realizados com o látex recebido, que originaram a obtenção de três extratos secos distintos.

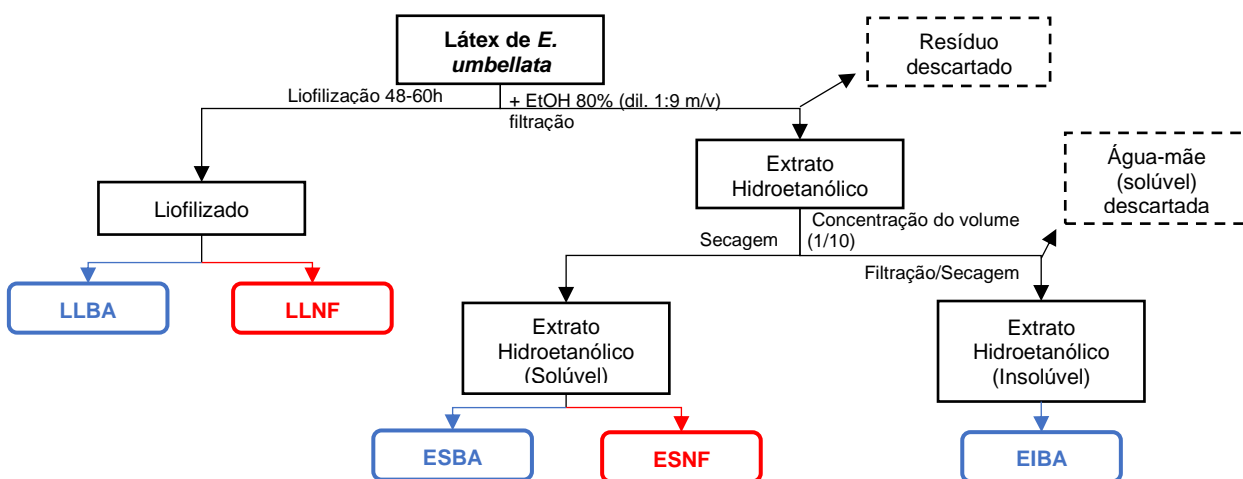


Figura 9: Esquema dos processamentos realizados com o látex de *E. umbellata* e obtenção dos extratos secos. As variações do processo foram inteiramente monitoradas por CCD.

5.4.1 Liofilização

Alíquotas de látex foram colocadas em ampolas de liofilização (100, 250 e 500 mL), novamente congeladas, e diretamente liofilizadas por cerca de 3 dias. O material resultante foi então pulverizado em almofariz com auxílio de pistilo e armazenado em dessecador, sendo devidamente rotulado (ex: LLBA1 para o Látex Liofilizado do lote 01 coletado em Barretos, 2017).

5.4.2 Extração hidroetanólica

Após descongelamento, o látex bruto foi adicionado, à temperatura ambiente, a uma mistura de EtOH:H₂O 8:2, com relação látex:solvente 1:9. A mistura foi agitada manualmente por 15 minutos com auxílio de bastão de vidro e em seguida filtrada por gravidade, em papel de filtro. Este filtrado, já contendo algum material que re-precipita, foi evaporado à exaustão e então levado ao liofilizador para secagem em alto vácuo. Este produto foi analisado sob a denominação de ESBA/ESNF (ex: ESNF1 = extrato hidroetanólico do lote 5 coletado em Nova Friburgo, 2019). Este produto está referido no texto como “extrato hidroetanólico solúvel”.

Uma variação deste procedimento inclui a redução do volume logo após a filtração para 1/10 do seu volume inicial. Após essa redução, uma nova filtração foi efetuada em funil de Buchner (papel de filtro comum), à temperatura ambiente. O sólido resultante foi lavado com etanol absoluto resfriado a 10 °C. Após secagem, esse sólido foi mantido em dessecador e devidamente rotulado (ex: EIBA1 = extrato hidroetanólico do lote 01 coletado em Barretos, 2017). Este produto está referido no texto como “extrato hidroetanólico insolúvel”.

A liofilização foi aplicada a oito lotes e a extração hidroalcoólica a quatro deles. Em alguns casos, o mesmo material foi separado em duas partes, então submetidas aos dois procedimentos.

5.5 FRACIONAMENTO DO LÁTEX LIOFILIZADO E DO EXTRATO HIDROETANÓLICO INSOLÚVEL DE *EUPHORBIA UMBELLATA* POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS) UTILIZANDO SÍLICA DE FASE REVERSA

Uma seringa de polipropileno, com capacidade de 60 mL (2,5 cm diâmetro interno), foi empacotada com 9,4 g de sílica 60 RP-18 (40-63 µm utilizada para separações preparativas), usando CH₃CN como solvente. O volume de leito (VL) foi de 15 mL, correspondendo à altura de 2,5 cm. A seringa, tendo o orifício da base

vedado parcialmente com algodão, foi adaptada a um coletor tipo Manifold, com o empacotamento do leite sendo auxiliado por aplicação de vácuo (Vaccubrand RE 2.5). Após aplicação da amostra suspensa em CH₃CN, foram coletadas 3 frações de 15 mL cada uma, eluídas com CH₃CN; finalizando-se com uma fração única de 15 mL de CHCl₃. Essa descrição representa o experimento otimizado, que então foi repetido quatro vezes com o extrato etanólico (EIBA1) e oito vezes com o látex liofilizado (LLBA2). O experimento utilizando EIBA1 foi ensaiado com aumento da carga aplicada de 200-400 mg e LLBA2 foi ensaiado com aumento de carga aplicada de 500-1000 mg. Ambos os testes utilizaram a mesma seringa de 60 mL.

5.6 ENSAIO DA SEPARAÇÃO DE CLASSES DE TERPENOS UTILIZANDO PARTIÇÃO POR SOLUBILIDADE (ACETONITRILA : ÁGUA)

5.6.1 Fracionamento do lote único liofilizado (LLBA2) através de partição por solubilidade

Estes testes foram realizados com base nas condições estabelecidas pela análise do látex liofilizado em CLAE, quando se utiliza uma mistura de água e acetonitrila como fase móvel (item 5.8). Foram realizados três ensaios utilizando diferentes concentrações da relação sólido:solvente (RSS). O primeiro teste utilizou 100 mg de LLBA2 e 10 mL de mistura CH₃CN:H₂O (acetonitrila:água (RSS 1:100, mg/mL)); o segundo teste foi conduzido com 100 mg de LLBA2 em 20 mL de mistura 1:1 CH₃CN:H₂O (RSS 1:200); e o terceiro teste foi conduzido com 100 mg de LLBA2 em 5 mL (RSS 1:50). Cada um dos três testes foi desdobrado para admitir diferentes proporções da mistura CH₃CN:H₂O: 100% CH₃CN; 75% CH₃CN; 50% CH₃CN; 25% CH₃CN e 0% CH₃CN (100% H₂O). Os parâmetros utilizados nestes ensaios foram baseados na seletividade dos solventes obtidas em CLAE. Os ensaios foram efetuados em frascos fechados, à temperatura ambiente, e aplicação de ultrassom por 15 minutos, filtrando-se em papel de filtro quantitativo (porosidade 8 µm). O material insolúvel foi seco à temperatura ambiente e depois levado ao liofilizador por 12 horas, para completar a secagem. O material solúvel foi rotaevaporado em seguida levado ao liofilizador por 12 horas. Ambos os materiais foram armazenados no dessecador, em frascos devidamente rotulados.

5.7 PERFIL DO LÁTEX E DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA SEPARAÇÃO INICIAL POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As análises por CCD foram realizadas em fase normal e fase reversa, com todos os solventes e reagentes utilizados de grau PA. O revelador utilizado foi anisaldeído sulfúrico (WAGNER, BLADT, 1996), que é borrifado na placa, seguindo-se então o aquecimento desta em estufa a 105 °C por 10 min, ou usando-se um soprador térmico. As fases móveis otimizadas para eluição dos componentes do látex foram CHCl₃:éter etílico 95:5 ou CHCl₃:Acetona 95:5; e CH₃CN puro ou MeOH puro, no caso de fase reversa. As amostras foram solubilizadas em CHCl₃, nas concentrações de 2 ou 5 mg/mL, aplicando-se 10 µL. O padrão utilizado inicialmente foi o TPA (12-O-tetradecanoil-13-acetilforbol).

5.8 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em equipamento Shimadzu (VP) equipado com duas bombas LC-10AD, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A, degaseificador DGU-14A e detector de arranjo de diodos Shimadzu SPD-M10A. Aquisição de dados e controle gerenciadas pelo software Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2. As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas de Campos (2015): gradiente de CH₃CN-H₂O milli-Q sem ajuste de pH; com %CH₃CN variando da seguinte maneira: 20% a 95% (t₀ a 40 min), 95% (40-50 min), 95%-20% (50-55 min), 20% (55-60 min). A temperatura do forno foi 40 °C e o volume de injeção foi 10 µL. A leitura foi realizada em λ = 210 nm. As amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 2,5 mg/mL seguida de filtração em cartucho de 0,22 µm. O padrão empregado foi o TPA e os cromatogramas foram comparados com resultados obtidos e dados da literatura.

5.9 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafo a gás Agilent 6890N Network acoplado a um espectrômetro de massas Agilent 5973. Foi utilizada uma coluna capilar DB-17 HT Agilent (30 m x 250 µm x 0,15 µm), hélio como gás de arraste e fluxo de 1,0 mL/min. As amostras solubilizadas em CHCl₃ ou MeOH, nas concentrações de 2 ou 5 mg/mL, filtradas em cartucho de 0,22 µm, e injetadas com volume de 1,0 µl e divisão de fluxo (split) 10:1. A temperatura do injetor e do detector

foram mantidas em 250 °C e 290 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada de 150 °C até 365 °C, com taxa de aquecimento de 4 °C/min e sendo mantida por 10 min no final. O tempo total de análise foi de 65 min. O espectrômetro de massas operou com impacto de elétrons de 70 eV, temperatura da fonte de 250 °C e modo de análise em varredura linear na faixa de 70-800 Da. Os constituintes foram identificados pela comparação dos espectros existentes na literatura, através da biblioteca eletrônica Wiley 275 disponíveis no software MSD Productivity ChemStation, e analisando padrões de fragmentação no espectro.

5.10 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM DETECTOR POR IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC).

As análises por CG-DIC foram realizadas em cromatografo a gás utilizando um equipamento Agilent Technologies 6890N Network acoplado a um detector Agilent 5979. Foi utilizada uma coluna capilar DB-17 HT Agilent (30 m x 250 µm x 0,15 µm), empregando-se hidrogênio como gás de arraste com fluxo constante de 1,8 mL/min. As amostras solubilizadas em CHCl₃, nas concentrações de 2,5 mg/mL, filtradas em cartucho de 0,22 µm, e injetadas com volume de 2,0 µL e divisão de fluxo (split/splitless) 25:1. A programação do forno iniciou em 50 °C, com isoterma de 5 minutos, seguida de aquecimento a uma taxa de 20 °C/min até 230°C e então reduzida para 5 °/min até 350 °C, finalizando com uma corrida isotérmica de 9 min. A corrida durou 47 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas 300 °C. O detector de ionização de chama operou a uma temperatura de 300 °C, uma vazão de ar de 320 mL/min, vazão de hidrogênio de 31 mL/min, com uma vazão de nitrogênio de 10 mL/min.

5.11 QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LÁTEX POR CG-DIC

O emprego da linearidade de resposta do detector aos principais componentes do látex foi realizado em balões volumétricos de 10 mL foram preparadas soluções do látex liofilizado em CHCl₃ nas concentrações de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/mL. Estas foram analisadas em triplicatas por CG-DIC conforme descrito no item 5.10. Primeiramente foi injetado o látex liofilizado (LLBA2), em diferentes concentrações (2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/mL), para determinar uma linearidade de resposta do detector a cada componente da amostra, e a concentração ideal a ser utilizada. Em seguida, todas as amostras (LLBA1; LLBA2; LLBA3; LLNF1; EIBA2; EESG 01/19; ESNF1; FS; FI; SPE F1+F2;

SPE F3; SPE F4), preparadas separadamente, foram injetadas em triplicatas na concentração de 2,5 mg/mL.

5.12 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)

Em espectrômetro de infravermelho Thermo-Nicolet (modelo Nicolet 6700) pertencente ao Serviço de Métodos Analíticos (SMA - Farmanguinhos) e está equipado com *software* OMNIC 7.0. Nele, foram depositadas pequenas quantidades de amostra, em contato direto com o cristal do acessório de reflectância atenuada (ATR). Os espectros foram registrados entre 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 32 scans e 4 cm^{-1} .

5.13 ESTUDO DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *EUPHORBIA UMBELLATA*

5.13.1 Preparo das amostras

Uma alíquota do látex *in natura* coletada em Barretos-SP (LBA2) e outra em Nova Friburgo-RJ (LNF3), foram centrifugados (10.000 x g por 30 min a 4 °C). Desta centrifugação foram obtidos os sobrenadantes do látex de Barretos (SLBA) e do látex de Nova Friburgo (SLNF), que foram armazenados a 4 °C para as análises.

Posteriormente, foi feita a extração das proteínas utilizando 5 mg do látex liofilizado de Barretos (LLBA2) e de Nova Friburgo (LLNF3) com 1 mL de diferentes soluções extratoras: tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0 (a); tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5 (b) e água destilada (c), sob agitação leve (100 x g por 60 min a temperatura ambiente) utilizando Shaker (B.A.K 250, Benfer). Em seguida, o material foi centrifugado (10.000 x g por 30 min a 4 °C) e os sobrenadantes separados e armazenados a 4 °C para posteriores análises. Os sobrenadantes provenientes das extrações do látex liofilizado de Barretos e de Nova Friburgo foram denominados respectivamente de SLLBA-a, SLLBA-b, SLLBA-c e SLLNF-a, SLLNF-b, SLLNF-c, obtidos respectivamente com tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0 (a); tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5 (b) e água destilada (c).

5.13.2 Quantificação proteica

A determinação do teor de proteínas foi realizada pelo método Bradford (1976), usando a proteína albumina obtida soro bovino (BSA) como padrão. O reagente foi preparado a partir de 100 mg de Coomassie® Azul Brilhante G-250 solubilizado em 50

mL de etanol 95% e 100 mL ácido fosfórico 85%. A solução foi diluída para um volume final de 1 L, filtrada e utilizada para a dosagem de proteínas das amostras. A curva padrão foi construída utilizando BSA nas concentrações de 4.000; 2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 mg/mL. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 595 nm em espectrofotômetro (Uv 1800, Shimadzu). Este método baseia-se na absorvância máxima de uma solução ácida de Azul de Comassie G-250 a 595 nm quando se liga a proteína. Além disso, é o método mais adequado para o doseamento de proteínas de plantas, visto que minimiza a interferência de alcalóides e polifenólicos como os flavonóides e taninos comumente presentes nos vacúolos de citoplasmas vegetais (Zaia *et al.*, 1998).

5.13.3 A atividade peptidásica dos soros dos látex

A progressão da atividade lítica dos soros SLBA e SLNF sobre o substrato peptídico N- α -*p*-Tosil-L-arginil metil éster (L-TAME) foi realizada incubando soros e sobrenadantes com substrato na concentração final de 0,125 mM, na temperatura ambiente em tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5. A reação foi conduzida por 30 min e a hidrólise do substrato avaliada pelo aumento progressivo da absorvância a cada 5 min em espectrofotômetro a 247 nm. A atividade foi expressa em unidades (U), que significa o incremento de 0,1 na absorvância (GONÇALVES *et al.*, 2016).

5.13.4 Eletroforese de proteínas

A eletroforese em poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é correntemente utilizada para análises de peso molecular, atividade enzimática e glicosilação das proteínas e enzimas (GONÇALVES *et al.*, 2016). O SDS-PAGE 12% foi realizado para estudar o perfil de proteínas presentes nos soros (SLBA e SLNF) e seus respectivos sobrenadantes extraídos dos látex liofilizados (SLLBA e SLLNF), já o gel de SDS-PAGE 10% foi empregado para estudar a possível atividade proteolítica destes sobre a gelatina. As condições utilizadas para ambos os géis foram as descritas por Laemmli (LAEMMLI, 1970) em num sistema de eletroforese Mini-protean II (Bio-Rad) e espaçadores de 0,7 mm. Foi utilizado o padrão BIO-RAD com proteínas de massas moleculares de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa. O gel de 12% foi corado com azul de Coomassie brilhante R-250 a 0,2% em metanol/ácido acético/água (4:1:5). O perfil das proteínas presentes será evidenciado pela presença

de bandas azuis que correspondera ao peso da protease. O gel de 10% contendo 5% de gelatina foi lavado com Triton X-100 a 2,5% por 1 h para remover o dodecil sulfato de sódio (SDS) e posteriormente incubado *overnight* a temperatura ambiente em tampão Tris HCl 100 mM pH 7,0 para permitir a proteólise. No dia seguinte, o gel foi corado com 0,1% de preto de amido e descorados com metanol/ácido acético/água destilada (3: 1: 6). A proteólise será evidenciada pela presença de bandas claras que corresponderá ao peso da protease ativa.

5.13.5 Determinação do pH ótimo das proteases dos soros dos látex

O pH ótimo ou a faixa de pH na qual a enzima tem atividade máxima foi estudado incubando-se os soros dos látex (SLBA e SLNF) e o substrato caseína, em tampões na faixa de pH 4,5 a 10,0 sendo: tampão citrato de sódio 50 mM para valores de pH entre 4,0 a 6,5, tampão Tris HCl 50 mM para valores de pH entre 7,0 a 9,5 e tampão carbonato/bicarbonato 50 mM para valor de pH 10,0. A reação transcorreu por 15 min, em seguida paralisada com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, seguido de centrifugação (10.000 × g por 10 min a 4 °C) e a hidrólise do substrato foi medida pelo aumento da absorbância a 280 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa como a quantidade de enzima necessária para causar um incremento de 0,1 na absorbância em condições experimentais padrão (PACHECO, SILVA-LÓPEZ, 2012).

5.13.6 Avaliação da atividade proteolítica em diferentes substratos

Os substratos proteicos 0,1% (p/v) de alto grau de especificidade como gelatina, caseína, hemoglobina e BSA foram dissolvidos em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,0. A cada substrato diluído foram adicionados 10 µL de amostra dos soros (SLBA e SLNF) e do sobrenadante do látex liofilizado (SLLBA e SLLNF). A reação transcorreu sob agitação leve (100 × g por 30 min a temperatura ambiente) e foi paralisada pela precipitação de proteínas com TCA a 10% (v/v). Os tubos com as reações foram centrifugados (10.000 × g por 10 min a 4 °C), e a absorbância dos sobrenadantes foi medida a 280 nm em espectrofotômetro. A detecção da atividade da protease, utilizando proteínas como substratos, dependeu da solubilidade de peptídeos de baixo peso molecular, derivados da proteólise sobre substratos, no sobrenadante após precipitação dos grandes fragmentos de proteínas ou de proteínas intactas. Uma

unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um incremento de 0,1 na absorvância, como descrito anteriormente.

5.13.7 Influência de inibidores de proteases na atividade enzimática dos soros dos látex

A avaliação da inibição enzimática foi realizada incubando a enzima (SLBA e SLNF) e inibidores específicos das classes de protease em diferentes concentrações (1 mM de benzamidina (BZA), 1 μ M de L-trans-epoxisuccinyleucilamido- (4-guanidino) butano (E-64), e 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e 1 μ M de pepstatina) dissolvidas em água. A reação foi disparada pela a adição do substrato, caseína, em 100 mM de Tris-HCl pH 7,0 e conduzida por 30 min a temperatura ambiente, a absorvância foi avaliada a 280 nm. Soluções controle contendo apenas o inibidor com o substrato foram conduzidas simultaneamente e a porcentagem de inibição estimada tomando-se a solução controle sem adição do inibidor como 100 % da atividade (SILVA-LÓPEZ *et al.*, 2005).

5.14 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LÁTEX LIOFILIZADO DE *EUPHORBIA UMBELLATA*

5.14.1 Determinação do teor de umidade

Para esta análise utilizou-se a balança analítica com determinador de umidade por infravermelho e sensibilidade de 0,001 g (Marte série ID-50 v1.8). Os teores de umidade foram determinados em duplicata. Cada análise empregou aproximadamente 1 g dos materiais, que foram posteriormente descartados.

5.14.2 Determinação do ponto de fusão

A amostra (aproximadamente 5 mg) foi colocada em lamínula e o ponto de fusão foi determinado em aparelho digital com resolução de 0,1 °C (MQAPF-302, Microquímica). Este foi ajustado para iniciar o aquecimento com uma taxa de 5 °C/min. O experimento foi realizado em triplicata.

5.14.3 Análises térmicas

Foram feitas curvas de calorimetria diferencial exploratória (DSC), em equipamento TA, modelo DSC-250. Aproximadamente 5 mg de cada amostra foram pesados em cadinhos de alumínio lacrados, e aquecidos a $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, em atmosfera de nitrogênio fluindo a $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

As análises termogravimétricas (TGA) das amostras foram feitas em equipamento TA, modelo 550, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, com vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir a temperatura de $700\text{ }^{\circ}\text{C}$. As análises foram realizadas em porta-amostras de platina, contendo aproximadamente 5 mg de amostra.

5.14.4 Difração de raios X de pó (DRX)

As análises de difração de raios X de pó foram realizadas no Laboratório Regional de Difração de Raios X da Universidade Federal Fluminense. As medidas foram realizadas em difratômetro Bruker D8 Advanced com radiação $\text{CoK}\alpha$ ($\lambda = 1,78897\text{ \AA}$) e voltagem e corrente de tubo de 40 kV e 40 mA, respectivamente. Foram utilizados o passo de $0,02^{\circ}$ e o tempo por passo de 0,1 s, sendo explorados ângulos de 3° até 60° em 2θ . Foi utilizado o detector Bruker Lynxeye XE. Para facilitar a comparação entre os resultados obtidos com dados da literatura, foi realizada a conversão matemática dos valores experimentais e, assim, os gráficos apresentados possuem o eixo das abcissas 2θ relacionado à radiação de cobre ($\lambda = 1,54060\text{ \AA}$).

5.14.5 Análise granulométrica por tamisação

A análise para a determinação granulométrica foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica de Farmanguinhos em equipamento Produtest modelo Granutest. Aproximadamente 20 g do látex liofilizado foram submetidos à passagem através de tamises, previamente pesados, com abertura de malha de 0,125; 0,177; 0,250; 0,350; 0,420 e 0,600 mm e amplitude 7. As massas das frações retidas em cada um dos tamises foram determinadas por pesagem e os respectivos percentuais calculados.

5.14.6 Densidade aparente e compactada

As análises para determinação da densidade aparente e compactada do látex liofilizado foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica de Farmanguinhos em provetas calibradas acopladas ao aparelho de determinação de densidade Erweka 303D. Para tal, aproximadamente 8 g de amostra, em triplicata, foram transferidos cuidadosamente, sem favorecer a compactação do pó, para a proveta graduada (USP, 2018).

O volume inicialmente ocupado pelo pó foi determinado e caracterizado como o volume aparente (V_0) e esses foram utilizados para cálculo da densidade aparente (D_a), em g/mL, conforme Equação I.

$$D_a = \frac{m}{V_0} \quad (\text{Equação I})$$

Para a estimativa da densidade compactada (D_c) (Equação II), as amostras foram submetidas à compactação mecânica (10 a 1250 batidas) até volume constante (V_f).

$$D_c = \frac{m}{V_0} \quad (\text{Equação II})$$

5.14.7 Fluxo por orifício

A análise de fluxo de pó por orifício foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica de Farmanguinhos em equipamento Granulate Tester GTB – Erweka. Foram acondicionados cerca de 8 g de amostra em funil de escoamento com diâmetros de abertura 6, 8, 10, 11.3, 15 e 25 mm e nível de agitação de 0-4.

5.14.8 Ângulo de repouso

A análise de fluxo de pó por determinação do ângulo de repouso foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica de Farmanguinhos em equipamento Granulate Tester GTB – Erweka. Para tal, foram acondicionados cerca de 8 g de amostra em funil com abertura de 6, 8, 10, 11.3, 15 e 25 mm e nível de agitação de 0-4, o ângulo de repouso do pó foi determinado opticamente pelo equipamento.

5.14.9 Área superficial específica

A determinação da área superficial específica das amostras foi realizada em equipamento Quantachrome – NOVA 4200e, com base no modelo de *Brunnauer-Emmett-Teller* (BET), utilizando isotermas de adsorção de nitrogênio a 77 K. Acondicionou-se a amostra em tubo de amostra (*Sample Tube*) e, em seguida, esta passou por um pré tratamento de 20h a 50 °C para remover qualquer material adsorvido no interior dos poros e na superfície do material.

5.14.10 Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, da Fiocruz. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Hitachi modelo TM3030Plus com a voltagem de 10 kV. Pequenas quantidades de amostra foram aderidas a uma fita adesiva dupla face de carbono apoiada sobre um suporte. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de prata, à temperatura ambiente e a vácuo para serem então avaliadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as atividades de extração e fracionamento realizadas com o látex como material de partida foram acompanhadas por análises de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo diodos (CLAE-DAD) e cromatografia em fase gasosa (CG). Encontrar condições adequadas de análise, ou mesmo otimizar descrições de métodos da literatura aplicados ao látex de *E. umbellata*, também constituiu um dos principais propósitos deste estudo; daí parte da revisão da literatura orientada para estes três métodos.

6.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O látex de *Euphorbia umbellata* foi coletado em cultivos existentes nos municípios de Barretos (SP) e Nova Friburgo (RJ). Sabidamente irritante para a pele e olhos, o látex foi coletado com cuidados de proteção individual que incluiu o uso de trajés, máscaras e óculos apropriados (Figura 8, item 5.3, pag. 42).

No momento da coleta, o látex apresentou-se como um fluido leitoso viscoso, com forte e rápida tendência a aglutinar os sólidos nele dispersos, separando duas fases (líquida e sólida). Essa tendência de formar grumos foi descrita já por Kopaczewski (1950), quando submeteu o látex de *Euphorbia dendroides* à simples agitação mecânica. Além disso, esse autor também descreve que a floculação continuava a ocorrer, mesmo após sucessivas filtrações; com interrupção da precipitação no 16º dia de manipulação do látex diluído 1:5 em água destilada a 10 °C (KOPACZEWSKI, 1950). O mecanismo envolvido nessa coagulação foi recentemente explorado no sentido de investigar a natureza física (tamanho e forma) das próprias partículas, em látices oriundos de espécies de diversas famílias botânicas (BAUER *et al.*, 2014). Em geral, esta coagulação está associada a enzimas proteases presentes nos látices, ainda que os mecanismos não sejam claramente conhecidos (SHIVAPRASAD *et al.*, 2010).

Do ponto de vista do desenvolvimento de um produto medicinal a partir do látex de *E. umbellata*, esta tendência em aglomerar as partículas por alguma ação mecânica é o primeiro problema a ser contornado, já que a separação de fases implicaria também em provável concentração diferenciada de componentes nas

distintas fases. Este problema já surge, portanto, durante o armazenamento e o transporte dessa matéria-prima.

Um segundo problema, conforme descrito pelos coletores do látex, é que o material bruto sofre provável ação de microrganismos; fato constatado pelo odor que o látex apresentou, em alguns dos lotes recebidos alguns dias após a coleta. O congelamento do látex logo após sua coleta resolve, em parte, este problema, mas agrava a aglomeração das partículas, tornando praticamente irreversível a separação das fases.

Houve dificuldade em se obter o látex de *E. umbellata* nos períodos de estiagem, quando as plantas praticamente perdem suas folhas e ficam bastante mirradas, produzindo pouquíssimo látex. Há, portanto, lacunas na coleta do látex durante o período de verão.

Os lotes de látices transportados para o laboratório apresentaram-se sempre com aspecto heterogêneo, contudo mantendo a coloração branca ou levemente bege. A Figura 10 mostra o látex mantido congelado até o seu processamento, após a retirada da garrafa PET usada no transporte. Depois do descongelamento, as massas e volumes foram determinados (Tabela 1).

Tabela 1: Data de coleta, procedência, quantidade coletada e códigos de látices de *E. umbellata*.

Lote	Identificação	Código	Procedência	Volume*	Massa
1	Jun/2017	LBA1	Barretos-SP	300 mL	316 g
2	Mar/2018	LBA2	Barretos-SP	250 mL	246 g
3	Mar/2018		Barretos-SP	250 mL	249 g
4	Nov/2018	LBA3	Barretos-SP	250 mL	247 g
5	Jan/2019	LNF1	Friburgo-RJ	350 mL	353 g
6	Mar/2019	LNF2	Friburgo-RJ	90 mL	94 g
7	Mai/2019	LNF3	Friburgo-RJ	250 mL	256 g
8	Dez/2019	LNF4	Friburgo- RJ	120 mL	101 g

*Valor estimado usando proveta graduada, pois as fases já chegaram separadas no próprio frasco transportado.

A tentativa de homogeneização manual levou de fato à formação de grúmulos, que intensificava conforme se prolongava o tempo de agitação (Figura 10). A dificuldade para manusear essa matéria-prima, de modo a viabilizar a separação cromatográfica subsequente, sugeriu a adoção de dois processamentos distintos, os quais foram ensaiados em paralelo: (i) a liofilização direta do material íntegro (após homogeneização manual), e (ii) a prévia dissolução do látex em uma solução hidroalcoólica (à maneira de tintura, usando etanol).

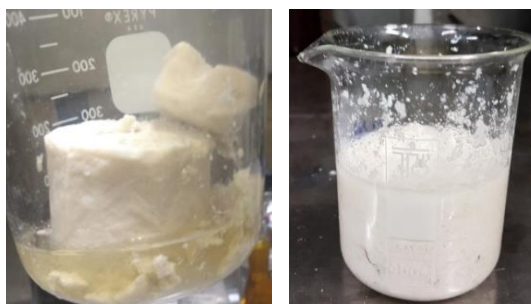


Figura 10: Látex após descongelamento e látex após homogeneização, respectivamente.

6.2 PROCESSAMENTO PRIMÁRIO: LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DO LÁTEX

O primeiro processamento foi a liofilização direta do látex homogeneizado manualmente, procedida com parte de cada lote. As massas iniciais utilizadas de látex, o rendimento final obtido e os códigos designados a cada amostra estão descritos na Tabela 2. A liofilização é um processo de secagem a frio, que geralmente é utilizada para evitar a degradação de substâncias termolábeis, portanto esta técnica oferece alta possibilidade de preservação das substâncias originais do látex.

Tabela 2: Massa utilizada para o processo de liofilização e massa final obtida do látex liofilizado.

Lote	Liofilizado	Massa liofilizada**	Massa seca obtida
LBA1	LLBA1	50,2 g	12,4 g (25%)
LBA2	LLBA2* (Lotes 2 e 3 de mai/17)	534,9 g	119,7 g (22%)
LBA3	LLBA3	117,5 g	28,8 g (25%)
LNF1	LLNF1	24,9 g	7,2g (29%)
LNF2	LLNF2	25,8 g	5,2 g (20%)
LNF3	LLNF2	51,2 g	12,3 g (24%)
LNF4	LLNF3	10,7 g	3,4 g (32%)

BA = origem: Barretos/SP. NF = origem Nova Friburgo/RJ. * Amostras unificadas com base na similaridade dos perfis em CLAE (ver abaixo). ** A massa liofilizada foi composta de uma mistura das fases sólida e líquida do látex recebido dos coletores, homogeneizadas manualmente com um bastão de vidro.

O teor médio de água no látex, considerando todos os lotes, ficou entre 68% e 80%, considerando as coletas nas duas origens. Esse resultado foi calculado pela diferença da massa antes e após o processo de liofilização. Este teor de água em látices de espécies de *Euphorbia* é semelhante ao de alguns casos descritos na literatura (KOPACZEWSKI, 1950). As publicações mais recentes normalmente não mencionam o teor de água contido no látex.

De acordo com Evans (1983), os látices de euforbiáceas podem ser coletados diretamente em etanol ou metanol para provocar a coagulação das enzimas, proteínas e polímeros isoprênicos. A evaporação do sobrenadante concentraria os ésteres diterpênicos, que então poderiam ser armazenados em freezer por até 5 anos. Nessa

direção, o segundo processamento realizado envolveu a diluição do látex em etanol 80% seguido de uma filtração (item 5.4.2, pag. 44).

Aparentemente, isso evitou a aglomeração (excetuando-se uma baixa quantidade de material insolúvel remanescente, que é descartado), mas o filtrado produzido continuou a precipitar um sólido branco, gerando uma suspensão, então denominada de extrato hidroetanólico. Por hipótese, este procedimento atenderia às necessidades de evitar a floculação das partículas, ou mitigar essa tendência, e proteger a matéria-prima de contaminações microbianas. Esse processo foi aplicado aos lotes 1 (LBA1) e 5 (LNF1) da Tabela 1, sendo que com o LBA1, o procedimento foi efetuado de imediato, logo no local da coleta (denominado ESBA1); evitando assim a aglutinação devido a intervenções mecânicas mais drásticas e ao armazenamento, quando prolongado.

