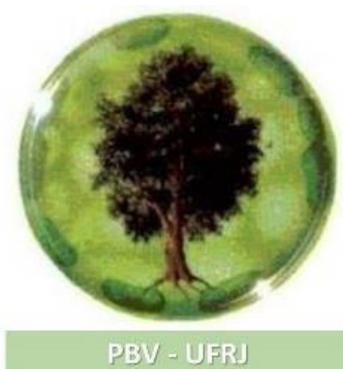


Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal – PBV



Análises químicas e biológicas de amostras comerciais de Leite de Janaguba/Janaúba na busca da identidade botânica relacionada ao látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae)

Brendo Araujo Gomes

Rio de Janeiro

2021

Brendo Araujo Gomes

Análises químicas e biológicas de amostras comerciais de Leite de Janaguba/Janaúba na busca da identidade botânica relacionada ao látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos como requisito final para a obtenção do grau de mestre na área de pesquisa e desenvolvimento em Biotecnologia Vegetal.

**Orientadoras: Profa. Dra. Suzana Guimarães Leitão
Profa. Dra. Rosineide Costa Simas**

Rio de Janeiro

2021

CIP - Catalogação na Publicação

G633a Gomes, Brendo Araujo

 Análises químicas e biológicas de amostras comerciais de Leite de Janaguba/Janaúba na busca da identidade botânica relacionada ao látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) / Brendo Araujo Gomes. -- Rio de Janeiro, 2021.

 106 f.

 Orientadora: Suzana Guimarães Leitão. Coorientadora: Rosineide Costa Simas. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2021.

 1. Terpenoides. 2. Métodos instrumentais. 3. Análises físico-químicas. 4. Quimiometria. 5. Parametrização. I. Leitão, Suzana Guimarães, orient. II. Simas, Rosineide Costa, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Análises químicas e biológicas de amostras comerciais de Leite de Janaguba/Janaúba na busca da identidade botânica relacionada ao látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae)

Profa. Dra. Suzana Guimarães Leitão
(Orientadora)

Profa. Dra. Rosineide Costa Simas
(Orientadora)

Prof. Dr. Celso L. S. Lage
(Titular interno da Banca Examinadora)

Profa. Dr. Alane B. Vermelho
(Suplente interno da Banca Examinadora)

Prof. Dr. Danilo R. de Oliveira
(Titular externo da Banca Examinadora)

Dr. Daniel L. R. Simas
(Suplente externo da Banca Examinadora)

Prof. Dr. Flávio L. Beltrame
(Titular externo da Banca Examinado)

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 2021.

Dedico este trabalho a Ciência e a todos aqueles que a praticam,
pois mesmo frente ao pouco reconhecimento, banalização
e duros golpes permanecem de pé desenvolvendo
suas pesquisas para o inteiro benefício
de tudo e todos.

Agradecimentos

Neste presente trabalho, gostaria de deixar explícito os meus sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram não só com a elaboração do estudo, mas também em minha formação, auxiliando no meu crescimento.

Agradeço aos meus pais Suely, Álvaro e Lourival que me concederam conselhos e ensinamentos, assim como zelaram pelo meu bem-estar e criação.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Suzana Leitão, a Tia Su, pela chance de fazer parte de sua incrível equipe, além disso pela paciência, auxílio e ensinamentos ao longo de minha jornada no mestrado.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Rosineide Simas, a Tia Rosy, por ser mãe, amiga, chefe, líder e Professora. Me aconselhando, guiando e zelando por mim nos âmbitos pessoal e profissional.

Agradeço aos meus amigos da UFRJ: do LabFitoFar Mariana Campos, Thamirys Fonseca, Yasmim Barros, Diego Ramalho e Rafa Carvalho; do LabCCC Carla Leal, Simony Carvalho e Isabel Rangel; da Central Analítica da Faculdade de Farmácia Aline Soares, Jonatas Milato e Marcos Toledo, pela companhia, bons momentos e memórias, e disposição em ensinar e ajudar no que fosse necessário.

Agradeço aos meus colaboradores Profa. Dra. Gilda Leitão, Profa. Dra. Carla Holandino, Profa. Me. Michelle Nonato e Prof. Dr. Boniek Vaz pelas ideias, aconselhamentos, auxílio em tomadas de decisão e treinamento técnico teórico-prático.

Agradeço ao meu eterno orientador Prof. Dr. Rodrigo Leo. Como não elaborei uma monografia em minha graduação, não tive a chance de registrar o meu agradecimento ao “Pai” Rodrigo. Há de se saber que não estaria onde estou, não chegaria aonde cheguei, sem o auxílio dele. Agradeço o tanto que cuidou/a, zelou/a, aconselhou/a, ajudou/a, defendeu/e e ensinou/a desde o início de minha jornada acadêmica.

Agradeço aos Professores Dr. Celso Lage, Dr. Leopoldo Baratto, Dr. Danilo Oliveira, Dr. Flávio Beltrame, Dra. Alane Vermelho e ao Pesquisador Daniel Simas por comporem minhas bancas de defesa de projeto e defesa da dissertação contribuindo com ideias e críticas auxiliando no melhoramento do trabalho final.

Agradeço aos órgãos de fomento CNPQ, CAPES e FAPERJ pela verba disponibilizada em forma de bolsa de estudos e pesquisa.

“Não permaneça sempre na estrada principal, indo apenas aonde os outros já foram, seguindo um atrás do outro como um rebanho de ovelhas. Ocasionalmente, deixe a trilha já traçada e mergulhe na floresta. Cada vez que você fizer isso, certamente encontrará algo que nunca viu antes. Pode ser uma coisa simples, mas não a ignore. Explore em sua volta; uma descoberta leva a outra e, antes que você perceba, terá algo com o qual vale a pena ocupar sua mente. Todas as grandes descobertas são frutos do pensamento.”

[Artigo na National Geographic, 1914]

— Alexander Graham Bell

“A exigência délfica “conhece-te a ti mesmo”, significava:

“reconhece que és um homem, não um Deus!”,

ela vale também para o homem, na época da ciência,

pois serve de advertência frente a todas as ilusões

de dominação e de domínio.”

Gadamer, Hans-Georg (1983).

Resumo

O "leite de Janaguba/Janaúba" é uma preparação popular feita a partir da diluição do látex de algumas espécies vegetais em água e comercializado para o tratamento de câncer. Até o momento a origem botânica desse látex, a eficácia e o potencial tóxico dessa prática não estão bem definidos. Essa preparação popular pode estar associada, principalmente, à *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) e *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae). Enquanto *H. drasticus* não se apresenta como uma espécie potencialmente tóxica, *E. umbellata* contém em sua composição diterpenos (ésteres de forbol) potencialmente danosas à saúde. Dessa forma, objetivou-se determinar se as amostras de "leite de Janaguba/Janaúba" comercializadas no Brasil possuem o látex de *E. umbellata* em sua composição. Amostras comerciais foram adquiridas na *internet* e amostras de referência foram confeccionadas com o látex de *E. umbellata* coletado em Niterói (RJ). Todas as amostras foram submetidas a métodos de caracterização físico-química, DI-MS, UV-VIS e ATR-FTIR, e os resultados obtidos foram tratados por quimiometria. As amostras comerciais apresentaram grande variação em relação aos volumes iniciais, embalagem dos produtos e rotulagem, que foi ausente na maioria das amostras. Quanto ao perfil químico e os aspectos físico-químicos, as amostras da região Sudeste e referências apresentaram grande similaridade, enquanto as demais amostras apresentaram maior similaridade entre si de acordo com a região. Aspectos visuais, físico-químicos e perfis químicos das amostras enfatizam a heterogeneidade entre os "leites de Janaguba/Janaúba" que estão sendo comercializados em diferentes estados. Vinte e cinco íons: 279; 297; 313; 338; 363; 409; 414; 426; 428; 437; 444; 449; 468; 490; 534; 562; 593; 612; 614; 619; 627; 640; 649; 685; 749 e dezesseis substâncias: tetratetracontano; tetracontano; nonacosano; tricosanona; heneicosano; lanosterol; tirucalol; fernenol; eufol; acetato de lupeol; cicloartenol; taraxasterol; ciclolaudenol; lupeol; friedelin-3 β -ol; friedelina foram determinados como marcadores do látex em amostras de referência de *E. umbellata*. Ensaio biológico utilizando o método MTT contra a linha de tumor de câncer de mama triplo-negativo MDA-MD-231 mostraram um grande potencial citotóxico *in vitro* de amostras comerciais e de referência. Os resultados sugerem que *E. umbellata* é a origem botânica do látex

utilizado nas amostras da região Sudeste, indicando que estas preparações podem ser potencialmente nocivas, porém há necessidade de maiores estudos sobre a presença, concentração e atividades das substâncias associadas a este risco.

Palavras-chave: Terpenoides, Métodos Instrumentais, Análises Físico-químicas, Quimiometria, Parametrização.

Abstract

"Janaguba/Janaúba's milk" is a popular preparation made from the dilution of plant latex in water and commercialized for cancer treatment. Until now the botanical origin of this latex, the efficacy, and the toxic potential of such practice is not well defined. This popular preparation may be associated with *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) and *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae). While *H. drasticus* does not present itself as a potentially toxic species, *E. umbellata* contains in its composition diterpenes (phorbol esters) that are potentially harmful to health. The aim is to determine if the samples of "Janaguba/Janaúba's milk" commercialized in Brazil have *E. umbellata* latex in their composition. Commercial samples were purchased on the internet and referential samples were made with *E. umbellata* latex collected on Niterói (RJ). All the samples were subjected to physicochemical characterization tests, DI-MS, UV-VIS, and ATR-FTIR, and the outcome data were treated by chemometrics. The commercial samples presented a large variation regarding initial volumes, product packaging, and labeling, which was absent in most of the samples. About the chemical profile and physicochemical aspects, samples of the Southeast region and references presented great similarity, while the other samples showed greater similarity to each other according to the region. Visual and physical-chemical aspects and chemical profiles of the samples emphasized the heterogeneity between the samples of "Janaguba/Janaúba's milk" that are being commercialized in different states. In addition to *E. umbellata*, the data showed that two other species are possibly being used as raw material in the product commercialized. Visual and physicochemical aspects and chemical profiles of the samples emphasized the heterogeneity among the "Janaguba/Janaúba's milk"

that are being commercialized in different states. Twenty-five ions: 279; 297; 313; 338; 363; 409; 414; 426; 428; 437; 444; 449; 468; 490; 534; 562; 593; 612; 614; 619; 627; 640; 649; 685; 749 and sixteen substances: tetratetracontane; tetracontane; nonacosane; tricosanone; heneicosane; lanosterol; tirucalol; fernenol; eufol; lupeol acetate; cycloartenol; taraxasterol; cyclolaudenol; lupeol; friedelin-3 β -ol; friedelin were determined as latex markers in *E. umbellata* reference samples. Biological assays using the MTT method against the MDA-MD-231 triple-negative breast cancer tumor line showed a great in vitro cytotoxic potential of commercial and reference samples. The results suggested that *E. umbellata* is the botanical origin of the latex used in the samples from the Southeast region, indicating the risk of ingesting a potentially harmful preparation, however, there is a need for further studies on the presence, concentration, and activities of the substances associated with this risk.

Keywords: Terpenoids, Instrumental Methods, Physicochemical Analysis, Chemometric, Parametrization.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ACN: acetonitrila

ATR-FTIR: *attenuated total reflectance - fourier transform infrared*

BuOH: butanol

CCP: cromatografia em camada preparativa

CH₂Cl₂: diclorometano

CHCl₃: Clorofórmio

DAD: *diode array detector*

DI-MS: *direct injection – mass spectrometry*

E. umbellata: *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

ESI: *electrospray ionization*

EtOAc: Acetato de etila

EtOH: etanol

GC-MS: *gas chromatography – mass spectrometry*

HEX: hexano

LACA: amostra do Acre

LACB: amostra do Acre

LCEA: amostra do Ceará

LCEB: amostra do Ceará

LEUFS: amostra de referência confeccionada com látex de *E. umbellata* durante o período frio e seco.

LEUQU: amostra de referência confeccionada com látex de *E. umbellata* durante o período quente e úmido.

LMA: amostra do Maranhão

LPA: amostra do Pará

LRJ: amostra do Rio de Janeiro

LSPA: amostra de São Paulo

LSPB: amostra de São Paulo

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sal de Tetrázólio)

MeOH: metanol

PCA: *principal component analysis*

UV-VIS: ultravioleta – visível

Lista de Figuras

Figura 1: Características organofráficas de *Euphorbia umbellata*. I: hábito; II: detalhe do ramo e inflorescência; III: detalhe da inflorescência; IV-V: detalhes das flores - estruturas reprodutivas (androceu e gineceu). Fotos: Maurício Mercadante – Flickr.

Figura 2: Representação esquemática das rotas biossintéticas de terpenoides pelas vias do mevalonato (I) e do DXP (II). Representação esquemática das estruturas base dos terpenoides (III). *HMG-CoA: hidroximetilglutaril-coenzima A; DXP: fosfato de desoxilulose; IPP: pirofosfato de isopentenilo; GPP: pirofosfato de geranilo; FPP: pirofosfato de farnesilo; GGPP: pirofosfato de geranilogeranilo. Figura adaptada de Husnu *et al.* (2007) *apud* Berger (2007).

Figura 3: Triterpenos encontrados no látex de *E. umbellata*. Estrutura dos triterpenos: eufol (I); tirucalol (II); lanosterol (III); cicloartenol (IV); taraxasterol (V); lupeol (VI); friedelina (VII); 3 β -friedelinol (VIII); germanicol (IX); ciclolanost-7-en-3-ol (X).

Figura 4: Ésteres de forbol encontrados no látex de *E. umbellata*. Esqueleto base tigiano dos ésteres de forbol (I) e possíveis estruturas formadas a partir de reações nas hidroxilas mais desprotegidas (II). Estrutura dos forbóis: 12-O-tigloil-4-desoxiforbol-13-isobutirato (III); 12-desoxiforbol-13-(2-metilpropionato) (IV); 12,13,20-triacetato de forbol (V); 4-desoxiforbol-12,13-ditiglato (VI); 3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato (VII). 3-desoxi-3,16-dihidroxi-12-desoxiforbol-3,13,16,20-tetraacetato (VIII).

Figura 5: Mapa da área de coleta. Morro das Andorinhas, Itaipu, Niterói – RJ. Georreferenciamento 22°58'17.5"S / 43°02'34.8"W. Fonte: Google Earth.

Figura 6: Exsicatas de *E. umbellata* depositadas no Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta sob o número de tombo HUNI6092.

Figura 7: Processo de coleta do látex de *E. umbellata* a partir de excisões nos órgãos caule e folha.

Figura 8: Cromatograma em Camada Preparativa após revelação com vanilina sulfúrica do extrato de látex bruto de *E. umbellata*. Eluição: Clorofórmio:Éter 9,5:0,5.

Figura 9: Espectros de massas, em resolução unitária, obtidos por injeção direta das amostras de referência em ionização por *electrospray* (ESI), no modo positivo. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca.

Figura 10: Espectro de perfil total no ultravioleta das amostras de referência: LEUQU: Látex de *E. umbellata* coletado na estação quente úmida. LEUFS: Látex de *E. umbellata* coletado na estação fria e seca.

Figura 11: Espectros de perfil total no infravermelho das amostras de referência: LEUQU: Látex de *E. umbellata* coletado na estação quente úmida. LEUFS: Látex de *E. umbellata* coletado na estação fria e seca.

Figura 12: Amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” obtidas para o estudo. LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA e LSPB: amostras de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA e LCEB: amostras do Ceará; LACA e LACB: amostras do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 13: Espectros de massas, em resolução unitária, obtidos por injeção direta das amostras comerciais e das amostras de referência em ionização por *electrospray* (ESI), no modo positivo. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 14: Diagramas de Venn dos 100 íons de maior intensidade observados nos espectros de massas, em resolução unitária, obtidos por injeção direta em *electrospray (ESI)* no modo positivo das amostras comerciais da região sudeste (I), nordeste (II), norte (III), das amostras de referência (IV) e entre as amostras comerciais e de referência (V). LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 15: *Scores plot* por PCA dos agrupamentos das amostras comerciais e de referência, por similaridade estatística dos íons mais intensos presentes nas amostras, em ESI positivo. LRJ: amostra de origem desconhecida; LSPA: primeira amostra de São Paulo; LSPB: segunda amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: primeira amostra do Ceará; LCEB: segunda amostra do Ceará; LACA: primeira amostra do Acre; LACB: segunda amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão. As elipses foram elaboradas manualmente apenas para facilitar a visualização do agrupamento das amostras.

Figura 16: Espectro de massas por injeção direta dos extratos do látex de *E. umbellata* produzidos em diferentes solventes. H₂O = água; MeOH = metanol; EtOH = etanol; ACN = acetonitrila; DCM = diclorometano; CH₂Cl₃ = clorofórmio.

Figura 17: Diagramas de *Venn* da distribuição dos 1000 íons mais intensos do látex de *E. umbellata* nos diferentes solventes extratores de forças eluotrópicas: alta (I), média (II), baixa (III) e reunidas (IV). As caixas apresentam os íons mais significativos (grupo: região Sudeste e referências) descritos no item 4.2 (Quadro 4).

Figura 18: Cromatograma por GC-MS da fração (banda 1) obtida por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

Figura 19: Alcanos tentativamente identificados através de análises por GC-MS e comparações com as bibliotecas NIST 8 e WILEY 7. Substâncias: tetratetracontano (I); tetracontano (II); nonacosano (III); tricosanona (IV); heneicosano (V).

Figura 20: Cromatograma por GC-MS da fração (banda 5) obtida por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

Figura 21: Triterpenos tentativamente identificados através de análises por GC-MS e comparações com as bibliotecas NIST 8 e WILEY 7. Substâncias: lanosterol (I); tirucalol (II); fernenol (III); eufol (IV); acetato de lupeol (V); cicloartenol (VI); taraxasterol (VII); ciclolaudenol (VIII); lupeol (IX); friedelin-3 β -ol (X); friedelina (XI).

Figuras 22: Espectro de perfil total no ultravioleta das amostras de referência (I): LEUQU, Látex de *E. umbellata* coletado na estação quente úmida. LEUFS: Látex de *E. umbellata* coletado na estação fria e seca; do Sudeste (II): LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra do São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; do Nordeste (III): LMA: amostra do Maranhão; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; do Norte (IV): LPA: amostra do Pará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre.

Figuras 23: Espectros de perfil total no infravermelho das amostras de referência (I): LEUQU, Látex de *E. umbellata* coletado na estação quente úmida. LEUFS: Látex de *E. umbellata* coletado na estação fria e seca; do Sudeste (II): LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra do São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; do Nordeste (III): LMA: amostra do Maranhão; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; do Norte (IV): LPA: amostra do Pará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre.

Figura 24: Scores plot por PCA dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados tratados obtidos por UV-VIS. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 25: Gráficos de loadings dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados tratados obtidos por UV-DAD. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex

de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura. 26: *Scores plot* por PCA dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados tratados obtidos por ATR-FTIR. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura. 27: Gráfico de *loadings* dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados tratados obtidos por ATR-FTIR. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 28: *Scores plot* por PCA dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados brutos obtidos por análises físico-químicas. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 29: Gráfico de *loadings* dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados brutos obtidos por análises físico-químicas. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 30: *Scores plot* por PCA dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados brutos obtidos por DI-MS; UV-DAD; ATR-FTIR e análises físico-químicos. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 31: Gráfico de *loadings* dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados brutos obtidos por DI-MS; UV-VIS; ATR-FTIR e análises físico-químicos. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Figura 32: Atividade citotóxica frente à linhagem MDA-MB-231 das amostras comerciais e referência com concentrações variando de 6,75-3200 µg/mL. CT= controle positivo de viabilidade (não-estimulado).

Figura 33: *Zoom* da faixa de concentração selecionada para avaliação atividade citotóxica frente a linhagem MDA-MB-231 das amostras comerciais e referência. Concentrações variando de 12,5-400 µg/mL. CT= controle positivo de viabilidade (não-estimulado).

Lista de Quadros

Quadro 1: Características físico-químicas das amostras de referência adquiridas de acordo com os métodos descritos no item 3.2.3.

Quadro 2: Solubilidade das amostras de referência em diferentes solventes (diferentes graus de polaridade).

Quadro 3: Análise das embalagens e rotulagens das amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” adquiridas para o estudo.

Quadro 4: Íons mais significativos (marcadores) dos três grandes grupos observados (*Vip score: top 25*).

Quadro 5: Massa final dos extratos do látex de *E. umbellata* utilizando diferentes solventes. Valores de força eluotrópica segundo Broekaert (2015).

Quadro 6: Substâncias anotadas por GC-MS da fração (banda 1) obtidas por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

Quadro 7: Substâncias anotadas por GC-MS da fração (banda 5) obtidas por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

Quadro 8: Características físico-químicas das amostras de “leite de Janaguba/Janaúba” adquiridas de acordo com os métodos descritos no item 3.2.3.

Quadro 9: Solubilidade das amostras de “leite de Janaguba/Janaúba” em etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), acetonitrila (ACN), acetato de etila (AcOEt), diclorometano (CHCl₂), clorofórmio (CHCl₃) e hexano (HEX) segundo os métodos descritos pela Farmacopeia Brasileira. Volumes aproximados de solvente em mililitros por grama de substância: - = insolúvel (mais de 10.000 partes); + = pouco solúvel (de 100 a 1.000 partes); ++ = solúvel (de 10 a 30 partes); +++ = muito solúvel (menos de 1 parte).

Quadro 10: IC₅₀ das amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” e amostras de referência frente à linhagem MDA-MB-231.

Sumário

1. Introdução	20
1.1. Produtos naturais e preparações populares	20
1.2. A origem botânica do “Leite de Janaguba/Janaúba”	21
1.3. A família Euphorbiaceae Juss e o gênero <i>Euphorbia</i> L.....	22
1.4. <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns: aspectos botânicos e usos medicinais	23
1.5. O látex de <i>Euphorbia umbellata</i> : terpenoides	25
1.6. Métodos para a parametrização e caracterização de látex utilizados em preparações populares	29
1.7. Justificativa	33
2. Objetivos	34
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. Materiais e métodos	34
3.1. Coleta de material vegetativo, fértil e látex de <i>E. umbellata</i>	34
3.2. Caracterização das amostras de referência por métodos espectrométricos, espectroscópicos e análises físico-químicas.....	37
3.2.1. Análises por injeção direta em espectrômetro de massas (DI- MS).....	37
3.2.2. Análises por ultravioleta (UV-VIS) e infravermelho (ATR-FTIR). 37	
3.2.3. Análises físico-químicas	38
3.4. Obtenção e análise de amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba”	39
3.5. Cálculos matemáticos e quimiométricos.....	40
3.6. Escolha de solventes para a confecção de extrato a partir das amostras de referência.....	41
3.7. Cromatografia em camada preparativa (CCP) dos extratos das amostras de referência.....	41
3.8. Cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) das frações obtidas por CCP.....	43
3.9. Avaliação da ação proliferativa e/ou citotóxica das amostras comerciais e de referência	43

4. Resultados e Discussão	44
4.1. Caracterização das amostras de referência por métodos espectrométricos, espectroscópicos e análises físico-químicas.....	44
4.2. Avaliação das embalagens das preparações comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba”	48
4.3. Comparação entre os resultados obtidos por DI-MS das amostras comerciais com as amostras de referência.....	50
4.4. Determinação dos íons marcadores das amostras de referência a partir dos resultados de DI-MS e cálculos quimiométricos	53
4.5. Escolha de solventes para a confecção de extratos a partir das amostras de referência.....	55
4.6. Cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) das frações obtidas por CCP.....	58
4.7. Comparação entre os resultados obtidos por métodos espectroscópicos das amostras comerciais com as amostras de referência.....	66
4.8. Comparação entre os resultados obtidos pelas análises físico-químicas das amostras comerciais com as amostras de referência	74
4.9. Comparação das amostras de referência com as amostras comerciais a partir de DI-MS, UV-VIS, ATR-FTIR e análises físico-químicas	80
4.10. Avaliação da ação proliferativa e/ou citotóxica das amostras comerciais e de referência	84
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	87
6. Referências bibliográficas	89

1. Introdução

1.1. Produtos naturais e preparações populares

No Brasil, estima-se que cerca de 25.000 plantas sejam utilizadas em preparações da medicina tradicional (Brasil, Ministério da Saúde – PNPMF, 2019). Entretanto, apenas uma pequena parcela dessas plantas foi estudada quanto à composição química e, um número menor ainda, quanto às propriedades biológicas (Passos *et al.*, 2018). Dessa forma, diversas preparações que utilizam partes de plantas ditas medicinais são comercializadas de forma desordenada (Soares *et al.*, 2016). Ou seja, não há nenhuma garantia de segurança e eficácia destes produtos. O uso descuidado pode vir a originar diversos casos de intoxicação seguido de agravos e até mesmo morte (Stelmann *et al.*, 1989; Soares *et al.*, 2016).