O extrato hidroetanólico ESNF1 foi obtido com o lote 5 (LNF1, Tabela 1 (pag. 56), sendo evaporado e seco em alto vácuo por 24 horas. O sólido resultante, embora com aspecto mais fino, continuou a se mostrar viscoso, com tendência a amarelar levemente quando exposto ao ar. Além disso, após a secagem, o sólido obtido resultou consideravelmente compactado e duro – fato relevante para os estudos de suas partículas. A quantidade de látex bruto utilizado em cada extração hidroetanólica e rendimentos dos extratos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Massa utilizada e rendimento da extração hidroetanólica.

Lote	Extrato	Massa inicial de látex	Massa final do extrato	Aspecto (cor)
LBA1	EIBA1	266 g	11,2 g (4%)	Branco
LBA2	EIBA2	128 g	3,14 g (3%)	Branco
LBA1	ESBA1*	300 g	34,3 g (11%)	Amarelo
LNF1	ESNF1	125 g	7,05 g (6%)	Amarelo

*Recebido já na forma de extrato hidroetanólico, feito no local de coleta.

Uma variante dessa extração foi explorada, ao incluir uma redução de volume do filtrado em rotaevaporador até 1/10 do volume inicial, procedendo-se então outra filtração. Nesse caso, o produto de interesse foi o sólido insolúvel formado. Este foi seco e denominado EIBA, para 2 lotes originados de Barretos (LBA 1 e LBA 2) (Figura 11, Tabela 3).



Figura 11: Extrato hidroetanólico (fração solúvel ESNF1) e Extrato hidroetanólico (fração insolúvel, EIBA1).

Ao contrário do extrato ESBA/ESNF (proveniente da fração solúvel em EtOH-água), os extratos EIBA (proveniente da fração insolúvel da suspensão reduzida em EtOH-água) demonstraram ser manuseáveis, com maior facilidade de particulação manual, sem viscosidade, e de coloração intensamente branca (Figura 11). Todavia, os rendimentos dos processos que conduziram a EIBA foram bem menores do que no caso de ESNF produzido em nosso laboratório (2,8 a 3,7 vezes). As constituições dos sólidos obtidos em ambos os processos foram comparadas por CCD, CLAE e CG (itens 6.3, 6.4 e 6.5, adiantes).

6.3 PERFIL EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) DO LÁTEX E DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA SEPARAÇÃO INICIAL

Vários sistemas de solventes apresentados no Quadro 2 (pag. 27), assim como variações empíricas das misturas, foram testados com vistas à separação dos componentes terpênicos do látex e seus extratos, empregando-se reveladores colorimétricos próprios para esta classe de substâncias (anisaldeído sulfúrico ou vanilina) (WAGNER; BLADT, 1996).

As melhores respostas, em termos de desdobramento de sinais foram obtidas com CHCl_3 :éter etílico em placas de gel de sílica (fase normal) e CH_3CN puro em sílica de fase reversa (RP-18). No primeiro caso, a mistura de CHCl_3 :acetona também funcionou satisfatoriamente, com a vantagem de a proporção da mistura permanecer constante por mais tempo na cuba, nos ambientes mais quentes.

A Figura 12 mostra a separação obtida em ambas as placas. Os sinais avermelhados mais fortes (maiores RFs em 12A e menores RFs em 12B) são típicos das respostas dos triterpenos e esteroides. Os sinais índigos mais escuros e, em teoria, menos concentrados (menores RFs em 12A e maiores RFs em 12B), foram inicialmente atribuídos aos ésteres de forbol; hipótese que foi paulatinamente se confirmando pelo isolamento e caracterização das substâncias correspondentes (efetuados por outros componentes do grupo de pesquisa).

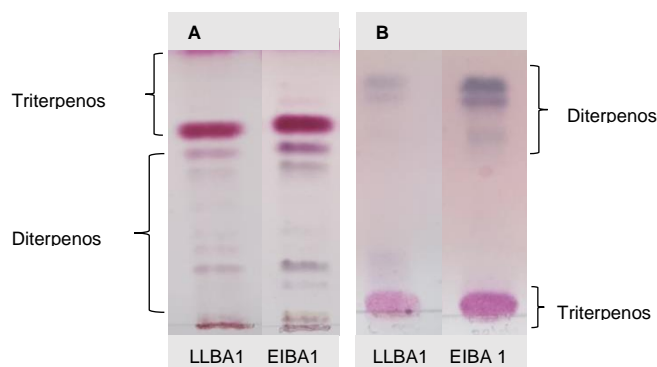


Figura 12: Cromatografia em Camada delgada (CCD), Fase estacionária: A (gel sílica) B: Fase reversa (RP-18); Fase móvel: A: CHCl_3 :éter etílico (95:5); B: CH_3CN (100%). LLBA1 = látex liofilizado Barretos; EIBA1 = extrato EtOH 80% 01/17. Concentração das amostras: 5 mg/mL (10 μL aplicados em cada spot). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico em metanol a 105 °C (estufa por 10 min).

A Figura 13 mostra uma comparação entre amostras do látex liofilizado LLBA1 e LLBA2 ao lado dos extratos hidroetanólicos (parte insolúvel), este obtido a partir do mesmo lote de látex *in natura*. Como exemplo, foram utilizados dois lotes provenientes de Barretos. Fica evidente a concentração da maioria dos componentes terpênicos nestes dois últimos, além de uma separação mais nítida, em particular dos sinais referentes aos forboloides ($\text{RF} \leq 0,5$). Estes resultados apontam para a rota de obtenção de EIBA (Figura 11, pag 59) como um tratamento conveniente para iniciar o isolamento dos constituintes forboloides do látex.

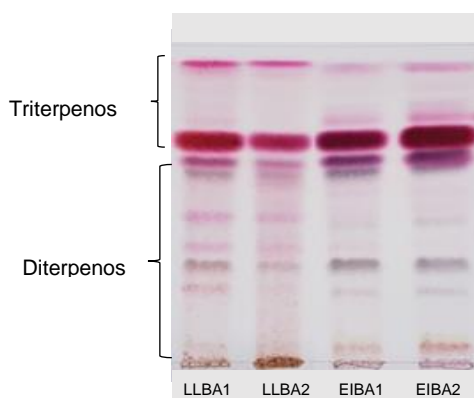


Figura 13: Cromatografia em Camada delgada (CCD) dos látices liofilizados (LLBA1; LLBA2) e dos extratos etanólicos (EIBA1; EIBA2) Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 5% de acetona em CHCl_3 . Concentração das amostras: 5mg/mL (10 μL aplicados em cada spot). Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, aquecimento a 105 °C.

6.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)

As condições de análise CLAE para o látex, seus extratos e frações derivados, foram inicialmente inspiradas no trabalho de Campos (2015) (Figura 14), que utilizou um sistema de eluição composto por água, acetonitrila e metanol (Quadro 3, pag. 29).

Adaptações foram introduzidas, no sentido de melhorar a resolução dos sinais (leituras em 210, 254 e 360 nm), com variações na composição do gradiente, eliminação do metanol na mistura de eluentes e, principalmente, evitando-se a adição de ácidos, como cautela para evitar possíveis hidrólises de componentes contendo grupamentos ésteres. Nas condições adaptadas, o tempo de análise foi mais longo (de 37 para 60 minutos). Os cromatogramas obtidos por Campos (2015) mostraram pequenas variações nos perfis dos extratos obtidos em diferentes estações (primavera, verão, outono e inverno), destacando uma maior intensidade nos sinais entre os tempos de retenção de aproximadamente 19,5 min a 24 min nas condições utilizadas, principalmente dos extratos obtidos de amostras coletadas na primavera (Figura 14). Nessa publicação, é possível notar a drástica diminuição dos sinais de menos t_R nas estações mais frias, nas quais, teoricamente, as plantas estão mirradas e produzem menos látex.

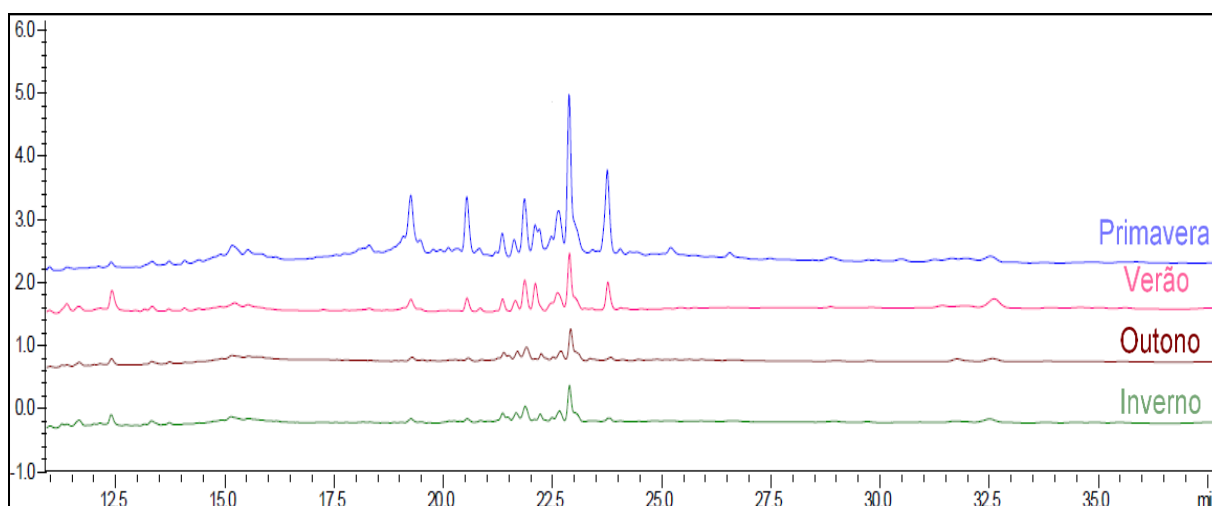


Figura 14: Cromatogramas CLAE-DAD dos extratos do caule de *E. umbellata* (*S. grantii*) obtidos nas 4 estações. Leitura em 210 nm. Fonte: CAMPOS, 2015.

Os cromatogramas obtidos nas condições modificadas (Item 5.8, pag. 46), embora sejam passíveis de melhora, já ofereceram uma resolução suficiente (aqui incluindo as possibilidades de ampliação virtual dos cromatogramas) para iniciar estudos comparativos entre os extratos liofilizados e aqueles obtidos pelas alternativas que empregaram etanol. A otimização empírica deste método continuará sendo ensaiada no laboratório por outros componentes do grupo de pesquisa.

A Figura 15 mostra os perfis em CLAE de sete amostras diferentes de látex liofilizado. É possível observar que as amostras são bastante similares, apresentando entre 4 e 6 sinais mais intensos entre 32 e 42 min, com alguma variação de

intensidade/área entre sinais correspondentes em amostras diferentes. A distinção mais notável ocorre entre os látex de origens diferentes, quando o material oriundo de Friburgo/RJ apresenta sinais com maior intensidade. A identidade entre os látex de mesma origem permitiu a unificação das amostras LLNF1 e LLNF2 (Tabela 2, pag. 57) para a sequência dos trabalhos desenvolvidos na seção 6.11 (pag. 101).

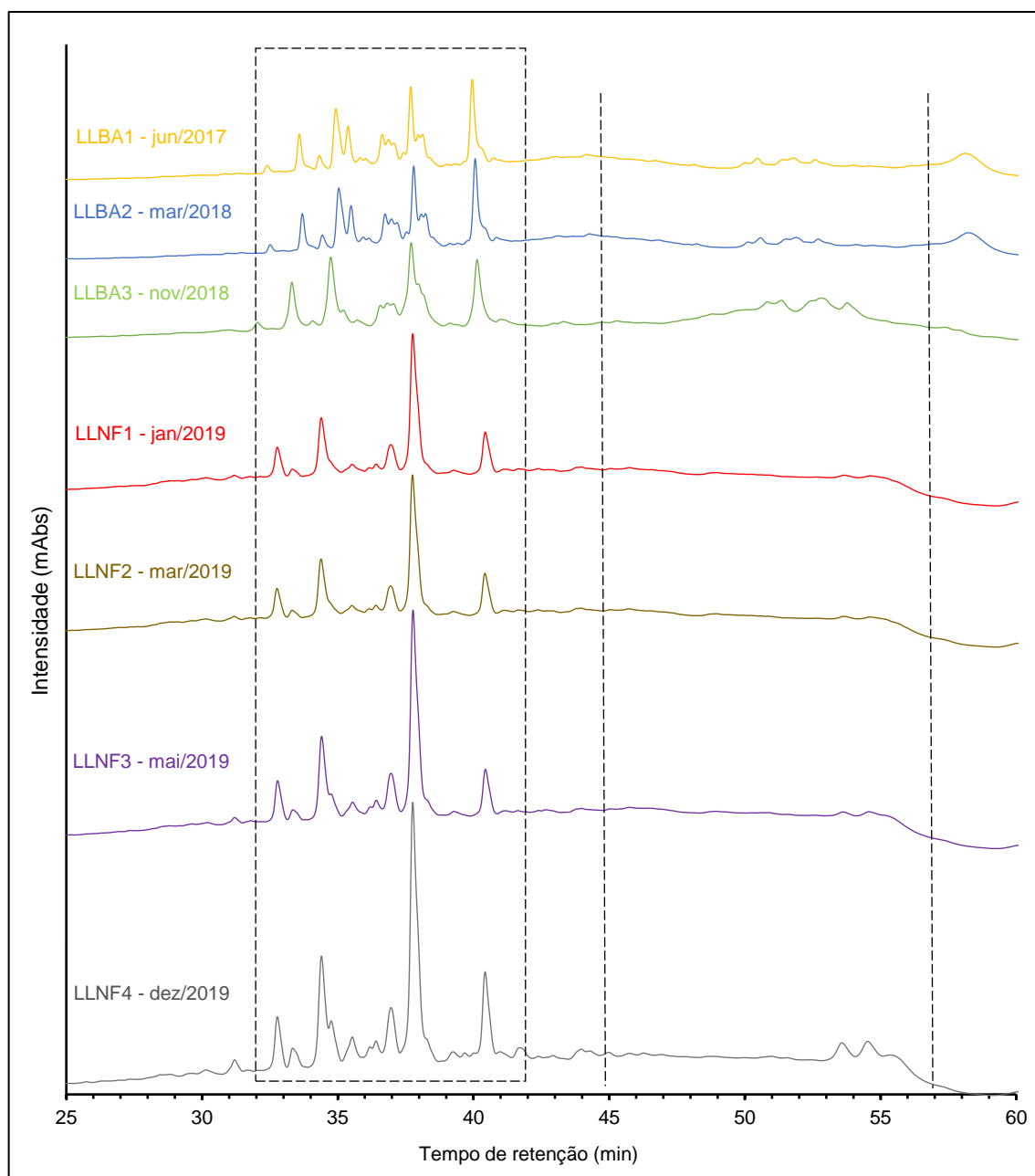


Figura 15: Cromatogramas CLAE-DAD dos látex liofilizados. LLBA: Látex liofilizados de Barretos
LLNF = Látex liofilizados de N. Friburgo. Todas as análises foram feitas nas mesmas condições operacionais e obtidas com os mesmos parâmetros gráficos.

Um segundo conjunto de sinais, com baixa resolução aparece entre 45 e 57 minutos, na região relacionada à resposta dos triterpenos e esteroides. Nas análises

de rotina, os sinais mais resolvidos nessa parte do cromatograma não foram reproduzíveis (ao contrário da região dos forbóis, abaixo de 42 min), mesmo no caso de injeções repetidas de uma mesma amostra. Esta suposição foi corroborada pelas análises de frações isentas total ou parcialmente de diterpenos, as quais produzem sinais nessa mesma região. Os constituintes triterpênicos dessas frações também foram evidenciados por CCD (ver Figura 24 do item 6.7, pag 80).

O método desenvolvido por Campos (2015) foi adaptado por nosso grupo de pesquisa para analisar especificamente os diterpenos, comparando os resultados do presente estudo (Figura 15, pag 62) com os obtidos por Campos (2015) (Figura 14, pag. 61), nota-se uma maior resolução com sinais mais bem resolvidos. Adicionalmente, os resultados mostram uma semelhança nos perfis com diferentes tempos de retenção, o que é esperado, uma vez que as condições de análises foram modificadas. Os sinais mais fracos e mais retidos na coluna também aparecem nos cromatogramas publicados por Campos (2015), com ligeira proeminência em duas das estações de coleta. Em suma, ficou claro que os triterpenos exigiriam investir em um método distinto, mais adequado à separação e resposta destas substâncias, cuja solubilidade é bastante dificultada no eluente utilizado para os diterpenos. A otimização de condições de análise em CLAE para o conteúdo de triterpenos do látex não foi explorada nessa dissertação.

Tanto os diterpenos quanto os triterpenos são substâncias com cromóforos pobres, que fornecem pouca informação na detecção por UV, mas é possível distinguir uma absorção um pouco mais proeminente na região de 210 nm (Figura 16a) para os ésteres de forbol (Figura 6, pag 23).

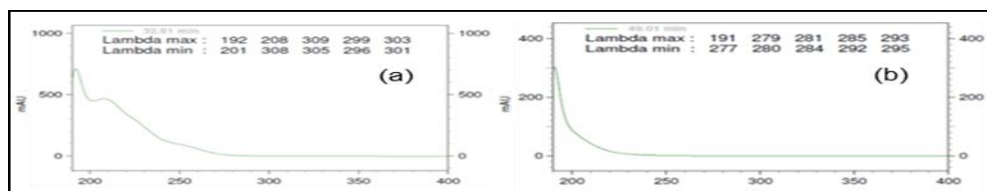


Figura 16: (a) UV representativo de éster de forbol. (b) UV representativo de triterpeno/esteróide.

De qualquer maneira, os espectros de UV não foram considerados diagnósticos, mas sim contribuíram com o conjunto de dados analíticos produzidos.

A Figura 17 mostra os cromatogramas dos extratos etanólicos (parte solúvel da filtração, ESNF1) e do extrato etanólico reduzido (insolúvel da segunda filtração, EIBA1). Registradas com os mesmos parâmetros operacionais usados para as

amostras liofilizadas, a Figura 17 mostra uma região mais limpa para os forboloides (28 - 38 min), com os sinais mais bem resolvidos. Além dos seis sinais mais destacados nos cromatogramas do material liofilizado na Figura 15 (pag. 62), dois outros destacam-se no início do cromatograma (em 30 e 31 minutos, na Figura 17), havendo uma simplificação concomitante na região dos triterpenos/esteroides, onde agora aparecem apenas dois sinais significantes, mas com baixa resolução.

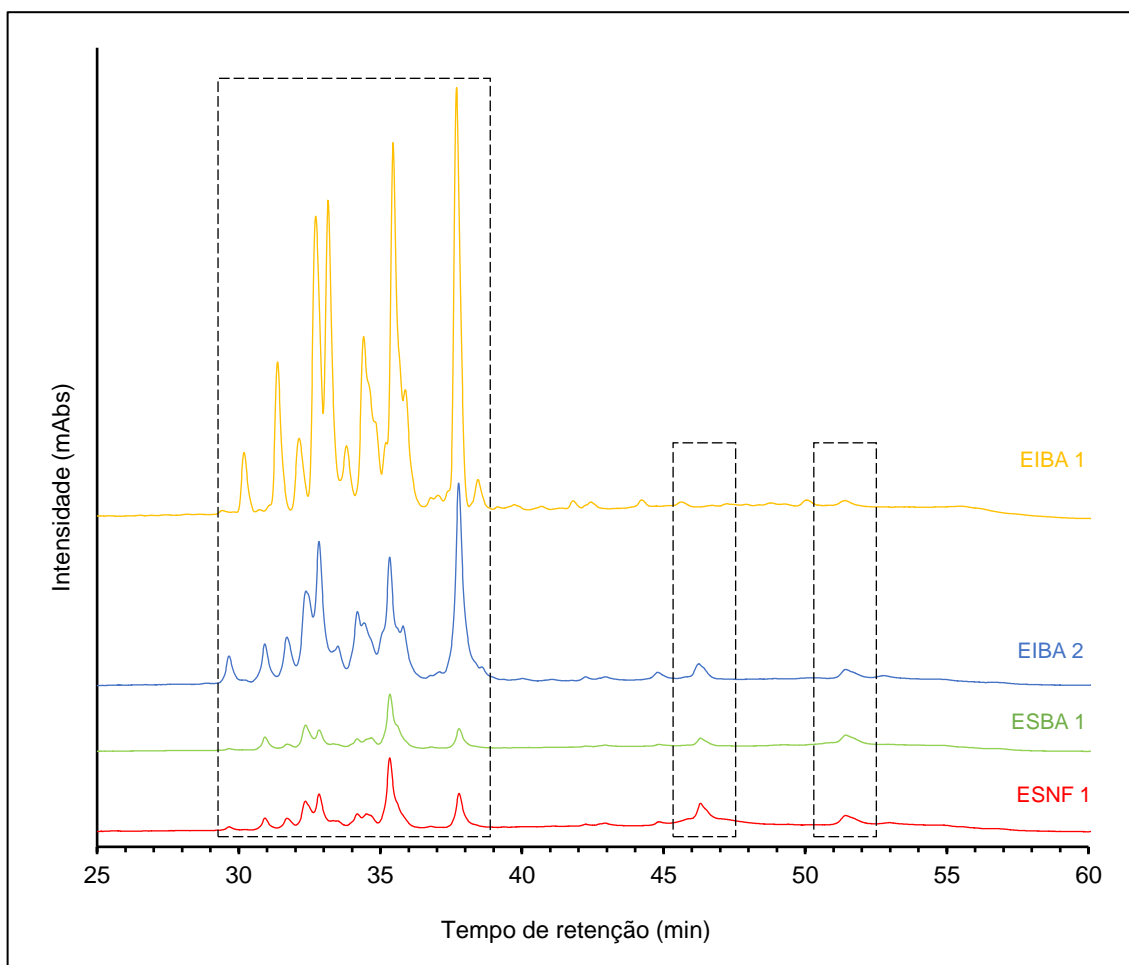


Figura 17: Cromatogramas CLAE-DAD de EIBA: extrato etanólico insolúvel Barretos, ESBA: extrato hidroetanólico solúvel Barretos e ESNF: extrato hidroetanólico solúvel N. Friburgo. As análises foram todas feitas nas mesmas condições operacionais e com os mesmos parâmetros gráficos. Condições de análise: item 5.8.

Ao comparar os quatro cromatogramas da Figura 17, percebe-se que há um enriquecimento de diterpenos na constituição do sólido insolúvel (EIBA) frente ao extrato etanólico solúvel (ESBA) (Figura 9, pag. 43) em cerca de 2,5 vezes. Assim, o procedimento que reduz para 1/10 o volume extrato etanólico inicial promove a seletividade para constituintes forbólicos no sólido insolúvel resultante.

Estes resultados em CLAE corroboram aqueles de CCD (item 6.3, pag. 59), ao aumentar a seletividade em relação aos diterpenos forbólicos, apontando um caminho

inicial para o isolamento destes a partir do látex de *E. umbellata*, a despeito da perda no rendimento em comparação com a liofilização ou a secagem do extrato etanólico a 80%. Por fim, convém enfatizar que as condições cromatográficas desenvolvidas para CLAE até o momento responderam satisfatoriamente para qualificar os *fingerprints* quanto ao conteúdo de diterpenos-alvo do trabalho, relacionados aos três processos testados para a abordagem extrativa do látex (Figura 9, pag. 43).

Além das análises por CCD, uma evidência adicional sobre os constituintes forbólicos nos perfis dos látices liofilizados adveio da injeção de três constituintes isolados do mesmo látex. Estes forbóis, com identidades preservadas sob códigos (Ph1, Ph2 e Ph3), foram isolados em outro subprojeto do grupo de pesquisa, que deu suporte à publicação de Valadão e colaboradores (2018). As respectivas retenções e correspondência de Ph1, Ph2 e Ph3 nos cromatogramas dos látices estão apontadas na seção 6.7.1 (pag.79), após os ensaios de separação entre triterpenos e diterpenos, com enriquecimento da fração em forboloides.

6.5 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

A adequabilidade da técnica de cromatografia gasosa para analisar o látex de *E. umbellata* foi avaliada de maneira qualitativa, considerando os resultados na separação e caracterização das diferentes classes de terpenoides.

O levantamento realizado (Quadro 4, pag. 30) revelou que são raras as publicações que descrevem análises por cromatografia gasosa especificamente aplicadas a matrizes similares de látices do gênero *Euphorbia*, ou ainda contendo substâncias forbólicas (VALADÃO *et al.*, 2018). Normalmente, as condições de separação encontradas na literatura, ou não foram otimizadas ou estão descritas de maneira incompleta (COSTA *et al.*, 2012), dificultando a reprodução e reduzindo o grau de confiabilidade quanto aos fragmentos-diagnósticos para a identificação dos componentes.

As condições de análise por CG foram inicialmente testadas com base naquelas desenvolvidas para triterpenos pentacíclicos contidos em matrizes resiníferas (SIANI *et al.*, 2012). O procedimento que utilizava coluna HP-5 (baixa polaridade) foi adaptado para o uso da coluna HP 17HT (polaridade média), mais adequada para temperaturas altas do que as normalmente usadas para analisar terpenoides (NEVES, 2018). Os principais parâmetros operacionais ajustados foram: a programação de temperatura e o fluxo do gás de arraste, com reflexo no tempo total da análise. As

amostras foram dissolvidas em CHCl_3 dada a capacidade deste solvente em dissolver todas as classes de terpenoides presentes no látex.

As condições selecionadas para as análises foram as mesmas utilizadas nas duas modalidades de detecção: por impacto de elétrons seguido de análise das massas dos fragmentos gerados (CG-EM) e por ionização de chama (CG-DIC), de maneira a permitir uma correlação entre os sinais gerados pelos dois detectores. Na prática, essas análises foram realizadas de maneira simultânea, de acordo com a disponibilidade dos equipamentos. Os resultados foram avaliados considerando-se a adequação dos perfis químicos em servirem de suporte a futuras análises quantitativas de terpenoides na matéria-prima e em seus produtos de transformação. Como critério fundamental, adotou-se uma separação satisfatória entre os sinais mais intensos do cromatograma.

Os primeiros experimentos de ajuste para o perfil terpenoídico foram executados com uma das amostras do látex liofilizado (LLBA1). Em seguida, a obtenção do perfil foi estendida ao material coletado em ambos os locais e em diferentes datas (Figura 18 para CG-DIC e Figura 19 para CG-EM). Todas as amostras analisadas tiveram o mesmo preparo e foram injetadas nas mesmas concentrações, o que permitiu comparar as respostas dos látices quanto à composição dos principais componentes.

O cromatograma do látex liofilizado (CG-DIC) permitiu assinalar 19 picos aparentes, cuja numeração está ilustrada para a amostra LLBA1. Esses sinais compreendem 75-87% da constituição total do látex, medidos pela soma de suas áreas relativas. Quando se consideram os 7 picos majoritários no cromatograma (circulados nas Figura 18 e Figura 19), o somatório das áreas corresponde a 50-66% dos constituintes.

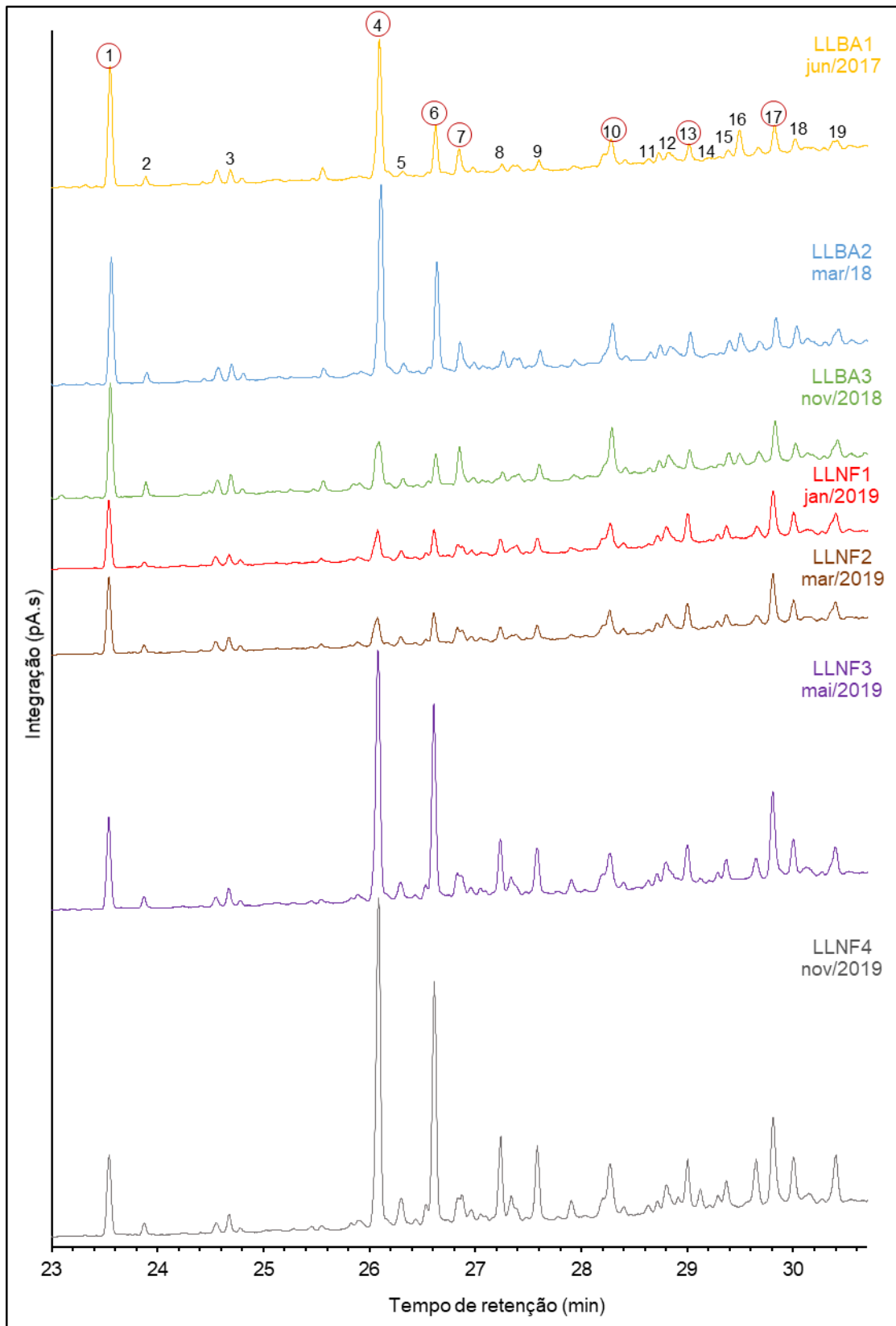


Figura 18: Cromatogramas expandidos de CG-DIC dos látices liofilizados, destacando os sinais mais relevantes. LLBA: Látices liofilizados de Barretos LLNF = Látices liofilizados de N. Friburgo. Condições de análise: ver item 5.10.

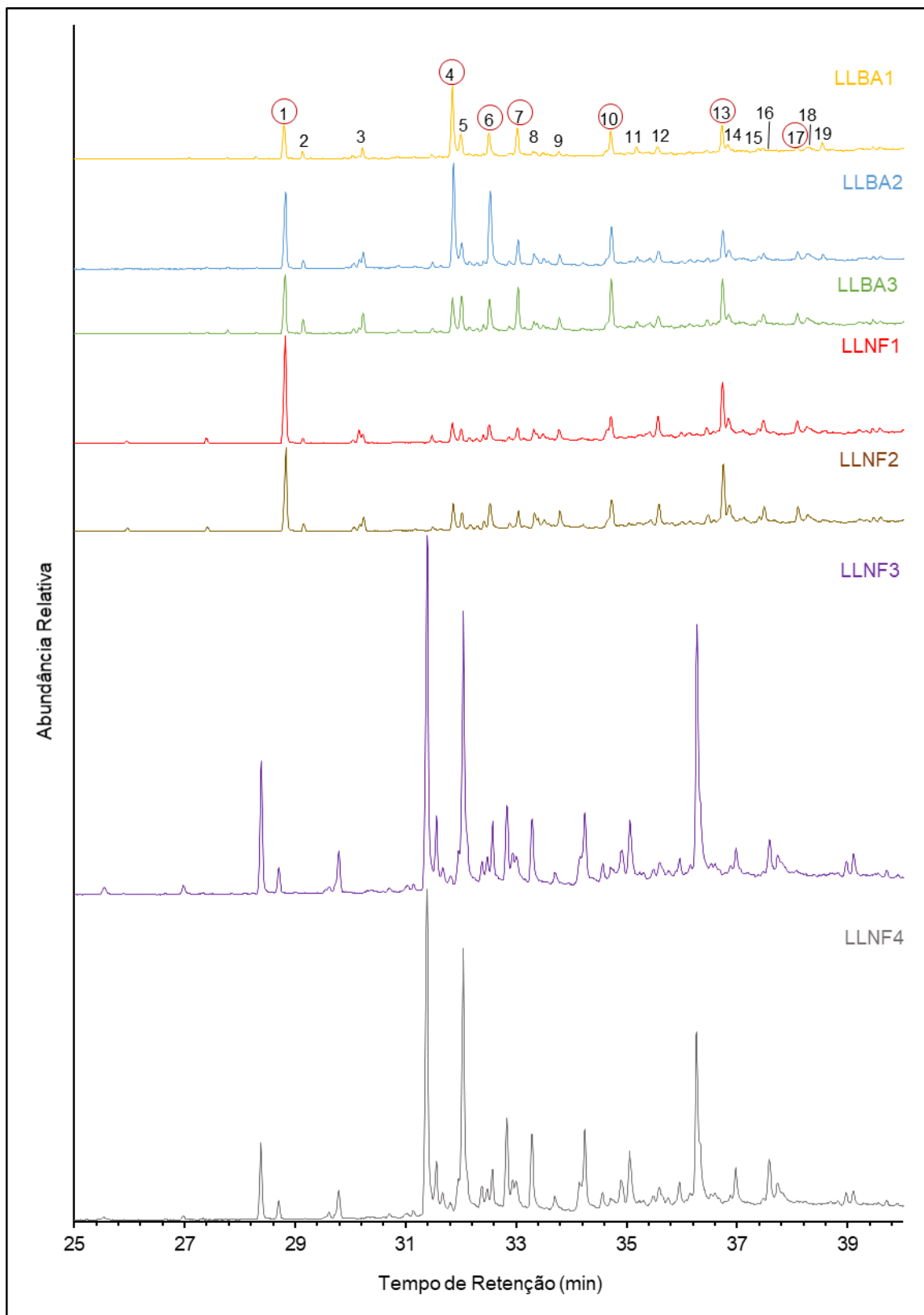


Figura 19: Cromatogramas expandidos de CG-EM dos látices liofilizados, destacando os sinais mais relevantes. LLBA: Látices liofilizados de Barretos LLNF = Látices liofilizados de N. Friburgo. Condições de análise: ver item 5.9.

Qualitativamente, há uma excelente similaridade de composição entre todas as amostras, independente de local e data de coleta. Algumas diferenças residem na

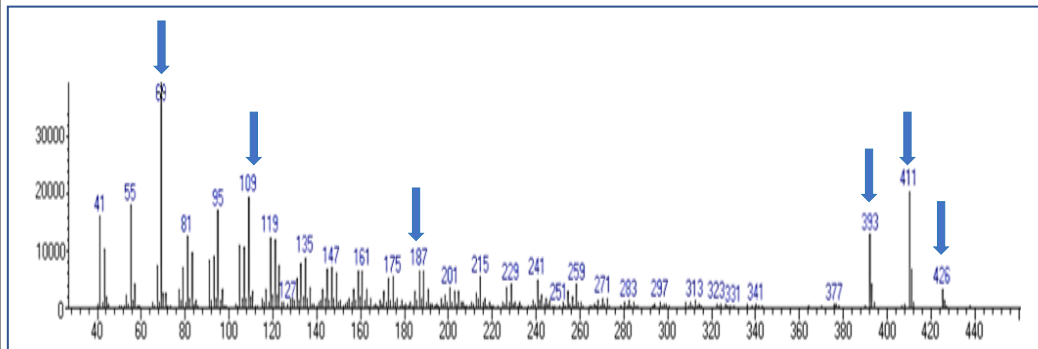
diminuição de intensidade dos picos 4, 6 e 7 em LLBA3 (nov/2018), LLNF1 (jan/2019) e LLNF2 (mar/2019). Nota-se uma grande intensidade de um sinal entre os picos 12 e 13 nos látices LLNF3 e LLNF4. Também é notória a maior intensidade do pico 17 em todas as amostras NF (6,3-10,4%), comparadas com BA (4,2-9,7%). Ainda, o pico 1 decresce nos cromatogramas de LLNF1 a LLNF4, considerando as relações entre os sinais em cada cromatograma; por exemplo, em LLBA1 e LLBA2, sua intensidade rivaliza com o pico 4, e mesmo ultrapassa os picos 4 e 6 em LLBA3.

A análise dos fragmentos nos espectros de massas (Figura 19) dos 19 picos forneceu diagnósticos sobre a natureza dos componentes, apontando a provável classe terpenoídica à qual pertencem (Tabela 4, pag. 75). Esta tarefa foi mais bem-sucedida para os sinais mais intensos. A caracterização dos constituintes minoritários mostrou-se dificultosa, devido à baixa pureza dos picos com área relativa abaixo de 3% resultando em fragmentações indefinidas (Tabela 4, pag. 75).

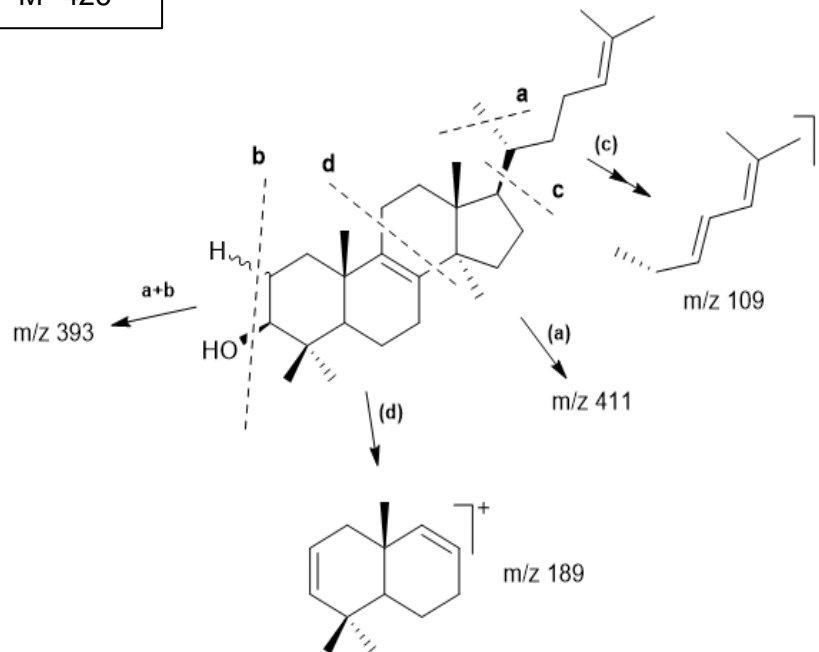
Considerando os cromatogramas em conjunto, os sinais mais intensos referem-se aos picos 1, 4 e 6. Os dois últimos correspondem aos triterpenos isoméricos eufol e lanosterol, que são descritos como os mais abundantes no látex de *E. umbellata* (OLIVEIRA *et al.*, 2013; MUNHOZ *et al.*, 2014), e possuem fragmentações idênticas. O íon molecular (M^+) = 426 ($C_{30}H_{50}O$) e os fragmentos mais comuns são m/z 411 ($M^+ - CH_3$), 393 ($M^+ - CH_3 - H_2O$), 189 ($C_{14}H_{21}$, anéis A e B da molécula). 109 (C_8H_3 , cadeia lateral), 69 (C_5H_9 , cadeia lateral) (MUCCINO; DJERASSI, 1974) (Figura 20).

A área do pico 1 variou entre 11,8-18% nos látices coletados em São Paulo (BA) e entre 4,7-13,6% nos látices coletados no Rio de Janeiro (NF). Essa substância foi a mais volátil entre os componentes terpenoídicos (menor tempo de retenção na coluna). Seu espectro de massas aponta uma estrutura que corresponde a um isoprenoide acíclico (DOUGLAS *et al.*, 1974). Os espectros de massas dessas moléculas são caracterizados por quebras intercaladas da cadeia carbônica, gerando fragmentos mais proeminentes separados por 28 unidades de massas. Este padrão de fragmentação ocorre em muitos derivados isoprenoides acíclicos, como por exemplo, a vitamina E (RAJESWARI *et al.*, 2012) (Figura 21).

PICOS 4 e 6



Lanosterol
 M^+ 426



MUCCINO & DJERASSI, 1974
NIST:

Figura 20: Fragmentação típica de triterpenos do tipo lanosterol/eufol.

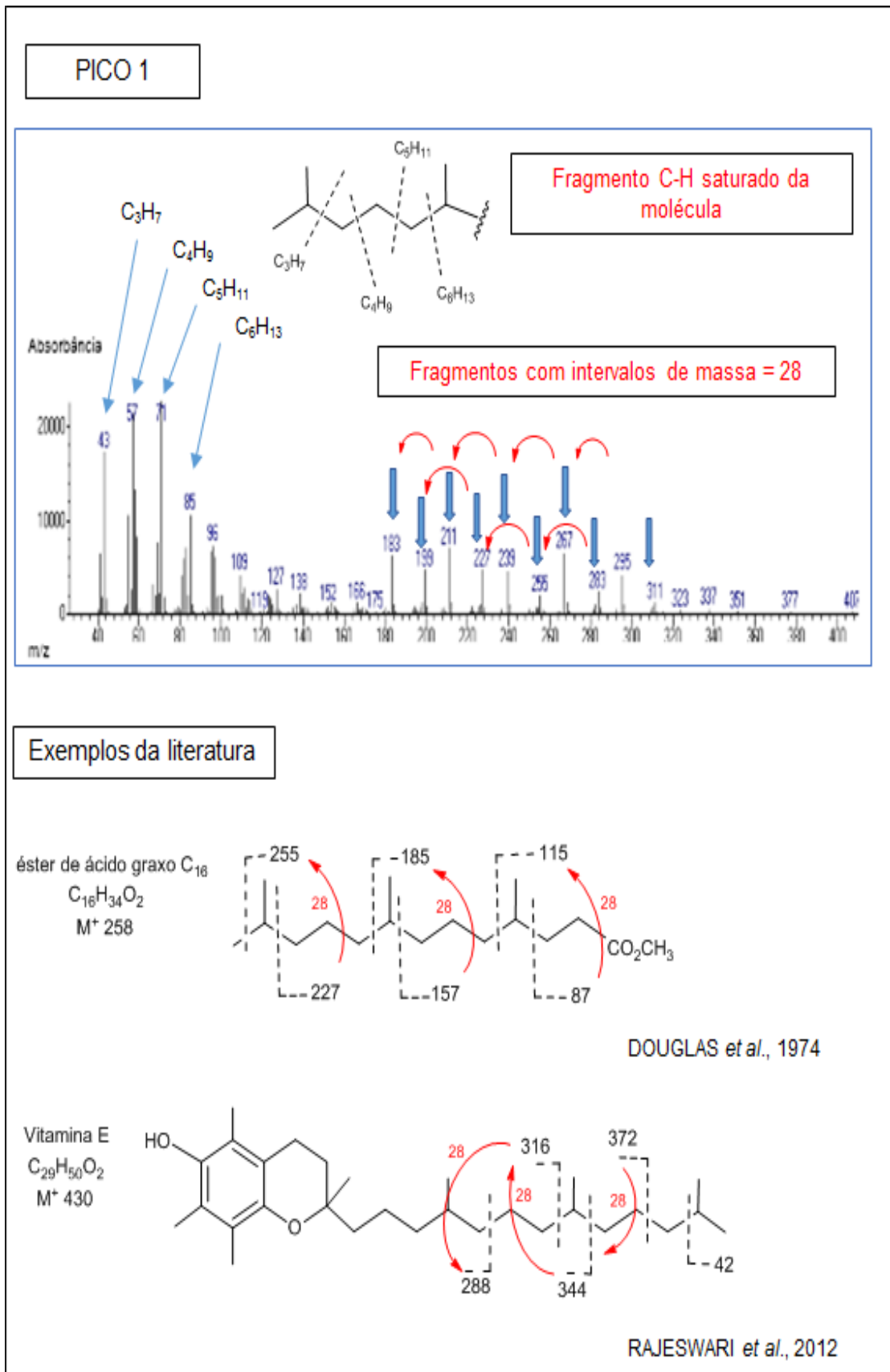


Figura 21: Fragmentação típica de substâncias isoprenoides com cadeia carbônica saturada.

Os isoprenoides acíclicos são substâncias intermediárias na biossíntese dos terpenos cíclicos como diterpenos e triterpenos. Dentro dessa hipótese, é provável que ocorra uma competição entre os mecanismos de acumulação entre estes. Uma avaliação rápida desta possibilidade foi testada comparando-se as áreas proporcionais do pico 1 com a soma das áreas dos picos 4 e 6. O resultado está mostrado no gráfico da Figura 22, para os diferentes lotes de látex.

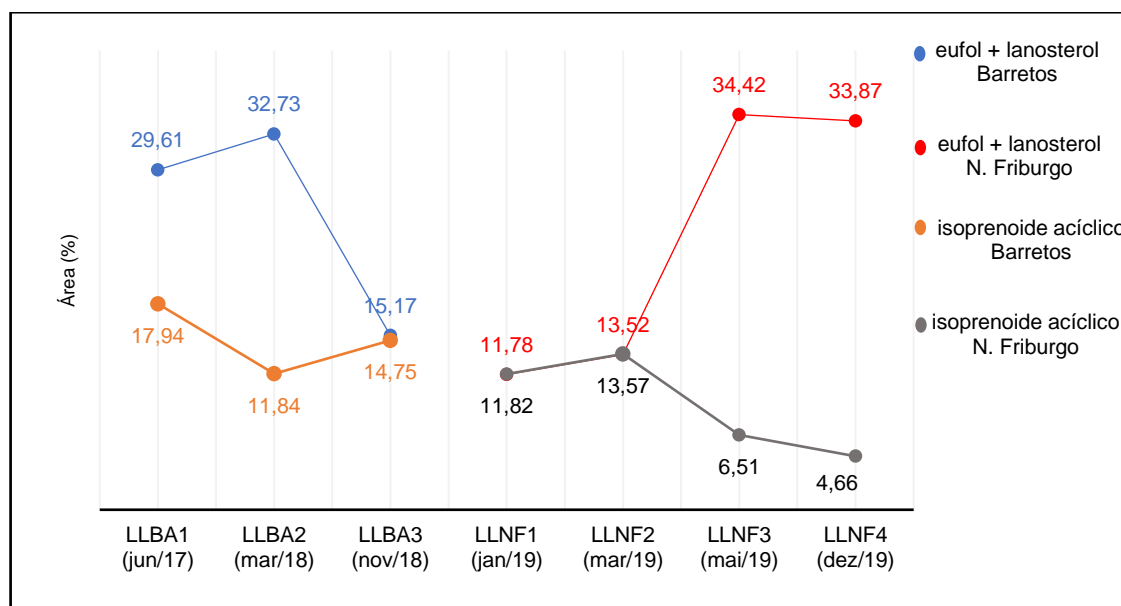


Figura 22: Comparação entre as áreas (%) dos referentes ao somatório dos sinais majoritários 4 e 6 (eufol + lanosterol) e 1 (isoprenoide acíclico) dos cromatogramas dos látices liofilizados. Condições de análise: ver item 5.10.

Embora a amostragem seja pequena, é interessante notar que há uma tendência oposta quanto ao acúmulo do isoprenoide 1 x triterpenos (4+6) nos látices LLBA. Isso também ocorre nas amostras LLNF, com ligeira exceção para duas delas (jan/19 e mar/19), onde as quantidades se equivalem.

A detecção de esteróides como o stigmasterol e β -sitosterol (estruturas tetracíclicas com 29 carbonos) por CG-EM foi reportada por Nielsen e colaboradores (1979) no látex de uma série de espécies de Euphorbiaceae, incluindo *E. umbellata* (*S. grantii*). No presente estudo, esses esteroides não foram detectados, ao menos entre os picos mais relevantes nos cromatogramas dos látices. Ainda, a injeção de uma mistura-padrão (resultado não mostrado) de β -sitosterol, stigmasterol e campesterol, intercalada nos lotes de análise por CG-EM do látex, produziu picos que não aparecem nos cromatogramas obtidos. Em geral, essas substâncias são mais

frequentemente descritas em outras partes da planta, como casca e folhas (DAWIDAR *et al.* 2011; KANUNFRE *et al.*, 2017).

Ao contrário dos triterpenoides, as fragmentações dos ésteres de forbol não produzem diagnósticos seguros que permitam sugerir a identificação estrutural. A causa disso é que a alta energia de ionização utilizada na análise por CG-EM desfavorece qualquer seletividade na fragmentação de moléculas dessa natureza, com ausência de íon molecular e alto nível de fragmentação. Este fenômeno já foi descrito em 1978 por Solomon e colaboradores, num estudo em que demonstrou a instabilidade dos fragmentos produzidos por uma série de éteres de 4 α -forbóis, quando ionizados em 70 eV (SOLOMON *et al.*, 1978). Alternativas para contornar a extrema labilidade dos forboloides e obter espectros de massas informativos envolveriam técnicas que utilizam ionizações com energias mais baixas, como a ionização química ou CLAE-EM.

O perfil cromatográfico da amostra LLBA1 foi comparado com os perfis dos extratos hidroetanólicos gerados conforme o esquema da Figura 9 (pag. 43) (solúvel ESBA1 e insolúvel EIBA1) (Figura 23, pag. 74), para verificar possíveis alterações de composição. Isso é importante porque, em alguns locais do Brasil, o uso popular tem acrescentado etanol como maneira de preservá-lo da proliferação de microrganismos.

Na Figura 23, pode-se notar que ambas as amostras correspondentes aos extratos são similares ao látex liofilizado. ESBA1 originou-se da parte solúvel do látex após a adição de EtOH:H₂O 8:2 e filtração. EIBA1 originou-se da redução do volume original do extrato hidroetanólico (contendo então proporção de EtOH bem abaixo dos 80% originais), seguido de filtração. Em ambos os casos, a adição de EtOH-H₂O ao látex produziu amostras mais uniformes, que resultaram em cromatogramas mais bem resolvidos e com sinais minoritários mais facilmente detectáveis.

Para ilustrar as diferenças entre os sinais dos extratos solúveis ESBA1 e ESNF1, as áreas relativas dos sinais destas duas amostras foram inseridas na Tabela 4 (pag. 75), permitindo compará-las com as áreas dos mesmos sinais nos respectivos látices bruto.

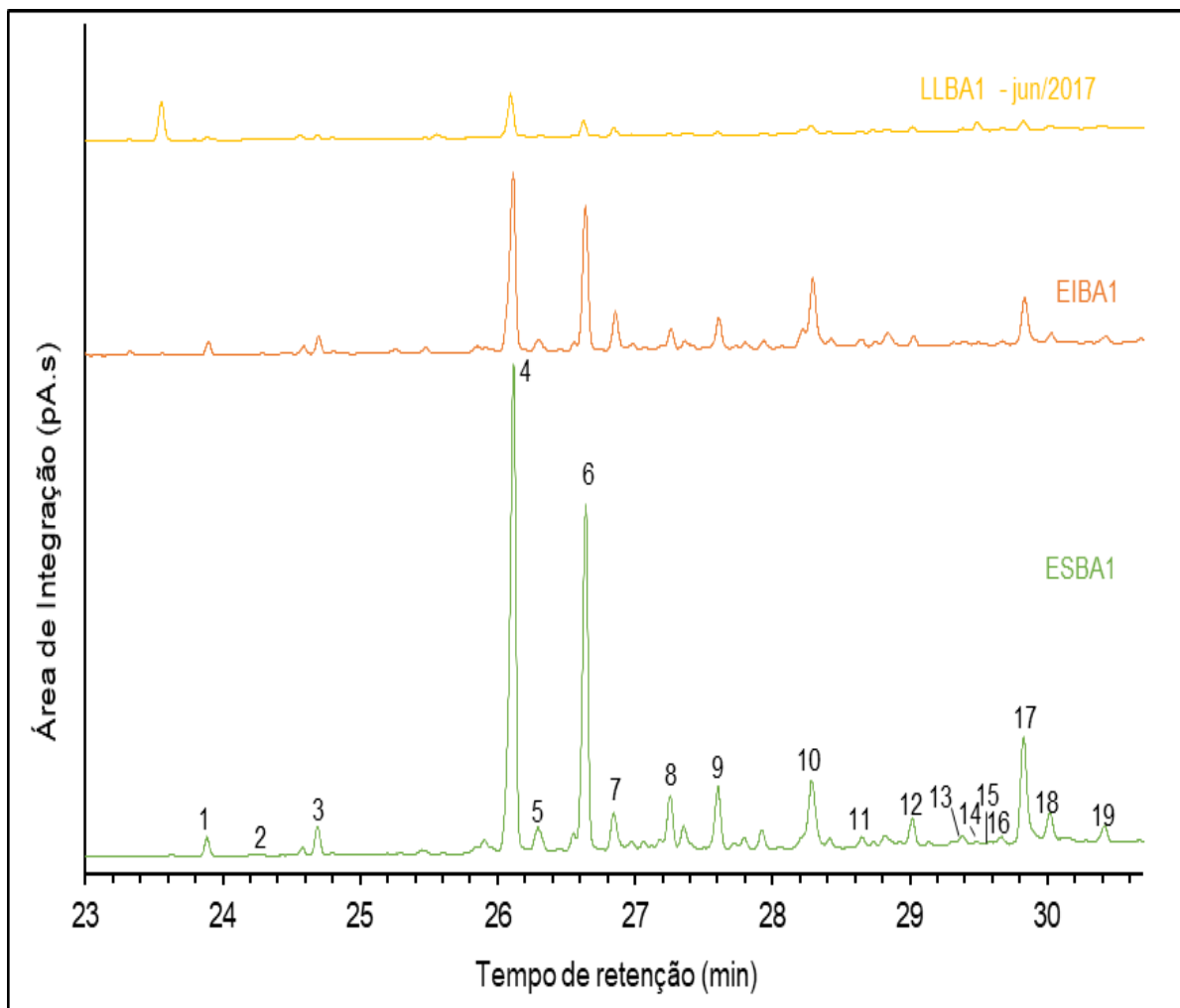


Figura 23: Cromatogramas expandidos de CG-DIC com LLBA1, ESBA1 e EIBA1. A numeração dos picos foi baseada nos cromatogramas de CG-EM das mesmas amostras (não mostrado).

É interessante notar que o sinal 1 dos cromatogramas das amostras liofilizadas virtualmente desaparece nos extratos hidroetanólicos, ou seja, é eliminado logo na primeira filtração da mistura. Isso é compatível com a menor solubilidade do isoprenoide acíclico na mistura EtOH-H₂O, em relação aos outros terpenoides da mistura. Como exemplo, as áreas dos picos 4 e 6 (eufol + lanosterol) aumentam 1,35x e 2,6x no ESBA1 comparados ao LLBA1; e 4,6x e 6,5x no ESNF1 comparado ao LLNF1. Já a tendência da maioria dos picos restantes (entre os 7 selecionados) é a diminuição de área nos extratos solúveis (Tabela 4).

Tabela 4: Fragmentações correspondentes aos sinais mais relevantes em CG-EM e CG-DIC dos látices liofilizados e extratos hidroetanólicos

Pico	t _R (min) CG-EM	t _R (min) CG-DIC	Área relativa do pico em CG-DIC (%)									Fragmentos principais	Sugestão de identidade ou classe terpenoidal
			LLBA1 jun/2017	LLBA2 mar/2018	LLBA3 nov/2018	LLN1F jan/2019	LLNF2 mar/2019	LLNF3 mai/2019	LLNF4 dez/2020	ESBA1	ESNF1		
1	28,804	23,553	17,94	11,84	14,75	11,82	13,57	6,51	4,66	0,11	0,16	450, 323, 295 , 267, 253, 239, 211, 199, 183 , 138, 109, 85, 71 , 57 , 43	Isoprenoide acíclico
2	29,140	23,888	1,19	0,94	1,61	---	1,33	0,77	0,60	0,92	0,21	415, 372, 313, 295, 279, 253 , 225, 207 , 193 , 149, 135 , 95, 71 , 43	Provável T
3	30,227	24,686	1,98	1,60	2,62	1,83	2,39	1,34	0,99	1,52	0,3	415, 397, 355, 313, 295, 253, 207 , 193 , 173, 149, 135, 121, 107, 85, 69, 57 , 43	Provável T
4	31,853	26,093	22,03	21,54	10,84	6,95	7,84	20,78	20,33	29,84	31,91	426, 411 , 393 , 311, 271, 241, 215, 187, 161, 135, 109, 69, 41	Eufol (*)
5	32,003	26,316	0,91	1,12	1,22	1,66	1,63	---	2,08	2,05	1,64	411, 393, 377 , 315, 281, 253 , 241, 195, 147, 135, 121, 109 , 91 , 69 , 55, 43	Indefinido
6	32,514	26,625	7,58	11,19	4,33	4,83	5,68	13,64	13,54	19,37	31,19	426, 411 , 393 , 311, 271, 241, 215, 189, 161, 135, 109 , 69 , 41	Lanosterol (*)
7	33,026	26,847	3,99	3,30	5,60	3,52	4,59	3,17	2,69	2,65	0,82	470, 451, 439, 377, 311, 281 , 253 , 209, 193 , 159, 147, 135 , 119, 105, 85 , 69 , 43	Provável E**
8	33,314	27,250	1,23	1,99	1,94	2,98	2,66	4,30	4,77	3,36	5,18	451, 439, 426, 377, 315, 253, 207 , 189 , 161, 147, 135 , 121, 109 , 93 , 81 , 69 , 55, 43	Provável T
9	33,777	27,600	2,17	2,48	3,26	3,63	2,66	3,92	4,60	3,86	4,5	451, 439, 411, 393, 377 , 315, 253 , 197 , 175 , 161, 147, 135 , 121, 107 , 95 , 81 , 69 , 55, 43	(T) Provável cicloartenol
10	34,717	28,284	6,89	6,74	9,23	7,84	7,63	5,37	5,37	5,97	3,57	451, 439, 409, 377, 315, 297, 279, 253 , 149, 135 , 109, 91 , 69, 43	Indefinido T/E (sinal largo, acetato?)

(continua)

(continuação)

11	35,186	28,654	---	0,73	---	---	---	0,49	0,50	0,61	0,95	468, 451, 411, 377, 315 , 253 , 197, 165, 135 , 109, 91 , 78, 55, 43	Indefinido T/E (acetato?)
12	35,564	28,819	2,83	2,56	3,84	2,29	5,68	3,58	2,40	1,01	0,63	426, 411 , 393, 377, 315, 259 , 241 , 197, 159, 135, 109, 107, 95 , 69 , 55, 43	(T) Provável fernenol (pentacíclico)
13	36,734	29,019	2,78	2,78	2,85	5,68	5,40	3,35	3,15	1,7	1,91	454, 415, 377, 315, 295 , 207, 253, 193 , 135, 119, 91 , 69, 43	Indefinido (provável di-hidróxi-T)
14	36,837	29,319	---	0,59	---	---	---	0,71	0,78	0,27	0,46	470, 456, 439, 411 , 393, 377, 315, 259 , 241, 197, 173, 147, 135 , 119, 107, 91 , 83, 69, 43	Provável acetato (T)
15	37,400	29,386	1,33	1,66	2,00	2,22	2,00	1,64	1,74	0,7	0,2	468, 454, 439, 377, 331, 315, 269, 253, 197, 175, 159, 135 , 109, 91 , 69 , 43	Provável acetato (T)
16	37,487	29,493	4,45	2,73	1,94	---	---	---	---	0,23	0,34	440, 425 , 377 , 329 , 315, 253 , 197, 175, 149, 135 , 121, 105, 91 , 69 , 57, 43	Provável acetato (T)
17	38,098	29,824	4,78	4,20	6,69	9,69	10,40	7,65	6,32	7,89	2,53	440, 425, 439 , 427, 405, 377 , 315 , 287, 253 , 227, 197 , 161, 135, 91	T pentacíclico
18	38,276	30,020	2,19	2,75	2,87	4,75	4,56	3,17	3,25	3,05	2,13	470, 455, 439, 405, 377, 331, 315, 253 , 197, 135, 107 , 91 , 69 , 57, 43	Provável acetato ou di-hidroxi-T
19	38,548	30,413	2,49	2,64	3,59	5,51	5,11	2,65	3,09	1,16	0,4	470, 455, 439, 377 , 346, 315 , 285, 253 , 219, 189, 135	Provável acetato ou di-hidroxi-T

(*) Adotou-se a ordem de eluição para eufol e lanosterol, descrita na literatura, em colunas menos polares do que a empregada neste estudo. (**) Possui mesmo tempo de retenção e alguns fragmentos em comum com o estigmasterol (injeção não mostrada). Fonte: Elaboração própria (2020). Referências utilizadas: KNIGHTS, 1967; DOUGLAS *et al.*, 1971; NIELSEN *et al.*, 1979; EVANS; TAYLOR, 1983; DAWIDAR *et al.*, 2011; COSTA, 2012; GIARDINI, 2012; RAJESWARI *et al.*, 2013, BASE PUBCHEM, 2020.

6.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ANÁLISES POR CCD, CLAE E CG

Conforme já observado por Evans (1983), a maior parte dos problemas associados com a purificação de grandes quantidades (gramas ou miligramas) de derivados forboloides concernem à natureza tóxica, à instabilidade durante a purificação, e à baixa qualidade na separação pelos métodos convencionais. Dada a alta complexidade da composição do látex de *E. umbellata*, houve sempre o cuidado de manter o rigor na preparação das amostras a serem analisadas por CCD, CLAE e CG, dentro do propósito de uniformizar ao máximo os procedimentos e construir uma base para comparar diretamente os resultados, ainda de maneira qualitativa. Tratando-se de uma mistura de substâncias de polaridades distintas, o preparo de amostras para analisar o conteúdo terpênico seguiu um roteiro uniformizado, buscando diminuir os riscos de análise associados às manipulações.

A preparação das amostras em cada técnica empregada está detalhada na seção de Material e Métodos (item 5), com a diluição em CHCl_3 (2 ou 5 mg/mL, 10 μL em cada ponto de aplicação) para CCD; em MeOH (2,5 mg/mL, injeção de 10 μL) para CLAE-DAD; e em CHCl_3 ou MeOH (2 ou 5 mg/mL, injeção de 1,0 μl) para CG. Nos dois últimos casos, antes da injeção, as amostras foram filtradas em cartucho de PVDF 0,22. Os solventes utilizados foram aqueles que sabidamente dissolveriam os componentes-alvo nas concentrações utilizadas. Para as análises por CLAE, a solubilidade do látex liofilizado de *E. umbellata* foi previamente testada em MeOH, CH_3CN e H_2O (10 seg em vórtex seguido de 5 min ultrassom).

Além da comparação entre os perfis cromatográficos dos variados lotes de látex de *E. umbellata*, o conjunto de procedimentos permitiu também apontar algumas vantagens e limitações das técnicas de CLAE e CG, aplicadas ao conteúdo terpênico das amostras.

Uma análise mais imediata dos cromatogramas por CG-EM evidencia a conveniência desta técnica para analisar os triterpenos e seus precursores isoprenoides, que são os constituintes majoritários nos látices liofilizado de *E. umbellata*. Contudo, esses cromatogramas apresentaram, via de regra, sinais com baixo grau de pureza, fato obviamente agravado nos picos minoritários. Esta condição refletiu diretamente na baixa qualidade dos espectros de massas que, com poucas exceções, foram de difícil reconhecimento pela espectroteca (Tabela 4, pag. 75). Já os constituintes forbólicos, por outro lado, foram impossíveis de caracterizar nos

cromatogramas das amostras liofilizadas, pois além da baixa pureza dos sinais, ocorre uma intensa fragmentação dessas moléculas na energia de 70 eV (SOLOMON, 1978).

Por sua vez, as condições estabelecidas para a CLAE-DAD permitiram obter um perfil trabalhável dos látices quanto ao conteúdo em diterpenos, mas as condições estabelecidas com esse foco não foram adequadas para analisar os triterpenos e possíveis esteróis. Qualitativamente, os cromatogramas mostraram excelente reprodução dos perfis apenas na região dos diterpenos. Adicionalmente, os terpenoides-alvo do trabalho possuem grupos cromóforos fracos e geram espectros de UV indiscerníveis entre si, prejudicando a caracterização dos componentes por este tipo de detecção.

Eventuais adequações das condições estabelecidas em ambas as técnicas para solucionar as restrições referidas acima envolveriam ensaiar (i) novas condições em CLAE, que permitissem analisar ao mesmo tempo os triterpenos e diterpenos; e (ii) promover um tratamento das amostras (*clean up*) para 'eliminar' os triterpenos (ou boa parte deles), permitindo caracterizar adequadamente os forboloides minoritários.