No Brasil, são encontradas preparações populares intituladas como garrafadas, de forma bastante difundida. Estas são comercializadas tipicamente em feiras livres e mercados populares para o tratamento de diversas enfermidades, assim como mazelas de cunho místico como falta de prosperidade e/ou proteção (Passos *et al.*, 2018). As garrafadas são soluções preparadas com bebidas alcoólicas (vinho ou cachaça), água ou até mesmo produtos de origem animal como o mel, além da mistura de partes de plantas (qualquer órgão vegetativo ou reprodutivo) ditas medicinais (Dantas *et al.*, 2008; Passos *et al.*, 2018).

A produção e comércio desses produtos não atendem às condições mínimas das práticas adequadas de identificação, preparo, transporte, armazenamento e garantia de eficácia, já que não é previsto na legislação a caracterização e controle de qualidade dessas preparações, tornando o acesso a produtos que não atendam a critérios adequados ao uso, facilitado e, com isso, expondo a população a grandes riscos de saúde (Simões *et al.*, 2001; Souza & Maciel, 2010; Soares *et al.*, 2016; Passos *et al.*, 2018).

Em sua revisão sobre a disseminação cultural das garrafadas no Brasil, Passos *et al.* (2018) destacaram o estudo de Oliveira *et al.* (2013) que utilizou uma preparação popular conhecida como “leite de Janaguba/Janaúba” em ensaios *in vivo* na investigação de uma possível atividade antitumoral. Este estudo chamou atenção, segundo os autores, por ser um dos poucos trabalhos em que garrafadas são utilizadas em ensaios biológicos, principalmente em ensaios *in vivo*. Além disso, o

trabalho de Passos *et al.* (2018) constatou a relevância dessa preparação popular dado o número de informações disponíveis na *internet* e o quanto estas foram acessadas. Assim, torna-se evidente o quanto a preparação “leite de Janaguba/Janaúba” é difundida, e por isso necessita de mais estudos, já que não há maiores relatos na literatura sobre seu perfil químico, eficácia e principalmente sobre a identidade botânica da(s) espécie(s) utilizadas para confecção dos preparados.

1.2. A origem botânica do “Leite de Janaguba/Janaúba”

Segundo Ortêncio (1997) entende-se por “Leite de Janaguba/Janaúba” a preparação popular originada da diluição de 18 gotas de látex em um litro de água, que deve ser ingerida na dose de um copo (200 mL) três vezes ao dia. Esse produto é comercializado como remédio frente a vermes intestinais, febre, menstruações irregulares, infertilidade feminina, sintomas da menopausa, úlceras gástricas e, como indicação principal, o tratamento de câncer (Soares *et al.*, 2015).

O consumo deste produto pode representar risco de intoxicação, devido à falta de definição acerca da(s) espécie(s) vegetal(ais) utilizada(s) em sua preparação e, conseqüentemente, dos dados de química e toxicologia desse preparado, que são praticamente desconhecidos.

Sabe-se que diversas espécies botânicas podem ser associadas à nomenclatura popular “Janaguba/Janaúba”, sendo estas muitas das vezes de diferentes famílias. Excluindo-se os diversos grupos não latescentes, ainda restam embates sobre a origem botânica do látex utilizado nesse preparado, possivelmente associado às espécies *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) ou *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) conhecidas popularmente como “Janaguba/Janaúba” (Soares *et al.*, 2016; Kanunfre, *et al.*, 2017).

A espécie *H. Drasticus* já foi anteriormente classificada como *Plumeria drastica* Mart. (The Plant List, 2020), devido à ausência de maiores caracteres morfológicos que separem esses grandes gêneros da família Apocynaceae (Kinoshita *et al.*, 2005). Esta espécie se destaca por ser uma das plantas de uso popular mais difundido (Soares *et al.*, 2015). Os trabalhos de Wood (2001) e Rahman *et al.* (2014) ressaltam a potencialidade antitumoral da espécie, assim como a ausência de agravos ao organismo.

E. umbellata, que tem como sinônimas *Synadenium grantii* Hook f. e *Synadenium umbellatum* Pax. (Luz *et al.*, 2015) pertence ao maior gênero (*Euphorbia*) da família Euphorbiaceae. Inúmeras espécies do gênero *Euphorbia* são alvos de estudos quando se trata da busca de novos fármacos com ação anticancerígena, sendo *Euphorbia tirucalli* o maior alvo dessas buscas, já que apresenta ampla distribuição, rápido crescimento e desenvolvimento, látex abundante e substâncias potencialmente ativas associadas a ação anticâncer (Silva *et al.*, 2018). Algumas substâncias são promissoras na investigação dessa atividade sendo que a maioria se encontra em etapas de investigação pré-clínica: ensaios *in vitro* e *in vivo* (Madlener, *et al.*, 2009; Mondal, *et al.*, 2016; Mangisa, *et al.*, 2018).

1.3. A família Euphorbiaceae Juss e o gênero *Euphorbia* L.

Globalmente, a família Euphorbiaceae conta com cerca de 300 gêneros e 5000 espécies, sendo uma das maiores famílias de Angiospermas (Yener *et al.*, 2018). Apresenta ampla distribuição em ambientes tropicais, subtropicais e temperados, principalmente ao longo dos continentes americano e africano. No Brasil, ocorrem cerca 63 gêneros e 942 espécies, distribuídas em todas as regiões do país, com registros na Amazônia, Cerrado, Pampa, Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica. Quanto à forma de vida, as espécies da família Euphorbiaceae podem se apresentar como arbustos, subarbustos, árvores, ervas até mesmo lianas, tendo hábitos rupícola, terrícola e aquático (Seigler, 1994; Flora do Brasil, 2019).

Por ser uma família de ampla distribuição e grande diversidade, pode-se encontrar diversos estudos etnofarmacológicos de suas espécies (Ramalho *et al.*, 2017). Os relatos envolvem usos estabelecidos em práticas tradicionais difundidas, como a medicina tradicional chinesa e ayurvédica, assim como a utilização cultural restrita a populações de diferentes regiões da América e da África (Alonso-Castro *et al.*, 2012; Gangwar *et al.*, 2014; Luz *et al.*, 2015; Ramalho *et al.*, 2017; Albino *et al.*, 2019).

Existem diversas atividades biológicas citadas na literatura para as espécies desta família, sejam advindas de estudos com extratos brutos dos diversos órgãos, ou frações purificadas e substâncias isoladas. Alguns exemplos dessas atividades encontradas são: analgésica, citotóxica, antitussígena, antiplasmódica, antioxidante, hepatoprotetora, gastroprotetora, antibacteriana, antimicobacteriana, antiviral e

antifúngica (Lanhers *et al.* 1990; Lanhers *et al.* 1991; Cimanga *et al.*, 2004; Harish & Shivanandappa, 2006; Oliveira *et al.*, 2011; Luz *et al.*, 2015).

Há uma enorme variedade de metabólitos secundários que podem ser encontrados nos representantes dessa família e que podem ser responsáveis pelas atividades estudadas. As principais classes encontradas são: alcaloides, terpenoides, flavonoides (C e O-glicosilados), taninos e peptídeos (cíclicos e lineares) (Rizk, 1987; Seigler, 1994; Salatino *et al.*, 2007; Refahy, 2011; Ramalho *et al.*, 2017).

No gênero *Euphorbia*, que conta com cerca de 2000 espécies, pode-se encontrar toda a variedade de hábitos e distribuição que a família, como um todo, possui. Todos os órgãos vegetativos e reprodutivos são explorados na busca de suas propriedades farmacológicas (Madlener, *et al.*, 2009; Luz *et al.*, 2015; Mondal, *et al.*, 2016; Mangisa, *et al.*, 2018). Para esse grupo é relatada na literatura a presença de cumarinas, esteroides e terpenoides, sendo estes últimos os mais abundantes e farmacologicamente estudados (Yener *et al.*, 2018).

1.4. *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns: aspectos botânicos e usos medicinais

A espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns pertence ao gênero *Euphorbia* L., família Euphorbiaceae Juss, ordem Malpighiales, classe Equisetopsida e subclasse Magnoliidae (Trópicos, 2020). É um arbusto originário da África, com ocorrências nos continentes americano e asiático (Nogueira, 2008). Espécie originalmente xerófita, ocorrendo em grandes altitudes em regiões de clima quente-seco, porém pode vir a ocorrer em outros ambientes. Arbusto de 3-5 metros com caule cilíndrico, alongado e com cicatrizes foliares bastante aparentes. Folhas oblanceoladas, discoloras e com nervuras proeminentes avermelhadas. Inflorescências em cimos/cachos com flores sésseis, unissexuais e com ausência de perianto (Nicholson, 2008) (Figura 1).

Diversas classes de substâncias com possível potencial bioativo foram registradas nos extratos de caule e folha, e também no látex isolado dessa espécie. Algumas classes são as antocianinas, glicosídeos cianogênicos, glicoproteínas, enzimas proteolíticas, lecitinas, saponinas, ácidos graxos, hidrocarbonetos, compostos fenólicos e diversos terpenoides (Govardhan *et al.*, 1984; Uzabakiliho *et al.*, 1987; Koops *et al.*, 1991; Menon *et al.*, 2002; Rajesh *et al.*, 2006; Jassbi, 2006; Andersen *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012).

Grande parte das possíveis ações conhecidas são advindas do uso popular do látex dessa planta. Na África, há registros de uso para tratar verrugas, combater parasitas intestinais, tratar a sífilis e auxiliar no tratamento de problemas cardíacos (Nicholson, 2008). Também há relatos de uso para o caule e folha, tais como: pó dos caules jovens para tratar a tosse; ingestão das cinzas das folhas para dores de garganta; folhas pulverizadas para tratar escarificações e outros ferimentos. As raízes também são utilizadas, normalmente maceradas, no tratamento de dores de ouvido e malária (Nicholson, 2008). A partir de ensaios *in vitro* tem sido relatadas as ações antiulcerôgena, antiviral e antitumoral para esta espécie (Costa *et al.*, 2012; Valadão *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2020). Também há relatos da grande toxidez do látex dessa planta. Em diversos países do continente africano descreve-se o uso do látex de *E. umbellata* como veneno para aves, peixes e mamíferos, auxiliando na caça e pescaria. Além disso, o látex também é utilizado por algumas tribos para envenenar as pontas de armamentos visando ataque e defesa frente outras aldeias, assim como há indícios de seu uso para fins criminosos (intoxicação) (Nicholson, 2008).

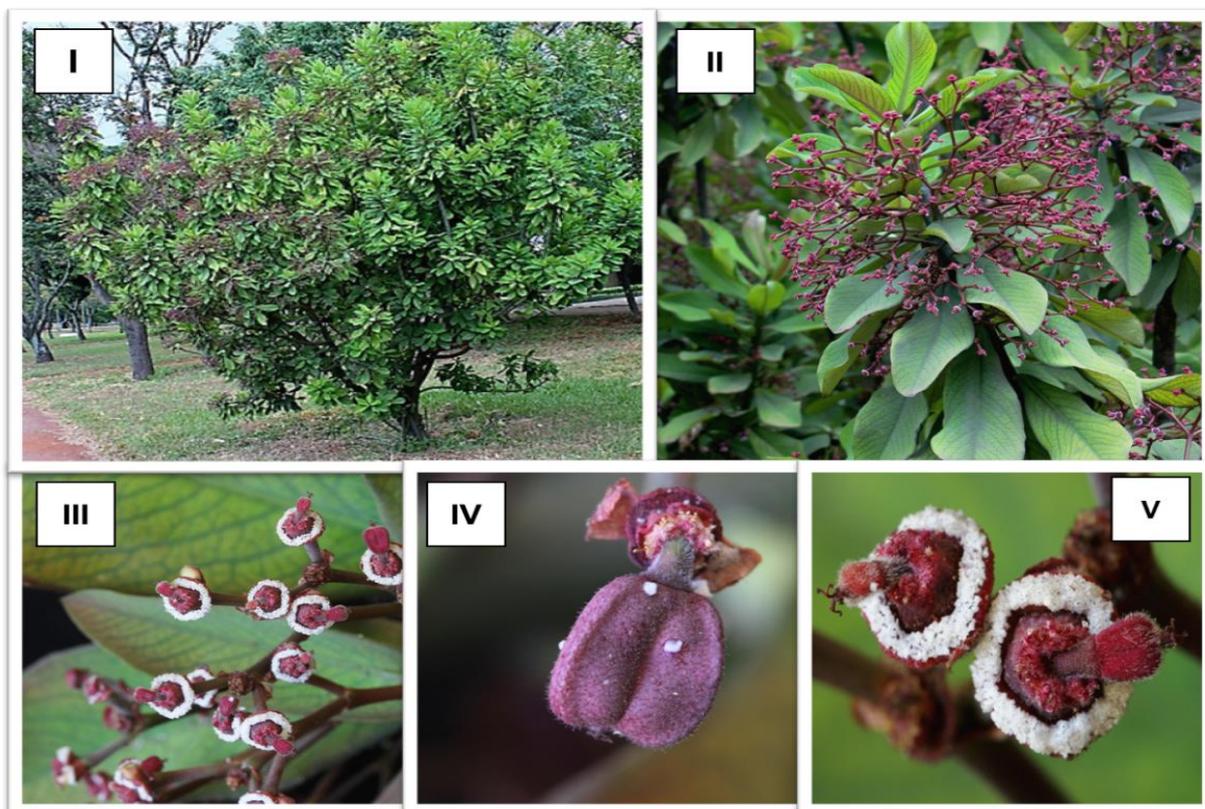


Figura 1: Características organofráficas de *Euphorbia umbellata*. I: hábito; II: detalhe do ramo e inflorescência; III: detalhe da inflorescência; IV-V: detalhes das flores - estruturas reprodutivas (androceu e gineceu). Fotos: Maurício Mercadante – Flickr.

1.5. O látex de *Euphorbia umbellata*: terpenoides

Apesar do vasto conhecimento sobre a presença de látex na família Euphorbiaceae, esta é restrita aos membros das subfamílias Crotonoideae e Euphorbioideae. As demais subfamílias (Phyllanthoideae, Oldfieldioideae e Acalyphoide) geralmente não apresentam a produção desse material vegetal (Seigler, 1994).

No látex, o qual é tipicamente fluído e leitoso, encontram-se proteínas, por vezes substâncias fenólicas (flavonoides, taninos e fenilpropanoides), e de forma majoritária os terpenoides. Dentre essa classe de substâncias, pode-se destacar, principalmente, os diterpenos com esqueleto do tipo tigliano (ésteres de forbol) e os triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos (Lynn & Clevette-Radford, 1987; Ramalho *et al.*, 2017).

Os termos terpeno e terpenoide se confundem por toda a literatura, mas comumente, são utilizados para denotar apenas substâncias naturais sem modificações (terpenos) ou também incluir produtos de degradação, derivados e substâncias de estruturas similares (terpenoides) (Paterson & Anderson, 2005).

Os terpenos são advindos da condensação do pirofosfato de isopentenila (IPP). Os precursores dos terpenos podem ser tanto o ácido mevalônico (MVA), oriundo de unidades de acetil-CoA (acetil coenzima A), quanto o fosfato de desoxilulose (DXP), proveniente de unidades de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. A estrutura básica de isopreno (C5), através de ligações do tipo “cabeça-cauda”, forma esqueletos maiores: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), entre outros (Lobo & Lourenço, 2007; Simões *et al.*, 2016) (Figura 2).

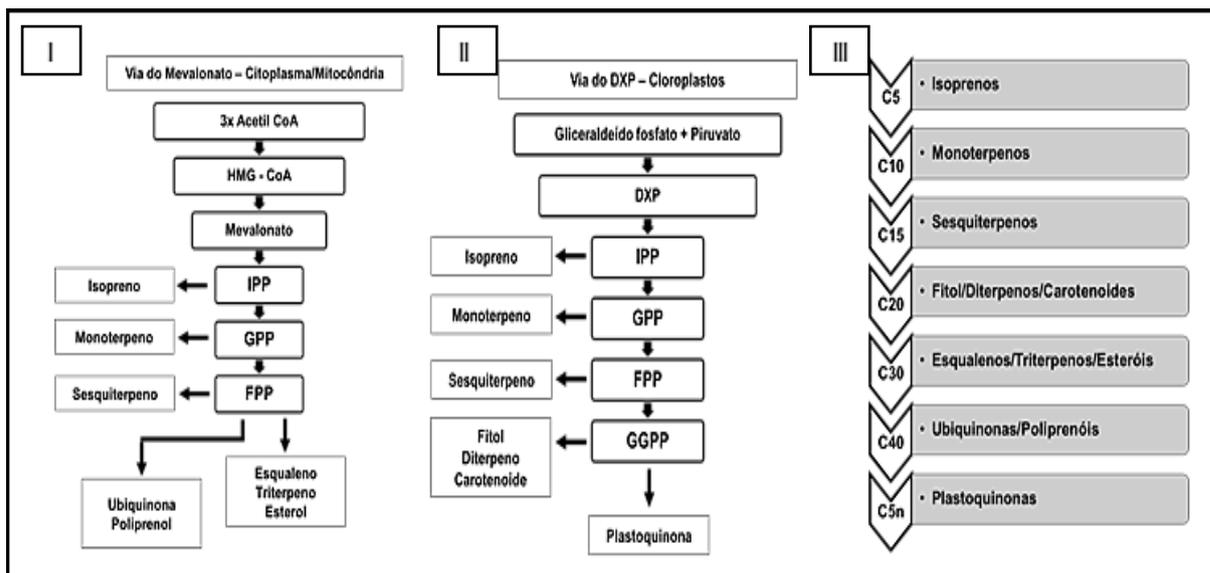


Figura 2: (I-II) Representação esquemática das rotas biossintéticas de terpenoides pelas vias do: (I) mevalonato e do: (II) DXP; (III) Representação esquemática das estruturas base dos terpenoides. *HMG-CoA: hidroximetilglutaril-coenzima A; DXP: fosfato de desoxilulose; IPP: pirofosfato de isopentenilo; GPP: pirofosfato de geranilo; FPP: pirofosfato de farnesilo; GGPP: pirofosfato de geranilogeranilo. Figura adaptada de Husnu *et al.* (2007).

Dentre os triterpenos já identificados no látex de *E. umbellata* pode-se destacar os epímeros eufol e tirucalol (Figura 3I-II), bastante conhecidos quanto às suas atividades como agentes antimutagênicos e reversores do fenótipo multiresistente em células cancerígenas (bomba de efluxo para antitumorais) (Whelan & Ryan, 2003; Jassbi, 2006). Porém, assim como os demais triterpenos encontrados no látex de *E. umbellata*, eles atuam como citotóxicos de forma inespecífica, ou seja, agem tanto sobre células normais quanto tumorais (Gauthier *et al.*, 2006; Erukainure *et al.*, 2020; Karunakaran *et al.*, 2020). No látex desta espécie vegetal também há relatos da presença dos triterpenos lanosterol, cicloartenol, taraxasterol e lupeol (Cruz *et al.*, 2020) (Figura 3III-VI), além de friedelina e 3 β -friedelinol (Figuras 3VII-VIII) (Valadão *et al.*, 2018), germanicol e ciclanosta-7-en-3-ol (Oliveira *et al.*, 2021) (Figuras 3IX-X).

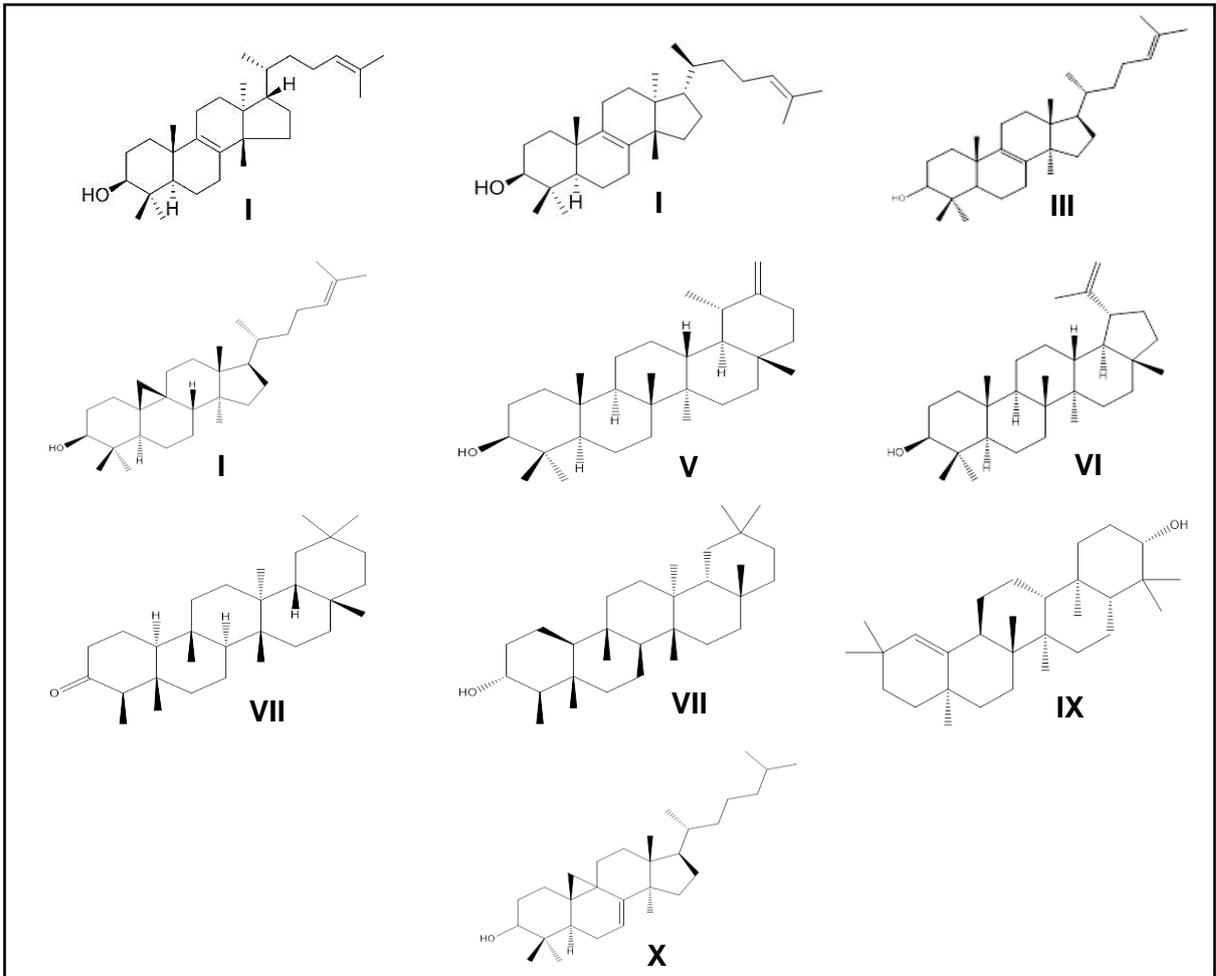


Figura 3: Triterpenos encontrados no látex de *E. umbellata*. Estrutura dos triterpenos: (I) eufol; (II) tirucalol; (III) lanosterol; (IV) cicloartenol; (V) taraxasterol; (VI) lupeol; (VII) friedelina; (VIII) 3β-friedelinol; (IX) germanicol; (X) ciclolanost-7-en-3-ol. Figura elaborada pelo autor.

Os ésteres de forbol são diterpenos que têm em comum a presença do esqueleto tigliano em sua estrutura básica (Figura 4I). A grande variedade de estruturas naturais conhecidas para os ésteres de forbol deve-se à diversidade dos ésteres nas hidroxilas da estrutura base desse grupo, levando assim à formação de diversas novas estruturas mais complexas (Figura 4II) (Makkar *et al.*, 2012; Goel, *et al.*, 2007). Há relatos dessas substâncias atuando de forma similar aos triterpenos eufol e tirucalol, como citotóxicos, *in vitro*, frente a diferentes linhagens tumorais, inclusive de forma específica (não afetando linhagens celulares normais). Porém, tais relatos são encontrados, em sua maioria, para as substâncias isoladas de espécies do gênero *Croton* sp. (Zhang *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2017).

Os ésteres de forbol encontrados nos demais grupos da família Euphorbiaceae, inclusive no gênero *Euphorbia*, têm se apresentado como promotores tumorais e metastáticos (Vogg *et al.*, 1999; Hohmann *et al.*, 2002). Esta atividade está ligada à sua capacidade de mimetizar a ação do diacilglicerol (DAG), ativador da proteína quinase C (PKC) que, no organismo, regula diferentes atividades gênicas e metabólicas, tais como regulação do processo transcricional, modulação de estruturas membranares, dessensibilização de receptores celulares, e mediação de respostas imunes, entre outras (Devappa, *et al.*, 2010). Além disso, os ésteres de forbol também estão associados à causticidade/irritação que o látex dessa planta pode vir a causar sobre a pele ou mucosas (Kinghorn, 1980).

No látex de *E. umbellata* já foi relatada a presença dos seguintes ésteres de forbol: 12-O-tigloil-4-desoxiforbol-13-isobutirato; 12-desoxiforbol-13-(2-metilpropionato); 12,13,20-triacetato de forbol; 4-desoxiforbol-12,13-ditiglato e 3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato (Valadão *et al.*, 2018) (Figuras 4III-VII). Cruz *et al.* (2020) também identificaram 4 β -forbol (Figuras 4I) e 3-desoxi-3,16-dihidroxi-12-desoxiforbol-3,13,16,20-tetraacetato no látex desta espécie (Figura 4VIII).

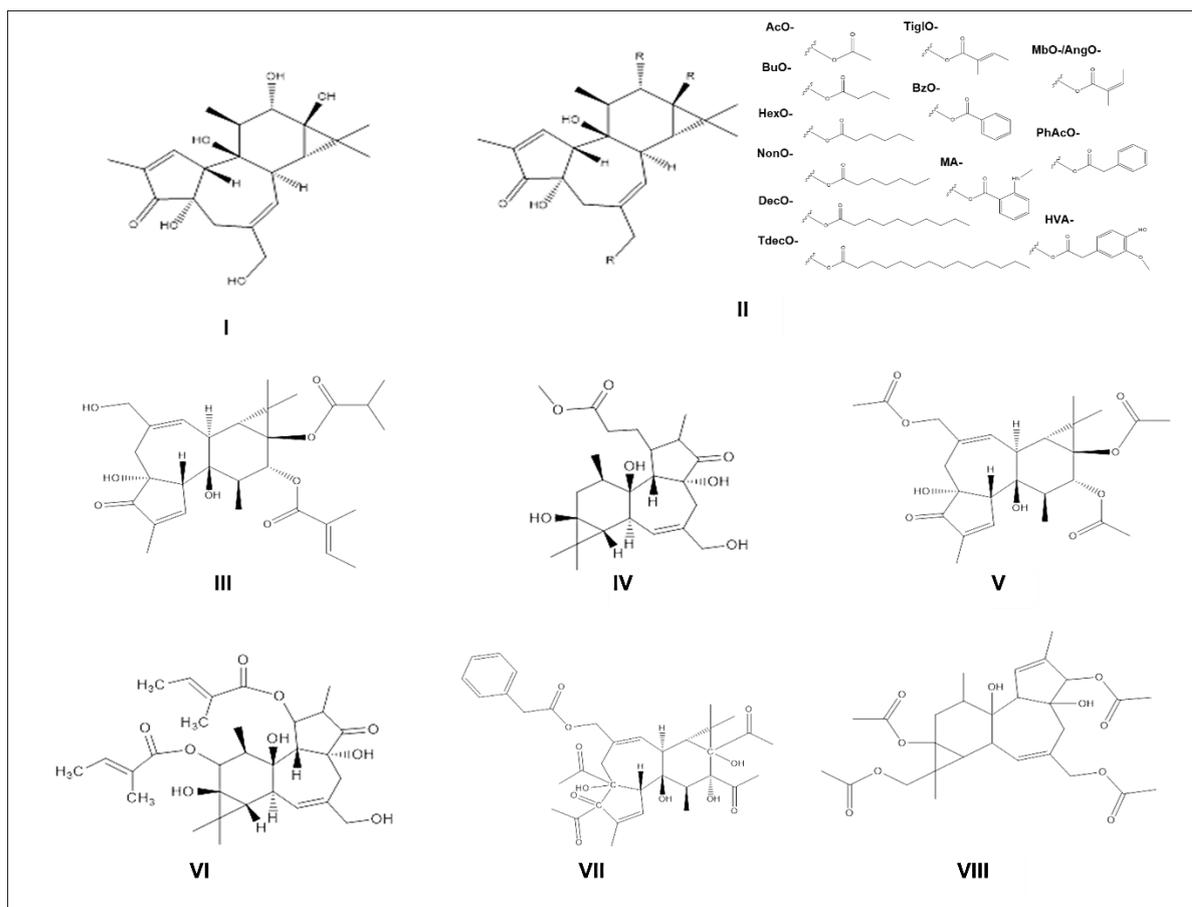


Figura 4: Ésteres de forbol encontrados no látex de *E. umbellata*. Esqueleto base tigliano dos ésteres de (I) forbol; e (II) possíveis estruturas formadas a partir de reações nas hidroxilas mais desprotegidas. Estrutura dos forbólis: (III) 12-O-tigloil-4-desoxiforbol-13-isobutirato; (IV) 12-desoxiforbol-13-(2-metilpropionato); (V) 12,13,20-triacetato de forbol; (VI) 4-desoxiforbol-12,13-ditiglato; (VII) 3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato; (VIII) 3-desoxi-3,16-dihidroxi-12-desoxiforbol-3,13,16,20-tetraacetato. Figura elaborada pelo autor.

1.6. Métodos para a parametrização e caracterização de látex utilizados em preparações populares

A necessidade de parâmetros bem definidos para caracterizar preparações populares é imprescindível, já que em muitos casos podem gerar sérias complicações ao consumidor final. O desenvolvimento de métodos para esta caracterização pode vir a auxiliar em estudos que visem a parametrização dessas preparações. Além disso, a utilização de plantas medicinais e desses preparados pode ser determinada como uma prática difundida na medicina popular, que apesar de atualmente estar à margem da legislação e vigilância sanitária, deve ser alvo de políticas públicas visando garantir

o mínimo de qualidade, segurança e eficácia desses produtos comerciais (Lima *et al.*, 2016; Passos *et al.*, 2018).

Para qualquer droga, se estabelece que a caracterização da composição química, descrição do método de preparo, do grau de pureza e dos caracteres farmacognósticos sejam obrigatoriamente estabelecidos, antes que se possa administrar qualquer novo produto ao ser humano (Calixto & Siqueira Junior, 2008). Assim como a obrigatoriedade de testes de taxa de absorção, excreção e concentração das substâncias majoritárias, além de sua toxicidade aguda e crônica em diferentes espécies animais, e a investigação das possíveis consequências histopatológicas, bioquímicas e fisiológicas (Calixto & Siqueira Junior, 2008).

Dentre os métodos mais empregados na parametrização química de drogas vegetais pode-se destacar as análises cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas, nas quais se baseiam muitos ensaios descritos nas farmacopéias. As farmacopéias são compêndios que contêm, dentre outras, monografias de drogas vegetais, onde estão estabelecidos os critérios de qualidade de acordo com os parâmetros como: binômio científico, nomes populares, descrições morfoanatômicas macroscópicas e microscópicas, além de métodos de identificação físico-químicos (Veiga Junior & Mello, 2008).

Os métodos de parametrização química podem vir a ser sugeridos para estudos de caracterização e comparação de preparações populares. Dessa forma, como a cromatografia é o método mais difundido nas farmacopeias (Veiga Junior & Mello, 2008), também pode ser utilizado para obter os perfis químicos dos preparados populares. Na cromatografia, a separação ocorre devido a interação das substâncias com as fases móvel e estacionária utilizadas no processo. A fase estacionária (sólida ou líquida) retém, enquanto a fase móvel (líquida ou gasosa) faz o carreamento das substâncias (Collins *et al.*, 2006). A seleção do tipo de separação cromatográfica é dada pelo material a ser analisado, onde as substâncias de média a alta polaridade são normalmente investigados em cromatografia em fase líquida e substâncias de baixa polaridade (alta volatilidade) em cromatografia em fase gasosa (Collins *et al.*, 2006). Se as plantas utilizadas nas preparações populares forem conhecidas, assim como os “solventes”: bebidas alcoólicas, água ou mel, pode-se determinar mais

facilmente o tipo de método cromatográfico a ser utilizado dado a possível polaridade da composição química do preparado.

Dentre as outras possibilidades de métodos que permitem a obtenção de maiores informações químicas acerca das substâncias e que podem vir a ser utilizadas para investigação da composição dos preparados populares estão os métodos espectroscópicos de ultravioleta e infravermelho. Os métodos espectroscópicos são capazes de medir as propriedades físicas (absorver, transmitir ou refletir) de determinadas substâncias em relação à radiação infravermelho ou ultravioleta (Skoog *et al.*, 2002). Nas análises utilizando radiação infravermelho, frequentemente, as amostras exigem preparos específicos, onde as amostras líquidas são misturadas e prensadas em placas de cloreto de sódio (alta pureza) e as sólidas junto ao sal de brometo de potássio (alta pureza). Porém, o método *attenuated total reflection-ATR* (reflexão total atenuada) não requer o uso de outros substratos (sais) e pouco (ou nenhum) preparo de amostra, o que simplifica e agiliza os processos analíticos (Dorling & Baker, 2013), sendo uma ótima alternativa para investigar os perfis das amostras, buscando a sua parametrização. Para as análises em ultravioleta, alguns detectores do tipo *diode array detector-DAD* (detector de arranjo de diodos) ou *photodiode array detector-PDA* (detector de arranjo de fotodiodos) foram desenvolvidos buscando a “hifenação” de técnicas, assim como automatizar e agilizar as análises. Como podem ser utilizados para investigar os perfis químicos, funcionam como métodos rápidos de acompanhamento de processos ou de determinação de amostras. Ambos os métodos, além das análises qualitativas, também podem ser utilizados para avaliações semi-quantitativas, porém necessitam, muitas das vezes, de padrões ou referências mesmo havendo bastante literatura para auxílio na identificação.

Por fim, um dos métodos menos utilizado para a caracterização química de drogas vegetais encontradas nas monografias da farmacopeia brasileira é a espectrometria de massas. Esse método pode ser utilizado para a identificação e quantificação de substâncias, assim como para a elucidação estrutural. A possibilidade de hifenação de espectrômetros de massas com diversos cromatógrafos, devido ao desenvolvimento das fontes de ionização a pressão atmosférica, permite o uso dessa técnica para aumentar as informações utilizadas em

estudos de parametrização (Iglesias, 2016). Assim, também é relevante para utilização na tentativa de investigação de preparados populares.

As análises físico-químicas são bastante difundidas na parametrização de produtos alimentícios e de drogas vegetais. São utilizadas buscando estabelecer os perfis das propriedades moleculares e do comportamento das amostras. Além disso, podem estabelecer uma padronização que pode vir a ser utilizada como método de confirmação da origem e/ou matriz que compõem o produto (Barata-Silva *et al.*, 2017). Alguns produtos alimentícios como bebidas alcoólicas e mel, ou produtos com aspectos aquoso ou leitoso (emulsionados) podem ser parametrizados através de análises físico-químicas. Assim, também pode-se sugerir tais métodos para parametrização de preparações populares, já que essas podem conter ou apresentar aspecto semelhante a alguns desses produtos alimentícios. Os ensaios físico-químicos são inúmeros e buscam, frequentemente, caracterizar propriedades como pH, solubilidade, ponto de fusão, massa seca, cinzas e proteínas totais, sedimentação, densidade, viscosidade, entre outras, dependendo diretamente do tipo da amostra (IAL-Instituto Adolfo Lutz, 2008; Farmacopeia Brasileira 6ªed, 2019; AOAC-*Association of official analytical chemists*, 2016). Pode-se sugerir que as análises físico-químicas conseguem atender de forma eficaz as questões que buscam determinar o perfil geral, produção e/ou reprodutibilidade de preparações populares.

Os métodos instrumentais para investigação dos perfis químicos, assim como as análises físico-químicas geram conjuntos complexos de dados, por isso o grau de dificuldade na interpretação desses dados pode acarretar a não visualização de determinados resultados. Os dados obtidos, de natureza química, podem ser submetidos à cálculos quimiométricos que verificam a correlação de um grupo de variáveis de uma determinada amostra (ou grupo de amostras) em interpretações relacionadas ao conjunto total de dados (Barros Neto *et al.*, 2006; Correia & Ferreira, 2007). Na parametrização das preparações populares, os cálculos matemáticos e quimiométricos podem vir a auxiliar na determinação de quais variáveis são relevantes como marcadores do perfil químico obtido. Além disso, também podem vir a comparar esses preparados com amostras de referência, sugerindo ou confirmando as espécies vegetais utilizadas. Dentre as ferramentas mais utilizadas na quimiometria destaca-se os modelos de análise exploratória como a *Principal Component Analysis* (PCA) que determina a distribuição natural dos dados, assim como sua similaridade interna

(tendência de grupos) em um plano, sem a designação de fatores determinantes (Ferreira, 2015; Maraschin *et al.*, 2017). Além dessas ferramentas, o modelo matemático gráfico, diagrama de *Venn*, também pode ser utilizado na quimiometria, buscando averiguar a existência de correlações simples e os fatores correlacionáveis entre amostras (Skov *et al.*, 2014).

1.7. Justificativa

O uso indiscriminado de preparados populares, que muitas das vezes não apresentam a(s) espécie(s) vegetal(is) utilizadas em sua confecção bem definidas, podem gerar riscos à saúde do consumidor final. Isto se dá devido ao desconhecimento pelo público leigo dos prejuízos à saúde que tais produtos podem vir a gerar, e esta falta de informação é agravada por questões culturais “enraizadas”. Uma dessas preparações, o “leite de Janaguba/Janaúba”, é bastante utilizado no Brasil para o tratamento, principalmente, de câncer. Porém, a possibilidade da presença do látex de alguma espécie da família Euphorbiaceae nessas preparações é inquietante, e carece de investigação, dado o potencial tóxico de vários membros dessa família botânica e os riscos inerentes. Dessa forma, torna-se necessário investigar a identidade botânica da(s) planta(s) utilizada(s) nesses preparados. Em uma investigação preliminar por injeção direta em espectrômetro de massas de uma amostra de “leite de Janaguba/Janaúba” (tratada ao longo deste estudo sob a sigla LRJ) adquirida no Rio de Janeiro, nosso grupo de pesquisa detectou íons produto com características semelhantes à de ésteres de forbol, o que chamou a atenção da equipe e motivou o presente estudo. Devido à possível presença dos ésteres de forbol, os quais são encontrados apenas em indivíduos da família Euphorbiaceae, especulamos que a espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns que recebe o nome popular “Janaguba/Janaúba” pudesse estar presente nessas preparações. As informações encontradas na literatura sobre o perfil químico do látex dessa espécie, que relatam substâncias possivelmente citotóxicas, cáusticas e promotoras tumorais, associada às descrições do uso desse látex como “meio de envenenamento” para caça, pesca e atividades criminosas, torna preocupante a possível utilização habitual desta espécie nos preparados de “leite de Janaguba/Janaúba” comercializados no Brasil.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar, a partir de diferentes métodos analíticos, químicos e biológicos com tratamento quimiométrico de dados, se as preparações de "leite de Janaguba/Janaúba" comercializadas em diferentes estados brasileiros possuem em sua composição o látex de *E. umbellata*.

2.2. Objetivos específicos

- Propor diferentes métodos instrumentais químicos e físico-químicos para caracterizar o perfil do látex de *E. umbellata* coletados em duas diferentes sazonalidades (quente e úmido; frio e seco - amostras de referência).
- Identificar possíveis variáveis marcadoras do látex de *E. umbellata* (amostras de referência).
- Caracterizar amostras comerciais de "leite de Janaguba/Janaúba" utilizando os métodos definidos no estudo do látex de *E.umbellata* (amostras de referência).
- Identificar quais amostras comerciais de "leite de Janaguba/Janaúba" seriam classificadas como oriundas de *E. umbellata*.
- Determinar estudos quimiométricos que possam ser utilizados para avaliar a relação entre as amostras comerciais de "leite de Janaguba/Janaúba" e o látex de *E. umbellata* (amostras de referência).
- Analisar o potencial proliferativo e/ou citotóxico de amostras comerciais de "leite de Janaguba/Janaúba" e do látex de *E. umbellata* (amostras de referência).

3. Materiais e métodos

3.1. Coleta de material vegetativo, fértil e látex de *E. umbellata*

Após buscas no sítio eletrônico Re flora-virtual herbarium (Re flora, 2018) e visitas aos locais de coleta citados nas exsicatas presentes no banco de dados, a

espécie foi encontrada apenas na estrada de acesso à trilha do Morro das Andorinhas, Itaipu, Niterói - RJ com georreferenciamento 22°58'17.5"S / 43°02'34.8"W (Figura 5). As visitas para coleta do material de estudo ocorreram em dois períodos distintos: nos meses de julho de 2018 (período frio e seco) e em fevereiro de 2019 (período quente e úmido). Foram obtidas amostras de material fértil (com flores) e de látex de *E. umbellata*.



Figura 5: Mapa da área de coleta. Morro das Andorinhas, Itaipu, Niterói – RJ. Georreferenciamento 22°58'17.5"S / 43°02'34.8"W. Fonte: Google Earth.

O diagnóstico para confirmação da identidade da espécie foi realizado no local de coleta com auxílio de materiais suporte, como fotografias. O material fértil foi herborizado e as exsiccatas foram depositadas em duplicata no herbário da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta - HUNI sob o número de tombo HUNI6092 (Figura 6).



Figura 6: Exsicatas de *E. umbellata* depositadas no Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta sob o número de tombo HUNI6092. Foto do acervo pessoal.

A coleta do látex foi realizada a partir de excisões nos caules e folhas de indivíduos adultos, selecionados de forma randômica, com auxílio de estiletos, colher-espátula e acondicionados em frascos âmbar. Em ambas as coletas foram obtidos cerca de 150 mL (50g) de látex. Todo material foi fotografado e catalogado para documentação. Durante as coletas foi observado, mesmo com o uso de luvas nitrílicas, que o contato com o látex gerou vermelhidão, inchaço, sensação de ardência e descamação da pele dos dedos.



Figura 7: Processo de coleta do látex de *E. umbellata* a partir de excisões nos órgãos caule e folha. Foto do acervo pessoal.

Os látex coletados em ambas as visitas foram utilizados para confecção de duas amostras de referência. As amostras de referência foram confeccionadas segundo o método de preparo popular do “leite de Janaguba/Janaúba” (Ortêncio, 1997), utilizando-se 18 gotas do látex obtido das coletas de *E. umbellata*, em um litro de água filtrada (Purificador Vitale – Lorenzetti). As amostras de referência foram confeccionadas com o objetivo de serem o mais semelhante possível aos produtos comercializados. As amostras confeccionadas utilizando o látex coletado no período frio-seco receberam a sigla LEUFS, enquanto a que se utilizou do látex coletado no período quente-úmido recebeu a sigla LEUQU.

3.2. Caracterização das amostras de referência por métodos espectrométricos, espectroscópicos e análises físico-químicas

3.2.1. Análises por injeção direta em espectrômetro de massas (DI-MS)

As amostras de referência foram liofilizadas em liofilizador K108, da marca Liotop. As amostras secas (100 mg) foram solubilizadas em 1 mL de metanol grau HPLC SK chemicals e centrifugadas à 15.000 RPM com auxílio de microcentrífuga K14-1215 – Kasvi. O material solubilizado foi utilizado em análises iniciais por injeção direta (DI) em espectrômetro de massas de resolução unitária LCQ Fleet - Thermo Fisher Scientific com analisador IonTrap 3D. As análises foram realizadas em triplicatas. Foi utilizado como fonte de ionização *ESI* (*electrospray ionization*) no modo positivo. Como fase móvel, foi utilizada uma mistura de MeOH:H₂O acrescida de 0,1% de ácido fórmico. As condições de fonte foram *sheat gas flow* 20, *auxiliary gas flow* 5, *source voltage* de 5 kV, *source current* 100 µA e *tube lens* de 55V. A temperatura do capilar foi 400 °C e a voltagem 18 V, e a temperatura da fonte foi 450 °C. A faixa de aquisição utilizada foi de 50-1000 *m/z* e o fluxo se manteve constante em 0,1 mL/min. Foram injetados 10 µL de cada amostra com tempo de corrida de 5 minutos.

3.2.2. Análises por ultravioleta (UV-VIS) e infravermelho (ATR-FTIR)

Os processos (liofilização; solubilização; centrifugação) de preparo de amostras descritos no item 3.2.1. foram utilizados para se obter o material a ser analisado pelos métodos espectroscópicos. As amostras foram analisadas em triplicatas pelos métodos espectroscópicos de UV-VIS (Ultravioleta-Vísivel) e ATR-

FTIR (*Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infra-Red*). Os comprimentos de onda, assim como os valores de absorvância na região do UV-VIS foram verificados utilizando o detector de arranjo de diodos DAD (*ultravioleta - diode array detection*) do U/HPLC (*Ultra/High Performance Liquid Chromatography*) Dionex Ultimate 3000 - Thermo Fisher Scientific. Para se obter esses dados foi utilizado o amostrador automático analítico WPS-3000(T)SL -Thermo Fisher Scientific, o qual foi ligado diretamente ao detector, dessa forma foi possível obter os perfis em UV-VIS sem a utilização do processo cromatográfico. Para verificar os comprimentos de onda e os valores de transmitância na região do infravermelho (IR) foi utilizado um espectrofotômetro IRPrestige-21 – Shimadzu.