Entendendo que, no atual estágio, a técnica de CG é a que possibilita caracterizar o maior número de constituintes individuais do látex, optou-se por prosseguir o estudo, adotando a abordagem do *clean up* e ensaiando uma separação inicial entre triterpenos e diterpenos. Um procedimento factível e ágil para esta separação apontaria uma base para desenvolvimento de métodos independentes – e ao mesmo tempo complementares – para analisar separadamente cada grupo de terpenoides. Nessa perspectiva, seriam estabelecidos um método em CLAE para os diterpenoides e em CG para os triterpenos. O desenvolvimento do método para cada caso incluiria, então, o procedimento de separação inicial entre as classes de terpenoides, o que também exigiria ensaios de otimização.

6.7 SEPARAÇÃO DOS ÉSTERES DITERPÊNICOS X TRITERPENOS E ESTEROIDES

Com o objetivo de caracterizar os grupos de substâncias e delinear um caminho para o enriquecimento de frações em classes similares de terpenoides, foram testados dois métodos.

a) Extração em Fase Sólida (EFS): Este experimento teve como base os resultados obtidos em CCD em fase reversa, com uso de CH₃CN puro, onde se visualizou uma separação eficiente entre forboloides (eluição mais rápida, maiores

RFs) e triterpenoides (eluição mais lenta, menores RFs) do látex de *E. umbellata* (ver Figura 12-B).

b) Partição por solubilidade: A partição foi inspirada nos cromatogramas do látex em CLAE, os quais indicam o início da eluição do conjunto dos forboloides na coluna C-18 com a proporção aproximada de 35% de água em CH₃CN. Daí esse experimento baseou-se na separação dos grupos pela solubilidade que apresentam na mistura dos solventes escolhidos.


6.7.1 Separação de forboloides x triterpenoides por extração em fase sólida

Primeiramente, foi ensaiada a separação com o extrato etanólico insolúvel (EIBA1), de mais fácil manuseio e aparência mais próxima de um pó, passando-se, em seguida, para o látex liofilizado (LLBA2). O experimento foi monitorado por CCD e incluiu sucessivos testes com aumento da carga inicial. O eluente inicial foi CH₃CN, seguido de CHCl₃ para retirar os triterpenos retidos. Foram realizados 4 e 8 experimentos com EIBA1 e LLBA2, respectivamente. Os detalhes estão resumidos na Tabela 5.

As frações que concentraram os diterpenos de interesse (F1 e F2) foram sempre reunidas por similaridade em CCD; contudo, foram coletadas e analisadas separadamente, em todos os testes, com vistas a observar a reprodutibilidade do processo durante os testes de aumento de carga. Isto de fato ocorre, como fica evidenciado pelos resultados obtidos com o aumento 200-400 mg com EIBA1, e de 400-1000 mg com LLBA2. Os rendimentos médios nas frações ricas em forboloides (F1+F2, eluição com CH₃CN puro) foram 32,9% (EIBA1) e 20,7% (LLBA2).

É importante destacar que o rendimento da fração de interesse (F1+F2) foi maior quando se utilizou o EIBA1 frente ao LLBA2, demonstrando que a utilização do extrato insolúvel é vantajosa quanto a esse aspecto. Para as frações ricas em triterpenos, eluídas com CHCl₃ e concentradas em F4, os rendimentos médios foram 34,0% a partir de EIBA1 e 42,3% a partir de LLBA2. Isso confirma que os triterpenos são constituintes majoritários no látex de *E. umbellata* (HASSAN *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MUNHOZ *et al.*, 2014).

Tabela 5: Aumento de carga utilizada e rendimento do Fracionamento por Extração em Fase Sólida (EFS).

Ensaio	Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)			Aparato utilizado**
			F1+F2*	F3	F4	
1	EIBA1	200,5 ^a	34,1%	1,3%	39,9%	
2	EIBA1	300,0 ^a	28,9%	2,8%	25,8%	
3	EIBA1	400,0 ^b	36,4%	1,4%	44,3%	
4	EIBA1	400,2 ^b	32,2%	2,1%	25,8%	
5	LLBA2	499,9 ^b	22%	7,4%	41,8%	
6	LLBA2	500,5 ^b	20,1%	7,2%	38,1%	
7	LLBA2	500,3 ^b	19,2%	7,7%	45,5%	
8	LLBA2	500,4 ^b	19,8%	7,8%	50,2%	
9	LLBA2	500,0 ^b	14,1%	10,4%	35,5%	
10	LLBA2	500,6 ^b	19,1%	10,4%	35,5%	
11	LLBA2	500,5 ^b	26,7%	10,4%	35,5%	
12	LLBA2	1000,3 ^b	24,8%	11,2%	56,4%	

*Fração de interesse. **Seringa de polipropileno, com capacidade de 60 mL (2,5 cm diâmetro interno), sílica 60 RP-18; volume de leito (VL) 15 mL Fracionamento: Eluente 1: CH₃CN (3 frações de 1 VL), eluente 2: CHCl₃ (1 fração de 1VL). ^a1mL, ^b5mL de CH₃CN para suspender a amostra aplicada.

A eficiência na separação dos forboloides também foi indicada pela análise, por CLAE-DAD, de frações representativas de F1+F2 (contendo os diterpenos) e de F4 (contendo os triterpenos) (Figura 24A). A Figura 24B mostra uma placa de CCD onde se aplicou uma das amostras de LLBA2 e as frações obtidas de sua separação. Estes dados revelam que a separação não foi completamente efetiva, restando traços de triterpenoides e diterpenoides na fração 3 (F3, baixo rendimento).

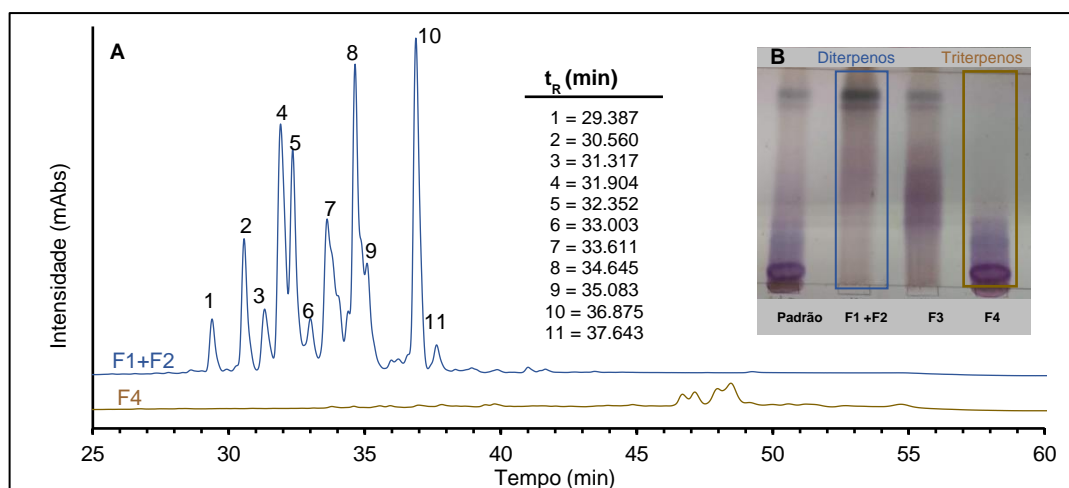


Figura 24: A: Cromatograma CLAE-DAD das frações ricas em diterpenos (F1+F2) e rica em triterpenos (F4), provenientes da EFS (Tabela 5). F3 não analisada (pouco rendimento). Condições de análise: ver item 5.8. B: CCD em RP-18 das frações recolhidas de EFS do lote de látex liofilizado. Padrão= Látex liofilizado (LLBA2), F1+F2: Fração rica em Diterpenos, F3: Mistura de diterpeno + triterpeno, F4: fração rica em triterpenos. Eluente: 100% CH₃CN. Concentração das amostras 5 mg/mL (10 µL aplicados em cada spot). Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico.

O cromatograma de F1+F2 na Figura 24A é quase totalmente dominado pelos sinais entre 29-39 minutos, na região estabelecida como característica para os ésteres

diterpênicos, nas condições de análise. O cromatograma correspondente a F4 complementa os dados da separação, mostrando a região dos triterpenos, refletindo, de maneira qualitativa, a eficiência do processo. O enriquecimento dos diterpenos pode ser constatado ao se compararem os resultados da Figura 24A com cromatogramas do látex íntegro liofilizado e do extrato hidroetanólico, quando houve um aumento aproximadamente 17 vezes e 7 vezes dos sinais da mesma região do cromatograma em LLBA2 (Figura 15) e EIBA1 (Figura 17) (item 6.4), respectivamente. Assim, o procedimento de EFS mostrou bom grau de eficiência na separação, com boa repetibilidade.

Além dos indicativos em CCD, a presença dos ésteres diterpênicos na fração enriquecida F1+F2 foi corroborada pela análise, nas mesmas condições de CLAE, de três ésteres de forbol isolados no laboratório (como atividade de um subprojeto que objetiva determinar marcadores químicos para o látex de *E. umbellata*). Os ésteres de forbol Ph1, Ph2 e Ph3 provieram da fração mais ativa no ensaio de interrupção da latência do HIV em células infectadas pelo vírus. Na Figura 25 estão apontados os sinais correspondentes aos três forboloides ativos, no perfil da fração F1+F2.

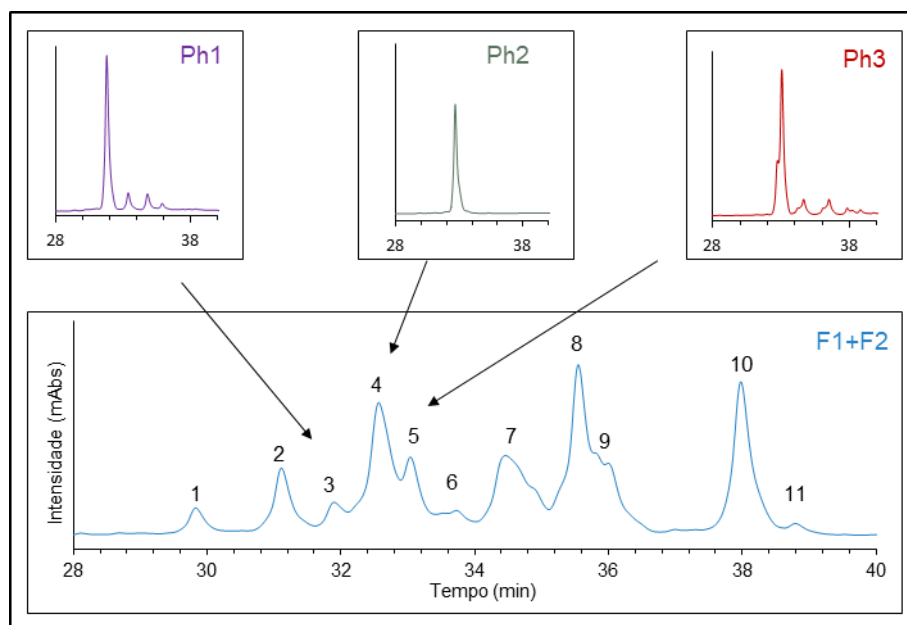


Figura 25: Cromatograma CLAE-DAD expandido de F1+F2, mostrando os sinais referentes a Ph1, Ph2 e Ph3. Estes foram cedidos pelo Dr. J. B. Tostes (Farmanguinhos/Fiocruz), e foram isolados e identificados como ésteres de forbol (resultados não mostrados).

6.7.1.1 Comparação dos perfis das frações separadas em CG

A efetividade da separação obtida entre os diterpenos e triterpenos, respectivamente, nas frações F1+F2 e F4, é evidenciado pela análise comparativa

dos cromatogramas em CG-DIC de ambos. Pode-se observar que, à exceção dos sinais com tR 26,0 e 28,3 min, praticamente não há sobreposições de sinais considerando ambos os cromatogramas (Figura 26).

Os espectros de massas associados a cada pico representam padrões de fragmentação que se repetem para cada classe de terpenoide a que correspondem. O conjunto obtido para os espectros dos triterpenoides apresentou fragmentos característicos bem definidos, com as clivagens moleculares esperadas (Figura 20, pag. 70).

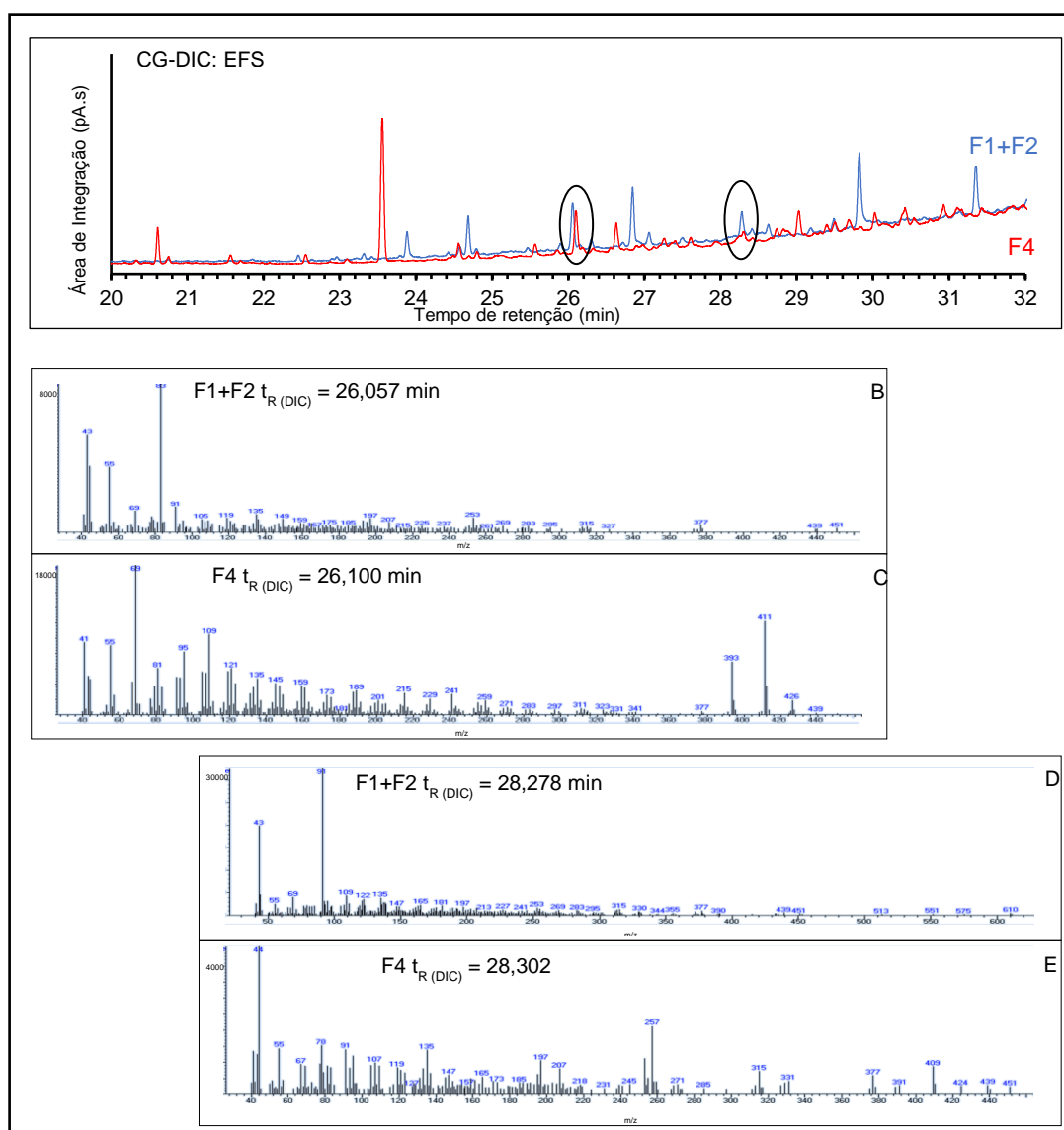


Figura 26: A = Cromatogramas obtidos por CG-DIC das frações F1+F2 e F4. Fragmentações por CG-EM: B = t_R: 31,397 de F1+F2 EFS, C = t_R: 31,363 de F4 EFS, D = t_R: 34,716 de F1+F2 EFS, E = t_R: 34,716 de F4 EFS.

Embora os picos com tempo de retenção próximos a 26 min e 28 min aparentam ser co-eluições, é possível caracterizá-los por intermédio dos fragmentogramas

produzidos por cada um nas análises por CG-EM de F1+F2 e F4 (cromatograma não mostrado). O espectro correspondente aos forboloides Figura 26B e Figura 26D apresentam uma intensa fragmentação, que é característica deste tipo de moléculas submetidas ao impacto de elétrons em 70 eV. A diferenciação de picos co-eluídos pelo espectro de massas reforça a eficiência da separação efetuada por EFS.

De maneira análoga àquela efetuada para CLAE, foi possível identificar no cromatograma em CG-DIC de F1+F2, o sinal do forbol isolado Ph1 (Figura 27), reforçando a utilidade da técnica de CG para aplicação em frações enriquecidas em ésteres de forbol, que são componentes minoritários no látex liofilizado.

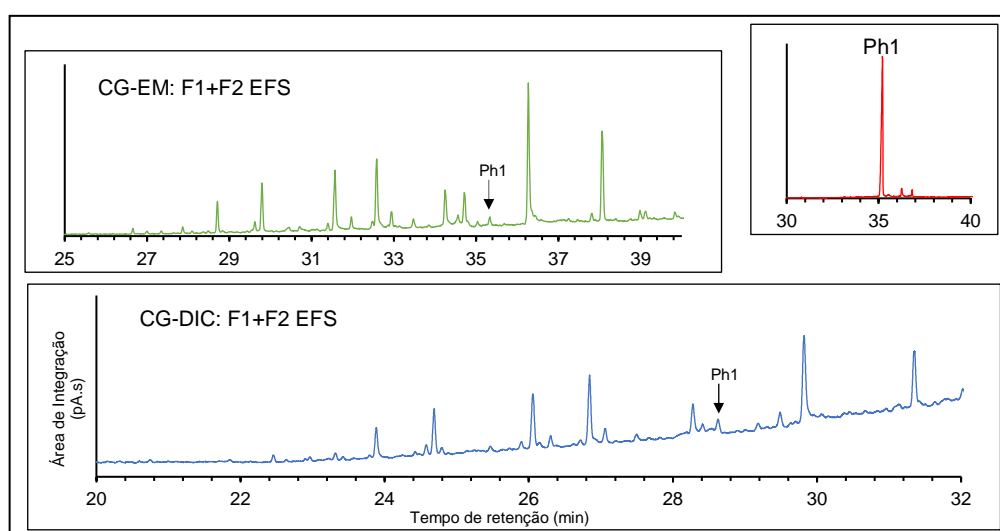


Figura 27: Ph1 foi cedido pelo Dr. J. B. Tostes (Farmanguinhos/Fiocruz). Foi isolado e identificado como éster de forbol (resultado não mostrado).

6.7.2 Separação de forboloides x triterpenoides por partição por solubilidade em mistura de solventes

Os forboloides eluem a partir de 30 minutos ($\approx 35\%$ de água em CH_3CN) nas condições cromatográficas utilizadas em CLAE. Os experimentos foram então planejados com misturas de água: CH_3CN nas seguintes proporções: 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 e 0:1. A relação entre sólidos (extrato) e solvente (RSS) também foi ensaiada em três proporções: 1:50, 1:100 e 1:200. Um resumo dos experimentos realizados está no esquema da Figura 28, que gerou a Fração Insolúvel (FI), pressuposta como concentrada em triterpenos; e a Fração Solúvel (FS), pressuposta como concentrada em diterpenos forboloides. Todos os experimentos utilizaram o lote liofilizado LLBA2, com os resultados sendo monitorados por CCD, CLAE-DAD e CG-DIC.

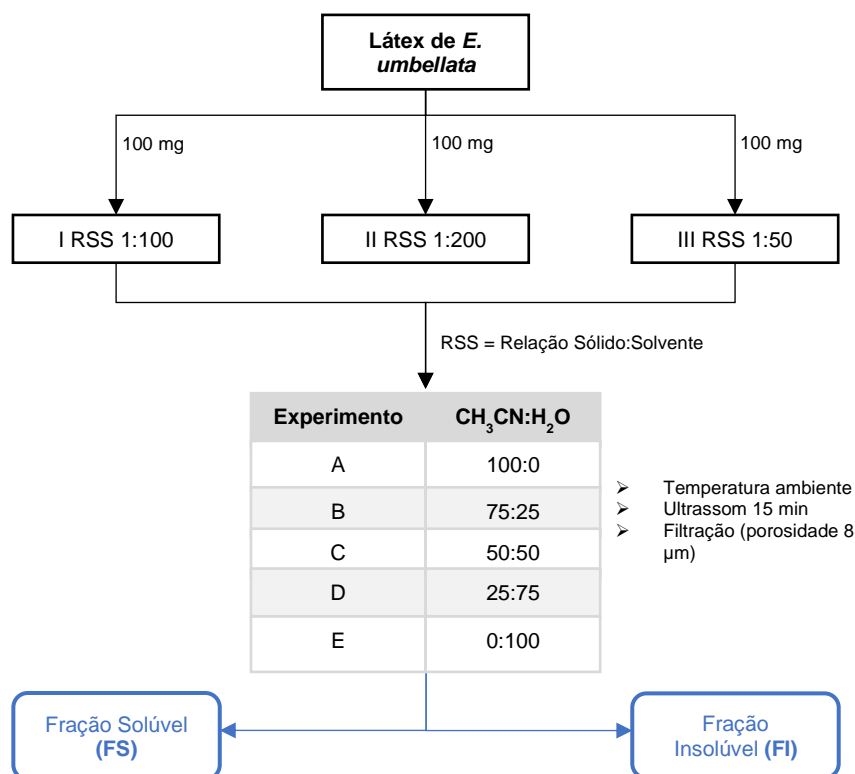


Figura 28: Resumo dos experimentos de separação entre forboloides x triterpenoides do látex de *E. umbellata* por partição entre H₂O e CH₃CN (experimental: item 5.6.1).

A cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 29), mostra os perfis obtidos em cada processo, após aplicação uniforme de 10 µL de solução de cada amostra a 5 mg/mL em CHCl₃.

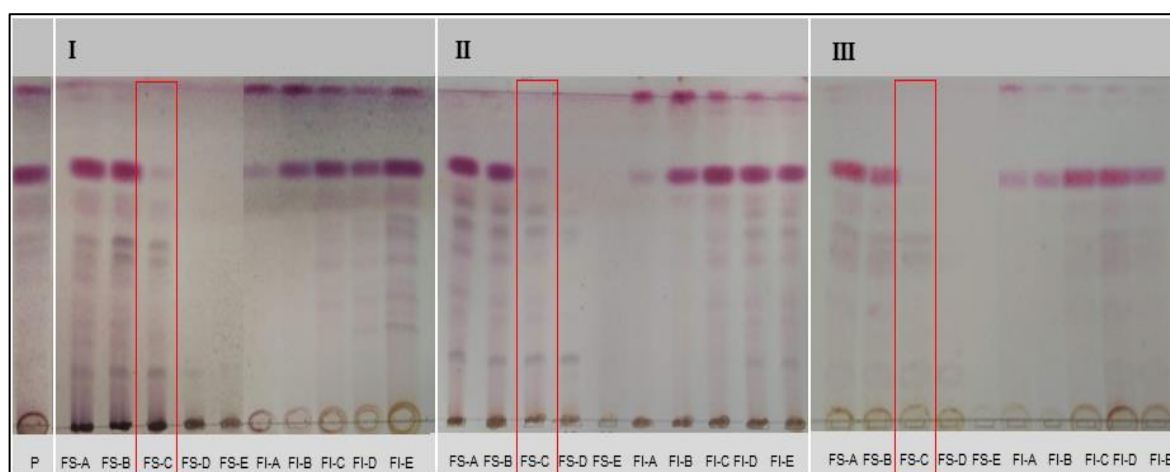


Figura 29: CCD em gel de sílica das frações recolhidas dos experimentos de partição em água-CH₃CN do lote de látex liofilizado LLBA2. FS = Frações solúveis. FI = Frações Insolúveis (FI) (detalhe das letras na Figura 28). P = Látex íntegro. Eluente: 5% de éter etílico em CHCl₃. Concentração das amostras 5 mg/mL (10 µL aplicados em cada spot). Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico.

A análise dos resultados concentrou-se na fração solúvel, que deveria ser enriquecida em forboloides, porém todas as medidas foram realizadas para ambas as frações.

Segundo indicativos de coloração dos sinais, as placas na Figura 29 mostraram que os experimentos do grupo C utilizando água:CH₃CN 1:1 foram os que resultaram na melhor separação entre triterpenos (maiores RFs) e diterpenos (menores RFs), utilizando como diagnóstico o desaparecimento dos sinais referentes aos triterpenos. Os rendimentos das frações originadas no grupo C foram 37,2% (FS-IC), 51,8% (FS-IIC) e 19,1% (FS-IIIC).

6.8 QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LÁTEX POR CG-DIC

Devido à precisão maior nas respostas cromatográficas até o momento, somada à maior disponibilidade de equipamentos, a técnica de CG-DIC foi selecionada para os testes de quantificação dos constituintes do látex, e das frações derivadas por EFS e por partição por solubilidade em mistura de solventes.

Para quantificar os constituintes nas frações enriquecidas, três métodos foram testados. O primeiro deles foi usar o colesterol como padrão de referência, como vinha sendo utilizado com sucesso em nossos laboratórios, para quantificar triterpenos em outras matrizes (NEVES, 2018). No entanto, a tentativa de utilizá-lo como padrão interno nas condições estabelecidas para a análise foi inviável, dada a coeluição com um importante sinal presente nos cromatogramas das amostras de látex e de suas frações. Ainda, o seu emprego como padrão externo mostrou-se inaplicável, pois houve inconsistência das respostas (áreas produzidas pelos sinais) com a curva de calibração construída (10-25 mg/mL), quando maiores concentrações de látex resultaram em menores teores de determinados constituintes.

O segundo método envolveu tentativas de isolamento de algum marcador químico de natureza forbólica, para ser usado como referência na quantificação dos outros constituintes, principalmente os diterpenos. Os testes realizados em coluna aberta, utilizando-se gel de sílica e eluição por gradiente de éter etílico, ou ainda acetona, em clorofórmio. As eluições foram baseadas nos resultados em CCD. Todavia, os experimentos mostraram-se morosos e de difícil reprodução, devido a um acentuado efeito de matriz, exercido principalmente pelo látex liofilizado, mas que também ocorreu com frações já enriquecidas em diterpenos; mesmo variando o eluente, com adição de n-hexano. Contornar essa ineficiência exigiria testes

adicionais, incluindo variação da fase cromatográfica e testes com outros eluentes. Cogitou-se também a utilização do 12-O-tetradecanoil-13-acetilforbol comercial, como marcador químico de referência; contudo, essa alternativa foi descartada por ora, devido ao seu alto preço.

O terceiro método se baseou na busca e aplicação de relação de áreas dos sinais dos constituintes do látex dentro de um intervalo linear. Assim, foram injetadas, amostras do látex e das frações obtidas na separação de forbóis x triterpenos pelos dois métodos (EFS e partição), em várias concentrações, com as áreas sendo mensuradas pela média de triplicatas de injeções. Observou-se que as respostas mantinham uma boa linearidade para o intervalo definido por 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 e 5,0 mg/mL. Nesse intervalo, a linearidade das respostas foi comprovada para 16 componentes mais relevantes no cromatograma do látex liofilizado (LLBA2).

Isso significa que o detector por ionização de chama (DIC) responde linearmente à concentração dos componentes do látex, com boa correlação, na faixa de trabalho abrangendo concentração de 20 a 50 mg de látex/10 mL CHCl₃ e um intervalo máximo de áreas entre 2,8 e 152 pA. Nestes limites, a concentração de um mesmo componente pode ser comparada linearmente entre diferentes amostras de látices, desde que mantida a faixa de trabalho. A Tabela 6 mostra os valores médios obtidos para a área de cada um dos 16 componentes para o intervalo entre 2 e 50 mg/mL de amostra.

Tabela 6: Evidência da linearidade para as correlações entre área do sinal x concentração da amostra, considerando-se 16 componentes do látex liofilizado de *E. umbellata*.

<i>Pico</i> t_R (min)	[amostra] (mg/10 mL CHCl ₃)				<i>Coefficiente de correlação</i>	
	20	30	40	50	na curva	incluindo zero
16,75	3,96	7,33	7,77	9,62	0,95318	0,98399
18,92	23,24	34,74	46,36	57,58	0,99997	0,99998
20,52	56,88	91,73	121,97	152,18	0,99936	0,99953
20,72	6,85	11,09	15,87	20,10	0,99969	0,99743
20,93	39,94	68,73	90,66	118,04	0,99877	0,99778
21,41	13,75	22,30	32,04	40,04	0,99936	0,99756
21,55	4,33	7,55	10,80	14,55	0,99928	0,99266
21,72	6,82	12,42	17,60	22,32	0,99929	0,99491
22,32	6,51	12,24	14,73	15,85	0,98850	0,99219
22,49	10,92	18,38	24,63	31,05	0,99918	0,99869
22,83	14,96	25,25	35,15	44,11	0,99951	0,99779
23,29	3,38	7,22	11,18	14,42	0,99908	0,98393
23,71	7,24	12,80	19,54	24,72	0,99880	0,99181
23,97	12,60	20,62	30,39	37,80	0,99872	0,99630
24,28	4,13	6,87	12,14	15,66	0,99335	0,98072
24,71	6,79	11,76	18,93	23,97	0,99726	0,98860

6.8.1 Quantificação dos constituintes forbólicos separados por extração em fase sólida e partição por solubilidade

Com base na linearidade demonstrada pela correlação área do pico x concentração da amostra, foram selecionados sete sinais comuns a ambas as amostras referentes a forboloides: aquela proveniente da separação por EFS (fração F1+F2) e a proveniente da separação por partição (fração solúvel), cujos $t_R = 19,4, 20,46, 21,13, 22,19, 22,53, 23,67$ e $24,84$ min. As áreas de integração fornecidas para cada um dos componentes estão comparadas na Figura 30.

Considerando todos os 7 sinais selecionados como forbóis-alvo, a seletividade na extração foi 4-5x maior pela técnica de EFS (solúveis em CH_3CN) do que na partição por solubilidade com $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (fração solúvel).

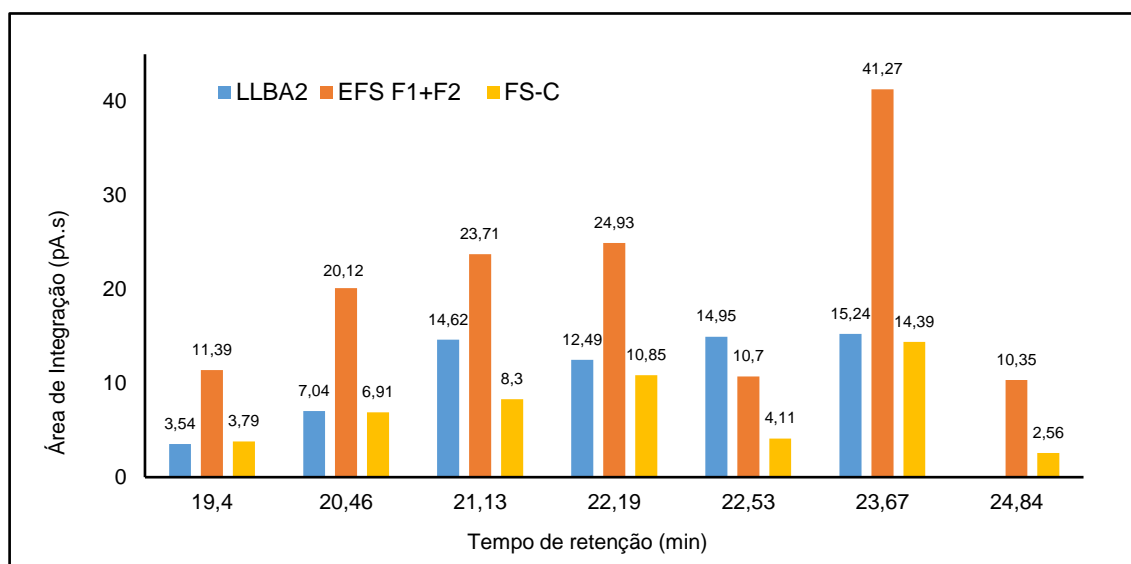


Figura 30: Comparação do enriquecimento de forbóis nas frações F1+F2 da EFS (eluída com CH_3CN , fase reversa) e FS-C: fração solúvel da partição por solubilidade ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1, RSS 1:100); LLBA2: Látex liofilizado de Barretos (material de partida de ambos os ensaios de separação). Por conveniência, as áreas precisas estão acima de cada barra.