3.2.3. Análises físico-químicas

Para as análises iniciais foram verificados parâmetros, tais como: coloração e o aspecto geral das amostras por análises visuais e volume total inicial em proveta. Quando necessário, as amostras foram submetidas à precipitação por congelamento (-6 °C por 24 h) e adição de metanol resfriado (1:10), já que algumas análises buscam analisar apenas os precipitados ou a fração aquosa. Para determinar a massa seca da fração aquosa e massa seca dos precipitados, as amostras foram secas com auxílio de estufa SL-100 SOLAB à 100 °C por 1 h, resfriadas em dessecador com sílica gel e pesadas em balança de precisão Sartorius BP 221S. A quantidade de sólidos solúveis foi determinada com refratômetro w/w 0-20%, p / p 1%, precisão ± 1% - Wort SG. A taxa de sedimentação foi verificada em proveta durante 1 h, em pH original e temperatura ambiente e o sedimento final total determinado em balança de precisão Sartorius BP 221S conforme Gabriëls & Plaizier-Vercammen (2004) *apud* Soares *et al.* (2016). A solubilidade das amostras totais secas foi avaliada utilizando placa de toque de porcelana. Para isso, uma pequena porção das amostras (~100 mg) foi solubilizada em 1 mL de solvente. A porção solúvel foi seca em estufa SL-100 SOLAB à 100 °C por 1 h, resfriadas em dessecador com sílica gel e pesadas em balança de precisão Sartorius BP 221S. A solubilidade foi verificada em diferentes solventes: água ultra purificada (obtida em ultrapurificador Purelab classic – ELGA); etanol comercial 96%; butanol, acetonitrila, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e hexano de grau HPLC SK chemicals. Os graus de solubilidade foram determinados de acordo com as especificações gerais descritas na Farmacopeia

Brasileira 6ªed. (2019). Ainda utilizando os métodos determinados nos itens da Farmacopeia Brasileira 6ªed. (2019) foram determinados: o pH de acordo com o item 5.2.19 com o auxílio de potenciômetro K39 1014B – Kasvi; as cinzas totais de acordo com o item 5.4.2.4 com auxílio de mufla NT380 - Novatecnica e balança de precisão Sartorius BP 221 S; a densidade de acordo com o item 5.2.5 com densímetro massa específica 1,500/2,000 x 0,005g/mL 290mm calibrado a 20°C - Incoterm 5601; a viscosidade de acordo com o item 5.2.7 com auxílio de viscosímetro de Ostwald – Zonwon em temperatura ambiente. As análises foram realizadas utilizando os equipamentos e materiais presentes nos laboratórios de aula prática multiusuários da Escola de Nutrição e do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO e da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

3.4. Obtenção e análise de amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba”

Em outubro de 2018 foram adquiridas sete amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” (LSPA, LSPB, LCEA, LCEB, LMA, LACA e LACB) junto a diferentes comerciantes de todo o Brasil, hospedados no sítio eletrônico da empresa “Mercado Livre” (plataforma de comércio virtual que coordena diversos processos de compra e venda). Também foram adquiridas duas amostras comerciais (LRJ e LPA) através de colaboradores que obtiveram os materiais em viagens aos locais de venda. A região norte foi representada por dois preparados do Acre (LACA; LACB) e um do Pará (LPA); o Nordeste foi representado por duas amostras advindas do Ceará (LCEA; LCEB) e uma do Maranhão (LMA) e, por fim, o Sudeste representado por duas amostras distintas do Estado de São Paulo (LSPA; LSPB) e uma terceira do Rio de Janeiro (LRJ). Não foram encontradas amostras originárias dos Estados das regiões Sul e Centro-Oeste. Dados descritivos como as informações apresentadas nas rotulagens, quando presentes, foram registradas e catalogadas para cada material obtido. Foi observado que as amostras comerciais precisavam ser armazenadas em temperatura ambiente, pois a refrigeração fez com que houvesse quebra da emulsão e as amostras apresentassem duas fases distintas. Devido ao custo do material e ao tempo gasto no processo de compra e recebimento das amostras, optou-se por conservar os produtos em geladeira e fazer a reemulsão quando fossem ser submetidas às análises químicas e físico-químicas. A reemulsão foi realizada em

liquidificador industrial, seguido de descanso em ambiente refrigerado (6 °C) durante sete dias, retornando ao aspecto original. Todas as amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” foram avaliadas utilizando os métodos espectrométricos, espectroscópicos e físico-químicos realizados para caracterização das amostras de referência como descrito no item 3.2 deste estudo.

3.5. Cálculos matemáticos e quimiométricos

Para as comparações das amostras de referência com as amostras comerciais obtidas, foram realizados cálculos quimiométricos utilizando o software virtual *Metaboanalyst – statistical, functional and integrative analysis of metabolomics data*, versão 4.0 (Chong *et al.*, 2019). O conjunto de dados obtido a partir dos resultados físico-químicos foi tratado estatisticamente, já que é formado por variáveis (parâmetros) mensuradas/dimensionadas utilizando diferentes métodos. Assim, os dados foram auto escalonados: centrados na média e divididos pelo desvio padrão de cada variável. Os demais resultados químicos (DI-MS; UV-VIS; ATR-FTIR) não passaram por pré-tratamento. Para as análises por DI-MS os resultados obtidos foram extraídos e exportados como *spectrum list* dos 1000 íons mais intensos. Os dados foram concatenados e organizados com as amostras (triplicatas) em linhas e variáveis (m/z) em colunas. As variações de intensidade dos íons foram utilizadas para determinação dos agrupamentos. Os conjuntos de dados dos resultados obtidos nos métodos espectroscópicos foram organizados da mesma forma que para os de DI-MS, porém nas análises de UV-VIS e ATR-FTIR os comprimentos de onda: absorvância e transmitância foram utilizados como variáveis, respectivamente. As variações de intensidade de absorvância e transmitância foram utilizadas para determinação dos agrupamentos. Todos os dados foram analisados pelo ensaio exploratório/descritivo de análise de componentes principais (PCA). As análises por diagrama de *Venn*, também utilizadas para investigação de semelhanças químicas ao longo do estudo, foram realizadas utilizando o software virtual *Venn Diagram* disponibilizado por *bioinformatics & evolutionary genomics* (2019).

3.6. Escolha de solventes para a confecção de extrato a partir das amostras de referência

Com a finalidade de estabelecer os íons marcadores das amostras de referência determinados pela análise quimiométrica de *Vip Scores* (top 25) dos dados de DI-MS, estas foram liofilizadas em liofilizador K108, da marca Liotop e submetidas a testes para investigação do melhor solvente extrator destes íons. As amostras foram extraídas sob agitação magnética em placa de aquecimento-agitação. Um grama de látex bruto foi submetido à extração com solvente (100 mL), sob agitação por 1 h em aquecimento brando (40 °C). Os solventes utilizados foram água ultra purificada (obtida em ultrapurificador Purelab classic – ELGA); etanol comercial 96%; butanol, acetonitrila, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e hexano de grau HPLC SK chemicals. Todos os extratos obtidos foram analisados por DI-MS, utilizando os parâmetros descritos no item 3.2.1.

3.7. Cromatografia em camada preparativa (CCP) dos extratos das amostras de referência

Em placa de sílica gel 60, 2 mm (20 x 20 cm) – Merck (para cromatografia preparativa), foram aplicados 10 mL do extrato em acetonitrila-clorofórmio (1:1) confeccionado conforme citado em 3.6, na concentração de 180 mg/mL (solubilizado nos mesmos solventes de preparo). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de clorofórmio-éter etílico (9,5:0,5). Parte da placa foi recoberta com placa de vidro (para que se evitasse contato com o revelador), o pequeno trecho descoberto foi revelado com vaporização da solução de vanilina 1% em etanol 96% e da solução de ácido sulfúrico 10% em etanol 96% seguido de aquecimento brando (40 °C) (Picman *et al.*, 1980, modificado). O perfil cromatográfico e as massas obtidas de cada fração podem ser observados na Figura 8.

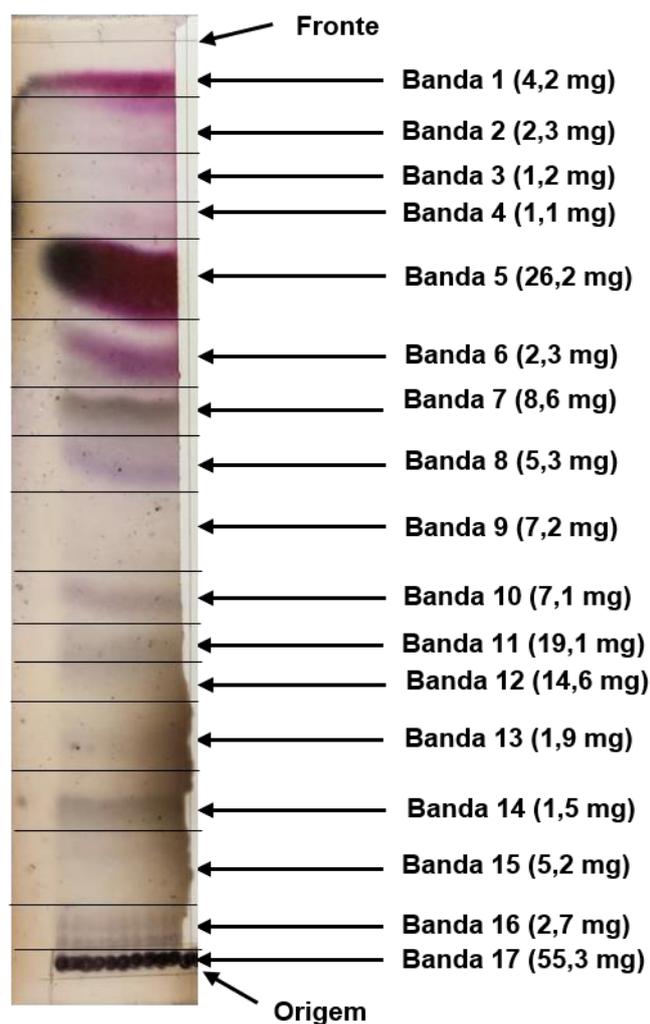


Figura 8: Cromatograma em Camada Preparativa após revelação com vanilina sulfúrica do extrato de látex bruto de *E. umbellata*. Eluição: Clorofórmio:Éter 9,5:0,5.

O cromatograma apresentou 16 bandas que foram reveladas pela vanilina sulfúrica e que foram extraídas individualmente, incluindo a origem (banda 17), que foi a fração de maior massa (~55mg), seguido das bandas 5 (26,2 mg), 11 (19,1 mg) e 12 (14,6 mg). O rendimento total foi de 92% (cerca ~166 mg). Todas as bandas reveladas foram raspadas individualmente. As bandas raspadas foram solubilizadas em clorofórmio:acetonitrila (1:1) e a sílica separada com filtragens em papel de filtro qualitativo 80g – Qualy® e lã de vidro. Os solventes utilizados eram de grau HPLC SK chemicals.

3.8. Cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) das frações obtidas por CCP

Todas as frações provenientes do fracionamento por CCP foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Esta escolha justifica-se pelos relatos na literatura da composição química do látex *E. umbellata*, utilizada para confecção das amostras de referência. Tais relatos descrevem a presença majoritária de terpenoides, classe química de substâncias de fácil volatilização, no látex dessa espécie vegetal. O sistema utilizado foi o QP2010SE – Shimadzu, com injetor automático AOC20, equipado com a coluna (DB-5) 007 5% metil 5% fenil Silicone com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e espessura do filme de 0,20 µm. As amostras injetadas estavam na concentração de 2 mg/mL. O sistema foi operado com energia de ionização de 70 eV, utilizando hélio como gás carreador, em fluxo constante de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 1 µl, com divisão de fluxo (*Split*) 1:2. A temperatura do injetor foi de 280 °C, a da fonte de íons em 260 °C, da interface de 280 °C. A programação de temperatura foi de 250 °C (isoterma de 3 min) até 290 °C (isoterma de 20 min) com incremento de 5 °C/min. A faixa de varredura foi de 40 – 600 *m/z* e o tempo total de corrida foi de 31 min.

3.9. Avaliação da ação proliferativa e/ou citotóxica das amostras comerciais e de referência

Os ensaios de investigação da ação proliferativa ou de inibição da proliferação celular foram realizados em colaboração com a Prof^a. Dr. Carla Holandino e com a Prof^a Me. Michelle Nonato do Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento de Práticas Integrativas e Complementares – LabPICs da Faculdade de Farmácia – UFRJ. Os ensaios foram realizados utilizando o sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazólio) (Mosmann, 1983), que se baseia na redução da substância amarelada (em células vivas e com funcionamento mitocondrial não comprometido) pela enzima mitocondrial NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) desidrogenase, gerando cristais violáceos de formazana. As atividades foram avaliadas frente à linhagem aderente MDA-MB-231 (câncer de mama - triplo negativo) obtidas junto à ATCC[®], cultivadas em frascos de cultura de tecido Falcon[®] de 50 mL no meio RPMI 1640 Gibco[™] acrescido de 10% de soro fetal bovino Gibco[™] (inativado pelo calor: 56°C, 30min) e 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina 10,000 U/mL

Gibco™), com ciclos de repique a cada 4 dias. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços, utilizando 200 µL de suspensão celular (2×10^4 células/poço) e incubadas por 24 h. As soluções de estoque e os tratamentos (concentrações definidas) foram confeccionados a partir das amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” e do látex de *E. umbellata* (amostras de referência). As concentrações dos tratamentos foram selecionadas de acordo com ensaios iniciais de triagem utilizando a faixa de 3200-6,25 µg.mL, em razão de 1:2. Em seguida, as células tratadas com as concentrações selecionadas (400-12,5 µg.mL [1:2]) na triagem foram incubadas por 48 h em duplicatas internas (dois poços por concentração de cada amostra). Foram realizados controles de meio (RPMI 1640) e Dimetilsufóxido (DMSO). Após a retirada de meio contendo os tratamentos e o acréscimo de solução contendo 180 µL de meio e 20 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço, a placa foi protegida contra luminosidade e mantida em estufa por 4 h, então o meio contendo MTT foi descartado e os cristais solubilizados em DMSO (200 µL/poço). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de 540 e 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental. Todos os procedimentos se deram em fluxo laminar estéril e estufa a 37 °C com 5% CO₂. Os cálculos de IC₅₀ foram conduzidos utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 8.0.1. Os resultados (absorvância [nm]) observados, assim como os valores das concentrações utilizadas, foram transformados em Log (10) e escalonados pelo conjunto de médias de cada replicata. Os dados foram analisados por regressão não-linear para obtenção de curvas de resposta baseado no método de dose-resposta: log do inibidor x resposta normalizada.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das amostras de referência por métodos espectrométricos, espectroscópicos e análises físico-químicas

A caracterização inicial das amostras de referência constituída pelo látex vegetal e água foi realizada para que se obtivesse parâmetros marcadores desse preparado associado a *E. umbellata*. Assim, os métodos químicos e físico-químicos utilizados na parametrização dessas amostras foram essenciais para produzir material

comparativo que pode vir a ser utilizado na busca da presença do látex dessa espécie botânica em amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba”.

Utilizando a fonte *ESI* foi possível obter uma melhor ionização das amostras (LEUQU e LEUFS), indicando a presença de espécies químicas polares na composição das amostras de referência. Além disso, o modo positivo propiciou um espectro mais rico em sinais, utilizando na injeção uma baixa concentração (10 mg/mL) das amostras. Para as avaliações obtidas a partir de injeção direta em espectrômetro de massas, nota-se que as regiões do espectro entre 300 – 500 *m/z* e 550 – 750 *m/z* são as mais relevantes, já que são regiões de maior abundância de íons, além de apresentarem as espécies químicas mais intensas (Figura 9).

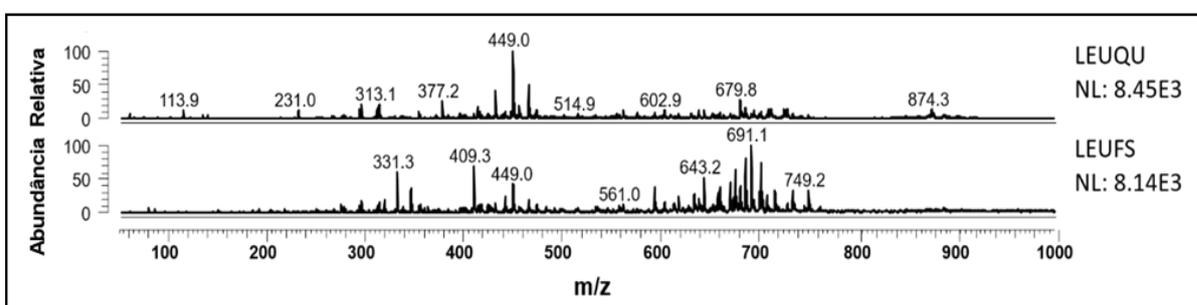


Figura 9: Espectros de massas, em resolução unitária, obtidos por injeção direta das amostras de referência em ionização por *electrospray* (*ESI*), no modo positivo. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca.

Na análise espectroscópica de absorvância em UV-VIS, a utilização de um amostrador automático analítico junto a um detector de arranjo de diodos automatizou o processo de análise e permitiu avaliações do perfil químico das amostras de forma rápida, utilizando pequenas quantidades de amostra (2 μ L). Nessas análises, as amostras de referência LEUQU e LEUFS apresentaram absorvância na faixa entre 190 - 220 nm e um λ [lambda] máximo em 207 nm (Figura 10).

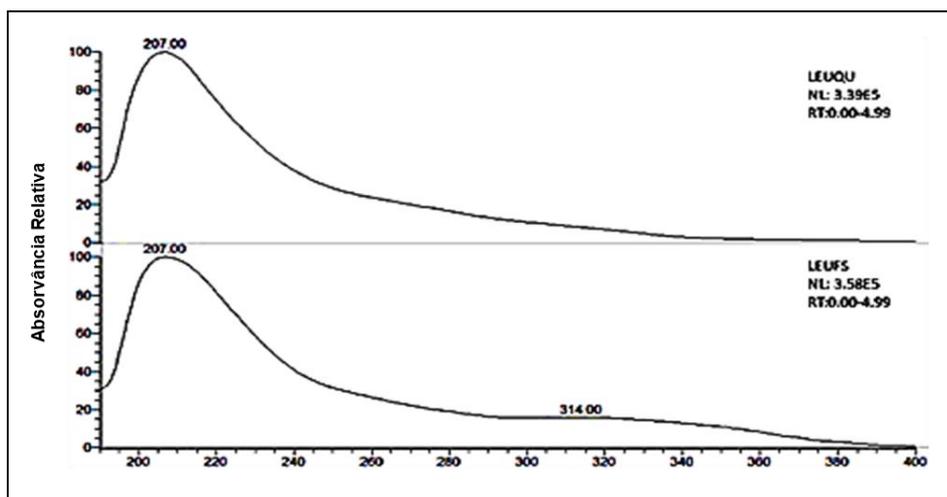


Figura 10: Espectro de perfil total no ultravioleta das amostras de referência: LEUQU: Látex de *E. umbellata* coletado na estação quente úmida. LEUFS: Látex de *E. umbellata* coletado na estação fria e seca.

Para as análises em infravermelho, o uso de espectrofotômetro com base ATR, assim como esperado, tornou a obtenção do perfil químico mais rápida e diminui o tempo e material gastos com preparo das amostras em comparação as análises convencionais utilizando pastilhas de KBr (brometo de potássio), por exemplo. Os perfis obtidos por ATR-FTIR apresentaram sinais de transmitância relevantes nas faixas de 500-1000 cm^{-1} , 1400-1900 cm^{-1} , 2200-2900 cm^{-1} e 3500-3900 cm^{-1} (Figura 11).

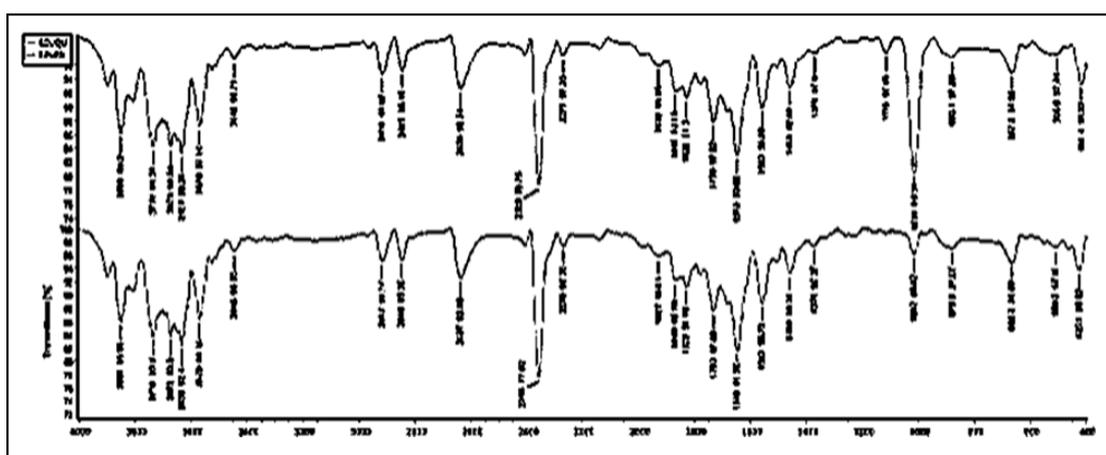


Figura 11: Espectros de perfil total no infravermelho das amostras de referência: LEUQU: Látex de *E. umbellata* coletado na estação quente úmida. LEUFS: Látex de *E. umbellata* coletado na estação fria e seca

As avaliações físico-químicas (Quadro 1) mostraram que as amostras de referência (látex de *E. umbellata*) são: brancas com pH próximo ao neutro;

apresentam em torno de 1,4 g de precipitado de aspecto granular para cada 1000 mL de amostra; a fração aquosa seca apresenta cerca de 0,0096 g; as amostras são pouco densas (1500 mg/mL) e pouco viscosas (1006 Pa.s/0,0480 St); taxa de sedimentação de cerca de 0,965 F com 0,011 g de sedimento total; baixo teor de minerais (0,45%); cerca de 13,5 % de sólidos solúveis, além disso são bastante solúveis em acetonitrila e clorofórmio (Quadro 2).

Quadro 1: Características físico-químicas das amostras de referência de *E. umbellata* adquiridas de acordo com os métodos descritos no item 3.2.3.

Amostras	Cor	pH	Precipitado (g)	Aspecto do Precipitado	Densidade (mg/mL)	Viscosidade Dinâmica (Pa.s)	Viscosidade Cinemática (St)	Massa seca da fração aquosa (g)	Sólidos Solúveis °Brix (%)	Cinzas Totais (%)	Taxa de Sedimentação (F)	Sedimento Total (g)
LEUQU-Referência (Quente-Úmido)	Branco	6,94	1,367	Granular	1460	1004	0,0687	0,0094	14	0.4	0,97	0,013
LEUFS-Referência (Frio-Seco)	Branco	6,96	1,494	Granular	1650	1011	0,0191	0,0101	13	0.5	0,96	0,011

Quadro 2: Solubilidade das amostras de referência de *E. umbellata* em diferentes solventes (diferentes graus de polaridade).

Solubilidade	Solventes
Insolúvel	água
Pouco solúvel	etanol; butanol; acetato de etila
Solúvel	metanol; diclorometano; hexano
Muito solúvel	acetonitrila; clorofórmio

Os métodos espectrométricos e espectroscópicos utilizados demonstraram ser eficientes na obtenção dos perfis químicos das amostras de referência. As análises físico-químicas demonstraram ser alternativas (ou complementos) aos demais métodos, já que a maior parte das análises não exigem instrumentos de análise de valor elevado.

4.2. Avaliação das embalagens das preparações comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba”

Observando-se os frascos e as vedações, assim como a presença ou não de rotulagem, nota-se que todas são distintas, independente da região onde o produto era comercializado, ou seja, não há indícios de padronização quanto à embalagem desse produto, o que é esperado de produtos não registrados (Figura 12). Os frascos são confeccionados de material plástico ou vidro, sendo transparentes, de coloração âmbar ou branca opaca. O volume comercializado é, também, bastante diversificado, sendo as amostras comercializadas em frascos contendo entre 20 - 1000 mL. Todas as vedações eram plásticas, exceto em uma das amostras oriunda do Ceará (LCEA), onde uma rolha de cortiça era utilizada como vedação. De maneira geral, as rotulagens, quando presentes, apresentavam informações da espécie utilizada no preparado, modo de ingestão, conservação, indicação, datas de fabricação e validade (Quadro 3).



Figura 12: Amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” obtidas para o estudo. LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA e LSPB: amostras de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA e LCEB: amostras do Ceará; LACA e LACB: amostras do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

O contato direto com o plástico utilizado nos frascos e/ou vedações, algumas das vezes reaproveitadas, pode resultar em um processo de contaminação do produto comercializado. Estes recipientes são normalmente constituídos de termoplásticos, sendo polietileno (PE), polipropileno (PP) e poli tereftalato de etila (PET) os mais comumente encontrados (Rodrigues *et al.*, 2019). A presença desses termoplásticos

pode gerar impactos negativos na saúde. Segundo ensaios *in vivo* em camundongos realizados por Deng *et al.* (2017), a ingestão de PE, PP e poliestireno (PS) pode vir a causar perturbações no metabolismo energético e estresse oxidativo, além de diversas consequências associadas a um quadro de hepatotoxicidade. Estes mesmos plásticos podem vir a gerar danos a tecidos cerebrais e epiteliais como foi indicado por Schirinzi *et al.* (2017) em suas análises *in vitro* dos efeitos desses termoplásticos no processo de citólise e geração de espécies reativas de oxigênio. O uso de embalagens opacas e de coloração âmbar é o mais indicado, já que a exposição à intensa luminosidade pode acarretar modificações do produto. Segundo Toledo *et al.* (2003) algumas substâncias vegetais podem ser facilmente degradadas/ modificadas se expostas a fatores como: luz, calor, entre outros. Deste modo, processos de coleta, envase e acondicionamento dessas amostras de forma descuidada e sem preocupação com a higiene ou a qualidade do produto podem resultar em variações de diversos aspectos físicos do produto, assim como em sua composição química. A ausência de informações em algumas amostras, a presença de dados errôneos sobre o produto tais como a posologia, datas de fabricação e validade, além da identidade botânica podem acarretarem uso indevido, gerando diversos riscos ao consumidor. A presença de rótulos contendo informações de posologia e indicação, muitas das vezes elaboradas por pessoas sem conhecimento técnico-científico é de grande preocupação para a farmacovigilância, além disso a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) proíbe a indicação terapêutica para qualquer finalidade de quaisquer produtos sem registros (Silveira *et al.*, 2008).

Ao analisar o aspecto geral das amostras comerciais de leite de Janaguba/Janaúba, nota-se que o material era preparado em água e assemelhava-se a uma emulsão.

Quadro 3: Análise das embalagens e rotulagens das amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” adquiridas para o estudo.

Amostra-Origem	Frasco	Volume (mL)	Vedação	Rotulagem	Informações da espécie	Posologia	Modo de conservação	Indicação	Fabricação/ Validade
LSPA- São Paulo (sudeste)	Vidro âmbar	20	Plástica	Presente	Fotografia de <i>E. umbellata</i> na embalagem	Diluição de todo conteúdo da amostra em 1,5 L de água e ingestão de 30 mL do material diluído duas vezes ao dia	Ausente	Ausente	Presente
LSPB- São Paulo (sudeste)	Plástico âmbar	50	Plástica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
LRJ- Rio de Janeiro (sudeste)	Plástico transparente	100	Plástica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
LCEA- Ceará (nordeste)	Vidro transparente	1000	Metálica	Presente	Ausente	Ingestão de 30 gotas do material concentrado três vezes ao dia	Ausente	Tratamento do câncer, diabetes, reumatismo, tuberculose, IST's e Inflamações	Presente
LCEB- Ceará (nordeste)	Plástico transparente	1000	Plástica	Presente	Ausente	Ingestão de 2 colheres de sopa do material concentrado três vezes ao dia	Refrigeração	Inflamação, gastrite, úlceras, reumatismo, diabetes, circulação e câncer	Presente
LMA- Maranhão (nordeste)	Plástico branco opaco	250	Plástica	Presente	Informações sobre a família Apocynaceae e o gênero <i>Plumeria</i>	Ingestão de 1 colher de sopa do material concentrado ou diluído em 50 mL de água uma vez ao dia	Refrigeração	Ausente	Presente
LACA- Acre (Norte)	Plástico âmbar	50	Plástica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
LACB- Acre (Norte)	Plástico âmbar	50	Plástica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
LPA- Pará (Norte)	Plástico transparente	200	Plástica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

4.3. Comparação entre os resultados obtidos por DI-MS das amostras comerciais com as amostras de referência

Os espectros de massas obtidos por injeção direta em *ESI* modo positivo das amostras de referência (LEUQU e LEUFS) e das amostras comerciais estão mostrados na Figura 13. Ao observarmos os espectros de massas obtidos, verifica-se a semelhança na presença e intensidade dos íons na região entre 50-400 *m/z* comuns entre todas as amostras (comerciais e referências). Porém, nota-se que as amostras de referência (LEUQU e LEUFS) e as do Sudeste (LSPA, LSPB e LRJ) apresentam regiões específicas muito semelhantes entre si, sendo o mesmo também observado nos preparados do Norte e do Nordeste.

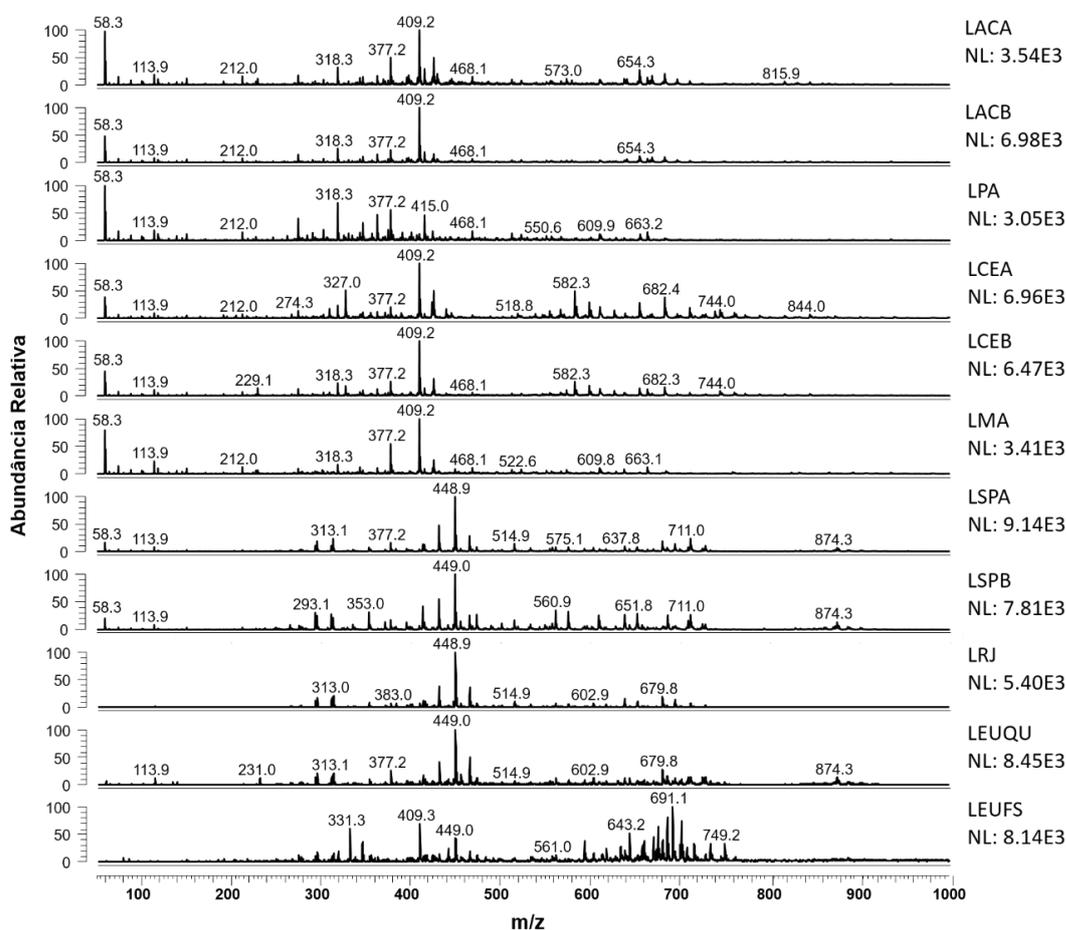


Figura 13: Espectros de massas, em resolução unitária, obtidos por injeção direta das amostras comerciais e das amostras de referência em ionização por *electrospray* (*ESI*), no modo positivo. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Os espectros das amostras obtidas da região Norte e Nordeste são bastante similares entre si, com variações apenas na intensidade dos íons observados. Porém, a amostra LPA chama atenção por não apresentar o íon 409 m/z intenso como nas demais amostras. As amostras LCEA e LCEB também apresentam certa diferença das demais na região entre 500-800 m/z . As amostras da região Sudeste são diferentes daquelas obtidas na região Norte e Nordeste, sendo mais semelhantes às amostras de referência LEUQU e LEUFS. Dadas as semelhanças observadas e considerando que as amostras do Sudeste contenham o látex de *E. umbellata* em sua composição, pode-se chamar atenção para o íon 874 m/z , presente nas amostras LSPA, LSPB e LEUQU (período quente e úmido), que pode vir a indicar o período de coleta do látex utilizado nestes preparados comerciais, já que este íon não é encontrado nas amostras LRJ e LEUFS (período frio e seco). A amostra LEUFS chama atenção na variação brusca das intensidades dos íons 449 m/z , 409 m/z e, principalmente, na região entre 550-750 m/z .

Com a finalidade de buscar maiores informações sobre a possível semelhança entre as amostras comerciais com as amostras de referência, os espectros foram submetidos a cálculos matemáticos e quimiométricos. Os dados foram exportados como *spectrum list* (ordenados com base nas intensidades relativas) contendo os 100 íons mais intensos de cada amostra analisada. Assim, foram comparados e plotados como digramas de *Venn*, onde foi possível verificar as distribuições dos íons, assim como verificar a semelhança entre as amostras de cada região, das referências, e entre as regiões e referências (Figura 14 I-V).

Com base nos 100 íons mais intensos, pode-se avaliar a semelhança entre as amostras a partir da quantidade dos íons compartilhados. Observou-se a semelhança de 6,44% entre as amostras do Sudeste, 3,5% entre as do Nordeste, 23,11% entre as do Norte e 4,65% entre as amostras de referência. No Sudeste há maior semelhança (29,61%) entre as amostras LSPA e LSPB, quando comparada às semelhanças observadas em relação a LRJ (12,51% e 13,27%, respectivamente). Na amostra LRJ pode-se observar a ausência de alguns íons (58; 113 e 874 m/z , por exemplo) que estão presentes nas demais amostras do Sudeste (Figura 13). Nas amostras da região Nordeste há pouca semelhança entre os íons quando se compara LMA com LCEB (13,67%) e com LCEA (7,08%), visto a maior semelhança entre LCEA e LCEB, que alcança 31,76%. A região entre 550 – 750 m/z apresenta a maior semelhança

observada entre LCEA e LCEB (Figura 13). A maior semelhança entre as amostras da mesma região é vista no Norte (23,11%), onde LACA compartilha 39,66% de semelhança com LPA e 42,53% com LACB, enquanto LPA e LACB apresentam cerca de 35,43% de semelhança entre si. Visualmente não é possível identificar íons responsáveis pelas diferenças notadas no diagrama, já que LACA, LACB e LPA são muito semelhantes quanto aos íons observados no espectro (Figura 13). As amostras de referência confeccionadas com látex coletados em diferentes períodos LEUQU e LEUFS apresentam 90,90% e 90,47%, respectivamente, de íons não compartilhados.

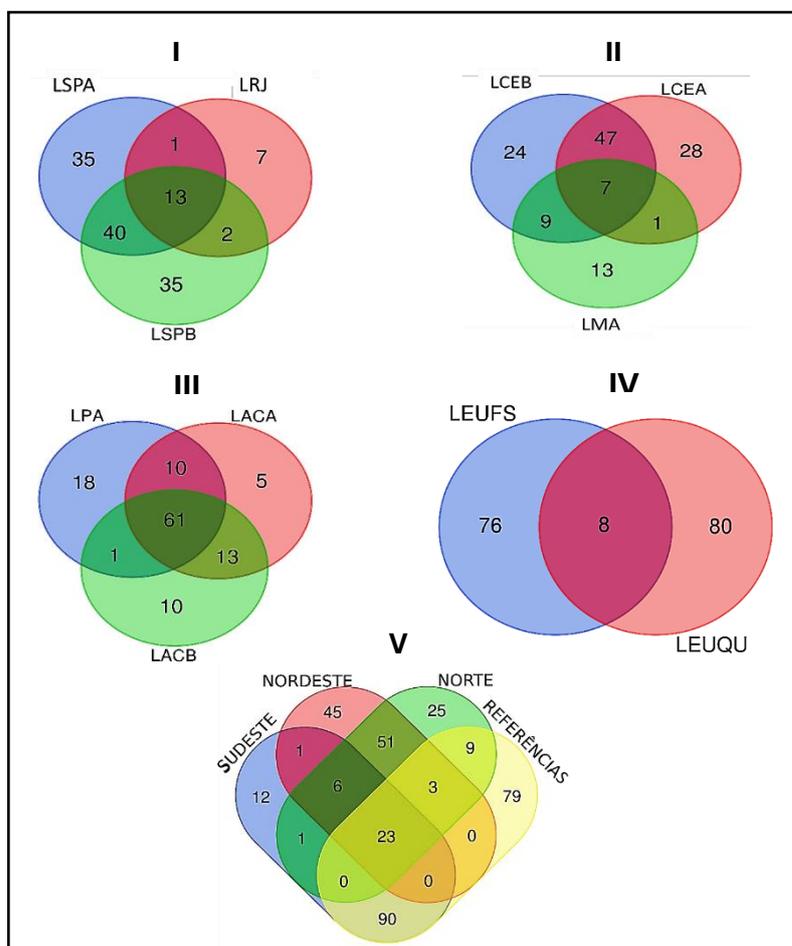


Figura 14: Diagramas de Venn dos 100 íons de maior intensidade observados nos espectros de massas, em resolução unitária, obtidos por injeção direta em *electrospray* (ESI) no modo positivo das amostras comerciais da região: (I) Sudeste, (II) Nordeste, (III) Norte, (IV) das amostras de referência e entre as (V) amostras comerciais e de referência. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Quando se compara as amostras de todas as regiões e as de referência há uma semelhança de apenas 3,94%. O grupo formado pelas amostras do Sudeste e de referência (33,53%), assim como o grupo constituído pelas amostras do Norte e Nordeste (33,60%) chamam atenção pelas maiores similaridades no diagrama das amostras comerciais e de referência comparadas entre si. Os dois grupos observados, devido à semelhança entre os íons compartilhados, podem vir a indicar que as espécies vegetais utilizadas na confecção dessas preparações são semelhantes dentro de cada grupo. Porém, apesar das similaridades observadas, os dados ainda demonstraram uma grande heterogeneidade entre as amostras, que talvez possa ser explicada pelo uso de diferentes espécies na confecção das preparações de cada estado ou região; pela sazonalidade e/ou local de coleta (solo, umidade, temperatura, entre outros fatores); pelo modo de preparo (cuidados ao manusear o látex e contaminação); e pelo armazenamento (embalagens reutilizadas ou sujas e de materiais diversos como plástico ou vidro) dos produtos comerciais e referências.

4.4. Determinação dos íons marcadores das amostras de referência a partir dos resultados de DI-MS e cálculos quimiométricos

Os dados obtidos a partir das injeções diretas em espectrômetro de massas foram avaliados por cálculos quimiométricos, buscando determinar os íons responsáveis por distinguir o grupo contendo as amostras de referência das demais. Dessa forma, pode-se determinar os íons mais relevantes (“únicos”) da espécie *E. umbellata* que podem ser utilizados como marcadores do látex. A análise ocorreu com base nos 1000 íons mais intensos das nove preparações comerciais e das duas amostras de referência, formando assim um conjunto de dados com 11 grupos, que foram analisados em triplicata de injeção, totalizando 33 amostras, 1412 picos (m/z e suas intensidades). Os dados não foram tratados quanto à transformação, normalização ou escalonamento. As separações obtidas (Figura 15) corroboram as semelhanças observadas visualmente nos espectros de massa (Figura 13) e nas análises por diagrama de *Venn* (Figura 14) descritas no item 4.1. As amostras agrupam-se por região e as amostras de referência são mais semelhantes às amostras da região Sudeste. Os íons responsáveis pelas separações foram verificados através da seleção de *Vip scores* (Quadro 4) buscando os 25 íons mais

significativos (*Top 25*) responsáveis pelos agrupamentos nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, mais as amostras de referência. Os *Vip scores* são determinados a partir da presença e intensidade dos íons nas amostras que formam os grandes agrupamentos. Os 25 íons mais significativos podem ser utilizados como marcadores das referências. Estes íons indicam a presença do látex de *E. umbellata* nas amostras comerciais da região Sudeste.

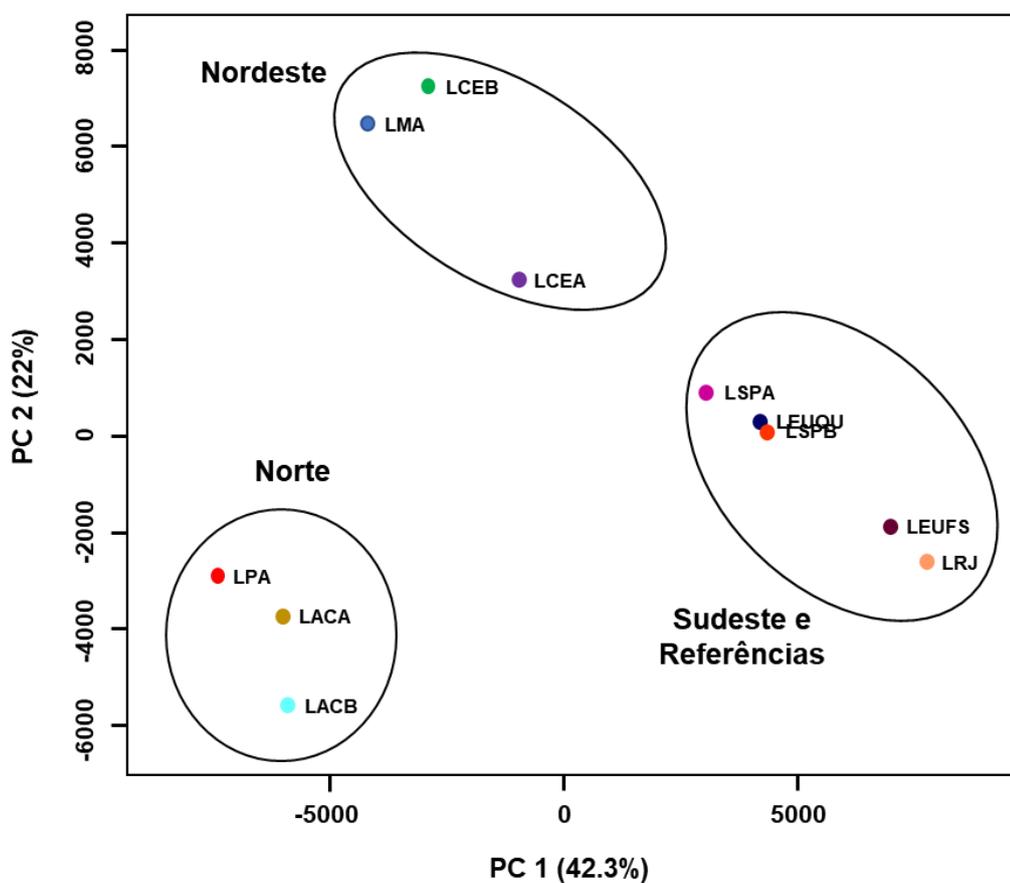


Figura 15: Scores plot por PCA dos agrupamentos das amostras comerciais e de referência, por similaridade estatística dos íons mais intensos presentes nas amostras, em ESI positivo. LRJ: amostra de origem desconhecida; LSPA: primeira amostra de São Paulo; LSPB: segunda amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: primeira amostra do Ceará; LCEB: segunda amostra do Ceará; LACA: primeira amostra do Acre; LACB: segunda amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão. As elipses foram elaboradas manualmente apenas para facilitar a visualização do agrupamento das amostras.

Quadro 4: Íons mais significativos (marcadores) dos três grandes grupos observados (*Vip score: top 25*).

Região	Íons significativos/marcadores
Sudeste e Referências	279; 297; 313; 338; 363; 409; 414; 426; 428; 437; 444; 449; 468; 490; 534; 562; 593; 612; 614; 619; 627; 640; 649; 685; 749
Nordeste	113; 130; 203; 205; 208; 217; 219; 225; 240; 256; 304; 320; 334; 352; 395; 421; 463; 487; 551; 567; 611; 655; 683; 699; 743
Norte	113; 130; 215; 219; 240; 269; 276; 284; 293; 304; 327; 329; 352; 399; 421; 463; 487; 507; 551; 579; 611; 639; 683; 699; 743

4.5. Escolha de solventes para a confecção de extratos a partir das amostras de referência

Com a finalidade de produzir um extrato seletivo e com maior abundância dos íons determinados como marcadores das amostras de referência foram realizados testes na busca do melhor solvente extrator. As massas obtidas nas diferentes extrações (Quadro 5) mostram que os maiores rendimentos foram alcançados nas extrações com metanol (88,6%), acetonitrila (91,7%) e clorofórmio (98,1%).

Quadro 5: Massa final dos extratos do látex de *E. umbellata* utilizando diferentes solventes. Valores de força eluotrópica segundo Broekaert (2015).

Força eluotrópica	Sequência eluotrópica	Solventes	Massa Final (g)
Alta	1	água	0,6701
	0.70	metanol	0,8881
	0.65	etanol	0,8862
Média	0.50	butanol	0,8874
	0.52	acetonitrila	0,9173
	0.48	acetato de etila	0,9013
Baixa	0.30	diclorometano	0,9799
	0.26	clorofórmio	0,9809
	0.01	hexano	0,9647

Os extratos obtidos a partir dos diferentes solventes foram analisados por injeções diretas em espectrômetro de massas (Figura 16). Os espectros de massa evidenciaram que a região inicial do espectro (100-500 m/z) é bem semelhante para os extratos obtidos com todos os solventes, com exceção da extração com água, onde há o aparecimento de algumas espécies mais intensas entre a faixa de 100-210 m/z . Na faixa entre 500-1000 m/z estão localizadas as maiores diferenças entre os solventes extrativos, onde a região entre 550-750 m/z mostra diferentes variações de intensidade entre os perfis observados, sendo que os extratos obtidos em acetonitrila e hexano mostraram íons mais intensos nessa faixa.