A fração obtida na eluição com clorofórmio na EFS (posterior ao CH_3CN) (item 6.7.1), foi avaliada quanto à seletividade, considerando 11 sinais majoritários no cromatograma da CG-DIC. Houve enriquecimento de até 6x dos sinais que incluem os triterpenos (Figura 31). Dois desses constituintes resultaram menos abundantes após EFS do que na partição por solubilidade em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{água}$ (t_R 16,60 e 18,69 min).

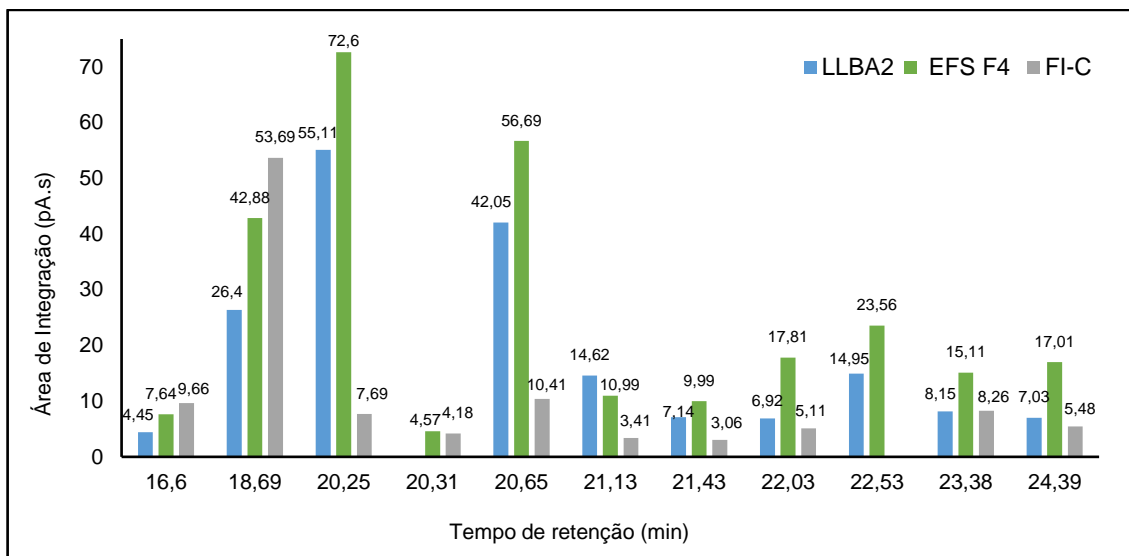


Figura 31: Comparação do enriquecimento de triterpenos na fração F4 da EFS (eluída com CHCl_3 , fase reversa) e FI-C: fração insolúvel da partição por solubilidade ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1, RSS 1:100); LLBA2: Látex liofilizado de Barretos (material de partida de ambos os ensaios de separação). Por conveniência, as áreas precisas estão acima de cada barra.

6.8.2 Considerações gerais sobre a separação diterpenos x triterpenos

As seções anteriores 6.3 a 6.8 trataram de (i) aplicação dos métodos cromatográficos na caracterização do látex de *E. umbellata*, (ii) ensaio de um primeiro processo de separação entre di- e triterpenos, e (iii) quantificação preliminar dos principais sinais das frações separadas de diterpenos e triterpenos do látex. Em conjunto, os testes realizados apontaram procedimentos que servirão de base para o acompanhamento de processos de separação entre classes de terpenoides, o isolamento de constituintes, e a padronização química do látex, no contexto de desenvolvimento de produtos.

O levantamento inicial da literatura sobre os métodos cromatográficos aplicados a látices de espécies de *Euphorbia* levou aos testes e adaptações dos procedimentos descritos na seção de Material e Métodos. Algumas ponderações sobre a conveniência das condições escolhidas em cada técnica utilizada estão apontadas como vantagens e desvantagens, resumidas na Tabela 7.

Tabela 7: Considerações sobre as técnicas testadas para análise do látex de *Euphorbia umbellata*

Técnica*	Condições utilizadas	Vantagens	Desvantagens*	Observações
CCD	Seção 6.3 (pag. 59)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rapidez de resposta quanto à presença dos constituintes de interesse ➤ Separações analíticas sugestivas de uso para separar forbois em escala preparativa 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ O melhor eluente (CHCl₃:Et₂O) testado não reproduz seus resultados em dias muito quentes ➤ Sinais referentes aos triterpenos não são resolvidos em sílica fase normal ou RP-18 	As colorações claramente distintas entre as classes de terpenoides reforçam as vantagens e dão suporte ao uso de CCD nos processos de desenvolvimento de produto
CLAE-DAD	Seção 6.4 (pag. 60)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparação da amostra relativamente ágil, apesar de sempre exigir filtração ➤ Os solventes da separação são rotineiros na técnica ➤ Região dos sinais de diterpenos no cromatograma com resolução e repetibilidade satisfatórias 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Caso de amostras muito insolúveis eluente selecionado ➤ Constituintes de interesse sem cromóforos apropriados para detecção UV ➤ Método não ajustado para análise de triterpenos, resultando em sinais dúbios para estas substâncias 	As desvantagens são, em muito, acarretadas pela extrema complexidade do látex, contendo substâncias com amplo intervalo de polaridade
CG-DIC	Seção 6.5 (pag. 65)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Separação satisfatória de sinais, conveniente para quantificações ➤ Respostas adequadas com injeções sem derivatização 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Não diferencia a natureza das moléculas que produzem os sinais; exige integração com resultados por CG-EM ou CLAE-MS 	Adequada para análise das frações terpenoídicas distintas e, em certa medida, para o látex íntegro (baixo grau de purezas de picos)
CG-EM	Seção 6.5 (pag. 65)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Idem ao CG-DIC ➤ Maior sensibilidade para o perfil complexo dos analitos ➤ Rapidez de análise 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Não adequada para quantificações ➤ Fragmentando demasiada em 70 eV, e dificultando a identificação dos forbois ➤ Baixa pureza de sinais no caso do látex íntegro 	Realizada nas mesmas condições que o CG-DIC, permite correlacionar os principais sinais obtidos nas duas técnicas, especialmente os triterpenos

*As condições de separação adaptadas em todas as técnicas sempre foram orientadas para a melhor resolução dos diterpenos forboloides.

6.9 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)

A espectroscopia no infravermelho (IV) foi realizada com amostras do látex liofilizado de Barretos (LLBA2) e de Nova Friburgo (LLNF1+2). O objetivo foi

estabelecer um parâmetro adicional de medida espectroscópica para contribuir na caracterização dessa matéria-prima.

Os espectros de ambas as amostras são idênticos (Figura 32). Em ambas as curvas são evidentes: (i) a banda larga centrada em 3300 cm^{-1} , característica da deformação axial de OH em ligação de hidrogênio; (ii) a banda composta entre 3025 e 2790 cm^{-1} , características de ligações carbono-hidrogênio (CH); (iii) a banda entre 1730 - 1740 cm^{-1} , característica da presença de grupos carboxílicos como em ésteres, aldeídos e cetonas; (iv) as bandas na região entre 1380 a 1005 cm^{-1} , de estiramento de ligações C-O em éteres, ésteres e ácidos carboxílicos. A banda forte em 1610 é característica do estiramento C-C em alcenos (SILVERSTEIN *et al.*, 1981).

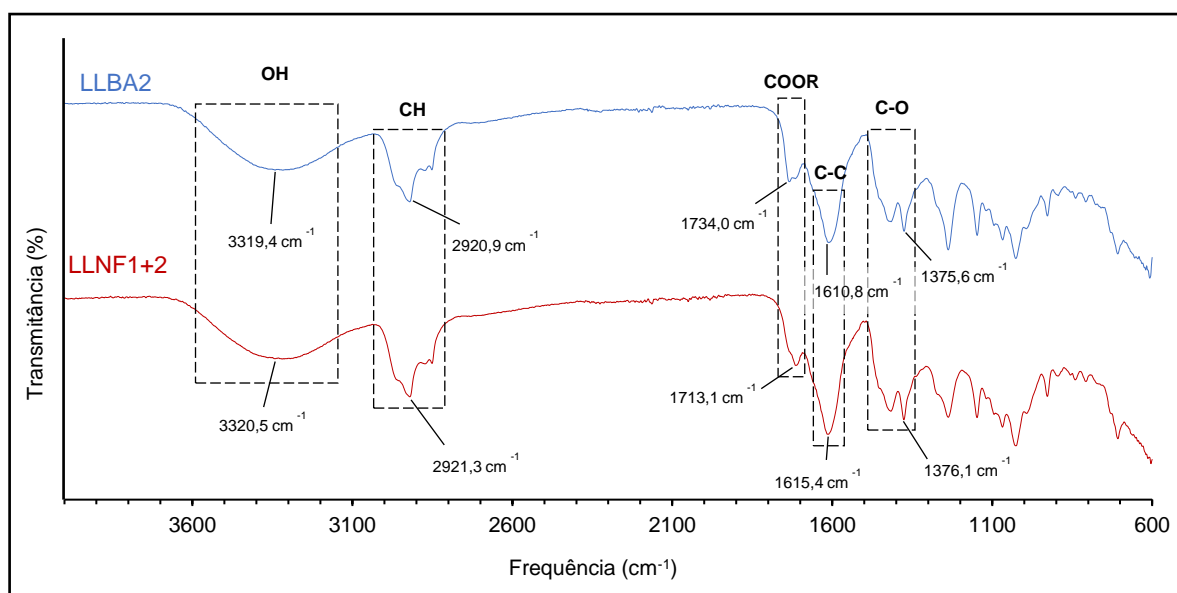


Figura 32: Espectro de infravermelho do látex liofilizado LLBA2 e do LLNF1+2. Em destaque bandas descritas no texto.

Todas essas bandas se justificam para os grupos funcionais contidos nas substâncias do látex, que são os ésteres de forbol (Figura 6, pag. 23) e a maioria dos triterpenos, estes últimos na forma de álcool secundário em sua maioria (OH em C-3, Figura 7, pag. 24). Essas bandas – normalmente com melhor resolução – são invariavelmente encontradas nos ésteres de forbol isolados, incluindo aqueles de *Euphorbia umbellata* (BAGAVATHI *et al.*, 1988; HASSAN *et al.*, 2012).

6.10 ESTUDO DE PROTEÍNAS PRESENTES NO LÁTEX DE *EUPHORBIA UMBELLATA*

Um aspecto importante no conhecimento da composição do látex de *Euphorbia umbellata* refere-se ao seu conteúdo em proteínas. Este estudo buscou caracterizar

as proteínas nos sobrenadantes do látex *in natura* e também no liofilizado. Para isso, foram utilizadas as amostras LBA2 (origem Barretos) e LNF3 (origem Nova Friburgo-RJ).

O método de Bradford foi utilizado para quantificar as proteínas totais presentes no látex. Neste ensaio foram construídas curvas utilizando albumina do soro bovino como proteína padrão, a qual foi diluída nas concentrações 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 mg/mL (seção 5.13.2). Essas diluições geraram uma curva de calibração com leitura em espectrofotômetro a 595 nm (Figura 33). Os pontos medidos resultaram em uma reta, cuja inclinação foi parâmetro para calcular o teor de proteínas totais no látex.

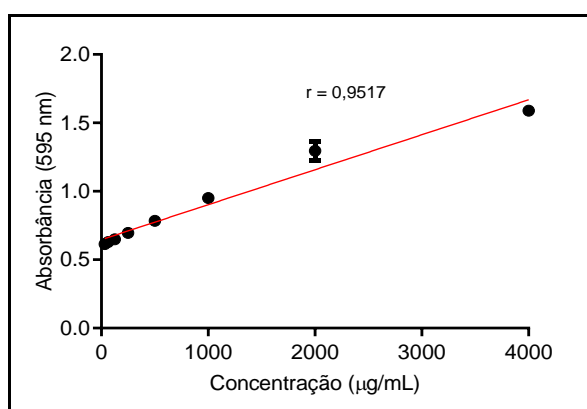


Figura 33: Curvas de calibração com a albumina de soro bovino (BSA).

A Tabela 8 mostra o teor de proteínas das amostras quantificadas pelo método de Bradford, que é utilizado para dosar proteínas de amostras complexas, visto que permite uma rápida quantificação, possui alta sensibilidade, e sofre pouca interferência de substâncias da amostra (GOLDRING, 2019).

Tabela 8: Quantificação de proteínas presentes no látex de *Euphorbia umbellata* através do método de Bradford.

Amostra	Teor de proteínas no sobrenadante (mg/mL)				
	Ensaio 1*	Ensaio 2*	Ensaio 3*	Média	Desvio padrão
SLBA	2,07	5,19	3,09	3,45	1,59
SLNF	3,21	6,54	4,01	4,59	1,74
SLLBA	**	**	**	**	**
SLLNF	**	**	**	**	**

SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo, SLLBA: Sobrenadante do látex liofilizado Barretos, SLLNF: Sobrenadante do látex liofilizado N. Friburgo.

* Média dos ensaios em triplicata. ** = Valores fora da curva de BSA.

Após centrifugação do soro SLNF, o sobrenadante apresentou cerca de 25% mais proteínas do que o SLBA, já que este resultou em um teor médio (três ensaios) de 3,45 mg/mL (Tabela 8). Um estudo anterior (MENON *et al.*, 2002) reporta o teor de proteínas no látex diluído de *E. umbellata* como 0,13 mg/mL, em uma amostra de látex coletado na Índia. Nesse mesmo estudo, os autores compararam a dosagem no látex diluído (20x) com aquela obtida após *salting out* com sulfato de amônio. Esta estratégia elevou o teor medido para 2,39 mg/mL, pelo método de Bradford.

Rajesh e colaboradores (2006) realizaram o doseamento pelo método de Lowry utilizando o látex diluído 3x em tampão fosfato (pH 7,0) e fervido (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando um látex coletado em Mysore (Índia). O resultado apresentou 100 mg de proteínas totais no látex diluído e 70 mg no látex que foi fervido. Os autores atribuem esta perda à coagulação observada durante a ebulição. Neste estudo não há a descrição do volume utilizado nos ensaios, o que impediu comparar os resultados com os de outros autores.

Em relação aos látex liofilizados do presente estudo, não foi possível detectar proteínas pelo método de Bradford. Isto pode estar relacionado à dificuldade de extração das proteínas, por solventes aquosos, a partir do material *in natura* liofilizado, apontando para um forte efeito de matriz. O látex apresentou grande dificuldade de solubilização, independentemente da solução empregada para a extração [tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0 (a); tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5 (b), ou água destilada (c)]. As leituras de absorbância demonstraram valores inferiores aos da curva padrão de BSA (Figura 33). Outros protocolos como a precipitação com sulfato de amônio, ou ainda, ferver o látex liofilizado, poderiam mostrar um resultado dentro da curva padrão de BSA (MENON *et al.*, 2002, RAJESH *et al.*, 2006). Contudo, a fervura da amostra foi evitada, para não comprometer sua função biológica.

Os látex são usualmente ricos em enzimas, especialmente de proteases, que representam estratégias de defesa das plantas (RAMOS *et al.*, 2019). Para verificar esta atividade enzimática, foram realizados ensaios utilizando um substrato peptidásico, o L-TAME, e substratos proteicos como BSA, caseína, gelatina e hemoglobina. Estas proteínas são usadas convencionalmente como substratos para estudar a atividade de endoproteases oriundas de amostras vegetais (SILVA-LÓPEZ, SIMONE, 2004).

Inicialmente foi avaliada a progressão da atividade dos soros (obtidos dos látices *in natura*) contra o substrato L-TAME durante o período reacional de 30 minutos, com

leitura de absorvância em 247 nm, de 5 em 5 minutos (Figura 34). Este tipo de ensaio é importante para avaliar a manutenção da atividade enzimática com o tempo, visto que sua não progressão é um sinal para a inatividade. É possível observar que as proteases de ambos os soros exibiram um aumento de absorvância ao longo do tempo de reação e, de maneira geral, as curvas apresentaram um comportamento ascendente demonstrando a capacidade das enzimas em clivar os substratos ensaiados, ou seja, são enzimas que preservaram seu poder de catálise.

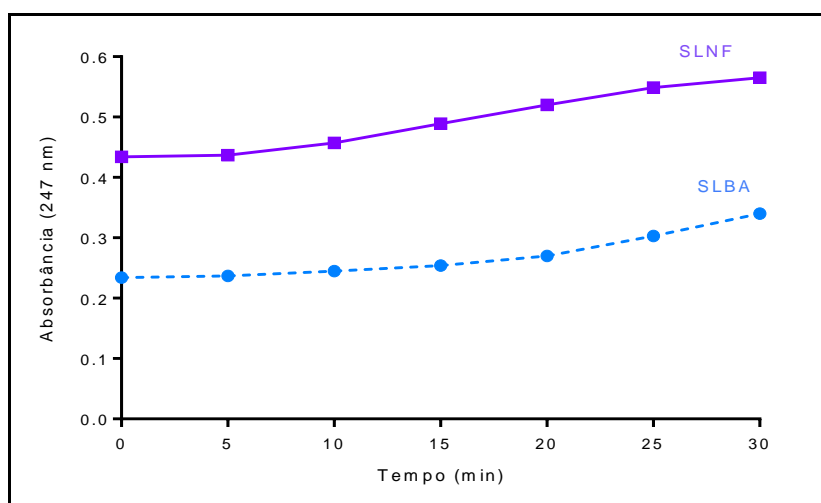


Figura 34: Avaliação da progressão da atividade peptidásica das proteases dos soros dos látex de *E. umbellata* usando L-TAME como substrato. SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo.

Analisando a Figura 34 nota-se que as proteases do SLNF são mais ativas no decorrer do tempo do que as do SLBA, visto que a absorvância apresentada pelo SLNF está na faixa de 0,434 a 0,565 nm, com variação de absorvância de 0,131, enquanto a do SLBA tem a faixa de 0,234 a 0,340 nm e variação de absorvância de 0,106 nm, indicando o aumento na formação de produto com o tempo, dentro do período considerado. Além disso, as proteases do soro SLNF apresentaram maior absorvância desde o início do ensaio.

A Figura 35 mostra a atividade das enzimas proteolíticas dos soros dos látex de *E. umbellata* e das proteínas extraídas dos soros liofilizados sobre substratos proteicos. É possível observar que SLBA apresentou a maior atividade sobre todas as proteínas ensaiadas, seguido por SLNF. Contudo, ambos os soros clivaram a BSA com atividades muito semelhantes. O SLBA apresentou maiores atividades sobre a gelatina (2,87 U) e a caseína (2,90 U), enquanto que as atividades sobre hemoglobina e BSA foram de 2,55 U e 2,68 U respectivamente. O SLNF exibiu melhor atividade

sobre a BSA (2,57 U), seguido da caseína com 2,08, gelatina com 1,87 U e de 1,83 U com a hemoglobina.

Considerando todos os substratos testados, nota-se que o SLBA não apresentou muita variação na atividade enzimática, permanecendo entre 2,55 - 2.90 U. O SLNF apresentou maior variação de atividade, dependendo do substrato utilizado (entre 1,83 e 2,57 U). Essa variação de atividade enzimática, a princípio, sugere a presença de diferentes enzimas em cada látex utilizado.

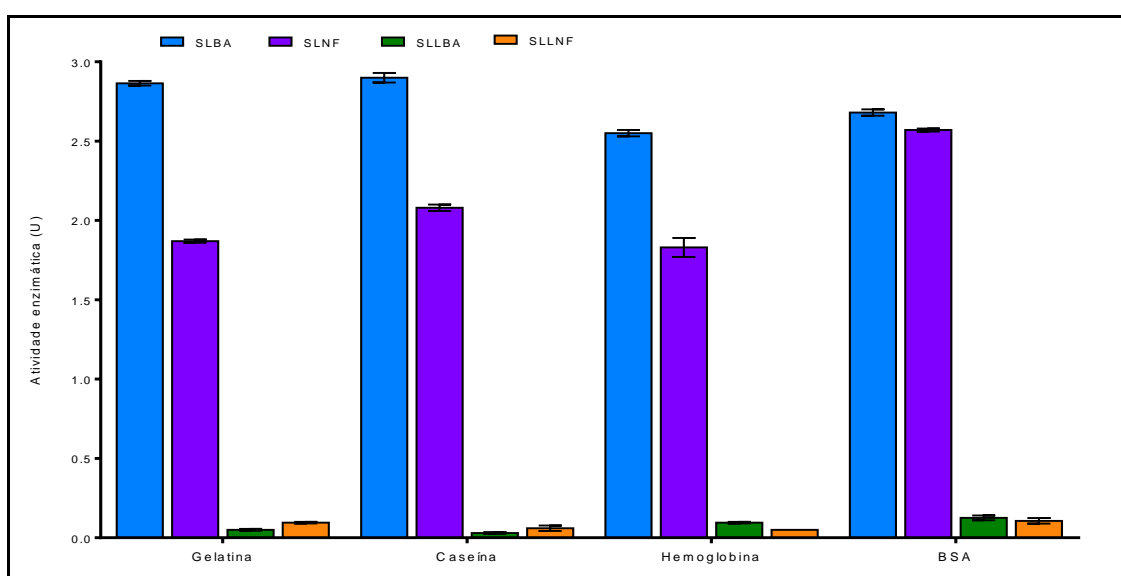


Figura 35: Atividade proteolítica do látex de *E. umbellata*. SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo, SLLBA: Sobrenadante do látex Liofilizado Barretos, SLLNF: Sobrenadante do látex Liofilizado N. Friburgo.

Em relação aos sobrenadantes dos látices liofilizados, a atividade foi muito abaixo do que aquela observada para os soros (< 0,2 U). Contudo, SLLNF apresentou um resultado melhor no ensaio com gelatina (0,10 U) e no ensaio com caseína (0,06 U). Já nos ensaios com hemoglobina e BSA, SLLNF exibiu menor atividade enzimática quando comparado com SLLBA. As atividades do SLLBA foram: para BSA (0,13 U), hemoglobina (0,10 U), caseína (0,03 U) e gelatina (0,05 U) (Figura 26).

A atividade do látex de *E. umbellata* com o substrato caseína foi relatada em estudos anteriores (MENON *et al.*, 2002, RAJESH *et al.*, 2006, MIHESH *et al.*, 2017, GOMES *et al.*, 2018), o que confirma a presença de enzimas com atividade caseinolítica. Todavia, não existem estudos usando gelatina, BSA ou hemoglobina como substratos. No geral, o presente estudo demonstrou atividades proteolíticas sobre todos os substratos testados, para ambas as amostras de látices de *E. umbellata* de distintas origens.

Também foram realizados ensaios para avaliar como a variação do pH interfere na atividade proteolítica. A influência do pH na atividade das enzimas fornece informações valiosas quanto à classe de proteases a que elas pertencem, visto que, cada uma delas atua em uma faixa exclusiva de pH, onde sua atividade enzimática é máxima (SILVA-LÓPEZ, 2010).

A Figura 36 exibe o resultado do efeito do pH sobre a atividade proteolítica dos soros dos látices de *E. umbellata*. As proteases presentes no SLBA exibiram expressivas elevações da atividade nos valores de pH 6,0; 7,5 e 9,0, que são valores de pH característicos das classes de cisteíno-, serino- e metaloproteases. Já para o SLNF os valores de pH de maiores atividades foram 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 10,0, sugerindo atividades peptidásicas ácidas, como no caso das proteases aspárticos e as cisteínoproteases; neutras, como é característico de serinoproteases; e alcalinas, como para serino e metaloproteases. Estes resultados convergem com outros estudos realizados com látices vegetais, como por exemplo, no estudo com látex de *Ficus racemosa* L., de onde foi isolada uma aspártico protease com faixa de pH 4,5 a 6,5 (DEVARAJ *et al.*, 2008). Ramos e colaboradores (2013) isolaram cisteínoproteases de espécies *Calotropis procera*, onde o pH manteve-se na faixa de 6,0 a 7,0.

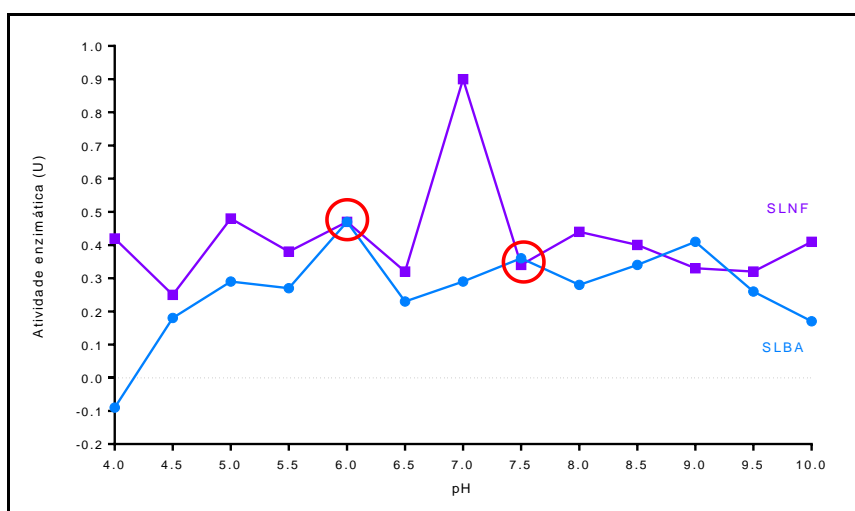


Figura 36: Influência do pH na atividade das proteases presentes nos soros dos látex de *E. umbellata*. SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo.

A Figura 36 traduz uma atividade mais expressiva no pH 7,0, sugerindo a presença/atividade majoritária de serinoproteases no SLNF. Ao contrário, no SLBA não foi possível atividade elevada em pH 7,0, o que pode estar relacionado à perda da atividade neste pH por uma degradação da amostra. A faixa de pH que sugere a presença de serinoproteases foi apresentada por outras espécies da mesma família

(Tabela 9) em estudos anteriores. Contudo, a presença de diversos picos de atividade nas diferentes faixas de pH sugere a existência de diferentes tipos proteases em ambas as amostras, ou seja, há uma heterogeneidade de proteases nos látex proveniente de locais distintos.

Os soros (dos látices *in natura*) apresentaram um comportamento diferenciado nos valores de pH estudados, mas algumas semelhanças foram preservadas. Em ambas as amostras, as atividades aumentaram em pH entre 5,0 a 10,0, apresentando a mesma atividade (0,470 U) em pH 6,0 e atividade muito próxima em pH 7,5 de (0,360 U para SLBA e 0,340 U para SLNF) (destacados na Figura 36). Essa ampla faixa de pH tem paralelo na literatura, que descreve valores de pH de 5,0; 7,0 e 10,0, sendo a atividade máxima no pH 7,0. (MENON *et al.*, 2002, MISHRA *et al.*, 2017). Este resultado é igual ao encontrado para o SLNF (Figura 36). A determinação do pH ótimo para atividade das enzimas foi necessária para avaliar as características cinéticas das proteases das amostras, contudo, a confirmação da classe das proteases é melhor estudada utilizando inibidores de proteases específicos.

O uso de inibidores específicos de proteases é uma estratégia comumente empregada para a caracterização das classes de uma enzima proteolítica, uma vez que estes interagem diretamente com os resíduos catalíticos do sítio ativo (SILVA-LÓPEZ, 2009). Diante disto, o estudo de inibição do látex de *E. umbellata* foi realizado contra inibidores específicos de metalo- (EDTA), serino- (benzamidina Bza), aspártico- (pepstatina) e cisteínoproteases (E-64), utilizando o soro dos látices SLBA e SLNF (Figura 37).

Ocorreu uma baixíssima inibição de 4,66% para o SLBA e 4,13% para o SLNF pelo inibidor específico de metaloprotease (EDTA). Estes valores podem indicar que estas proteases dos soros dos látex requerem algum íon metálico para promover a catálise ou, ainda, uma baixíssima ou nenhuma secreção de metaloproteases nestes látices. Estes resultados foram condizentes com o estudo realizado por Menon e colaboradores (2002), que também não encontraram inibição da atividade enzimática ao utilizar EDTA contra o látex de *E. umbellata*.

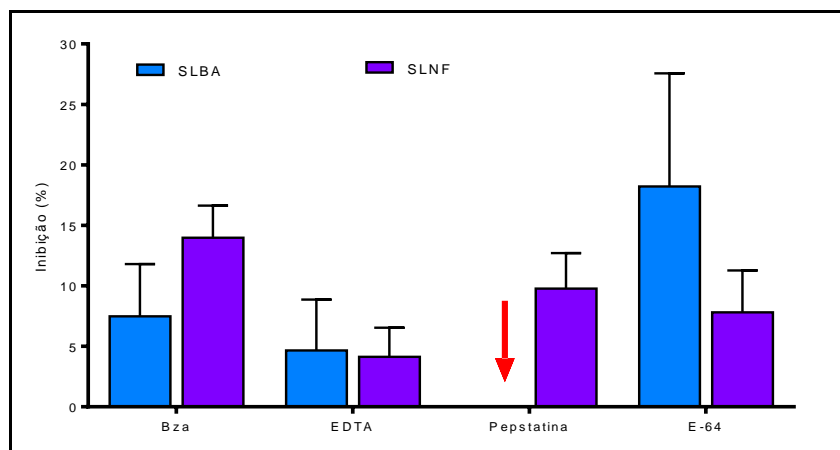


Figura 37: Influência de inibidores de proteases na atividade dos soros dos látexes de *E. umbellata*. SLBA: Soro do látex de Barretos, SLNF: Soro do látex de N. Friburgo, Bza: benzamidina; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; E-64: trans-2,3-epoxi-propil-leucilamido (4-guanidino)-butano. A seta vermelha indica ausência de inibidor de pepstatina.

Na presença da benzamidina (Bza) e de E-64, que são inibidores de serinoproteases e cisteínoproteases, respectivamente, as enzimas presentes no SLBA apresentaram inibição de 7,49% na presença de Bza e 18,22% na presença de E-64. O SLNF também apresentou inibição para Bza (13,97%) e E-64 (7,81%), sendo que a maior inibição para Bza indica a presença destas classes de proteases, ou seja, a presença de serino- e cisteínoproteases nos soros. Observações semelhantes foram feitas com relação à presença de serino proteases no látex de *E. umbellata* utilizando PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) (MENON *et al.*, 2002, RAJESH *et al.*, 2006). Tanto a Bza quanto o PMSF, utilizado nos estudos anteriores, são inibidores clássicos de serinoproteases em geral; ambos reagem com o resíduo de serino no sítio ativo da enzima, com Bza sendo mais específico para as tripsinas (RAWLINGS, BARRETT, 2014).

É importante ressaltar que SLNF foi mais inibido por Bza do que por E-64, e estes resultados estão em consonância com a curva de pH de SLNF que demonstrou pico em pH 7,0 típico das serinoproteases. O isolamento de serinoprotease foi descrito na literatura para diferentes espécies da família Euphorbiaceae, como: *E. tirucalli*, *H. brasiliensis*, *Elaeophobia drupifera*, dentre outras (Tabela 9). Contudo, não há descrições sobre a presença de cisteínoproteases na família Euphorbiaceae, mas sim espécies produtoras de látex de outras famílias botânicas (DOMSALLA, MELZING, 2008).

Adicionalmente, é possível observar uma diferença significativa ao analisar os resultados na presença de pepstatina, quando o SLBA foi capaz de preservar 100%

da sua atividade. Isso demonstra que tal inibidor não interferiu em sua atividade enzimática, sugerindo a ausência de proteases aspárticos no soro. Em contrapartida, a inibição de 9,78% apresentadas pelo SLNF sugere a presença deste tipo de proteínas no soro. Esta observação está consonante com a faixa de pH ótimo (Figura 36) apresentado para o soro, dada a elevação da atividade em meio ácido (pH 4,0), característica de proteases aspárticos.

6.10.1 Eletroforese

Ensaio de eletroforese utilizando gel de SDS-PAGE 12% foram realizados para estudar o perfil de proteínas e o potencial proteolítico do látex de *E. umbellata*. Utilizou-se o padrão eletroforético BIO-RAD, contendo proteínas em uma ampla faixa de massas moleculares (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa).

Como é se observa na Figura 38, os perfis de ambas as amostras são compostos por sinais muito semelhantes de bandas no gel. SLBA apresentou 11 bandas majoritárias, com aproximadamente 149, 94, 75, 48, 36, 30, 25, 16, 15, 14, 12 kDa. SLNF não apresentou a banda de 48 kDa, mas apresentou bandas com aproximadamente 11 e 10 kDa, além de 3 outras bandas com massas menores que 10 kDa. Portanto, os perfis são parecidos, mas não são idênticos. Além disso, a coloração de Coomassie revela apenas as proteínas majoritárias e as amostras possuem proteínas, mas o poder de resolução do método não é capaz de evidenciá-las. Estes perfis eletroforéticos podem explicar as semelhanças e diferenças da cinética das proteases das amostras derivadas dos látices, como mostrado nos resultados apresentados anteriormente (por exemplo: pH ótimo, inibição enzimática e atividade proteolítica).