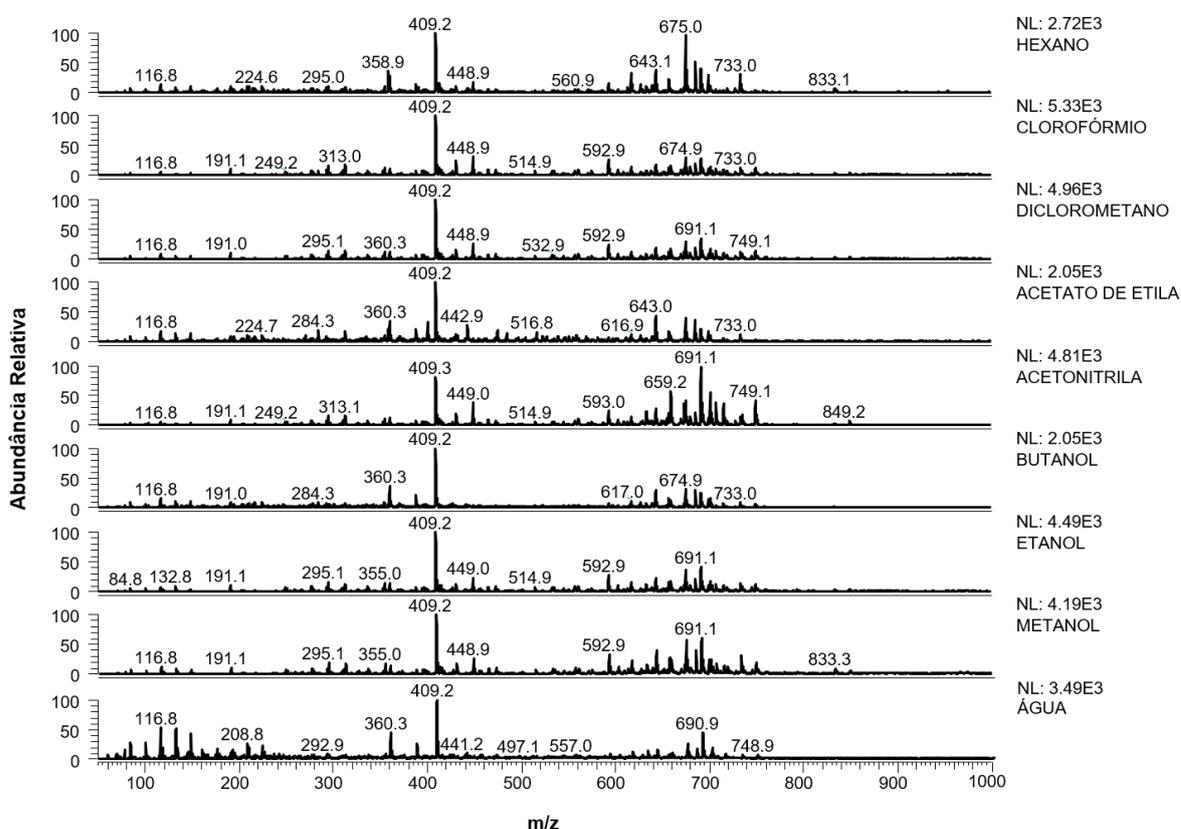


Figura 16: Espectro de massas por injeção direta dos extratos do látex de *E. umbellata* produzidos em diferentes solventes. H₂O = água; MeOH = metanol; EtOH = etanol; ACN = acetonitrila; DCM = diclorometano; CH₂Cl₃ = clorofórmio.

Os dados obtidos foram exportados como *spectrum list* dos 1000 íons mais intensos e explorados, de acordo com a força eluotrópica, pelas semelhanças observadas nos diagramas de *Venn* (Figura 17). Os 25 íons determinados como marcadores foram buscados manualmente em cada extrato gerado, no espaço de íons não compartilhados, assim como nas interseções observadas entre os extratos, de acordo com a força eluotrópica.

A distribuição dos íons observada demonstra uma semelhança de 15,76% dos íons presentes nos solventes de força eluotrópica alta, 13,28% nos de média e 20,54% quando se compara os de baixa. Nos extratos obtidos de solventes extratores de alta força eluotrópica há uma semelhança de 44,79% dos íons extraídos por etanol e metanol, enquanto as similaridades entre os íons extraídos com água e etanol ou metanol são de apenas 25,25% e 24,11%, respectivamente. A semelhança entre os íons encontrados nos extratos em butanol e acetato de etila (36,22%) é a maior entre os solventes de força eluotrópica média, já que quando comparado aos íons extraídos por acetonitrila há uma semelhança de apenas 21,27% e 25,29% com os íons extraídos por butanol e acetato de etila, respectivamente. A maior correlação entre solventes é vista entre os íons extraídos por diclorometano e clorofórmio (46,49%). Nos demais solventes de baixa força eluotrópica, as correlações dos íons extraídos são de 31,88% (hexano-diclorometano) e 31,86% (hexano-clorofórmio). Ao avaliar os solventes agrupados por força eluotrópica, a correlação entre todos é de 23%. As demais semelhanças são bem próximas: 35,57%: alta-média; 38,10%: média-baixa; 39,78%: alta-baixa polaridade.

A distribuição de íons foi bastante uniforme, não apresentando diferenças relevantes na quantidade de íons extraídos por cada solvente (ou grupo de solventes). Porém, a busca ativa dos íons marcadores demonstrou que clorofórmio e acetonitrila juntos conseguiam extrair todos os 25 íons marcadores. Logo, os solventes acetonitrila e clorofórmio (1:1) foram selecionados para gerar o extrato utilizado na cromatografia em camada preparativa, buscando frações contendo os íons marcadores que possam ser tentativamente identificados (tentativamente identificados).

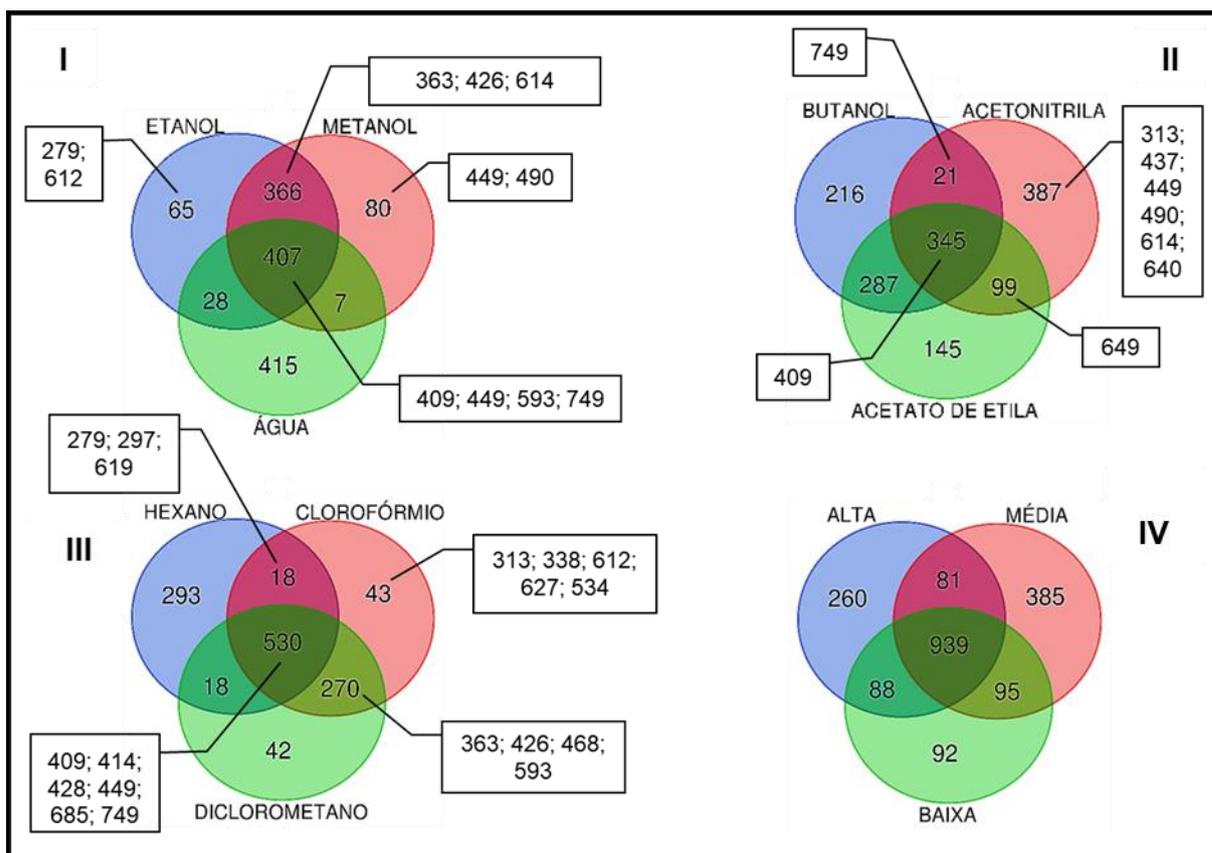


Figura 17: Diagramas de Venn da distribuição dos 1000 íons mais intensos do látex de *E. umbellata* nos diferentes solventes extratores de forças eluotrópicas: alta (I), média (II), baixa (III) e reunidas (IV). As caixas apresentam os íons mais significativos (grupo: região Sudeste e referências) descritos no item 4.2 (Quadro 4).

4.6. Cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) das frações obtidas por CCP

Após realizar buscas manuais dos sinais relacionados aos 25 íons marcadores nas frações obtidas por CCP e avaliadas por GC-MS, identificou-se 16 substâncias com massas semelhantes a 9 íons (296; 338; 408; 426; 428; 444; 468; 562; 618 m/z) determinados como marcadores. Apenas duas frações (1 e 5) da cromatografia em camada preparativa destacaram-se por apresentar a presença de 9 íons com massas semelhantes àqueles determinados como marcadores. Para as frações 9-16 não foram obtidos bons resultados no método desenvolvido por GC-MS. Os cromatogramas obtidos por cromatografia em fase gasosa para as bandas 1 e 5 podem ser visualizados nas Figuras 18 e 20, respectivamente. As frações foram caracterizadas como misturas de alcanos (Figuras 18 e 19; Quadro 6) e de triterpenos (Figuras 20 e 21; Quadro 7). Nos quadros 6 e 7 estão descritas as 16 substâncias que

foram anotadas a partir de comparações com espectros disponíveis nas bibliotecas NIST 8 e WILEY 7.

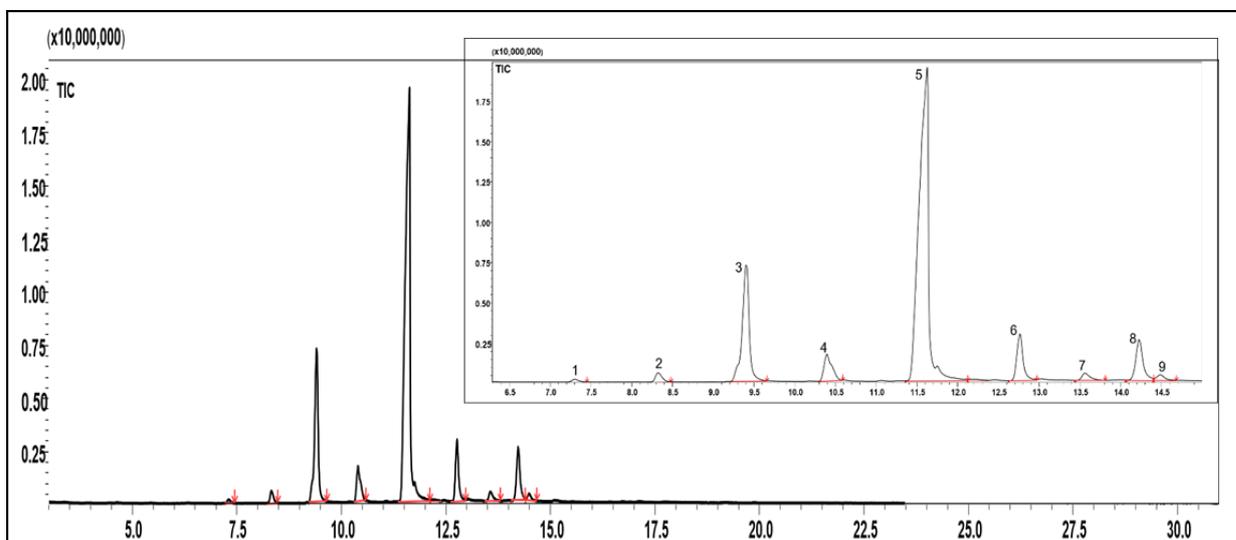


Figura 18: Cromatograma por GC-MS da fração (banda 1) obtida por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

Quadro 6: Substâncias anotadas por GC-MS da fração (banda 1) obtidas por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

N° do Pico	Tempo de retenção (min)	Área do pico (%)	Similaridade (%)	Substância anotada	<i>m/z</i> fragmentos (int. x100)	Fórmula molecular	Peso molecular
Fração (Banda 1)							
3	9,40	17,03	96	tetratetracontano	267(1), 239(1), 225(2), 211(2), 197(2), 183(3), 169(4), 155(6), 141(8), 127(11), 113(15), 99(14), 85(58), 71(80), 57(100), 43(52)	C ₄₄ H ₉₀	618
4	10,40	4,31	98	tetracontano	281(2), 253(1), 239(1), 225(1), 211(2), 197(2), 183(3), 169(3), 155(5), 141(7), 127(10), 113(14), 99(20), 85(55), 71(74), 57(100), 43(54)	C ₄₀ H ₈₂	562
5	11,63	62,57	96	nonacosano	281(4), 267(2), 253(2), 239(2), 225(1), 211(1), 207(7), 197(3), 183(3), 169(3), 155(6), 141(7), 127(9), 113(14), 99(18), 85(51), 71(76), 57(100), 43(54)	C ₂₉ H ₆₀	408
6	12,77	6,04	96	tricosanona	323(1), 309(3), 297(6), 281(23), 267(4), 253(11), 239(2), 227(5), 211(14), 199(16), 183(29), 169(7), 155(6), 138(10), 127(11), 113(8), 97(29), 85(46), 71(90), 57(100), 43(85)	C ₂₃ H ₄₆ O	338
8	14,23	6,03	96	heneicosano	281(22), 253(1), 239(1), 225(1), 211(2), 206(3), 197(2), 183(2), 169(4), 155(5), 141(7), 127(10), 113(14), 99(20), 85(52), 71(72), 57(100), 43(51)	C ₂₁ H ₄₄	296

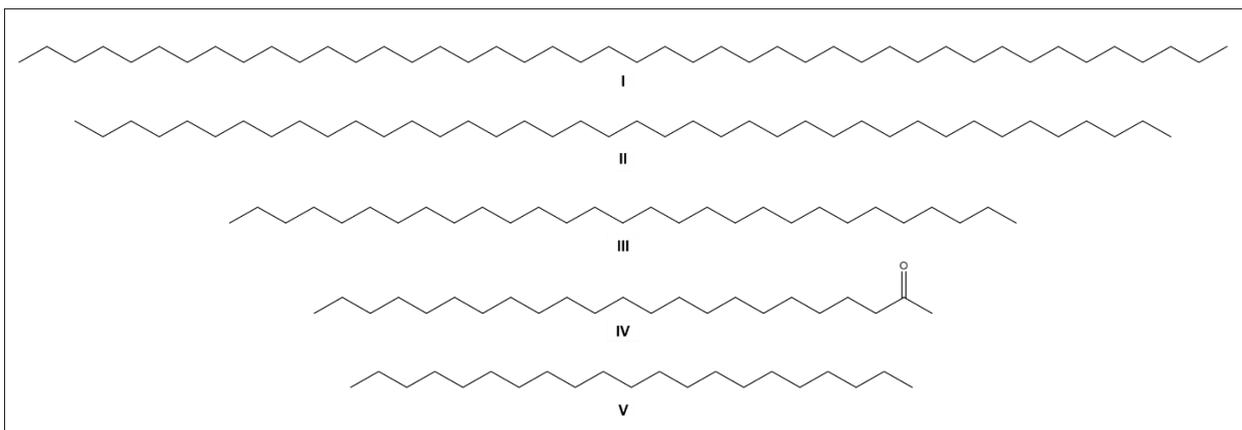


Figura 19: Alcanos tentativamente identificados através de análises por GC-MS e comparações com as bibliotecas NIST 8 e WILEY 7. Substâncias: (I) tetraetracontano; (II) tetracontano; (III) nonacosano; (IV) tricosanona; (V) heneicosano.

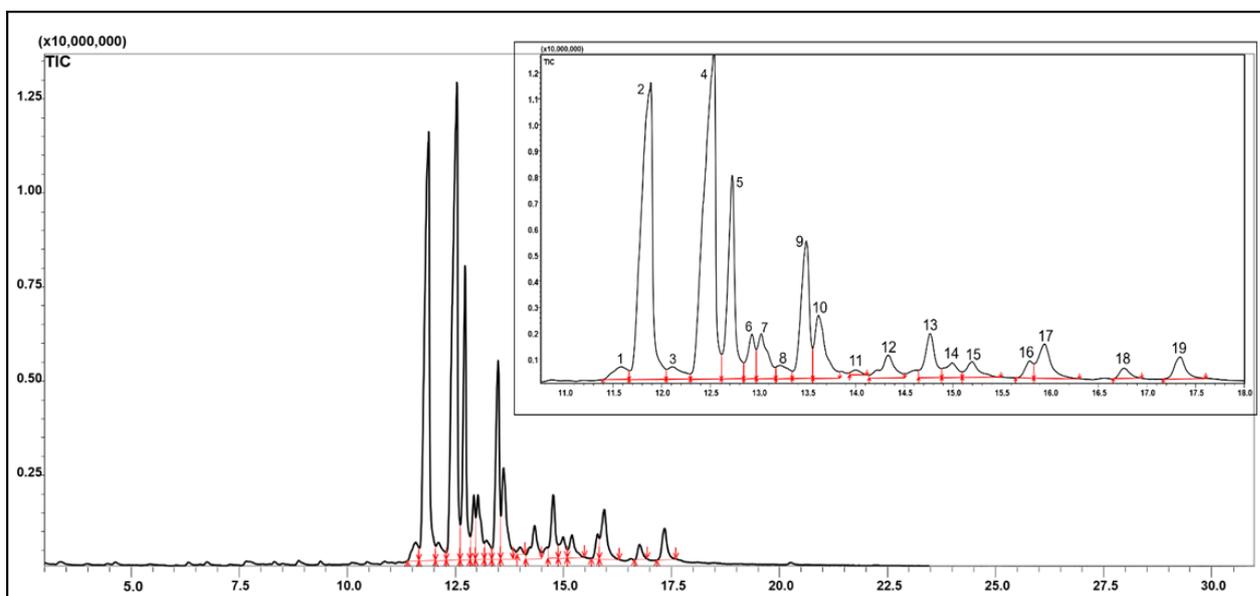


Figura 20: Cromatograma por GC-MS da fração (banda 5) obtida por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

Quadro 7: Substâncias anotadas por GC-MS da fração (banda 5) obtidas por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

[Continua]

Nº do Pico	Tempo de retenção (min)	Área do pico (%)	Similaridade (%)	Substância tentativamente identificada	<i>m/z</i> fragmentos (int. x100)	Fórmula molecular	Peso molecular
Fração (Banda 5)							
2	11,88	24,50	92	lanosterol	426(14), 411(76), 393(41), 341(2), 337(1), 323(2), 311(5), 297(4), 283(4), 271(6), 259(18), 241(15), 229(10), 215(13), 201(9), 187(15), 173(11), 161(15), 147(19), 135(24), 121(29), 109(60), 95(49), 81(36), 69(100), 55(39), 41(39)	C ₃₀ H ₅₀ O	426
4	12,54	27,51	94	tirucalol	426(15), 411(68), 393(43), 341(2), 337(2), 323(2), 311(5), 297(4), 283(5), 271(6), 259(19), 241(17), 229(10), 215(13), 201(9), 189(15), 175(12), 161(16), 147(19), 135(24), 121(28), 109(62), 95(47), 81(36), 69(100), 55(40), 41(39)	C ₃₀ H ₅₀ O	426
5	12,73	10,43	90	fernenol	426(13), 411(5), 393(4), 383(3), 365(2), 315(4), 297(3), 271(1), 257(3), 247(2), 229(7), 218(11), 207(42), 189(49), 175(20), 161(29), 147(28), 135(52), 121(37), 109(70), 95(76), 81(54), 69(87), 55(38), 43(100)	C ₃₀ H ₅₀ O	426
6	12,93	2,41	92	eufol	426(9), 411(61), 393(32), 341(2), 339(1), 327(2), 313(7), 297(4), 283(5), 271(7), 259(11), 241(11), 229(7), 215(9), 201(9), 189(16), 173(19), 161(16), 147(25), 135(32), 121(32), 109(67), 95(56), 81(45), 69(100), 55(50), 41(50)	C ₃₀ H ₅₀ O	426

Quadro 7: Substâncias anotadas por GC-MS da fração (banda 5) obtidas por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.**[Continua]**

7	13,03	3,28	90	acetato de lupeol	468(8), 426(9), 411(15), 393(7), 365(3), 357(7), 327(3), 299(5), 281(15), 276(7), 257(8), 249(14), 229(12), 218(48), 207(29), 203(35), 189(79), 175(27), 161(32), 147(44), 135(63), 121(73), 107(72), 95(82), 81(74), 69(68), 55(55), 43(100)	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	468
9	13,49	8,33	96	cicloartenol	426(4), 411(13), 393(26), 365(15), 339(10), 313(3), 297(3), 286(14), 271(12), 259(5), 243(6), 231(7), 215(8), 203(14), 189(13), 173(26), 161(23), 147(38), 135(41), 121(45), 109(54), 95(72), 81(54), 69(100), 55(53), 41(50)	C ₃₀ H ₅₀ O	426
10	13,62	4,90	90	taraxasterol	426(11), 411(35), 393(25), 365(2), 339(2), 327(2), 313(4), 297(4), 283(4), 271(7), 259(10), 241(9), 229(10), 218(10), 207(20), 203(14), 189(27), 175(19), 161(21), 147(31), 135(49), 121(44), 109(70), 95(70), 81(60), 69(100), 55(55), 41(50)	C ₃₀ H ₅₀ O	426
12	14,34	2,19	90	ciclolaudenol	440(6), 427(14), 409(27), 393(14), 389(1), 381(1), 355(6), 327(10), 313(5), 297(4), 281(17), 273(9), 259(14), 255(10), 241(15), 229(10), 215(12), 207(42), 189(28), 173(19), 161(26), 147(40), 135(50), 119(49), 109(77), 95(79), 81(65), 69(100), 55(72), 43(75)	C ₃₁ H ₅₂ O	444

Quadro 7: Substâncias anotadas por GC-MS da fração (banda 5) obtidas por cromatografia em camada preparativa do extrato de látex de *E. umbellata*.