Sobre as amostras dos liofilizados SLLBA e SLLNF, estas possuem menos proteínas, logo seus sinais são bem mais discretos. A edição da imagem foi necessária para melhorar a visualização na região dos sinais apresentados por essas amostras (Figura 38A). Observa-se o desaparecimento dos sinais no início do gel entre 250 e 37 kDa, indicando a ausência destas proteínas nas amostras. Nestas, restaram apenas 4 bandas, com aproximadamente 30, 25, 18, 14 kDa. De qualquer maneira, os sobrenadantes de ambas as amostras apresentaram perfis bastante parecidos, independente da origem do látex.

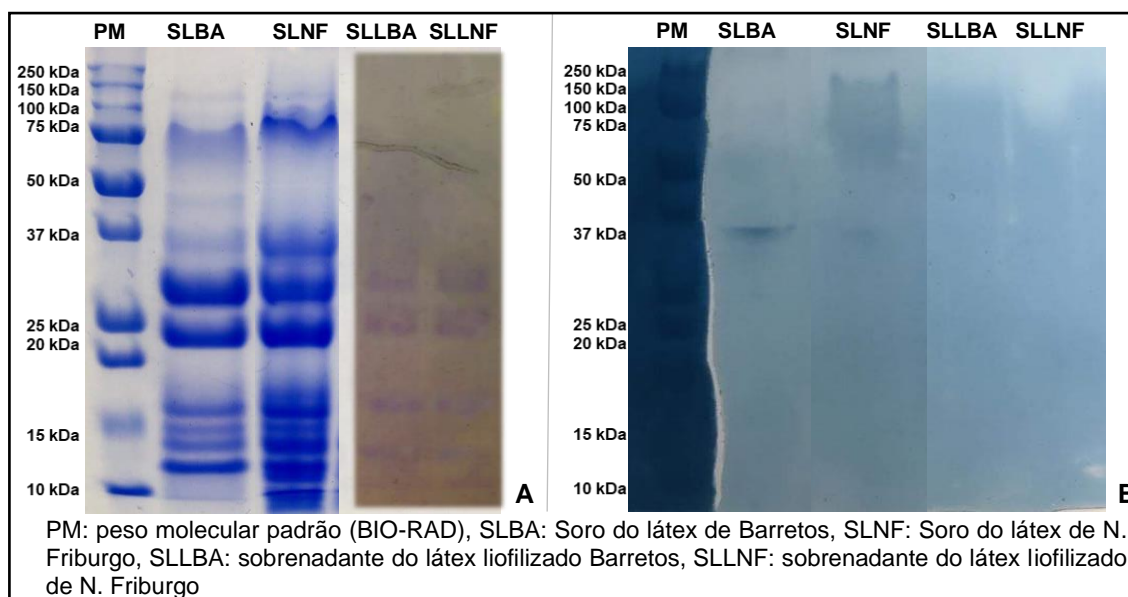


Figura 38: SDS-PAGE em condições não-redutoras do perfil proteico e proteolítico das amostras de látices de *E. umbellata*. (A) SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* e (B) SDS-PAGE-gelatina 10% lavado com Triton X-100 (2,5%) incubado *overnight* (tampão Tris HCl 100 mM pH 7,0).

Essa evidente diferença entre soros dos látices e os sobrenadantes da extração do material liofilizado pode estar relacionada ao preparo da amostra, visto que para usar o látex liofilizado foi necessário o uso de soluções extratoras: tampão tris HCl (a), tampão fosfato (b) e água destilada (c). As variações introduzidas não foram efetivas para extrair apropriadamente as proteínas. Essa é outra clara evidência do efeito de matriz induzido pela liofilização do material, desta vez afetando as proteínas presentes, dada a forte aglutinação que ocorre durante sua desidratação.

Estudos anteriores reportaram duas proteases isoladas do látex de *E. umbellata*, que degradam a caseína: uma na faixa de 76 kDa (MENON *et al.*, 2002) e outra na faixa de 37 a 30 kDa (RAJESH *et al.*, 2006). Esses autores relatam também a presença de proteases com pesos moleculares de 66, 35 e 16 kDa, que podem estar presentes nas amostras estudadas, uma vez que as amostras apresentaram bandas próximas (36, 30, 18, 16, 15 e 14 kDa).

É importante também destacar a presença de bandas com maiores pesos moleculares, como no caso de 149 e 94 kDa, apresentadas por ambos os látex *in natura*. Esses valores não haviam sido relatados na literatura para o látex de *E. umbellata* até o presente estudo. Neste sentido, a literatura reporta estudos com outras espécies de Euphorbiaceae, nos quais as serinoproteases isoladas apresentam, de forma geral, massa molecular entre 43 e 117 kDa (Tabela 9). Ou seja, trata-se de uma classe de proteínas com massa molecular mais elevadas que as

demais. Comparando com os resultados obtidos no presente estudo, observa-se que ao menos 4 bandas apresentadas pelos soros dos látices estão dentro desta faixa. Ademais, ao relacionar a ocorrência desses sinais com o pH ótimo para a atividade (Figura 36), é possível apontar a presença de serinoproteases nos látices *in natura* estudados.

Tabela 9: Serino proteases isoladas do látex de espécies da família Euphorbiaceae

Espécie	Peso molecular kDa	pH	Inibidor	Referência
<i>Elaeophorbia drupifera</i>	117, 65	6,3, 6,5, 7,8	PMSF, DEPC	LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1985c
<i>Euphorbia cyparissias</i>	67, 33, 67	5,2, 5,5, 7,0	DFP	LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1985a
<i>Euphorbia lactea</i>	66, 44, 33	7,5	DFP, PMSF, DEPC	LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1986
<i>Euphorbia lactea cristata</i>	70	8,3	DFP, PMSF, DEPC	LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1986a
<i>Euphorbia lathyris</i>	43	7,0, 7,5	DFP	LENNOX, ELLIS, 1945
<i>Euphorbia milii</i>	51,4	8,0	PMSF, APMSF, DFP	YADAV <i>et al.</i> , 2006
<i>Euphorbia pseudochamaesyce</i>	82	7,5	DFP	SHIMADA <i>et al.</i> , 2000
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	74	7,0	PMSF, DFP	LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1984a
<i>Euphorbia supina</i>	80	8,0	DFP	ARIMA <i>et al.</i> , 2000
<i>Euphorbia tirucalli</i>	74	-	DFP, PMSF, DEPC	LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1985b
<i>Hevea brasiliensis</i>	69, 58, 80	6,6, 6,3, 7,7	DFP, PMSF, DEPC	LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1986b; LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1984b
<i>Synadenium grantii</i>	76±2	7,0	PMSF, DEPC	MENON <i>et al.</i> , 2002
<i>Synadenium grantii</i>	34,4	-	PMSF	RAJESH <i>et al.</i> , 2006

DFP - fluorofosfato de diisopropil, PMSF - fluoreto de fenilmetanossulfonil, APMSF - fluoreto de *p*- amidinometanossulfonilo, DEPC - quimostatina e pirocarbonato de dietilo. *Synadenium grantii* Hook f. corresponde à *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (foco do presente estudo).

Fonte: Elaboração própria, 2019, adaptado de DOMSALLA, MELZING, 2008.

Na Tabela 9, o estudo realizado por Lynn e Clevette-Radford (1986) com *E. lactea* revelou massas moleculares de 66, 44 e 33 kDa para serinoproteases. Esses valores estão próximos das bandas encontradas nas amostras estudadas, sendo 66 kDa o valor mais distante dos encontrados nos soros dos látices estudados aqui (aproximadamente 75 kDa). Contudo, os valores de 44 e 33 kDa são bem próximos daqueles encontrados em SLBA e SLNF (aproximadamente 48 kDa) e também, de maneira relativa, nos sobrenadantes SLLBA e SLLNF (aproximadamente 30 e 25 kDa). No estudo realizado por Wanderley e colaboradores (2018) com látex de *Ficus benjamina* (Asclepiadaceae), foi isolada uma cisteínoprotease com massa molecular

de aproximadamente 25 kDa, um valor idêntico ao observado em ambas amostras utilizadas para os ensaios de SDS-PAGE. Dentro dos resultados apresentados pelos látices, no presente estudo, não foram observadas bandas em torno de 50 e 70 kDa, diferentemente de resultados encontrados por (i) Yadav e colaboradores (2006), que encontraram uma serinoprotease com massa aproximada de 51 kDa no látex de *E. millii*, e (ii) uma proteína com 70 kDa encontrada no látex de *E. lactea* (LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1986a).

O estudo do peso molecular aproximado da protease com possível atividade proteolítica do SLBA, SLNF, SLLBA e SLLNF sobre a gelatina empregou gel de SDS-PAGE 10% contendo gelatina copolimerizada (Figura 38B). As amostras foram submetidas à eletroforese e posteriormente incubadas com tampão específico para que as proteases da amostra atuassem na degradação da gelatina imobilizada no gel. Apenas a amostra SLLNF forneceu uma banda evidente, com massa entre 250 e 100 kDa, que é característica da degradação da gelatina. Contudo, todas essas amostras, especialmente as do soro, exibiram atividade com a gelatina em solução (Figura 35). Tais resultados parecem contraditórios, mas o processo de eletroforese pode ter afetado a atividade destas enzimas e também o acesso à gelatina é mais difícil no gel do que em solução, o que poderia explicar os resultados obtidos (VANDOOREN *et al.*, 2013).

Em resumo, o conjunto de resultados obtidos apontam para a presença majoritária de serinoproteases e cisteínoproteases, menores teores de metaloproteases e, ocasionalmente em uma das amostras (SLNF), protease aspártico.

6.11 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA PARA O LÁTEX LIOFILIZADO DE *E. UMBELLATA*

Para realização do estudo de caracterização físico-química foram selecionados um látex liofilizado de cada origem, um com origem de Barretos - SP, LLBA2 e outro com origem de Nova Friburgo – RJ, LLNF1+2 (Figura 39). Nota-se nas imagens obtidas que ambos se apresentam na forma de um pó fino com diferenças na coloração, o LLBA2 se apresentou amarelado e LLNF1+2 branco, fato este que pode estar relacionado à presença ou concentração dos constituintes dos látices de origens distintas, eventualmente com diferentes padrões de produção de metabólitos.



Figura 39: Látex liofilizado de *E. umbellata*. LLBA2 e LLNF1+2, respectivamente.

As amostras LLBA2 e LLNF1+2 apresentaram teores de umidade médios de 3,3% (p/p) e 4,6% (p/p), e faixas de fusão de 95-105 °C e 190-210 °C, respectivamente. Nota-se que o LLBA2 possui temperatura de fusão menor que o LLNF1+2, fato esse provavelmente devido à composição química quantitativa diferente das amostras (conforme mencionado no item 6.8, pag. 85), heterogeneidade significativa dos látices e limitação em termos de precisão da própria técnica empregada que se baseia na avaliação visual do fenômeno de fusão por um analista.

Na Figura 40, são demonstradas as curvas de DSC (calorimetria exploratória diferencial) para as amostras LLBA2 e LLNF1+2.

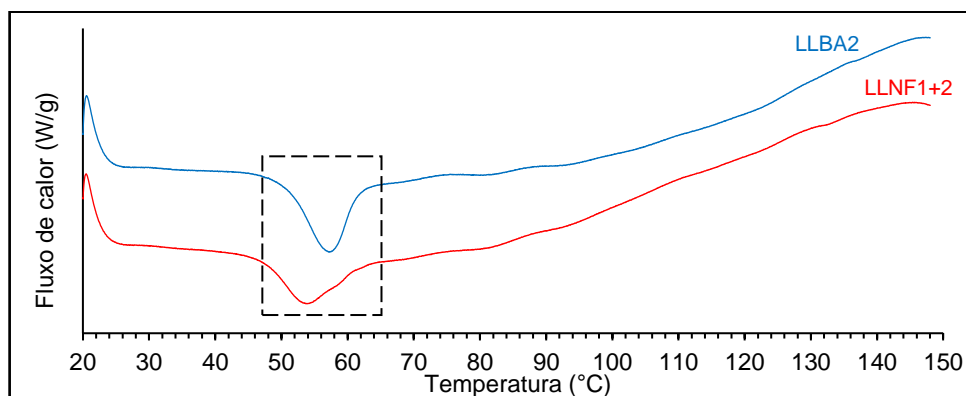


Figura 40: Curvas de DSC dos látices liofilizados LLBA2 e LLNF1+2.

A análise dessas curvas permite afirmar que as matrizes apresentam perfis térmicos similares, com um único pico endotérmico de entalpia de 15,33 J/g na faixa de 49,96-57,30 °C para LLBA2 e entalpia de 13,09 J/g na faixa de 47,06-54,09 °C para LLNF1+2. Todavia, não é possível correlacionar o evento endotérmico observado com fenômeno de fusão de um composto específico ou classe de compostos, uma vez que na literatura não há descrições relacionadas ao perfil térmico de constituintes do látex de Euphorbia.

Adicionalmente, ambas as curvas apresentaram perfil não homogêneo, que pode ser atribuído à complexidade de matrizes de origem natural, conforme descrito

anteriormente em estudos realizados por Camelo (2010), em que o autor avalia o perfil térmico do extrato hidroetanólico liofilizado de *Vismia guianensis*, e por Neves (2018) quando avalia o perfil térmico de frações purificadas, ricas em triterpenos, oriundas de oleorresinas de Burseraceae.

Na Figura 41 são demonstradas as curvas de TGA dos látices. As curvas obtidas revelam que as amostras apresentam perfil termogravimétrico similar. Nota-se ainda a presença de pequena perda de massa (3-4%) até a temperatura de 100 °C, provavelmente relacionada à evaporação de umidade ou compostos voláteis. Este fato reafirma o resultado obtido anteriormente em balança de infravermelho (umidade média dos látices ~ 4% p/p). Adicionalmente, observa-se uma perda de massa mais pronunciada a partir de 250 °C até próximo de 500 °C.

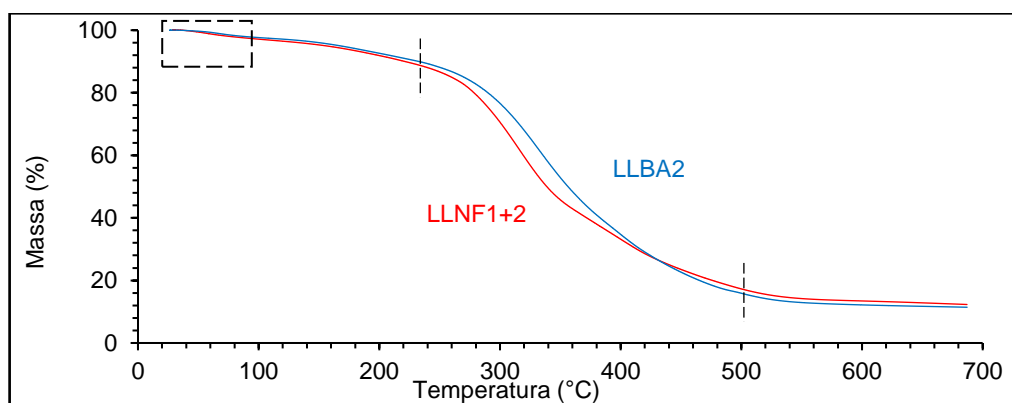


Figura 41: Curvas de termogravimetria dos látices liofilizados LLBA2 e LLNF1+2.

A caracterização quanto ao perfil cristalino dos insumos foi conduzida empregando a técnica de DRX de pó. A partir da análise dos padrões de difração (Figura 42) é possível perceber que apresentam perfil similar para ambas amostras analisadas.

Nesses padrões observa-se a presença de um halo especialmente evidente com reflexão em 2θ em torno de 15° , indicativo da presença de compostos com estrutura amorfa. Já os picos com reflexão em 2θ de $22,5^\circ$; 28° ; 41° indicam a presença de possíveis compostos cristalinos. Diante disso, os materiais podem ser caracterizados como semicristalinos e, portanto, o evento endotérmico observado no DSC para ambas as amostras (Figura 40) está, possivelmente, relacionado à fusão dessas regiões cristalinas (THRELFALL, 1995).

Este comportamento semicristalino pode ter sido ocasionado, por exemplo, durante o processamento primário dos insumos. Fato este embasado no estudo

realizado por Fernandes (2013), em que o autor analisa o extrato de *Psidium guajava* seco por liofilização, e constata a presença de um perfil difratométrico misto. Além disso, a liofilização é uma técnica usada rotineiramente para a indução de amorfização de sólidos (WILLART, DESCAMPS, 2008).

A possível presença de um perfil misto pode ter influência direta na dissolução do material, desempenhando função importante na biodisponibilidade. Isso porque esta heterogeneidade da matriz pode gerar diferenças nas taxas de dissolução, já que os sólidos amorfos, de forma geral, são mais solúveis e são hidrolisados mais rapidamente em relação ao padrão cristalino (HÖRTER, DRESSMAN, 2001; PRADO, ROCHA, 2015). Adicionalmente, o fato de ter compostos cristalinos poderia ocasionar a cristalização de outros constituintes desses materiais, e ainda, viabilizar a formação de diferentes estruturas cristalinas de um mesmo composto (polimorfismo) comprometendo, por exemplo, a estabilidade do insumo (HANCOCK, ZOGRAFI, 1997; ZHANG *et al.*, 2004; PRADO, ROCHA, 2015).

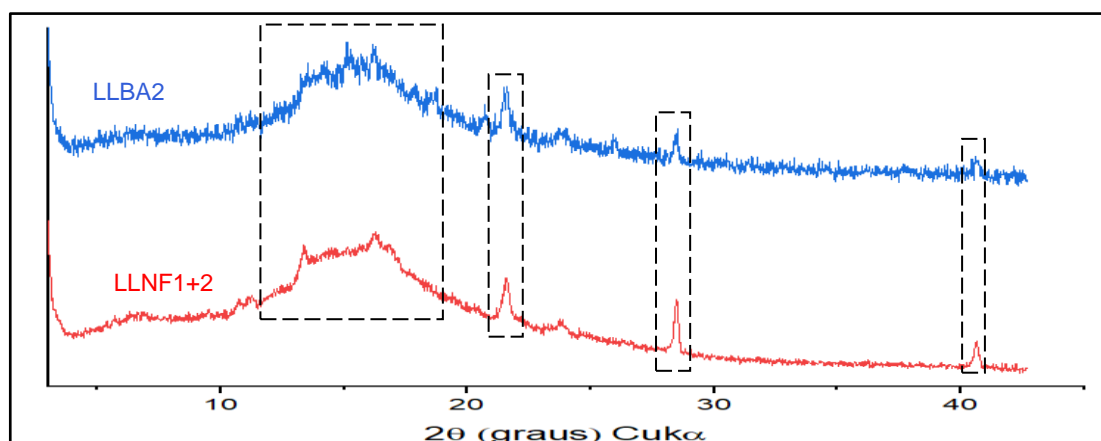


Figura 42: Padrão de difração do látex liofilizado LLBA2 e do LLNF1+2.

A Figura 43 mostra as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos látices em diferentes ampliações. A análise dessas micrografias permite notar a presença de partículas com morfologias heterogêneas, com superfícies e formatos irregulares, como é usual em ativos de origem vegetal (ZIMMERMANN, 2012; SANTANA, 2014). Por conta dessa característica, não foi possível estimar o tamanho de partícula por esta técnica. Os materiais apresentam majoritariamente composição por partículas sem formato definido e pequenos aglomerados com morfologia aparentemente mais bem definida (Figura 43 A2 e B2).

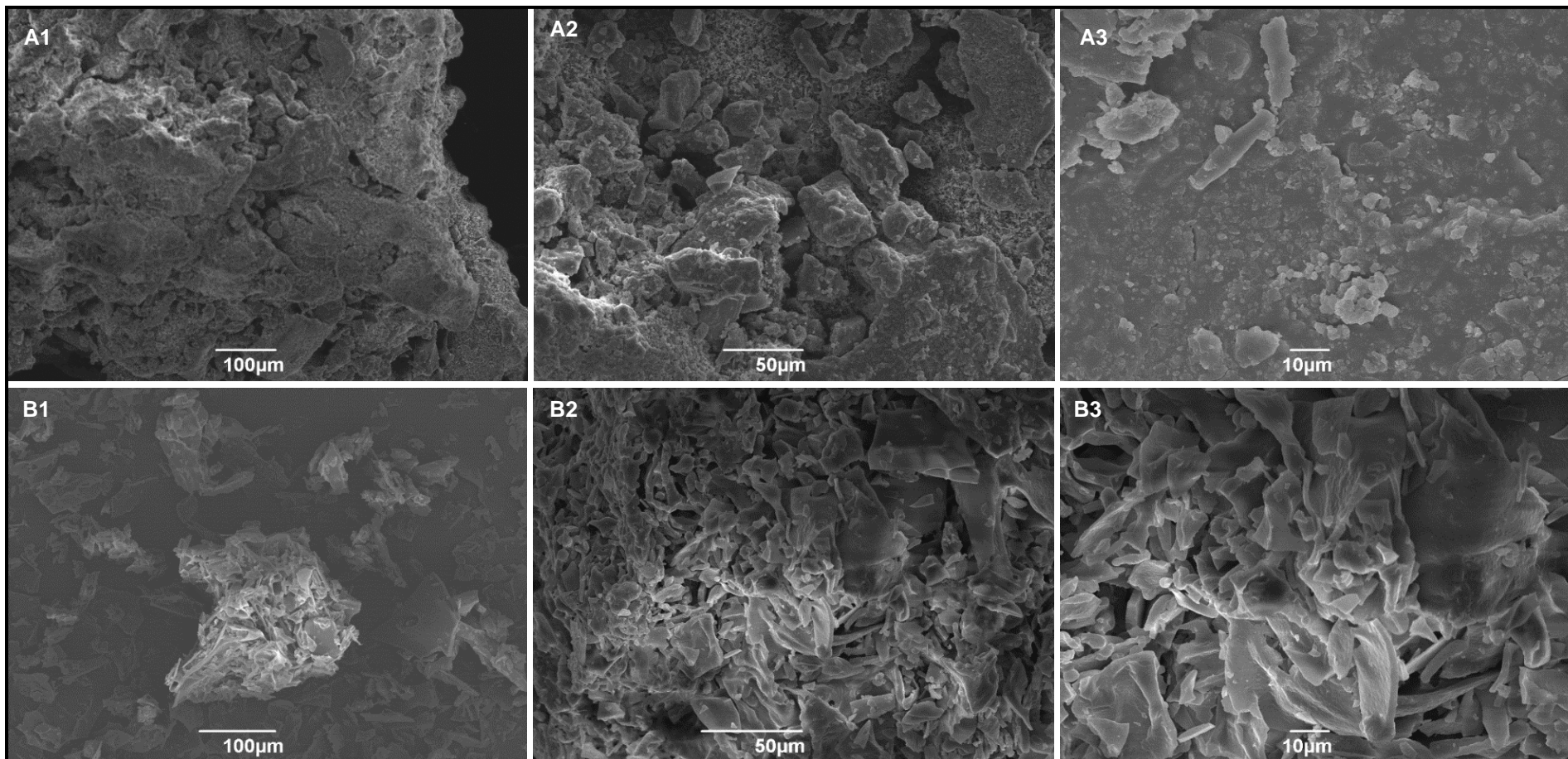


Figura 43: Micrografia dos látices liofilizados LLBA2 (A) e (B) LLNF1+2, com magnitudes de aproximação de 150 (A1), 400(A2), 1000 (A3) e 190 (B1), 500 (B2), 1000 (B3) vezes.

A distribuição do tamanho da partícula foi estimada pela técnica de granulometria por tamisação apenas para o LLBA2 (Figura 39), devido a essa amostra ser a única que apresentava quantidade suficiente para os requerimentos da análise. Entretanto, provavelmente um comportamento similar seria esperado para o LLNF1+2, uma vez que todas as análises de caracterização discutidas anteriormente demonstraram semelhanças para as amostras estudadas.

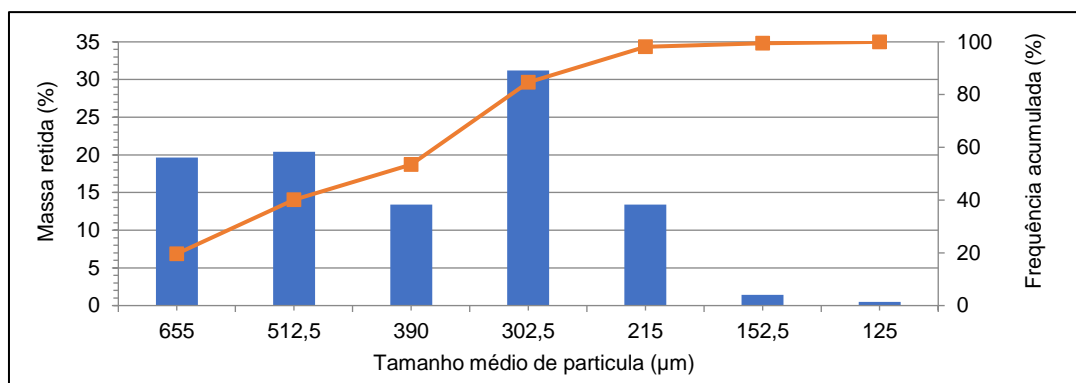


Figura 44: Distribuição do tamanho da partícula, massa retida e frequência acumulada do látex liofilizado de *E. umbellata* (LLBA2) obtido no ensaio de tamisação

Com base nos resultados sumarizados e apresentados no Figura 44, nota-se uma relativa dispersão relacionada a distribuição do tamanho das partículas, sendo a maioria das partículas em torno de 300 µm. Estes resultados estariam de acordo com os obtidos por MEV, onde através das imagens observa-se a ausência de tamanho regular e forma na amostra analisada.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2019) este material pode ser descrito como pó grosso, visto que mais de 40% das partículas que o constituem passam pelo tamis com abertura nominal de malha menor que 355 µm.

A literatura menciona apenas a análise de tamanho de partícula para látices *in natura* do gênero *Euphorbia*, e não após um processamento primário como foi o caso do presente estudo. Assim, não é possível efetuar uma comparação dos resultados obtidos com os da literatura. O tamanho observado pelos autores, empregando a técnica de difração de *laser* para essa matriz, é 100 vezes menor que aquele medido para o látex liofilizado (WOOD, CORNISH, 2000; BAUER *et al.*, 2014).

A área superficial específica e o diâmetro dos poros foram determinados utilizando isotermas de adsorção de nitrogênio. Para o LLBA2 foi obtido um valor de área superficial igual a 0,147 m²/g e uma porosidade estimada em 55 Å, enquanto

para o LLNF1+2 a área superficial não foi possível determinar e uma porosidade estimada em 18 Å.

A área superficial e o tamanho dos poros são parâmetros indicativos da solubilidade e dissolução de materiais, uma vez que permitem o acesso do meio de dissolução e difusão para o meio externo das moléculas de soluto dissolvidas (AULTON, 2016a). Portanto, torna-se relevante caracterizar insumos quanto a esses aspectos. De forma geral os poros com diâmetros menores que 20 Å são denominados microporos, entre 20 Å e 500 Å, mesoporos e maiores que 500 Å, macroporos (IUPAC, 1994; LOWEL, SHIELDS, 1991). Sendo assim, o resultado obtido referente ao material LLBA2 é indicativo da presença de mesoporos e de microporos na amostra LLNF1+2.

A determinação da densidade aparente e compactada foi usada para determinação da razão de Hausner (RH) e índice de Carr (IC) (AULTON, 2016b). A amostra LLBA2 apresentou densidade aparente igual a 0,50 g/mL, densidade compactada de 0,57 g/mL, RH de 1,14 e o IC de 12,28 % e a amostra LLNF1+2 apresentou densidade aparente igual a 0,29 g/mL, densidade compactada de 0,38 g/mL, RH de 1,31 e o IC de 23,68 % (Tabela 10). Esses resultados indicam um pó com bom fluxo para LLBA2 e fluxo aceitável para LLNF1+2 segundo os critérios constados na Farmacopeia Americana (2018).

Tabela 10: Resultados densidade, fluxo de pó por orifício e ângulo de repouso das amostras do látex liofilizado, LLBA2 e LLNF1+2

	LLBA2	LLNF1+2
Densidade aparente (g/mL)	0,50	0,29
Densidade compactada (g/mL)	0,57	0,38
Razão de Hausner	1,14 (bom)	1,31 (aceitável)
Índice de Carr (%)	12,28 (bom)	23,68 (aceitável)
Fluxo por orifício		
Média (s/100 g)	45,0	9,9
Desvio (σ) (%)	1,45	19,28
Ângulo de repouso		
Média (°)	15,6	18,4
Desvio (σ) (%)	0,68	1,70

A caracterização do fluxo foi realizada por meio do emprego de mais duas técnicas: análise do fluxo de pós por orifício e ângulo de repouso. A utilização de técnicas de forma combinada é geralmente recomendável pela literatura (YU *et al.*, 2011), uma vez que o escoamento de pós particulados sofre influência direta do

tamanho e formato das partículas. No caso de matrizes complexas, como as de origem natural, os resultados são muito variáveis.

A análise do fluxo de pós por orifício caracteriza-se pela verificação do tempo necessário para dispensar certa quantidade de pó, a partir de um funil com um orifício de diâmetro pré-determinado, sendo obtido resultado expresso em massa escoada em função do tempo. O uso desta metodologia é mais adequado para amostras de fluxo livre, porém o uso de dispositivos auxiliares para promover o escoamento pode auxiliar na análise de pós coesivos e heterogêneos (WU *et al.*, 2012). No presente estudo, tal recurso foi necessário apenas no caso da amostra LLNF1+2.

Na Tabela 10, são demonstrados os resultados de fluxo obtidos para LLBA2 e LLNF1+2 pela técnica de fluxo por orifício. Nesta pode-se notar que a amostra LLBA2 apresenta característica de fluxo contínuo e uniforme, uma vez que as replicatas apresentaram vazão de 45 segundos e comportamento reprodutível ($\sigma = 1,45\%$) quando se empregou funil de diâmetro igual a 6 mm. No caso de LLNF1+2 o contrário foi observado ($\sigma = 19,28\%$), caracterizando o fluxo dessa matriz como não contínuo, ou seja, que escoava irregularmente pelo orifício, mesmo após o emprego de funil com diâmetro máximo de 25 mm e agitação nível 4 em aparato específico.

Tais resultados são corroborados pelas curvas obtidas de massa *versus* tempo, apresentadas na Figura 45, em que para o LLBA2 tem-se uma curva representativa de taxa de escoamento constante e para o LLNF1+2 o aspecto da curva massa *versus* tempo permite visualizar mais claramente a dificuldade de escoamento do material, uma vez que é apresentada inicialmente escoamento contínuo (massa x tempo), em seguida um escoamento total, sendo representado na curva pelo aumento repentino da massa.

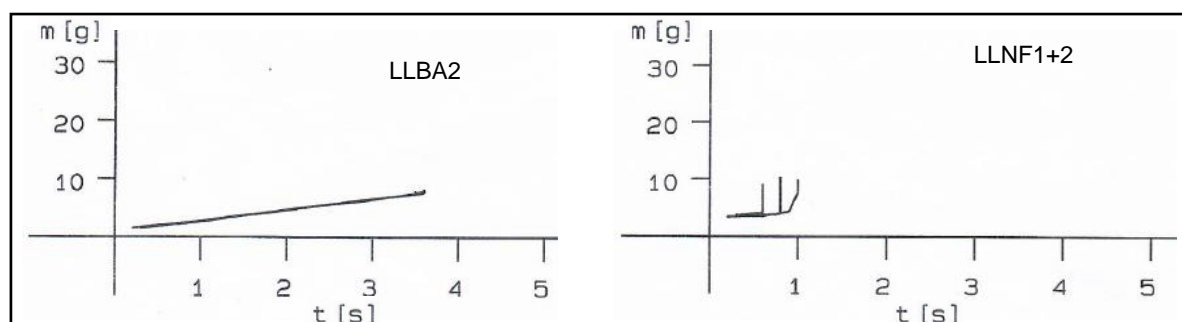


Figura 45: Curvas de fluxo de pó por orifício das amostras do látex liofilizado, LLBA2 e LLNF1+2

O ângulo de repouso é definido como o ângulo da superfície livre e o cone obtido pelo escoamento, em relação ao plano horizontal. Geralmente, os pós com melhor

escoamento apresentam menor ângulo de repouso, entretanto, a técnica tem aplicação limitada a amostras de coesividade baixa a intermediária, uma vez que pós coesivos não formam cone adequado (WU *et al.*, 2012; USP, 2018).

O LLBA2 apresentou ângulo de repouso de 15,6° e o LLNF1+2 de 18,2°. Assim, segundo a classificação pela Farmacopeia Americana (2018), ambos os pós seriam considerados como de excelente fluxo. Esse fato está em desacordo com os resultados obtidos pelas técnicas de fluxo por orifício, índice de Carr e razão de Hausner. Portanto, esse conjunto de informações indicam que provavelmente a técnica de ângulo de repouso não é discriminativa para matrizes vegetais (FERNANDES, 2013; RAMANATHAN *et al.*, 2019).

Os resultados de caracterização físico-química obtidos para os látices de ambas as origens, Barretos (SP) e Nova Friburgo (RJ), demonstraram semelhanças em relação aos aspectos térmicos, cristalográficos e morfológicos. Entretanto, nota-se uma clara diferença relacionada às propriedades de fluxo destes materiais, contemplada pela técnica de fluxo por orifício. Conforme discutido, estes escoamentos diferentes para os pós estudados podem ser consequentes da existência de diferenças quantitativas nessas matrizes. Assim, para melhor esclarecimento dessa questão, faz-se necessário o estabelecimento de metodologias capazes de viabilizar a identificação e quantificação precisa dos constituintes químicos nos látices.

Uma vez que o látex de Barretos (LLBA2) apresentou melhor fluxo, apesar de estudos mais aprofundados terem que ser ainda realizados, este poderia ser o critério de escolha para nortear, por exemplo, a eleição desta matéria-prima com vistas ao desenvolvimento de uma formulação farmacêutica sólida. Isso porque o bom fluxo deste material poderia significar ganhos em termos de processabilidade, caso o insumo ativo se apresentasse em concentrações significativas no produto final.

Em face ao exposto e tendo em vista a lacuna existente na literatura relacionada à caracterização dessa matéria-prima, o presente trabalho contribui e orienta o estudo para o desenvolvimento de matrizes medicamentosas contendo látex bioativo de *E. umbellata*.

7. TESTES BIOLÓGICOS

Um látex liofilizado selecionado (LLBA1), o extrato hidroalcoólico e frações enriquecidas em diterpenos (F1+F2 da EFS) e triterpenos (F4 da EFS) (seção 6.7.1) foram testadas quanto à capacidade de interromper a latência do vírus HIV e reativar o sistema celular em células humanas infectadas *in vitro*. Os testes foram realizados no Laboratório de Virologia Molecular do IB/UFRJ, via parceria com a equipe do Dr. Amílcar Tanuri. Os resultados estão no gráfico da Figura 46 do Anexo A.

Comparando com o controle positivo (TPA, 9.3% de atividade), virtualmente todas as amostras apresentaram alguma atividade. Na média, LLBA1 (liofilizado) e EIBA1 (extrato hidroetanólico insolúvel) apresentaram atividades similares ao TPA, com variações entre 3,8% e 13,6% de reativação celular, considerando as três diluições utilizadas. O extrato foi mais ativo que o liofilizado em duas diluições, levando a deduzir que concentra substâncias mais ativas. De fato, a comparação dos cromatogramas CLAE-DAD entre o liofilizado e o extrato insolúvel (Figura 15 e Figura 17, seção 6.4) denotam que esses extratos foram enriquecidos em ésteres diterpênicos.

As frações F1 e F2, ambas concentradas em diterpenos pela EFS (seção 6.7.1), foram separadamente testadas, produzindo resultados similares nas duas diluições mais baixas. Contudo, é bastante significativo o resultado obtido com F2 na diluição de 1:100, que atinge 92,8% de atividade na interrupção da latência do vírus. Este resultado assegura que as substâncias mais ativas nesse ensaio estão relacionadas aos ésteres de diterpênicos, que são descritos na literatura como possuindo essa atividade (JOSÉ *et al.*, 2014; SHANG *et al.*, 2015). Por fim, também é interessante o resultado fornecido por F4, que concentra os triterpenos, ao mostrar (ainda que menor) efetividade nas diluições de 1:100 (2,5x maior que o controle) e 1:1000.

Embora sejam preliminares, esses resultados apontam que as substâncias mais ativas estão entre os diterpenos e, ao mesmo tempo, mostram uma via para isolá-las via monitoramento por esse bioensaio.

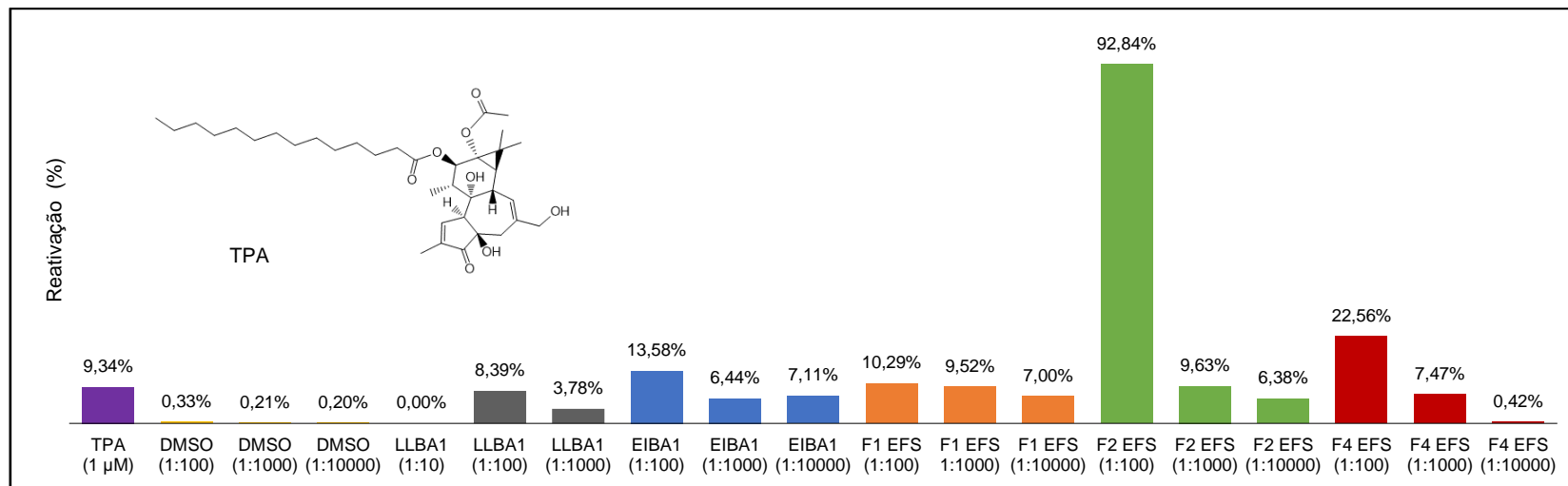


Figura 46: Capacidade de reativação viral *in vitro* do HIV em células infectadas. Células J-Lat 10.6 (linhagem de linfoblastos de células T humanas contendo o genoma completo do HIV-1) foram semeadas em placas de 96 poços (5.104 células/poço) e cultivadas com meio RPMI (Thermo Scientific) na presença do látex e frações sob diferentes concentrações. Quando ativadas, as células J-Lat expressam o HIV-1 juntamente com a proteína GFP (*green fluorescent protein*), que serve como marcador de latência obtida nesta linha celular. Como controle positivo para a ativação, o forbol 12-miristato 13-acetato (TPA; em inglês PMA - Sigma-Aldrich) foi usado em uma concentração final de 1 mM. As células foram mantidas em cultura por 24 h e, em seguida, foram colhidas para avaliação da expressão de GFP por análises de citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos pelas porcentagens de células positivas para GFP.

Fonte: construção a partir dos dados cedidos pelo Dr. Átila Duque Rossi (laboratório de Virologia Molecular da UFRJ).

8. CONCLUSÕES

O presente estudo representa uma primeira abordagem do látex de *E. umbellata*, usado popularmente com intuítos terapêuticos, e que é objeto de desenvolvimento de um fitoterápico pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia da Biodiversidade para a Saúde, em Farmanguinhos, Fiocruz. Nesse contexto mais amplo, o látex (ou algum derivado seu considerado mais adequado) é matéria-prima que será validada como IFAV, sobre o qual se desenvolverão etapas tecnológicas envolvendo áreas distintas do conhecimento. Portanto, a opção metodológica incluiu abordar o látex via um estudo horizontal e multidisciplinar, de maneira a construir uma base informacional para o subsequente desenvolvimento dessas tecnologias. Os resultados obtidos nesta abordagem permitiram as conclusões pontuadas abaixo.

- 1) O amplo levantamento da literatura, cobrindo aspectos relacionados às técnicas mais convencionais empregadas para analisar o látex serviram de base para otimizar empiricamente os métodos utilizados no decorrer do trabalho (CCD, CLAE, CG), e também para avaliar o perfil composicional dessa matéria-prima, seus extratos e frações. Dentro das limitações de cada técnica, foi possível estabelecer uma base para a análise de rotina do conteúdo terpenoídico nesse material. Complementarmente, foi construído um painel contendo um resumo das atividades biológicas publicadas até o momento com o látex de *E. umbellata*, pelo qual se constatou que os estudos mais recentes estão focados no seu conteúdo em triterpenos.
- 2) Tanto o látex íntegro liofilizado quanto sua fase sólida seca em separado (contendo os terpenoides) apresentaram baixa maneabilidade devido à viscosidade e formação de grumos duros e insolúveis. Optou-se pelo cuidado em não acrescentar operações laboratoriais, além da diluição desse material em mistura de água e álcool, circunscrevendo o processo proposto aos limites do uso na medicina popular. Esta estratégia auxiliou a concentrar os terpenoides, mas não solucionou totalmente a questão da alta viscosidade do produto formado.

- 3) Observou-se que a época e o local de coleta dos látices não influenciaram o perfil qualitativo das amostras no que se refere às substâncias terpenóides. Pondera-se, todavia, que uma coleta mais sistemática pode ser realizada para ampliar o universo amostral dos látices.
- 4) A separação eficiente entre triterpenoides e diterpenoides por CCD, com fase móvel estabelecida para gel de sílica e fase reversa (5% Et₂O ou Me₂CO em CHCl₃ e CH₃CN, respectivamente) e coloração por anisaldeído sulfúrico ou vanilina, aponta esta técnica como bastante adequada para análises de rotina da composição em triterpenoides do látex de *E. umbellata* e suas frações.
- 5) Na CLAE-DAD, as condições estabelecidas permitiram obter perfis razoavelmente adequados dos constituintes forbólicos. Isso foi útil tanto para caracterizar amostras contendo esse tipo de substância quanto para estabelecer um ponto de partida para a padronização e validação de um método CLAE, aqui incluindo o desenvolvimento posterior de CLAE-EM. Por outro lado, os resultados sugeriram que triterpenos e esteróis exigiriam variações mais drásticas nas condições usadas, provavelmente utilizando outros sistemas de eluentes e mesmo coluna com outras fases estacionárias.
- 6) A técnica de CG-EM foi eficiente para apontar os triterpenos e seus precursores isoprenoides, porém sem muita serventia para caracterizar os constituintes forbólicos. Dois motivos principais explicam essa condição: (i) o látex íntegro liofilizado é uma matriz extremamente complexa, contendo substâncias dentro de um largo intervalo de polaridade, acarretando a geração de sinais com baixa pureza de pico e fragmentogramas dúbios; e (ii) os ésteres diterpênicos respondem de maneira atípica à detecção por impacto de elétrons sob 70eV; uma vez que essa energia produz fragmentação excessiva dessas substâncias, sem fragmentos-diagnósticos visíveis no espectro. Em resumo, mesmo os sinais de maiores intensidades representavam coalescência de picos de substâncias distintas. Empiricamente observados, os perfis dos terpenoides obtidos por CG-EM reproduziram-se em CG-DIC quando obtidos sob condições idênticas, sem aparentes inversões de sinais.

- 7) A separação dos grupos triterpenos (+ isoprenoides) e diterpenos foi possível por EFS com eluição de CH₃CN, e também por partição do látex liofilizado em CH₃CN:H₂O. O primeiro método foi mais eficiente, além de reprodutível e escalonável para carga no sistema de 5x a massa inicial. A vantagem do segundo método é o seu menor custo. Ambos podem ser utilizados como passo inicial de um processo de isolamento de moléculas de interesse presentes no látex.
- 8) Os conteúdos relativos de componentes dentro de cada fração foram calculados por normalização de áreas dos sinais nos cromatogramas da CG-DIC, tendo-se previamente estabelecida a linearidade de respostas entre os principais sinais a serem quantificados, numa faixa de trabalho estipulada. Pelo método mais preciso do EFS, o conteúdo médio aproximado de triterpenos e diterpenos foram 40 % e 20 %, respectivamente. Os cromatogramas das frações triterpênica e diterpênica apresentam sinais que não se sobrepõem, indicando que a técnica EFS funcionou como um *clean up* simultâneo para ambas as amostras. Além da separação em si, duas vantagens adicionais desse processo foram: (i) foi possível obter um perfil bem definido dos diterpenos na fração que os concentrou (em contrapartida ao látex íntegro) por CG-DIC e CG-EM; (ii) os cromatogramas foram gerados com picos de maior pureza em ambos os casos, com fragmentações claramente distinguíveis entre si no CG-EM (ainda que pouco identificáveis no caso dos ésteres diterpênicos).
- 9) Tomados em conjunto, os resultados de (5) a (8) acima levam a concluir que o desenvolvimento de um método que se aplique à padronização química do látex como matéria-prima, para se qualificar como IFAV, exige uma etapa prévia de *clean up* do analito. Ao envolver também um procedimento eficiente de separação entre triterpenos e ésteres diterpênicos, a otimização dessa (recuperação, rendimentos das frações, escala de operação, repetibilidade) será necessária para que se incorpore no método a ser proposto. Nesse contexto, cada grupo de terpenoide seria separada e complementarmente quantificados por CG. Certamente, essa projeção supõe o estabelecimento de um marcador químico de referência para dar suporte e robustez ao método. Esse ponto é um dos mais relevantes achados do presente estudo. Não há

descrição na literatura sobre a adequação do látex de *E. umbellata* (ou de espécies congêneres) como matriz a ser padronizada quimicamente. A questão da baixa (ou nenhuma) detecção dos forboloides nas análises do látex bruto talvez seja a causa de a maioria das publicações nesse contexto estar focada nos triterpenoides.

10) A prospecção do conteúdo proteico foi realizada com dois lotes de látices (um de Barretos e um de Nova Friburgo) resultando na presença majoritária de serino- e cisteínoproteases em ambos os látices, sendo que o látex (*in natura*) coletado em Nova Friburgo apresentou uma maior quantidade de proteína, quando-comparado ao de Barretos. Contudo, não há parâmetros, neste estudo, para justificar tal diferença. É relevante o fato de a detecção das proteínas ter sido bem mais viável quando se abordou o látex *in natura*. A secagem (liofilização) produziu uma matriz pouco suscetível à extração das proteínas pelos métodos laboratoriais convencionais, denotando o alto efeito matriz, de resto observado em outras ocasiões de manipulação do material liofilizado.

11) As primeiras medidas das propriedades físico-químicas do látex liofilizado mostraram que as características do látex das duas origens foram semelhantes em relação aos aspectos térmicos, cristalográficos e morfológicos. Todavia, houve uma diferença considerável em relação às propriedades de fluxo, observadas pela técnica de fluxo por orifício. Podem ter contribuído para isso diferenças quantitativas entre componentes específicos em cada látex, os diferentes tempos entre a coleta e a secagem ou, ainda, a maneira eventualmente não uniforme do processo de liofilização. Convém mencionar que não há dados na literatura com os quais se possa comparar os resultados preliminares obtidos.

12) Por fim, os dados produzidos pela prospecção multidisciplinar deverão ser úteis para a continuação do projeto de desenvolvimento de um fitoterápico, aprofundando as atividades em cada etapa específica, inicialmente exploradas neste estudo.

9. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando o escopo do estudo desenvolvido, as sugestões resumidas abaixo representam tanto um aperfeiçoamento do trabalho realizado (itens a-d, f), quanto a continuidade do desenvolvimento da temática aplicada ao látex de *E. umbellata* (itens e, g-j). Embora focados em diferentes etapas técnicas, tratam-se de temas interdependentes, pois representam o aprofundamento de uma investigação multidisciplinar.

Quanto à matéria-prima:

- a) Com base nos dois fornecedores do látex, equacionar o suprimento seguro da matéria-prima, assim como a logística de seu transporte ao local de processamento;
- b) Obter e comparar o perfil do látex sob condições de coletas mais sistemáticas e frequentes, durante a estação climática em que a planta mais produz com mais abundância;
- c) Otimizar o processo de liofilização do látex, visando obter um material mais uniforme.

Quanto à caracterização química do látex:

- d) Aprofundar o estudo sobre a identificação das substâncias isoprenoides presentes no látex, visando determinar o possível papel delas no processo de coagulação e, portanto, na morfologia do látex liofilizado; assim como verificar sua influência nas condições estabelecidas para as análises cromatográficas;
- e) Isolar e identificar ésteres de forbol como marcadores químicos para o látex de *E. umbellata*.

Quanto aos métodos de análise para o látex:

- f) Aumentar a qualidade da caracterização das substâncias representadas nos cromatogramas do látex (principalmente as minoritárias) pelo uso da técnica de CG-EM;
- g) Planejar, desenvolver e validar um método para a quantificação dos constituintes do látex de *E. umbelatta* (com base em um marcador definido)

incluindo uma etapa – também validada – de separação prévia das classes de terpenoides.

Quanto à caracterização biofarmacêutica do látex:

- h) Estabelecer os parâmetros relacionados ao desenvolvimento e validação do IFAV de acordo com o preconizado no contexto regulatório, como os ensaios de dissolução, estabilidade em diferentes pH, etc.

De maneira geral:

- i) Manter o radar prospectivo com relação aos estudos relacionados a (i) o látex de *E. umbellata*, com especial atenção ao seu conteúdo em forboloides; e (ii) os estudos que abordam a capacidade de ésteres diterpênicos em interromper a latência do HIV;
- j) Preparar amostras certificadas para aprofundar os testes biológicos *in vitro* e *in vivo*, incluindo nisso os forboloides isolados do látex.

10. REFERÊNCIAS

- ABARCA, L. F. S.; KLINKHAMER, P. G. L.; CHOI, Y. H. Plant Latex, from Ecological Interests to Bioactive Chemical Resources. **Plant. Med.**, v. 85, n. 11/12, p.856-868, 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Farmacopeia Brasileira. **Brasil**, v. 6, 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada, nº 26, de 13/05/2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**, maio, 2014.
- ALDERBORN, G. Comprimidos e compactação, In: AULTON, M. E; TAYLOR, K. M. G. **Aulton delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed., cap. 30. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- ALVES, M. S. M. **Estudo de caracterização física, química, físico-química e de pré-formulação de *Arrabidaea chica* (H&B) Verlt.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, 2008.
- AMOROZO, M.C.M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: STASI, L. (org.). **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia interdisciplinar**, São Paulo: Editora da UNESP, p. 47-68, 1996.
- ANDERSEN, O. M., JORDHEIM, M., BYAMUKAMA, R., MBABAZI, A., OGWENG, G., SKAAR, I., & KIREMIRE, B. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochem.**, v. 71, n. 13, p. 1558-1563, 2010.
- ANGENOT, L.; Les poisons de fleches africains.I. Zaire (Congo), Rwanda et Burundi. Tervuren: **Africa-Tervuren.**, v. 24, n. 2, p. 36-54. 1978.
- ANSEL, H.C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed., cap. 6. São Paulo: Artmed, 2013.
- APPENDINO, G.; SZALLASI, A. Euphorbium: modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancient medicine. **Life Sci.**, v. 60, n. 10, p. 681-696, 1997.
- ARAGÃO, C. F. S.; SOUZA, F. S.; BARROS, A. C. S.; VERAS, J. W. E.; BARBOSA FILHO, J. M.; MACEDO, R. O. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Rer. Bras. Farmacog.**, v. 12, supl., p. 60-61, 2002.
- ARIMA, K.; UCHIKOBA, T.; YONEZAWA, H.; SHIMADA, M.; KANEDA, M. Cucumis-like protease from the latex of *Euphorbia supina*. **Phytochem.**, n. 53, p. 639-44, 2000.

AULTON, M. E. Dissolução e solubilidade. In: AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed., cap. 2. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016a.

AULTON, M. E. Fluxo de pós. In: AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed., cap. 12. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016b.

BADGUJAR, S. B. Evaluation of hemostatic activity of latex from three Euphorbiaceae species. **J. Ethnoph.**, v. 151, n. 1, p. 733-739, 2014.

BAGAVATHI, R.; SORG, B.; HECKER, E. Tiglane-Type Diterpene Esters from *Synadenium grantii*. **Plant. med.**, v. 54, n. 6, p. 506-510, 1988.

BALOCH, I. B., BALOCH, M. K., & US SAQIB, Q. N. Anti-tumor 12-deoxyphorbol esters from *Euphorbia cornigera*. **Europ. J. Med. Chem.**, v. 43, n. 2, p. 274-281, 2008.

BARBOSA, B. F. F.; CHEN, L. C. Avaliação da atividade antimutagênica do látex da *Synadenium umbellatum* PELO TESTE DE AMES. In: **Conpeex - Congresso de Pesquisa**, Ensino e Extensão- UFG/ 63ª Reunião Anual da SBPC, 2011, Goiânia. Anais do Conpeex 2011 - Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG, 2011.

BASE PUBCHEM Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em em 08 fev 2020.

BAUER, G.; GORB, S. N.; KLEIN, M. C.; NELLESEN, A.; TAPAVICZA, M. V.; SPECK, T. Comparative Study on Plant Latex Particles and Latex Coagulation in *Ficus benjamina*, *Campanula glomerate* and Three *Euphorbia* species. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, e113336, 2014.

BERRY, D. L.; LIEBER, M. R.; FISCHER, S. M.; SLAGA, T. J. Qualitative and quantitative separation of a series of phorbol-ester tumor promoters by high-pressure liquid chromatography. **Canc. let.**, v. 3, p. 125-132, 1977.

BEUTLER, J.; ALVARADO, A.; MCCLOUD, T.; CRAGG, G. Distribution of Phorbol Ester Bioactivity in the Euphorbiaceae. **Phytoth. Res.**, v.3, n.5, p.188-192, 1989.

BORGES, L.; SCILIAR, M.; ALMEIDA, S. **Biodiversidade brasileira e produtos industriais**, UFMG: Belo Horizonte, 2003.

BORGES, R.; NASCIMENTO, M. V. M.; CARVALHO, A. A. V.; VALADARES, M. C.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A.; CUNHA, L. C. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanolic Extract from *Synadenium umbellatum* Pax. (Euphorbiaceae) Leaves and Its Fractions. **Evid.-Bas. Complem. Altern. Med.**, Article ID 715650, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254. 1976

BREITMAIER, E. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. Weinheim: Wiley-VHC, Cap. 4, p. 52-81, 2006.

- BRUNETON, J. **Toxic plants dangerous to humans and animals**. Intercept Limited, 1999.
- BRUYNS, P. V.; MAPAYA, R. J.; HEDDERSON, T. J. A new subgeneric classification for *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and psbA-trnH sequence data. **Taxon**, v. 55, n. 2, p. 397-420, 2006.
- BURGER, W.; HUFT, M. Flora Costaricensis. Family Euphorbiaceae. **Field. Botany.**, v. 36, p. 1-169, 1995.
- CAMELO, P. R. S. **Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, 2010.
- CAMPOS, A. **Análise Fitoquímica e avaliação da atividade antiproliferativa de espécies adaptadas da flora catarinense: *Synadenium grantii*, *Cipura paludosa*, *Epidendrum mosenii* e *Maytenus robusta***. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2015.
- CAMPOS, A.; COSTA, D.; LONGATO, G.; ZERMIANI, T.; RUIZ, A.; CARVALHO, J.; PANDIELLA, A.; FILHO, V. Antiproliferative Effect of *Synadenium grantii* Hook f. stems (Euphorbiaceae) and a Rare Phorbol Diterpene Ester. **Inter. J. Tox.**, v. 35, n. 6, p.666-671, 28 jul. 2016.
- COSTA, L. L.; DAVID, V. C.; PINTO, R.; MINOZZO, B. R.; KOZLOWSKI J. V. A.; CAMPOS, L. A.; BELTRAME, F. L. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 22, n.5, p. 1070-1078, 2012.
- CRAIK, C. S.; PAGE, M. J.; MADISON, E. L. Proteases as therapeutics. **Biochem. J.**, v. 435, p. 1-16, 2011.
- CRUZ, L. S.; OLIVEIRA, T. L.; KANUNFRE, C. C.; PALUDO, K. S.; MINOZZO, B. R.; PRESTES, A. P.; WANG, M.; FERNANDES, D.; SANTOS, F. A.; MANDA, V. K.; KHAN, S. I.; ALI, Z.; MESSIAS-REASON, I. J.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Pharmacokinetics and cytotoxic study of euphol from *Euphorbia umbellata* (Bruyins) Pax latex. **Phytomed.**, v. 47, p. 105-12, 2018.
- CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 19, n. 2a, p. 403-411, 2009.
- DAOUBI, M.; MARQUEZ, N.; MAZOIR, N.; BENHARREF, A.; GALÁN, R. H.; MUÑOZ, E.; COLLADO, I. G. Isolation of new phenylacetylatingol derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from *Euphorbia officinarum* latex. **Bioorg.Medic. Chem.**, v. 15, n. 13, p.4577-4584, 2007.
- DASARI, N. P.; RAO, B. G.; RAO, E. S.; RAO, T. M. Quantification of phytochemical constituents in vitro antioxidant activity of *Synadium grantii*. **Free Radic. Antioxid.**, v. 2, n. 2, p. 68-72, 2012.

- DAWIDAR, A. A. M.; KESHK, E. M.; SAAD, H. H.; MOGIB, M. A. GC/MS analysis of sesquiterpenes in *Synadenium grantii*. **Mans. J. Chem.**, v. 38, p. 107-119, 2011.
- DEVARAJ, K. B.; GWODA, L. R.; PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemose* (L.). **Phytochem.**, v. 69, p. 647-55, 2008.
- DIMITRIJEVIĆ, S. M.; HUMER, U.; SHEHADEH, M.; RYVES, W. J.; HASSAN, N. M.; EVANS, F. J. Analysis and purification of phorbol esters using normal phase HPLC and photodiode-array detection. **J. Pharmac. Biom. Anal.**, v. 15, n. 3, p.393-401, 1996.
- DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Plant. Med.**, v. 74, n. 7, p. 699-711, 2008.
- DOUGLAS, A. G., BLUMER, M., EGLINTON, G., DOURAGHI-ZADEH, K. Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of naturally-occurring acyclic isoprenoid carboxylic acids. **Tetrah.**, v. 27, n. 6, p. 1071-1092, 1971.
- DURGAWALE, P. P.; SHUKLA, P. S.; SONTAKKE, S. D.; CHOUGULE, P. G. Differential erythrocyte agglutination pattern in normal and cancer patients with *Synadenium grantii* root (Hook f) lectin. **Ind. J. Clin. Biochem.**, v. 16, n. 1, p. 110-112, 2001.
- EVANS, F. J. Naturally occurring phorbol esters. **Boca Raton, FL: CRC press**, Cap. 1 (p. 1-31), 1986.
- EVANS, F. J. TAYLOR, S. E. Pro-inflammatory, tumour-promoting and anti-tumour diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. In **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Springer: Vienna, p. 1-99, 1983.
- FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food Biopr. Tech.**, 4: 1066-1088, 2011.
- FERNANDES, J. F. D. N.; SILVA, B. S. D. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P., MALAVASI, N. V. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., (Euphorbiaceae). **Rev. Pan-Amaz. Saúde**, v. 9, n 1, p. 59-65. 2018.
- FERNANDES, M. R. V. **Padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium guajava* L. obtidos por spray drying**. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos), Universidade de São Paulo, 2013.
- FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Documento de Áreas e Linhas de Pesquisa da Fiocruz**, v.12, 2018. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/areas_e_linhas_de_pesquisa_2018.pdf>. Acesso em: 20 de janeiro de 2020.
- FLASCHENTRÄGER, B.; FALHENHAUSEN, F. F. Über den Giftstoff im Krotonöl. II. Zur Konstitution von Krotophorbolon. **Jus. Lieb. Annal. der Chem.**, v. 514 n. 1, p. 252-260, 1934.

- FLORES, G. G. **La planta de la vida - *Synadenium grantii***. Editorial Altagraf S. A., 2010.
- FORGO, P.; RÉDEI, D.; HAJDU, Z.; SZABÓ, P.; SZABÓ, L.; HOHMANN, J. Unusual tiglane diterpenes from *Euphorbia grandicornis*. **J. Nat. Prod.**, v. 74, n. 4, p. 639-643, 2011.
- FÜRSTENBERGER, G.; HECKER, E. New highly irritant euphorbia factors from latex of *Euphorbia tirucalli* L. **Exper.**, v. 33, n. 8, p. 986-988, 1977.
- GAISFORD, S. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. E; TAYLOR, K. M. G. **Aulton delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed., cap. 23. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- GIARDINI, I. J. M. **Atividade antiproliferativa in vitro do látex, de extratos brutos e de frações obtidas a partir do *Synadenium grantii* Hook.** f. Dissertação (Mestrado em Odontologia na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica), UNICAMP-Piracicaba, 2012.
- GIDROL, X.; CHRESTIN H.; TAN H. L.; KUSHN A. Hevein, a Lectin-like Protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) Is Involved in the Coagulation of Latex. **The Amer. Soc. Biochem. Molec. Biol.**, v. 269, n. 12, p. 9278-9283, 1994.
- GIRIN, M. A.; SOMBOUN, P.; DAVIDETEVE, C.; CHABOUD, A.; RAYNAUD, J. Determination of ingenol in homoeopathic mother tinctures of Euphorbia species by high-performance liquid chromatography. **J. Chromat.**, v. 637, n. 2, p.206-208, 1993.
- GOLDRING, J. P. D. Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. In: KURIEN B., SCOFIELD R. (eds) **Electrophoretic Separation of Proteins. Methods in Molecular Biology**, v. 1855, cap. 3. New York: Humana Press, 2019.
- GOMES, E. H.; SOARES, F. E. F.; SOUZA, D. C.; LIMA, L. T.; SUFIATE, B. L.; FERREIRA, T. F.; QUEIROZ, J. H. Role of *Synadenium grantii* latex proteases in nematicidal activity on *Meloidogyne incognita* and *Panagrellus redivivus*. **Braz. J. Biol.**, v. 79, n. 4, p.665-668, 2018.
- GONÇALVES, B. S. **Avaliação do potencial do extrato natural de *Synadenium grantii* em modular a replicação do HIV-1 e a produção de citocinas em pacientes com AIDS**. 128f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, 2018.
- GONÇALVES, R. N.; BARBOSA, S. D. G.; SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases from *Canavalia ensiformis*: active and thermostable enzymes with potential of application in biotechnology. **Biotechnol. Res. Int.** Id. 3427098, 2016.
- GUISSONI, A. C. P.; SILVA, A. M. ; AGUIAR, T. P. C.; MENEZES, A. A. T.; BELTRÃO, T.; ROMANO, C. A.; SILVEIRA, A. A. Atividade larvicida do látex das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax (Euphorbiaceae) sobre *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae). **Refer. Saúde**, Faculdade Estácio de Sá, Goiânia – GO, v. 1, p. 14-19, 2018.

GULSEN, O.; EICKHOFF, T.; HENG-MOSS, T.; SHEARMAN, R.; BAXENDALE, F.; SARATH, G.; LEE, D. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm season turf grasses challenged by *Blissus occiduus*. **Arthrop. Plant Inter.**, v. 4, p. 45-55, 2010.

HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBACH, M. Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diesters Isolated from the Seed Oil of *Jatropha curcas*. **J. Nat. Prod.**, v.65, n.10, p.1434-1440, 2002.

HANCOCK, B. C.; ZOGRAFI, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 86, n. 1, p. 1-12, 1997.

HANDA, S. S.; KINGHORN, A. D.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R. Plant anticancer agents. XXII. Isolation of phorbol diester and its $\Delta^{5,6-7\beta}$ -hydroperoxide derivative from *Ostodes panicula*. **J. Nat. Prod.**, v. 46, n. 1, p. 123-126, 1983

HARTMANN, D. B.; MARIM, R. A.; DA SILVA, Y. L.; ZARDETO, G.; DE AZEVEDO SILVA, I.; DE ARRUDA MATTOS, D.; LAVERDE-JR, A. Letalidade do extrato de *Synadenium grantii* Hook. F. (Euphorbiaceae) frente a caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda, Planorbidae). **Arq. Ciênc. Vete. Zoo. UNIPAR**, v. 14, n. 1, (2011).