[Conclusão]

13	14,77	3,10	92	lupeol	426(16), 411(88), 393(25), 365(1), 355(1), 327(4), 311(3), 297(5), 273(17), 259(100), 241(54), 229(19), 215(10), 207(12), 189(19), 173(14), 159(21), 147(27), 135(38), 119(54), 109(58), 95(83), 81(61), 69(73), 55(62), 43(56)	C ₃₀ H ₅₀ O	426
17	15,95	3,18	90	friedelin-3β-ol	428(5), 411(4), 407(5), 397(3), 369(3), 355(8), 341(9), 327(18), 316(30), 273(15), 261(15), 243(12), 229(11), 215(8), 207(23), 187(17), 175(26), 159(23), 147(33), 135(42), 125(54), 109(44), 95(43), 81(32), 69(100), 57(74), 41(33)	C ₃₀ H ₅₂ O	428
19	17,34	1,77	90	friedelina	426(6), 411(5), 393(4), 370(2), 358(3), 341(2), 327(2), 315(8), 299(4), 281(5), 271(2), 257(3), 24(3), 229(5), 218(10), 207(58), 189(54), 175(20), 161(33), 147(38), 135(57), 125(52), 109(67), 95(84), 81(70), 69(100), 55(58), 43(50)	C ₃₀ H ₅₀ O	426

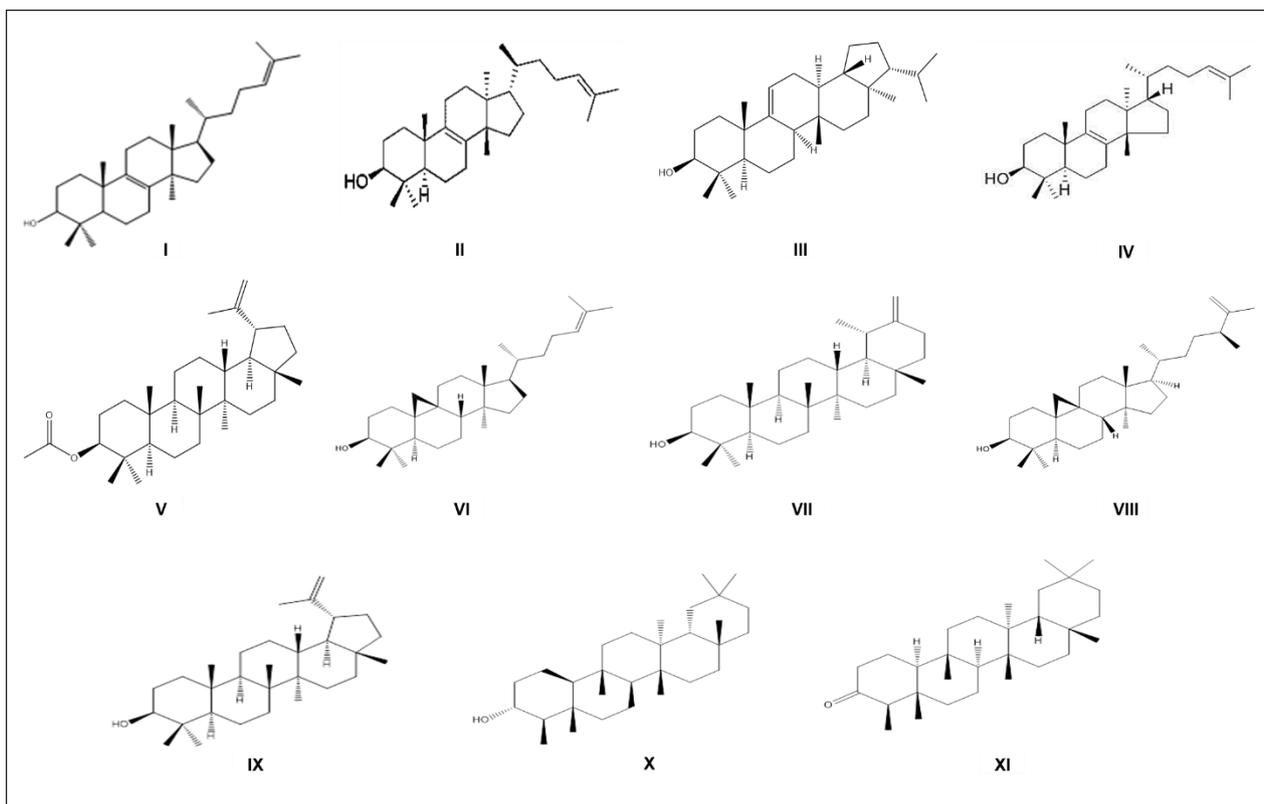


Figura 21: Triterpenos tentativamente identificados através de análises por GC-MS e comparações com as bibliotecas NIST 8 e WILEY 7. Substâncias: (I) lanosterol; (II) tirucalol; (III) fernenol; (IV) eufol; (V) acetato de lupeol; (VI) cicloartenol; (VII) taraxasterol; (VIII) ciclolaudenol; (IX) lupeol; (X) friedelin-3 β -ol; (XI) friedelina.

Dentre as 16 substâncias tentativamente identificadas, onze correspondem a álcoois triterpênicos tetra- e pentacíclicos. Essas identificações corroboram as substâncias encontradas por Kanunfre *et al.* (2017); Valadão *et al.* (2018); Cruz *et al.* (2020) nos órgãos caule e folha, e látex de *E. umbellata*. Cinco alcanos foram tentativamente identificados e correspondem aos hidrocarbonetos identificados por Uzabakiliho *et al.* (1987), Koops *et al.* (1991) e Jassbi (2006) em diferentes espécies do gênero *Euphorbia* L. Alguns dos íons marcadores, apesar de não terem sido encontrados nas análises realizadas neste estudo, corroboram dados químicos (m/z) encontrados na literatura. Acredita-se que o íon m/z 482 corresponda a um outro triterpeno pentacíclico não identificado, enquanto os íons m/z 409, 414 e 440 correspondam a esteróides encontrados em outras espécies do gênero *Euphorbia* L. (Govardhan *et al.*, 1984; Akihisa *et al.*, 2002; Kanunfre *et al.*, 2017 e De Souza *et al.*, 2019). De Souza *et al.* (2019) também observaram dois ácidos graxos (ácido linolênico e ricinoléico) no látex de *E. tirucalli* com massas (279 e 297 m/z) semelhante àquelas observadas como possíveis marcadoras. Também foram observados íons

marcadores semelhantes aos diterpenos de esqueleto ingol: 3,7,12-O-triacetil-8-O-benzoil-18-hidroxiarol (m/z 612), acetato de 19-acetoxi, ingol 3-(4-metoxifenil) (m/z 627) e 3,12-diacetato 7,8-ditigliato de ingol (m/z 649) (Fatope *et al.*, 1996; Daoubi *et al.*, 2007; Lin & Kinghorn, 1983; Marco *et al.*, 1998). Em seus estudos, com diferentes espécies do gênero *Euphorbia*, Haba *et al.* (2007), Costa *et al.* (2012) e De Souza *et al.* (2019) observaram a presença dos diterpenos de esqueleto forbol: 4,12-didesoxi-(4 α)-13-hexadecanoil forbol (m/z 593), 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (m/z 449), 12,13,20-triacetil forbol (m/z 490), 4-desoxi forbol (m/z 348) e o núcleo de forbol (m/z 363), que também apresentam m/z semelhantes aos íons marcadores observados nas amostras da região sudeste e de referência.

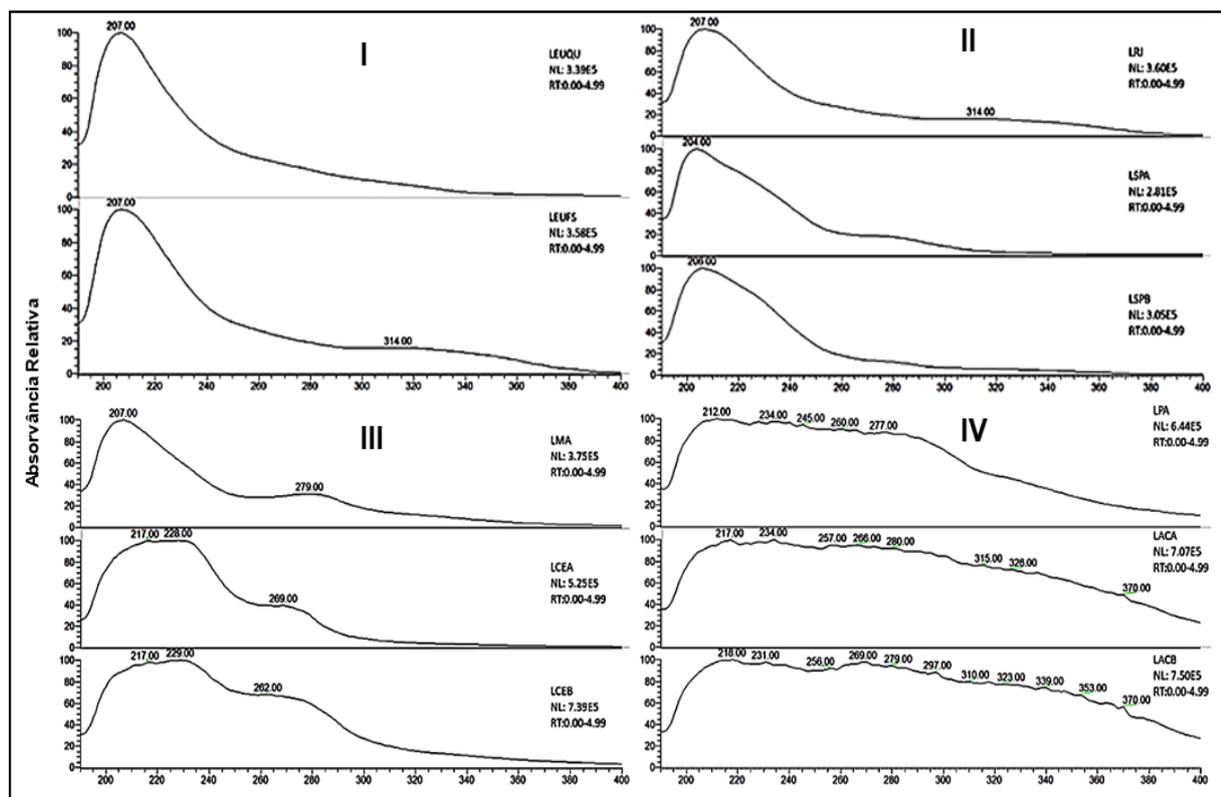
4.7. Comparação entre os resultados obtidos por métodos espectroscópicos das amostras comerciais com as amostras de referência

As análises utilizando os métodos espectroscópicos UV-VIS e ATR-FTIR permitiram verificar a semelhança química entre as amostras comerciais e de referência. Os cálculos quimiométricos obtidos a partir dos sinais dos espectros de UV-VIS e ATR-FTIR corroboram as análises de DI-MS descritas no item 4.2. Da mesma forma, as amostras se separam em três grupos principais, determinados pelas regiões, enquanto as amostras de referência se agrupam junto às da região Sudeste.

Para as análises em UV-VIS, as amostras de referência e as da região Sudeste apresentaram em seus perfis (semelhantes) um lambda máximo em 207 nm. LCEA e LCEB apresentam lambdas máximos em torno de 217 nm, 228 nm e 265 nm, enquanto LMA apresenta valores mais destoantes, 207 e 279 nm. Já LACA, LACB e LPA, formam uma curva contínua com inúmeros pontos com lambdas máximos que variam de 212 a 370 nm (Figura 22).

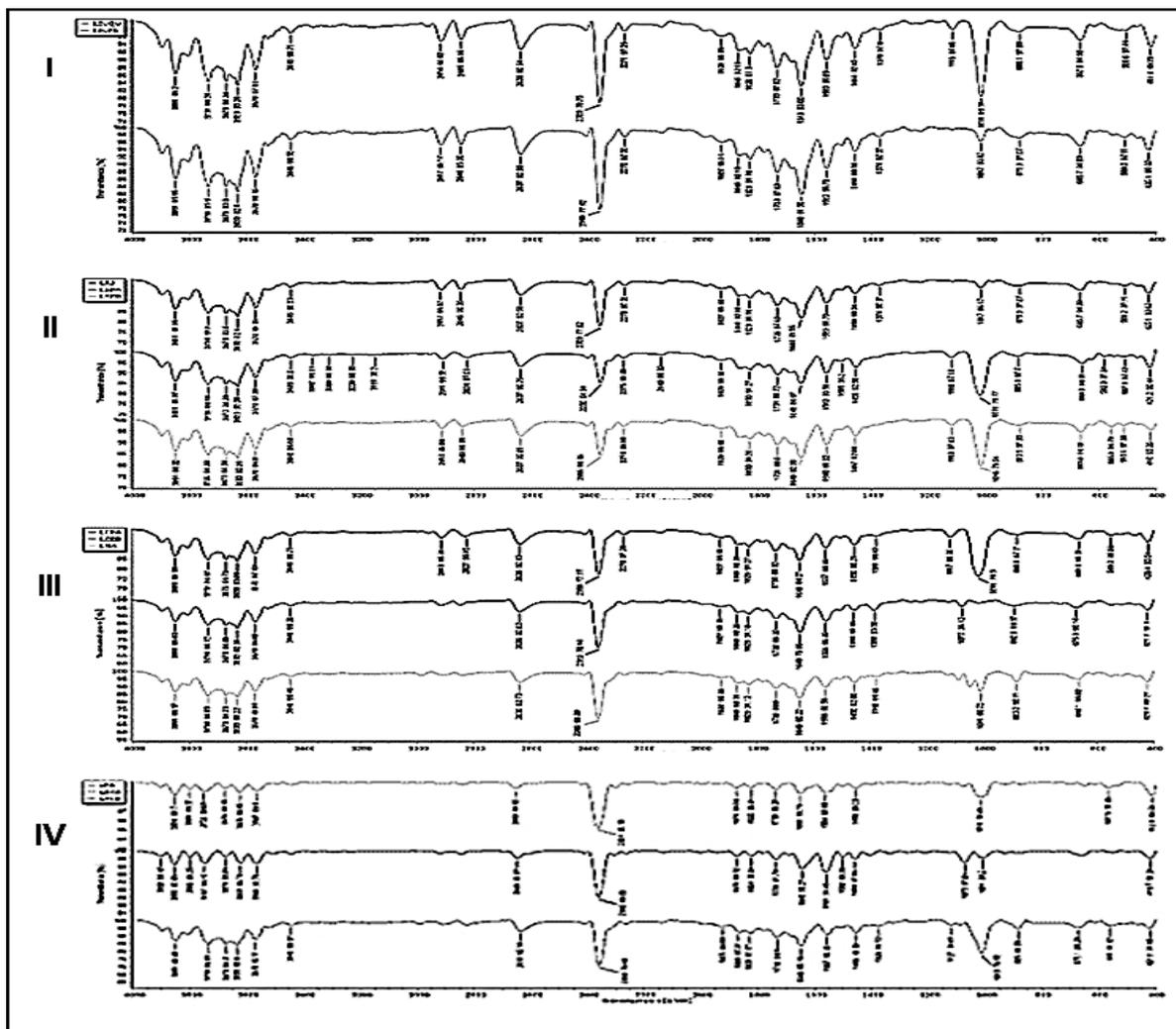
Para as análises em ATR-FTIR, o perfil observado demonstra a complexidade química das amostras, com regiões de sinal muito ricas e semelhantes. O perfil semelhante para todas as amostras (comerciais e de referência) pode ser explicado pela composição básica do látex de plantas, normalmente ricos em proteínas, por vezes substâncias fenólicas e majoritariamente terpenoides. Dessa forma, explica-se os sinais nas mesmas regiões, porém nota-se que há variação nas intensidades, que podem vir a sugerir as diferenças entre as amostras. De forma geral, os sinais mais

relevantes, para todas as amostras, encontram-se nas regiões de 1000-1200 cm^{-1} , 1400-2000 cm^{-1} , 2300-2700 cm^{-1} e 3400-3900 cm^{-1} (Figura 23).



Figuras 22: Espectro de perfil total no ultravioleta das amostras de referência (I): LEUQU, Látex de *E. umbellata* coletado na estação quente úmida. LEUFS: Látex de *E. umbellata* coletado na estação fria e seca; do Sudeste (II): LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra do São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; do Nordeste (III): LMA: amostra do Maranhão; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; do Norte (IV): LPA: amostra do Pará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre.

Os dados obtidos por UV-VIS e ATR-FTIR (comprimentos de onda de absorção [nm] e transmissão [cm^{-1}]) foram explorados por cálculos quimiométricos. Dessa forma, buscou-se determinar as regiões, além do $[\lambda]$ lambda máximo para UV-VIS que diferem as amostras de referência das demais, ou seja, regiões de relevância como marcadoras do látex de *E. umbellata*. Também foi objetivo identificar regiões marcadoras das amostras de referência nas análises de ATR-FTIR e os cálculos quimiométricos foram essenciais, já que as diferenças entre os espectros, apenas nas intensidades, são muito complexas para serem avaliadas visualmente.



Figuras 23: Espectros de perfil total no infravermelho das amostras de referência (I): LEUQU, Látex de *E. umbellata* coletado na estação quente úmida. LEUFS: Látex de *E. umbellata* coletado na estação fria e seca; do Sudeste (II): LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra do São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; do Nordeste (III): LMA: amostra do Maranhão; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; do Norte (IV): LPA: amostra do Pará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre.

Para as análises em UV-VIS obteve-se um arquivo de dados contendo 33 amostras e 211 variáveis (pontos de varredura - *binning*). Buscando obter informações mais concisas foi gerado um novo grupo de dados a partir de seleções de variáveis. O novo conjunto de dados era composto pelos valores de intensidade das absorvâncias dentro da faixa de 190 a 400 nm, com leituras a cada 10 nm. Dessa forma, o novo arquivo de dados continha 33 amostras e 22 variáveis (pontos de varredura - *binning*). Os dados não foram transformados, normalizados ou escalonados.

Duas PC's (*principal components*) conseguiram explicar 98,5% dos dados (Figura 24). As análises determinaram a separação das amostras em três grandes grupos distintos: Sudeste e referências (LEUQU, LEUFS, LRJ, LSPA e LSPB), Norte (LACA, LACB e LPA) e Nordeste (LCEA, LCEB e LMA). O gráfico de *loadings* (Figura 25) permitiu verificar quais são as regiões responsáveis pelas separações observadas. Observa-se que as amostras do Norte absorvem entre 250-400 nm, já as do Nordeste nas faixas entre 230-280 nm. As amostras de referência, do Rio de Janeiro (LRJ) e São Paulo (LSPA e LSPB) apresentaram absorvância nas faixas entre 190-220 nm. Dessa forma, pode-se determinar a região entre 190-220 nm como a região de maior relevância (marcadora) para o látex de *E. umbellata*.

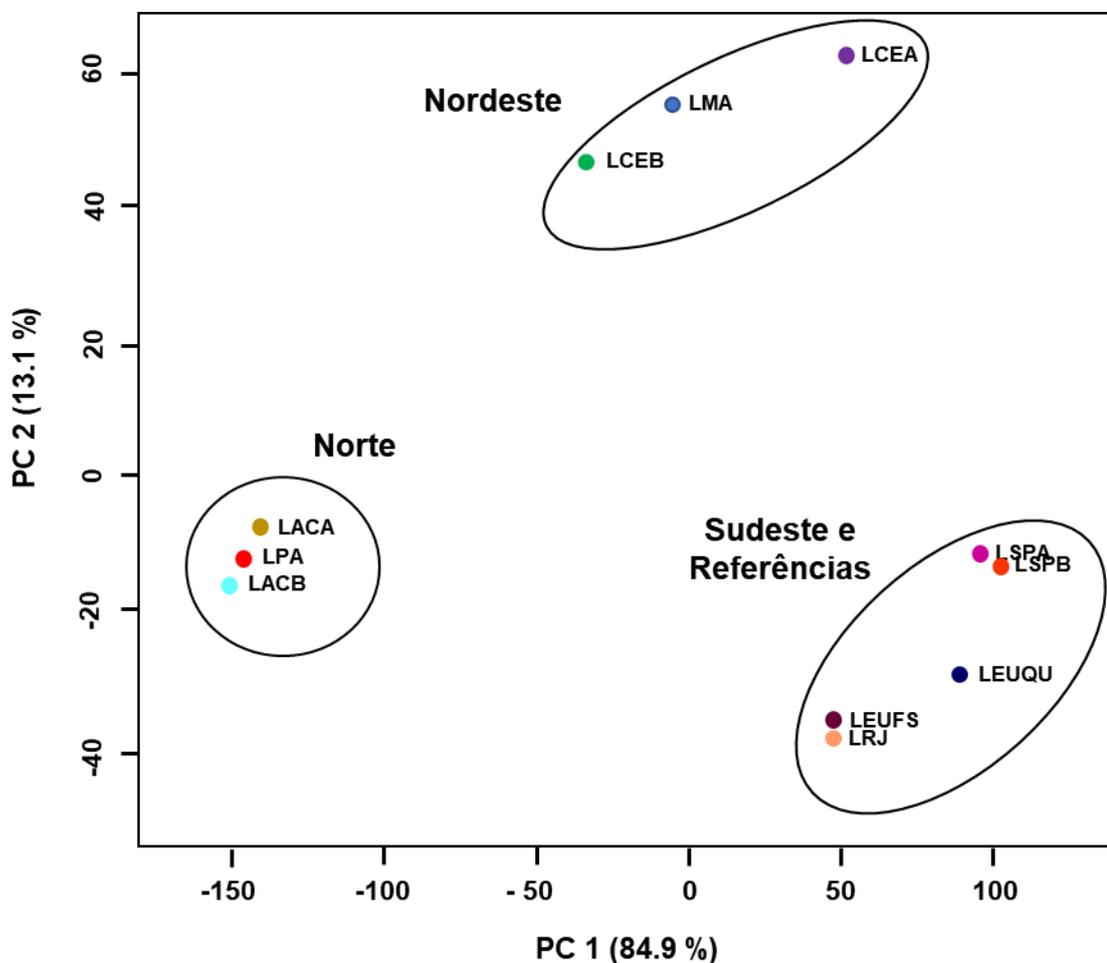


Figura 24: Scores plot por PCA dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados tratados obtidos por UV-VIS. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

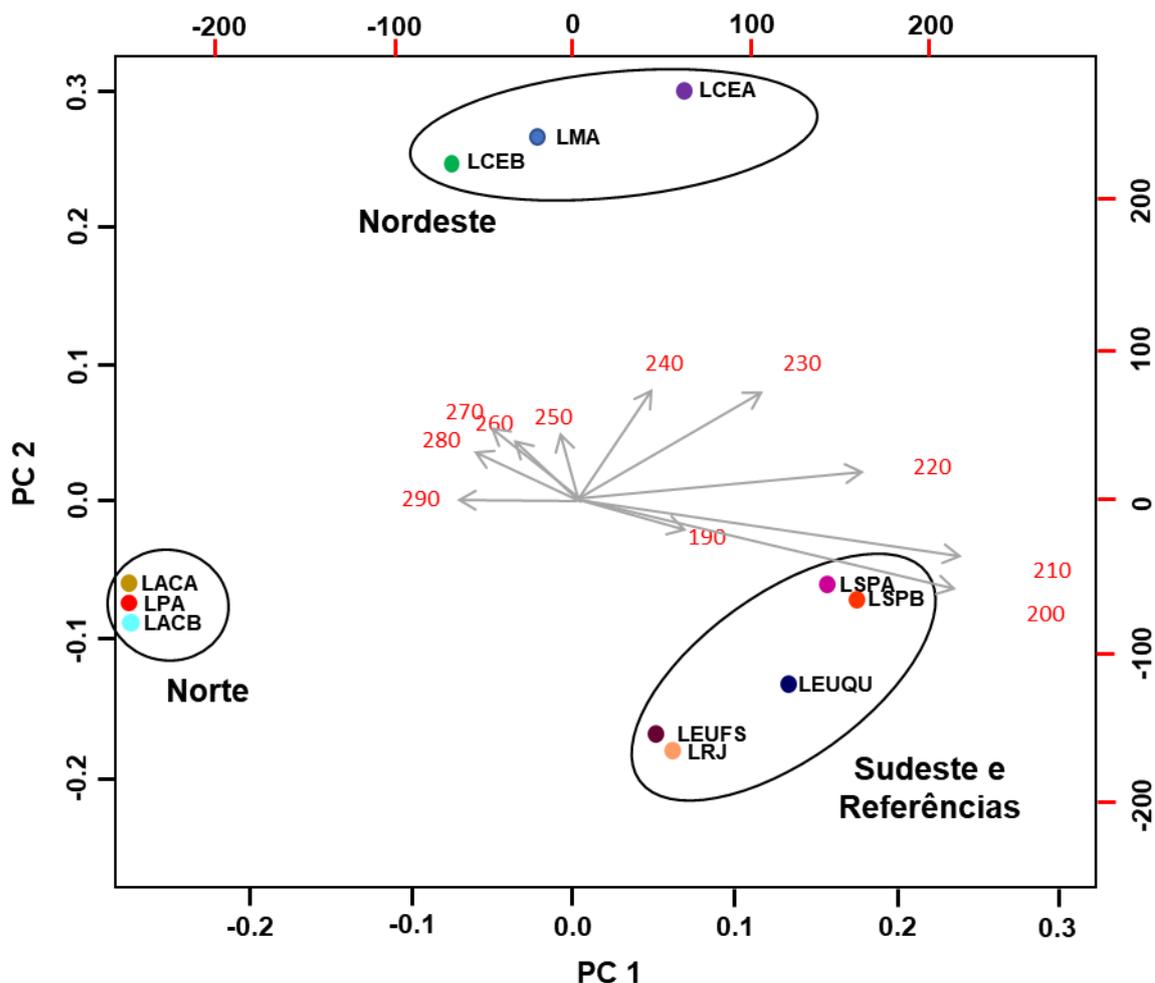


Figura 25: Gráficos de *loadings* dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados tratados obtidos por UV-DAD. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Para a faixa de absorvância (190-220 nm) de maior relevância para as amostras de referência e da região Sudeste (LRJ, LSPA e LSPB), observa-se a região de absorção de alcanos, o que corrobora os íons marcadores tentativamente identificados como hidrocarbonetos por GC-MS. Nessa região também há absorção de cetonas saturadas e ácidos carboxílicos, que podem estar relacionados aos íons determinados como marcadores. Nessa região também pode haver a absorção de aminas, amidas alifáticas e lactonas, que não estão presentes nas substâncias anotadas para este estudo (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010). As amostras da região Norte absorvem na faixa entre 250-400 nm, uma faixa típica de substâncias

aromáticas, aldeídos saturados e insaturados e cetonas saturadas. As amostras da região Nordeste absorveram entre 230-280nm, que é uma região de absorção de alcenos, alcinos e substâncias aromáticas (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010).