HASENCLEVER, L. PARANHOS, J.; COSTA, C. R.; CUNHA G.; VIEIRA, D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciênc. Saúde Col.**, v. 22, n. 8, p.2559-2569, ago. 2017.

HASSAN, E. M.; MOHAMMED, M. M.; MOHAMED, S. M. Two new phorbol-type diterpene esters from *Synadenium grantii* Hook f. leaves. **Rec. Nat. Prod.**, v. 6, n. 3, p. 255-262, 2012.

HECKER, E.; BARTSCH, H.; BRESCH, H.; GSCHWENDT, M.; HARLE, E.; KREIBICH, G.; KUBINYI, H.; SCHAIRER, H. U.; SZCZEPANSKI, CH. V.; THEILMANN, H. W. Structure and stereochemistry of the tetracyclic diterpene phorbol from *Croton tiglium*. **Tetrah. Lett.**, p. 3165, 1967.

HECKER, E.; HEIDELBERG-HANDSCHUHSHEIM; OSSWALD, H.; SCHMIDT, R. Use of non-irritating or slightly irritating and/or promoting diterpene alcohol and of derivatives there of as antineoplastic preparations. **United States Patent**, US4716179. 1987.

HECKER, E.; SCHMIDT, R. Phorbolesters: The irritants and cocarcinogens of *Croton tiglium* L. **Fortschr. Chem. Org. Naturst**, v. 31, p. 377-467, 1974.

HICKEY, T. A.; WOROBEK, S. M.; WEST, D. P.; KINGHORN, A. D. Irritant contact dermatitis in humans from phorbol and related esters. **Toxic.**, v. 19, n. 6, p. 841-850, 1981.

HOFFMANN P.; MCPHERSON G. Revision of *Wielandia* including *Blotia* and *Petalodiscus* (Phyllanthaceae; Euphorbiaceae). **Ann. Miss. Botan. Gard.**, v. 94, p. 519-553, 2007.

HÖRTER, J.B.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 46, p. 75-87, 2001.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY PHYSICAL CHEMISTRY DIVISION COMMISSION ON COLLOID AND SURFACE CHEMISTRY-IUPAC, Subcommittee on Characterization of Porous Solids: **Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report)**, Pure Appl. Chem., v. 66, n. 8, 1994.

JESUÍNO, W. R. F.; REIS, J. P.; WHITAKER, J. C. P.; CAMPOS, A.; PASTOR, M. V. D.; FILHO, V. C.; QUINTÃO, N. L. M. Effect of *Synadenium grantii* and its isolated compound on dysmenorrhea behavior model in mice. **Inflam.**, v. 27, n. 3, p. 613-620, 2018.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 4 ed., p. 777. São Paulo: Ed. Nacional, 1977.

JOSÉ, D. P.; BARTHOLOMEEUSEN, K.; CUNHA, R. D.; ABREU, C. M.; GLINSKI, J.; COSTA, T. B. F.; PETERLIN, B. M. Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. **Viol.**, v. 462, p. 328-339, 2014.

JUSTO, A. S.; CRUZ, L. S.; BELTRAME, F. L.; KANUNFRE, C. C. Cytotoxicity of apolar fractions of *Euphorbia umbellata* látex. **6th Brazilian Conference on Natural Products**, Vitória, ES, 2017.

KANUNFRE, C. C.; LEFFERS, T.; CRUZ, L. S.; LUZ, L. E.C.; CRISMA, A. R.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. *Euphorbia umbellata* bark extracts – an in vitro cytotoxic study. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 27, n. 2, p. 206-213, 2017.

KARALAI, C.; WIRIYACHITRA, P.; SORG, B.; HECKER, E. Improved Access to Highly Unsaturated Skin Irritants of the Daphnane Type from Latex of *Excoecaria oppositifolia*. **Plant. med.**, v. 60, n. 6, p. 566-568, 1994.

KINGHORN, A. D.; EVANS, F. J. A biological screen of selected species of the genus *Euphorbia* for skin irritant effects. **Plant. Med.**, v. 28, n. 8, p. 325-335, 1975.

KINGHORN, A.D. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. **J. Pharmac. Sci.**, v. 69, n.12, p. 1446-1447, 1980.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um Mercado promissor. **Rev. Ciên. Farm. Bás. Aplic.**, v. 30, n.3, p. 241-248, 2009.

KNIGHTS, B. A. Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry. **J. Chrom. Sci.**, v. 5, n. 6, p. 273-282, 1967.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemi.**, v. 72, n. 13, p. 1510-1530, 2011.

KOPACZEWSKI, W. Etude physico-chimique du latex. 2. Le Latex d'*Euphorbia helioscopia*. **Bull. de la Soc. de Chimie Biolog.**, v. 28, n. 7-9, p. 661-668, 1946a.

- KOPACZEWSKI, W. Etude physico-chimique du latex. 2. Le Latex d'*Euphorbia dendroïdes*. **Rev. Gén. Caout.**, v. 27, n. 4, p. 215-216, 1950.
- KOPACZEWSKI, W. Etude physico-chimique du latex. 3. Le Latex d'*Euphorbia resinifera*. **Bull. de la Soc. de Chimie Biolog**, n. 10-12, p.878-894, 1946b.
- KOPACZEWSKI, W. Etude physico-chimique du latex. 4. Le Latex d'*Euphorbia nereidum*. **Bull. de la Soc. de Chimie Biolog**, v. 29, n. 7-9, p. 830-832, 1947a.
- KOPACZEWSKI, W. Etude physico-chimique du latex. 5. Le Latex d'*Euphorbia tirucalli*. **Bulletin de la société de Chimie Biologique**, v. 29, n. 10-11, p. 924-926, 1947b.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nat.**, v.227, p. 680-685. 1970.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R. L.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.Ed. Porto Alegre, Florianópolis, UFRGS/UFSC, p. 250-261, 2007.
- LEMES, B. M.; NOVATSKI, A.; FERRARI, P. C.; MINOZZO, B. R.; JUSTO, A. S.; PETRY, V. E. K.; VELLOSA, J. C. R.; SABINO, S. R. F., GUNHA, J. V.; ESMERINO, L. A.; BELTRAME, F. L. Physicochemical, biological and release studies of chitosan membranes incorporated with *Euphorbia umbellata* fraction. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 28, n. 4, p. 433-443, 2018.
- LENNOX, F. G.; ELLIS, W. J. *Euphorbain*, a protease occurring in the latex of the weed *Euphorbia lathyris*. **Biochem. J.**, v. 39, p. 465-70, 1945.
- LOWEL, S.; SHIELDS, J.E. **Powder surface area and porosity**. London: Chapman & Hall. 1991.
- LOWRY, N. J.; ROSEBROUGH, A. L.; FARR, R. J. Randall Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUZ, L. E. C.; KANUNFRE, C. C.; PALUDO, K. S.; JUSTO, A.; S.; PETRY, V. K.; LEMES, B. M.; BARISON, A.; NEPEL, A.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Cytotoxic biomonitoring study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **J. Ethnoph.**, v. 183, p. 29-37, 2016.
- LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Euphorbain p, a serine protease from *Euphorbia pulcherrima*. **Phytochem.**, v. 23, p. 682-3, 1984a.
- LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Four serine proteases from the latex of *Euphorbia tirucalli*. **Can. J. Biochem. Cel.I Biol.**, v. 63, p. 1093-6, 1985b.
- LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochem.**, v. 25, p. 2279-82, 1986b

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Isolation and characterization of proteases from *Euphorbia lactea* and *Euphorbia lactea cristata*. **Phytochem.**, v. 25, p. 807-10, 1986a.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Purification and characterization of Hevain, a serine protease from *Hevea brasiliensis*. **Phytochem.**, v. 23, p. 963-4, 1984b.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Three serine proteases from the latex of *Euphorbia cyparissias*. **Phytochem.**, v. 24, p. 925-8, 1985a.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Two proteases from the latex of *Elaeophobias drupifera*. **Phytochem.**, v. 24, p. 2843-5, 1985c.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants.** 2^oed., Cambridge university press, 1997.

MACHADO, P. T. S.; SOARES, B. T. A.; CLEMENTE, A. D. Composição química e atividade biológica de *Synadenium grantii* hook (látex de tiborna). In: **VIII seminário de iniciação científica e tecnológica**, Goiás: Instituto Federal Fluminense, 2018.

MARCO, J. A.; SANZ-CERVERA, J. F.; CHECA, J.; PALOMARES, E.; FRAGA, B. M. Jatrophone and tiglane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia*. **Phytochem.**, v. 52, n. 3, p. 479-485, 1999.

MELO, P. R.; ANDRADE, L. S.; SILVA, C. B.; ARAÚJO, L. M. M.; PEREIRA, M. S.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

MENON, M.; VITHAYATHIL, P. J.; RAJU, S. M.; RAMADOSS, C. S. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook "f". **Plant Sci.**, v. 163, p. 131-9, 2002.

MINOZZO, B. R.; Lemes, B. M.; Justo, A. S.; Lara, J. E.; Petry, V. E. K.; Fernandes, D.; Belló, C.; José Velloso, J. C. R.; Campagnoli, E. B.; Nunes, O. C.; Kitagawa, R. R.; Avula, B.; Khan, I. A.; Beltrame, F. L. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). **J. Ethnoph.**, v. 191, p. 29-40, 2016.

MISHRA, A.; ANUSHA, P.; LAKSHMIKANTHA, M. R.; NAGAMANI, T. S.; MAHESH, M. Comparative studies on anticoagulant enzyme from plant latex samples, **World J. Pharmac. Res.**, v. 6, n. 13, p. 375-393, 2017.

MOREIRA, C. P. S.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A. Molluscicidal activity of *Synadenium carinatum* boiss. (Euphorbiaceae) latex against *Biomphalaria glabrata* and isolation of major compound. **Rev. Eletr. Farm.**, v. 7, p. 16-27, 2010.

MOTA, M. F.; BENFICA, P. L.; BATISTA, A. C.; MARTINS, F. S.; PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **J. Ethnoph.**, v. 139, n. 2, p. 319-329, 2012.

MOUTIM, V.; SILVA, L.G.; LOPES, M.T. P.; FERNANDES, G. W.; SALAS, C.E. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Plant Sci.**, v.142, n.2, p. 115-121, 1999.

MUCCINO, R. R., DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CCXXXIX. Elucidation of the ring D cleavage in lanostane. **J. Amer.Chem. Soc.**, v. 96, n. 2, p. 556-570, 1974.

MUNHOZ, A.; MONIZZO, B.; CRUZ, L.; OLIVEIRA, T; MACHADO, W.; PEREIRA, A.; FERNANDES, D; MANENTE, F.; VELLOSA, J; NEPEL, A; BARISON, A; BELTRAME, F. Chemical and Pharmacological Investigation of the Stem Bark of *Synadenium grantii*. **Plant Med.**, v.80, n.6, p.458-464, 2014.

NASCIMENTO, B. A.; ZANI, C. L. A simple high pressure liquid chromatographic method for the quantitative determination of the molluscicide milliamine L in the latex of *Euphorbia splendens*. **Phytochem. Anal.**, v. 10, n. 2, p. 93-96, 1999.

NEUWINGER, H. D. **African ethnobotany: poisons and drugs: chemistry, pharmacology, toxicology**. Chapman & Hall, 1996.

NEVES, G. P. D. **Obtenção, purificação e estudos de viabilidade tecnológica de frações de oleorresinas de espécies da família Burseraceae contendo triterpenos pentacíclicos**. Dissertação (Mestrado profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, de Farmanguinhos), Fiocruz, Brasil, 2018.

NIELSEN, P. E.; NISHIMURA, H.; LIANG, Y.; CALVIN, M. Steroids from *Euphorbia* and other latex-bearing plants. **Phytochem.**, v. 18, n 1, p. 103-104, 1979.

NIERO, R. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN T. M. B, CECHINEL FILHO V. **Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Univali. Itajaí. 2003.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B.; VIEIRA, M. D. S.; BENFICA, P. L.; DA CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **J. Ethnopharm.**, v. 120, n. 3, p. 474-478, 2008.

NOTHIAS-SCAGLIA, L. F., AFONSO, I. S.; RENUCCI, F.; ROUSSI, F.; TOUBOUL, D.; COSTA, J.; LITAUDON, M.; PAOLINI, J. Insights on profiling of phorbol, deoxyphorbol, ingenol and jatrophone diterpene esters by high performance liquid chromatography coupled to multiple stage mass spectrometry. **J. Chromat A.**, v. 1422, p.128-139, nov. 2015a.

NOTHIAS-SCAGLIA, L. F.; GALLARD, J. F.; DUMONTET, V.; ROUSSI, F.; COSTA, J.; IORGA, B. I.; PAOLINI, J.; LITAUDON, M. Advanced structural determination of diterpene esters using molecular modeling and NMR spectroscopy. **J. Nat. Prod.**, v. 78, n. 10, p.2423-2431, 2015b.

NOTHIAS-SCAGLIA, L. F.; RETAILLEAU, P.; PAOLINI, J.; PANNECOUQUE, C.; NEYTS, J.; DUMONTET, V.; ROUSSI, F.; LEYSSEN, P.; CONSTA, J.; LITAUDON, M. Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure

Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. **J. Nat. Prod.**, v. 77, n. 6, p.1505-1512, 2014.

NUNES, K. M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semissólida contendo tintura de *Calêndula officinalis* L.** Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, 2008.

OLIVEIRA, R. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C.; FILHO, J. P.; ARAUJO, D. M.; PAULA, J. R.; BASTOS, M. A. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. **Rev. eletr. farm.**, v. 2, n. 2, p. 143-145, 2005.

OLIVEIRA, T. L.; MUNHOZ, A. C.; LEMES, B. M.; MINOZZO, B. R.; NEPEL, A.; BARISON, A. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) látex. **J Ethnoph.I**, v. 150, n.1, p. 263-269, 2013.

OLIVIER, W.; ROWAN, M. G.; BRANCH, S. K.; MAHON, M. F.; MOLLOY, K. C. Two esters of synadenol, a new lathyrane diterpenoid, from the latex of *Synadenium compactum* (Euphorbiaceae): a crystal structure analysis. **J. Chem. Soc.**, Perkin Transactions, v.1, n. 14, p. 1831-1835, 1992.

ORTÊNCIO, W. B. **Medicina popular do Centro-Oeste**, 3^a ed. Thesaurus, 2012.

PACHECO, J. S.; SILVA-LÓPEZ, R. E. Study of the proteolytic activity of the tropical legume *Crotalaria spectabilis*. **Z. Naturforsch. C.**, v. 67, p. 495-509, 2012.

PAN, L. L.; FANG, P. L.; ZHANG, X. J.; NI, W.; LI, L.; YANG, L. M.; CHEN, C. X.; ZHENG, Y. T.; LI, C. T.; HAO, X. J.; LIU, H. Y. J. (2011). Tigliane-type diterpenoid glycosides from *Euphorbia fischeriana*. **J. Nat. Prod.**, v. 74, n. 6, p. 1508-1512, 2011.

PATIL, S. V.; BORASE, H. P.; PATIL, C. D.; SALUNKE B. K. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Latex from Few Euphorbian Plants and Their Antimicrobial Potential. **Appl. Bioch. Biotech.**, v. 67, n. 4, p.776–790, 2012.

PEREIRA, A. S. **Análise fitoquímica e avaliação do potencial antiparasitário das frações do látex de *S. umbellatum***. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde) Universidade Federal de Goiás - UFG, 2015.

PEREIRA, L. P. L. A.; DIAS, C. N.; MIRANDA, M. V.; FIRMAO, W. C. A.; RODA, C. S.; SANTOS, P. F.; BRITO, M. C. A.; ARARUNA, F. O. S.; ARARUNA, F. B.; SILVA-SOUZA, N.; COUTINHO, D. F. Molluscicidal effect of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns latex on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host snail. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo , v. 59, e85, 2017.

PETROVICK, G. F.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae: development of granules from *spray dried* powder. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 20, n. 5, p. 796-803, 2010.

PINTUS, F.; MEDDA, R.; RINALDI, A. C.; SPANÒ, D.; FLORIS, G. *Euphorbia latex* biochemistry: complex interactions in a complex environment. **Plant. Biosyst.**, v. 144, p. 381-391, 2010.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado Sólido na Indústria Farmacêutica: Uma Breve Revisão. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, n. 6, p. 2080-2112, 2015.

PREMARATNA, A.; SHDAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA, S. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex *Synadenium grantii* Hook f. **Ind. J. Biochem. Bioph.**, v. 18, p. 32-35, 1981.

PREMARATNA, A.; SHDAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA, S. Some biological properties of *Synadenium grantii* lectin. **Ind. J. Pathol. Microbiol.**, v. 27, p. 91, 1984.

QUINTÃO, N. L. M.; MEYRE-SILVA, C.; SILVA, G. F.; ANTONIALLI, C. S.; ROCHA, L. W. LUCINDA-SILVA, R. M.; MALHEIROS, A.; SOUZA, M. M.; FILHO, V. C.; BRESOLIN, T. M. B. *Aleurites moluccana* (L.) Willd. Leaves: Mechanical antinociceptive properties of a standardized dried extract and its chemical markers. **Evid. Bas. Compl. Alter. Med.**, ID. 179890, 2011.

RAJESH, R.; NATARAJU, A.; GOWDA, C. D. R.; FREY, B. M.; FREY, F. J; VISHWANATH, B. S. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Bioch.**, v. 8, p. 1313-1322, 2006.

RAJESWARI, G., MURUGAN, M., MOHAN, V. R. GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. (Linaceae). **Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.**, v. 3, n. 4, p. 301-308, 2012.

RAMANATHAN, M.; SUBRAMANIAN, L.; POONGODI, T.; MANISH, S.; MUNESWARI, E.; PAVITHRA, P.; PUGALENDRAN, S.; SOLAIRAJ, P. Formulation and Evaluation of *Nilavembu Kudineer* Capsules. **Asi. J. Phar. Res. Devel.**, v. 7, n. 1, p. 41-45, 2019.

RAMOS, A. P. S.; GABAN, L.; OLIVEIRA, S. H. P.; RAMOS, C. D. L. Antibacterial and Anti-inflammatory properties of *Synadenium umbellatum* Pax (Euphorbiaceae) 'in vitro'. **Acta Horticulturae**, n. 1198, p.1-8, 2018.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; JUCÁ, T. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A.; VIANA, C. A.; BELTRAMINI, L. M.; PEREIRA, D. A.; MORENO, F. B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **Inter. J. Biolog. Macromol.**, v. 58, p.211-219, 2013.

RAMOS, M. V.; DEMARCO, D.; SOUZA, I. C. C.; FREITAS, C. D. T. Laticifers, latex, and their role in plant defense. **Trends in Plant Sci.**, v. 24, n. 6, p.553-567, 2019.

RAO, G. H. R.; JACHIMOWICZ, A. A.; WHITE, G. Rapid separation of tumor-promoting agents, phorbol and phorbol myristate acetate by high pressure liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 96, p. 151, 1974.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Peptidases. **Essent. Lif. Sci.**, p. 1-9. 2014.

RAWLINGS, N. D; BATEMAN, A. Origins of peptidases. **Biochim.**, v. 166, p. 4-18, 2019.

ROGERIO, A. P.; CARDOSO, C. R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M. A.; CARDOSO, S. R. A.; SILVA, E. V. G.; KOYAMA, N. S.; BASEI, F. L.; SOARES, E. G.; CALIXTO, J. B.; STOWELL, S. R.; BARUFFI, M. D.; FACCIOLI, L. H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycob.**, v. 17, n. 8, p. 795-804, 2007.

ROOK, A. An unrecorded Irritant Plant, *Synadenium grantii*. *British Journal of Dermatology*, v. 77, n. 5, p. 284-284, 1965.

SANTANA, C. P. **Caracterização de extratos nebulizados de plantas medicinais por técnicas analíticas**. Trabalho de Conclusão (Graduação em Farmácia), Universidade Estadual da Paraíba, 2014.

SANTOS, F. S.; ARAUJO, A.; C.; ARAÚJO, K. T.A.; COSTA, M. S.; GOMES, J. P. Estudo das propriedades físicas do extrato da flor de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) liofilizado em diferentes formulações. IN: **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC'2018**, Maceió, 2018.

SARAIVA, M.; PORTOCARRERO, L.; VIEIRA, M.; SWICZAR, B.; WESTIN, A. T. Ingenol mebutate in the treatment of actinic keratoses: clearance rate and adverse effects. **Anais Bras. Dermat.**, v. 93, n. 4, p. 529-534, 2018.

SCHAAR, D.; GOODELL, L.; AISNER, J.; CUI, X. X.; HAN, Z. T.; CHANG, R.; MANAGO, J. A phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate for patients with relapsed/refractory malignancies. **Cancer chemoth. and pharm.**, v. 57, n. 6, p. 789-795, 2006.

SCHNEIDER, L. C. R.; SINKA, I. C.; COCKS, A. C. F. Characterisation of the flow behaviour of pharmaceutical powders using a model die shoe filling system. **Pow. Tech.**, v. 173, n.1, p. 59-71, 2007.

SEARL, T.J.; SILINSKY, E. M. Increases in acetylcholine release produced by phorbol esters are not mediated by protein kinase C at motor nerve endings. **J. Pharm.**, v. 285, p. 247–251, 1998.

SECCO, R. S. Flora da Reserva Ducke, AM, Brasil: Euphorbiaceae. Parte-I **Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p.143-168, 2005.

SEIPLE, I. B. **Daphnane, Tiglane, Ingenane and Lathyrane Diterpenes**. Baran Group Meeting, 2007.

SHANG, H. T.; DING, J. W.; YU, S. Y.; WU, T.; ZHANG, Q. L.; LIANG, F. J. Progress and challenges in the use of latent HIV-1 reactivating agents. **Acta Pharm. Sin.**, v. 36, n. 8, p. 908-916, 2015.

SHI, Q.-W.; SU, X.-H.; KIYOTA, H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. **Chem Rev**, v. 108, n. 10, p. 4295–4327. 2008.

SHIMADA, M.; UCHIKOBA, T.; YONEZAWA, H.; ARIMA, K.; KANEDA, M. Isolation and characterization of a Cucumisin-like serine protease from the latex of *Euphorbia pseudochamaesyce* Fisch. **J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.**, v. 4, p. 223-31, 2000.

SHIVAPRASAD, H. V.; RAJAIHAH, R.; FREY, B. M.; FREY, F. J.; VISHWANATH, B. S. 'Pergularain e I' - a plant cysteine protease with thrombin-like activity from *Pergularia extensa* latex. **Thromb. Res.**, v. 125, n. 3, p. e100-e105, 2010.

SHOKOOHINIA, Y.; SAJJADI, S. E.; ZOLFAGHARI, B.; CHIANESE, G.; APPENDINO, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Diterpenoid (poly) esters and a ring A-seco-phorboid from the aerial parts of *Euphorbia macroclada* Boiss. **Fitot.**, v. 81, n. 7, p. 884-890, 2010.

SIANI, A. C., NAKAMURA, M. J., TAPPIN, M. R. R., MONTEIRO, S. S., GUIMARÃES, A. C., RAMOS, M. F. S. Chemical Composition of South American Burseraceae Non-volatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. **Phytoch. anal.**, v. 23, n. 5, p. 529-539, 2012.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, p. 671-677, 2006.

SILVA S. Potencial oleaginoso da flora brasileira: Estado atual do conhecimento. Araújo (eds). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**, Recife: SBB/UFRPE, p. 234-237, 2002.

SILVA, W.; MANUWEERA, G.; KARUNARATNE, S. Insecticidal activity of *Euphorbia antiquorum* L. latex and its preliminary chemical analysis. **J. Nat. Sci. Found. Sri Lanka**, v. 36, n. 1, p. 15-23, 2008.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Protease inhibitors originated from plants: useful approach for development of new drugs. **Rev. Fitos**, v.4, n.1, p. 108-119. 2009.4:108-119, 2009.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Quím. Nova**, v.33, p.1541-1548, 2010.

SILVA-LÓPEZ, R. E.; COELHO, M. G.; SIMONE, S. G. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasit.**, v.131, p. 85-96. 2005.

SILVA-LÓPEZ, R. E.; SIMONE, S. G. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. **Exper. Paras.**, v.107, p. 173-182. 2004.

SILVA-LÓPEZ, R. E; GONÇALVES, R. N. Therapeutic proteases from plants: biopharmaceuticals with multiple applications. **J Appl Biotech. Bioeng.** v. 6, n. 2, p. 101-109, 2019.

SILVERSTEIN, R.; M., BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**, 4 ed. New York: Wiley 1981.

SOFIATI, F. T. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* h.b.k. (Polygonaceae) e *Synadenium carinatum* boiss (Euphorbiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UNESP, SP, 2009.

SOLOMON, J. J.; VAN DUUREN, B. L.; TSENG, S. S. Chemical ionization mass spectrometry of the tumor promoter related 4 α -phorbol esters. **Biom. mass spectr.**, v. 5, n. 2, p. 164-169, 1978.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. O.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 289-326. 2010.

SOUZA, D. P.; FREITAS, C. D.; PEREIRA, D. A.; NOGUEIRA, F. C.; SILVA, F. D.; SALAS, C. E.; RAMOS, M. V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Plant.**, v. 234, n. 1, p. 183-193, 2011.

SOUZA, M. A.; PEREIRA, F. A.; CARDOSO, C. R. B.; SILVA, A. G.; SILVA, E. G.; ANDRADE, L. R.; PENA, J. D. O.; LANZA, H.; CARDOSO, R. A. Isolation and Partial Characterization of a D-Galactose-Binding Lectin from the Latex of *Synadenium carinatum*. **Braz. Arch. of Biol. and Tech.**, v. 18, n. 5, p. 705-712, 2005.

SPOERKE, D. G.; MONTANIO, C. D.; RUMACK, B. H. Pediatric exposure to the houseplant *Synadenium grantii*. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 28, p. 283-4, 1985.

STRAIR, R. K.; SCHAAR, D.; GOODELL, L.; AISNER, J.; CHIN, K; V., EID, J.; RABSON, A. B. Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies: preliminary results from a phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, n. 8, p. 2512-2518, 2002.

SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W. J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.; INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J. M.; DANNENBERG, A. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 34, p. 21875-21882, 1998.

SYTWALA, S.; GRÑTHER, F.; MELZIG, M. F. Lysozyme-and chitinase activity in latex bearing plants of genus *Euphorbia*—A contribution to plant defense mechanism. **Plant Physiol. Bioch.**, v. 95, p. 35-40, 2015.

THE PLANT LIST. Version 1.1, 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/>>. Acesso em 29 de jan. 2020.

THRELFALL, T. L. Analysis of Organic Polymorphs: A Review. **Anal.**, v. 120, p. 2435-2460, 1995.

TRINEL, M.; JULLIAN, V.; LAMER, A. C. L.; MEJIA, I M.K.; CASTILLO, D.; CABANILLAS, B. J.; FABRE, N. Profiling of *Hura crepitans* L. latex by ultra-high-performance liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionisation linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. **Phytoch. Anal.**, v. 29, n. 6, p.627-638, 2018.

UNNIKRISHNAN, M. K. DESAI, V. B.; GURUSWAMY, M. N. Cardiovascular action of ethanolic extract of latex of *Synadenium grantii*. **Phitot.**, v. 59, n. 4, p. 343-347. 1988.

UNNIKRISHNAN, M. K. DESAI, V. B.; GURUSWAMY, M. N. Hypothermic activity of the ethanolic extract of the latex of *Synadenium grantii*. **Phitot.** v. 58, n. 4, p. 277-279, 1987.

USHA-RANI, P.; JYOTHSNA, Y. Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense. **Acta. Physiol. Plant**, n. 32, p. 695-701, 2010.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. Pharmacopoeia & National Formulary, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville: **Unit. States**, v. 41, NF 36, 2018.

UZABAKILIHO, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochem.**, v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987.

VALADAO, A. L.; PEZZUTO, P.; SILVA, V. A. O.; GONCALVES, B. S.; ROSSI, A. D.; DELVECCHIO, R. C.; SIANI, A. C.; TOSTES, J. B. F.; TROVÓ, M.; DAMASCO, P.; GONÇALVES, G.; REIS, R. M.; AGUIAR, R. S.; BENTO, C. A. M.; TANURI, A. Reactivation of latent HIV-1 in vitro using an alcoholic extract from *Euphorbia umbellata* (Euphorbiaceae) latex. **PloS one**, v.13, p. 1-12, 2018.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos, **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 43, p. 631-638, 2007.

VANDOOREN, J.; GEURTS, N.; MARTENS, E.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nat. Methods.**, v. 10, n. 3, p. 211-20, 2013.

VANDRESEN, J. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação na formação e pós-transplante de mudas de cinco espécies arbóreas nativas do Sul do Brasil. **Acta bot. Bras**, v. 21, n. 4, p. 753-65, 2007.

VASAS, A.; HOHMANN, J. *Euphorbia* diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008-2012). **Chem. Rev.**, v. 114, n. 17, p. 8579-8612, 2014.

VASAS, A.; RÉDEI, D.; CSUPOR, D.; MOLNÁR, J.; HOHMANN, J. Diterpenes from European *Euphorbia* species serving as prototypes for natural product based drug discovery. **Eur. J. Org. Chem**, v. 27, p. 5115–5130, 2012.

VILA JATO, J. L. **Tecnología farmacéutica: formas farmacéuticas**. v. 1-2, Madrid: Editorial Síntesis, 2001.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**: Springer Science & Business Media, 1996.

WAHLER, D.; GRONOVER, C. S; RICHTER, C.; FOUQU, F; TWYMAN, R. M.; MOERSCHBACHER, B. M.; FISCHER, R.; MUTH, J.; PRÜFER, D. Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. **Plant Physiol.**, v. 151, p. 334-346, 2009.

WANDERLEY, L. F.; SOARES, A. M. S.; SILVA, C. R. E.; FIGUEIREDO, I. M.; FERREIRA, A. T. A S.; PERALES, J.; MOTA, H. R. O.; OLIVEIRA, J. T. A.; COSTA

JUNIOR, L. M. A cysteine protease from the latex of *Ficus benjamina* has in vitro anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 27, n. 4, p. 473-480, 2018.

WANG, R.; LI, J. Y.; QI, H. Y.; SH, Y. P. Two new tiglane diterpene esters from the flower buds of *Daphne genkwa*. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 15, n. 5, p.502-506, 2013.

WEBSTER G. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Ann. Miss. Bot. Gard.**, v. 81, p. 33-144, 1994.

WEBSTER, G. L. Irritant plants in the spurge family (Euphorbiaceae). **Clinic. dermat.**, v. 4, n. 2, p. 36-45, 1986.

WILLART, J. F.; DESCAMPS, M. Solid State Amorphization of Pharmaceuticals. **Mol. Pharmac.**, v. 5-6, p. 905-920, 2008.

WITITSUWANNAKUL, R.; PASITKUL, P.; JEWTRAGOON, P.; WITITSUWANNAKUL, D. Hevea latex lectin binding protein in C-serum as an anti-latex coagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation. **Phytochem.**, v. 69, n. 3, p. 656–662, 2008.

WOOD, D. F.; CORNISH, K. Microstructure of purified rubber particles. **Inter. J. Plan. Sci.**, v. 161, n. 3, p. 435-445, 2000.

WU, C.; ARMSTRONG, B.; VLACHOS, N. Characterization of Powder Flowability for Die Filling. **Part. Sci. Tech.** v. 30, p. 378 – 389, 2012.

YADAV, S. C.; PANDE, M.; JAGANNADHAM, M. V. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. **Phytochem.**, v. 67, p. 1414-26, 2006.

YORK, P. Delineamento de formas farmacêuticas. In: AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed., cap. 1. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

YU, W.; MUTEKI, K.; LIN, Z.; KIM, G. Prediction of Bulk Powder Flow Performance Using Comprehensive Particle Size and Particle Shape Distributions. **J. Pharm. Sci.** v. 100, n. 1, jan., 2011.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**. v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quím. Nova**. v.21, p. 787-793, 1998.

ZHANG, G. G. Z.; LAWA, D.; SCHMITTB, E. A.; QIU, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, n. 1, p. 371-90, 2004.

ZHANG, X.; CAMBRAI, A.; MIESCH, M.; ROUSSI, S.; RAUL, F.; AOUDE-WERNER, D.; MARCHIONI, E. Separation of Δ^5 - and Δ^7 -Phytosterols by Adsorption

Chromatography and Semipreparative Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography for quantitative analysis of phytosterols in foods. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n. 4, p. 1196-1202, 2006.

ZIMMERMANN, M. **Caracterização da membrana de látex da *Hevea brasiliensis* e reação tecidual após implante no subcutâneo de equinos e bovinos.** Tese (Doutorado em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia), Universidade Federal de Goiás, 2012.