O arquivo de dados obtido em análises por ATR-FTIR continha 33 amostras e 1868 variáveis (pontos de varredura - *binning*). O grande número de pontos de varredura obtidos neste método dificultou a visualização de faixas de maior interesse que possam ser determinadas como marcadoras das amostras de referência. Assim, optou-se por realizar seleção de variáveis buscando desenvolver um novo conjunto de dados mais conciso. O novo conjunto de dados era composto pelos valores de intensidade das transmitâncias dentro da faixa de 400 - 4000 cm^{-1} , com leituras a cada 100 cm^{-1} . O novo arquivo de dados continha 33 amostras e 37 variáveis (pontos de varredura - *binning*). Os dados não foram transformados, normalizados ou escalonados.

Duas PC's (*principal components*) conseguiram explicar cerca de 87% dos dados (Figura 26). A redução de variáveis permitiu observar uma separação bem definida das amostras nos mesmos 3 grandes grupamentos visualizados nas análises em UV-VIS. As amostras da região Sudeste e amostras de referência apresentaram faixas mais relevantes entre 600-800 cm^{-1} , 1100-1600 cm^{-1} e 2900-3000 cm^{-1} , enquanto para o grupo formado pelas amostras da região Norte as faixas mais significativas são entre 400-500 cm^{-1} e 3700-4000 cm^{-1} e para o grupo da região Nordeste 900-1000 cm^{-1} e 2300-2800 cm^{-1} (Figura 27). As três faixas de maior relevância para separação das amostras de referência e da região Sudeste das demais amostras podem ser determinadas como marcadoras do látex de *E. umbellata*.

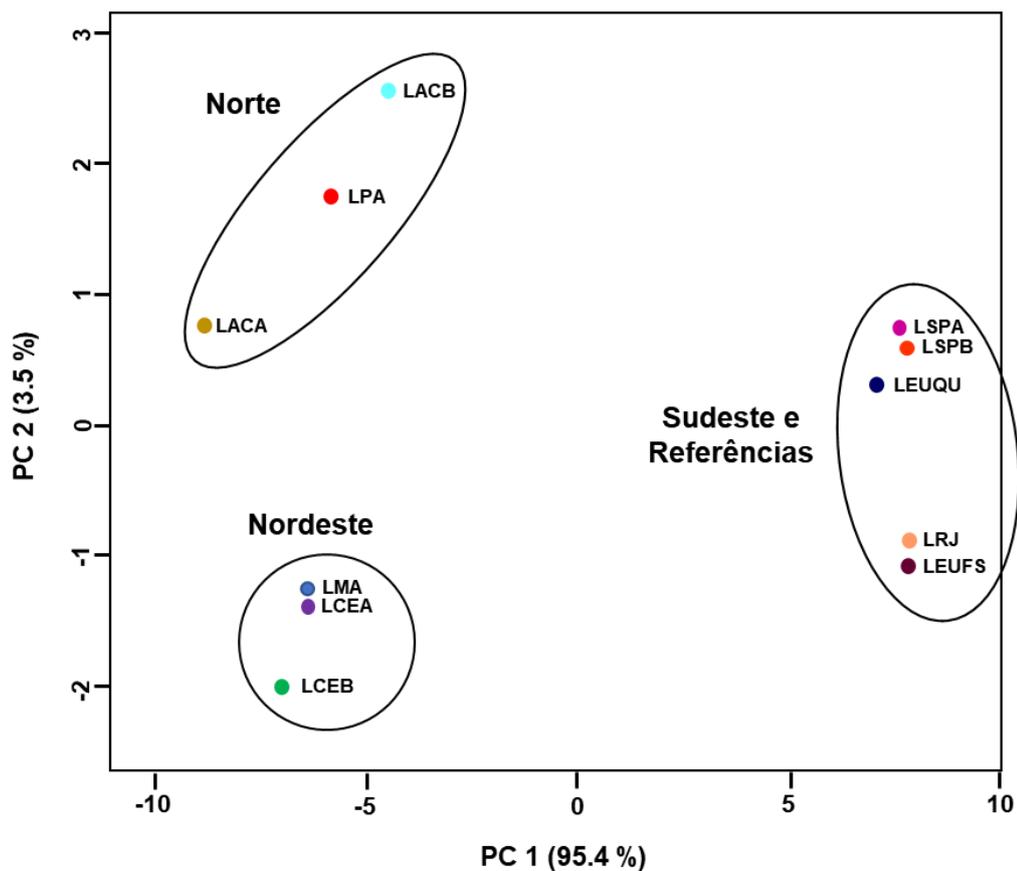


Figura. 26: Scores plot por PCA dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados tratados obtidos por ATR-FTIR. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

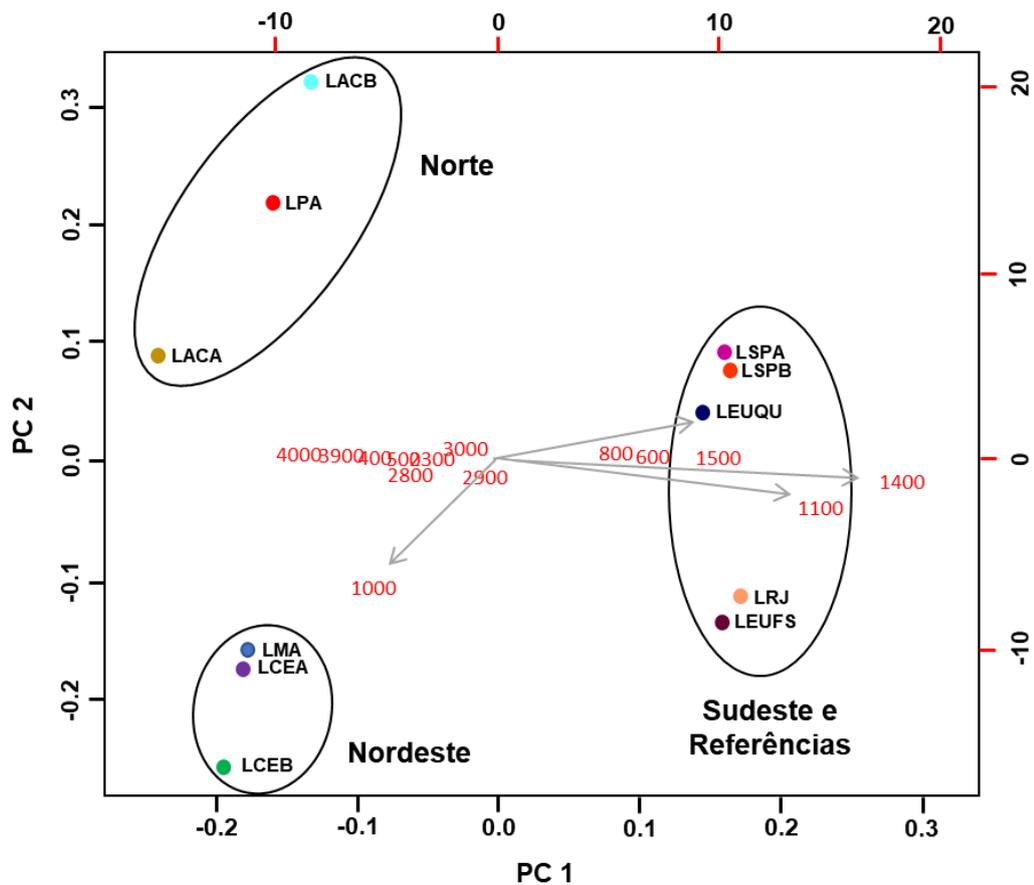


Figura. 27: Gráfico de *loadings* dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados tratados obtidos por ATR-FTIR. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

As regiões de maior relevância observadas no infravermelho podem determinar algumas características químicas das amostras. O primeiro grupo formado por amostras da região Sudeste e referências apresentaram sinais relevantes na faixa de $600\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, região típica de núcleos de aromáticos, devido à presença da vibração angular fora do plano de C-H. Os sinais visualizados no intervalo de $1100\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ puderam confirmar a presença de anéis aromáticos por ser uma região de absorção da ligação -C=C- do anel (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010). Ainda no intervalo de $1100\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ foi possível visualizar a região de estiramento de -C-O- típica de álcool. Estes sinais corroboraram a anotação dos terpenoides para as amostras de referência já que, dentre esta classe, foram observados álcoois triterpênicos tetra- e pentacíclicos. Neste estudo foram tentativamente identificados hidrocarbonetos por

GC-MS para as amostras de referência que podem estar associados aos sinais observados no intervalo 2900-3000 cm^{-1} , região de estiramento de -C-H de alcanos e alcenos (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010). O segundo grupo formado pelas amostras da região Norte apresentaram como regiões de maior relevância as faixas entre 400-500 cm^{-1} , região inicial do espectro típica de haletos de alcano e 3700-4000 cm^{-1} , região de estiramento de N-H livre (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010). Nesta mesma região podem ser vistas deformações de estiramento axial do grupo -OH de ácido carboxílicos ou de -NH de amins e amidas. Nas amostras da região Nordeste destacaram-se as faixas entre 900-1000 cm^{-1} , região típica de núcleos aromáticos e 2300-2800 cm^{-1} , região associada à deformação axial de -CH do grupo formila de aldeídos (Silverstein *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2010).

4.8. Comparação entre os resultados obtidos pelas análises físico-químicas das amostras comerciais com as amostras de referência

Os Quadros 8 e 9 apresentam as características gerais (coloração e aspecto), massa e volume de cada amostra, além das demais características físico-químicas analisadas conforme descritas no item 3.2.3. As análises físico-químicas apresentam menor custo financeiro e tempo de realização comparado aos demais métodos, podendo ser utilizadas para caracterização de amostras, ou seja, gerar perfis, como para comparação entre os perfis de diferentes amostras. As análises físico-químicas permitiram verificar a separação das amostras em 3 grandes grupos, assim como visualizado nos métodos espectrométrico e espectroscópicos. Dessa forma, as análises físico-químicas demonstraram ser eficientes para comparação das amostras comerciais com as amostras de referência.

As amostras da região Sudeste são similares em coloração, aspecto físico e apresentaram pH com valores próximos ao neutro. Já as amostras da região Nordeste são parecidas entre si quanto à coloração, aspecto físico e pH, porém são bem distintas das amostras da região Sudeste, com valores de pH, ligeiramente ácidos (em torno de 5,7). As amostras da região Norte são as mais diferentes entre si, algumas com coloração branca como as da região Sudeste e uma com coloração marrom (LPA), bem diferente de todas as amostras estudadas, mas com pH ácido semelhante às amostras da região Nordeste, sendo a amostra do Pará a mais ácida com pH de 4,69. As amostras do Sudeste e as de referência são as menos solúveis em água, ao contrário de todos os preparados comerciais de outras regiões, característica curiosa,

já que todos os preparados são feitos apenas em água. A quantidade de precipitado em cada preparado chama atenção por ser bastante diversificada (variando de 1,4 a 25,4 g), muito embora as apresentações sejam em volumes de 20 a 1000 mL, temos diferentes concentrações para o mesmo volume, por exemplo, as amostras com apresentação de 50 mL possuem concentração de 39000 mg/mL (LACA), 27000 mg/mL (LACB) e 51000 mg/mL (LSPB). As amostras são bem diversificadas, mesmo as comerciais da região Sudeste que se agrupam com as amostras de referência ainda guardam alguns parâmetros diferentes como a quantidade de matéria mineral (% cinzas totais).

Quadro 8: Características físico-químicas das amostras de “leite de Janaguba/Janaúba” adquiridas de acordo com os métodos descritos no item 3.2.3.

Amostras	Coloração	pH	Massa seca do Precipitado (g)	Aspecto do Precipitado	Densidade (mg/mL)	Viscosidade Dinâmica (Pa.s)	Viscosidade Cinemática (St)	Massa seca da fração aquosa (g)	Sólidos Solúveis °Brix (%)	Cinzas Totais (%)	Taxa de Sedimentação (F)	Sedimento Total (g)
LSPA- São Paulo	Branco	7,03	1,043	Granular	52890	1012	0,0191	0,0074	13	1.4	0,97	0,011
LSPB- São Paulo	Branco	6,93	25,467	Granular	51070	1021	0,1999	0,0136	12	1.2	0,97	0,01
LRJ- Rio de Janeiro	Branco	7,23	6,294	Granular	6520	1336	0,0021	0,0226	15	0.3	0,91	0,009
LCEA- Ceará	Rosado	5,91	8,874	Elástico (muito maleável)	1080	1213	0,1117	0,0198	24	0.3	0,97	0,011
LCEB- Ceará	Rosado	5,65	11,494	Elástico (muito maleável)	2140	1205	0,0562	0,0995	23	0.4	0,94	0,012
LMA- Maranhão	Rosado	5,54	9,758	Elástico (muito maleável)	4070	1196	0,0407	0,0164	12	1.6	0,94	0,011
LACA- Acre	Branco	5,93	19,306	Firme (pouco maleável)	39590	1326	0,0034	0,0977	18	1.3	0,94	0,014
LACB- Acre	Branco	6,03	13,494	Firme (pouco maleável)	27930	1305	0,0047	0,0939	18	1.1	0,90	0,009
LPA- Pará	Marrom	4,69	14,274	Pastoso	8240	1317	0,0160	0,1103	14	1.1	0,97	0,012
LEUQU- Referência (Quente-Úmido)	Branco	6,94	1,367	Granular	1460	1004	0,0687	0,0094	14	0.4	0,97	0,013
LEUFS- Referência (Frio-Seco)	Branco	6,96	1,494	Granular	1650	1011	0,0191	0,0101	13	0.5	0,96	0,011

Quadro 9: Solubilidade das amostras de “leite de Janaguba/Janaúba” em etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), acetonitrila (ACN), acetato de etila (AcOEt), diclorometano (CHCl₂), clorofórmio (CHCl₃) e hexano (HEX) segundo os métodos descritos pela Farmacopeia Brasileira. Volumes aproximados de solvente em mililitros por grama de substância: - = insolúvel (mais de 10.000 partes); + = pouco solúvel (de 100 a 1.000 partes); ++ = solúvel (de 10 a 30 partes); +++ = muito solúvel (menos de 1 parte).

Amostra	Água	EtOH	MeOH	BuOH	ACN	AcOEt	CHCl₂	CHCl₃	HEX
LSPA- São Paulo	-	+	++	-	++	+	++	++	++
LSPB- São Paulo	-	+	++	-	++	+	++	++	++
LRJ- Rio de Janeiro	-	+	++	++	++	+	+	++	++
LCEA- Ceará	+++	+	++	+	-	-	-	-	-
LCEB- Ceará	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-
LMA- Maranhão	+++	+	++	++	-	-	-	-	-
LACA- Acre	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
LACB- Acre	+++	++	+++	++	+	+	+	-	+
LPA- Pará	+++	+++	+++	+	-	-	+	-	+
LEUQU- Referência (Quente-Úmido)	-	+	++	+	+++	+	++	+++	++
LEUFS- Referência (Frio-Seco)	-	+	++	+	+++	+	++	+++	++

Com a finalidade de determinar os parâmetros físico-químicos de maior relevância para a separação das amostras de referência e da região Sudeste das demais amostras, os dados físico-químicos foram avaliados por cálculos quimiométricos. Os dados numéricos e categóricos obtidos em cada análise foram escalonados a partir de centralização na média geral e divisão pelo desvio padrão de cada variável. O escalonamento foi necessário já que as diferentes análises geram resultados em diferentes dimensões, ou seja, não comparáveis, ao realizar o escalonamento todos os dados são redimensionados e assim tornam-se comparáveis entre si. O conjunto de dados continha 33 amostras e 14 variáveis (parâmetros físico-químicos). Duas PC's (*principal components*) conseguiram explicar 80,1% dos dados (Figura 28). A avaliação do gráfico de *loadings* permitiu determinar os parâmetros físico-químicos de maior relevância para as amostras de referência (Figura 29).

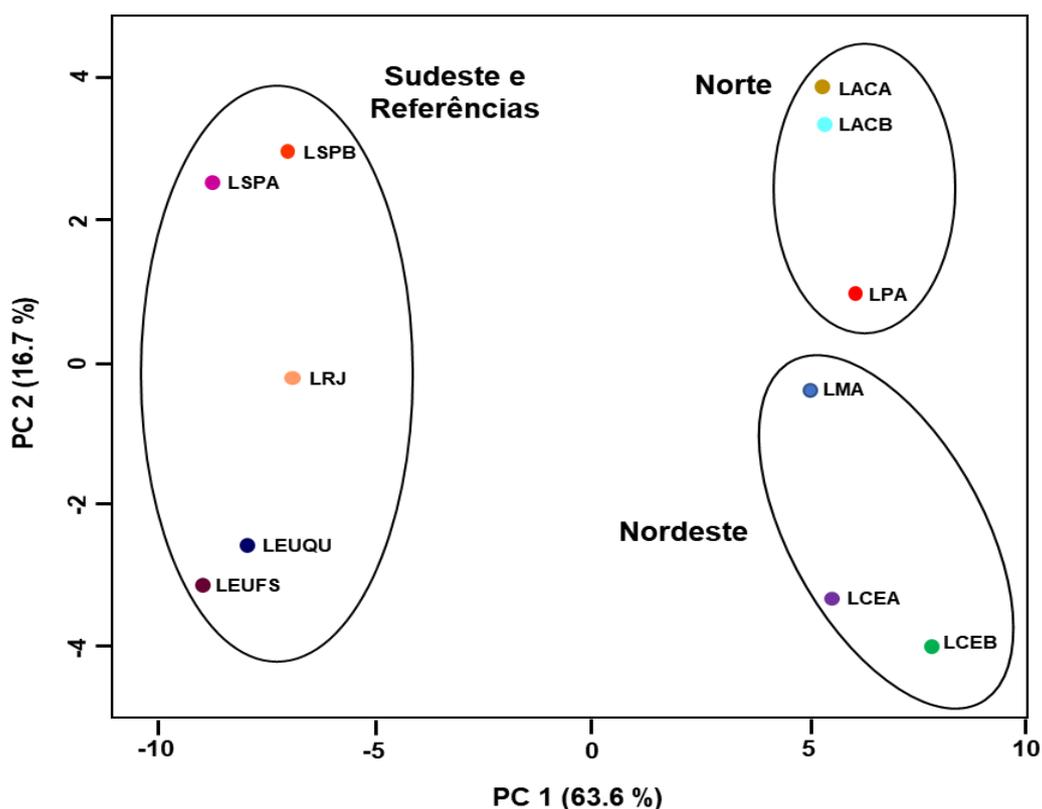


Figura 28: Scores plot por PCA dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados brutos obtidos por análises físico-químicas. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

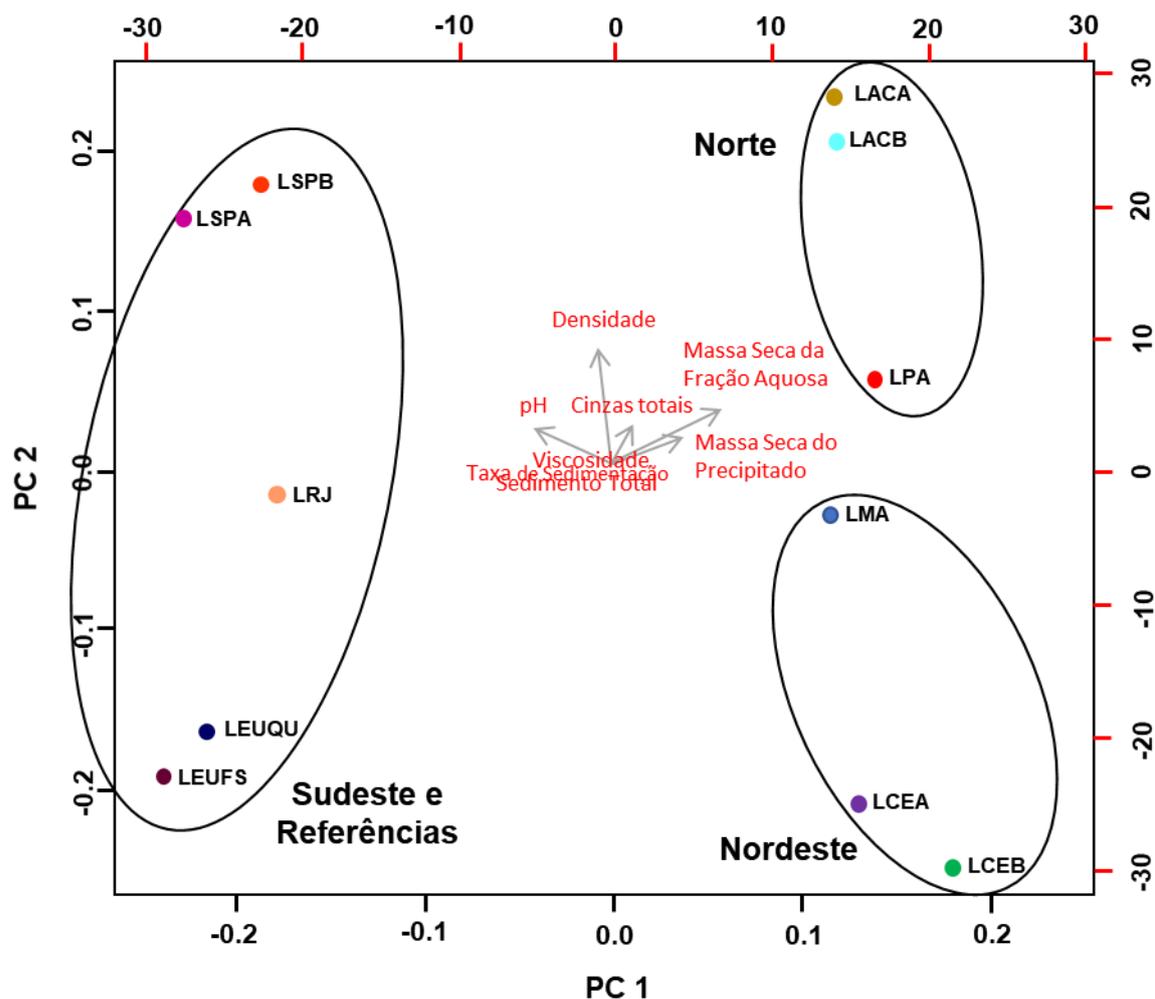


Figura 29: Gráfico de *loadings* dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados brutos obtidos por análises físico-químicas. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Dentre os parâmetros físico-químicos analisados alguns destacam-se por terem sido responsáveis pelas separações dos 3 grupos observados. Os parâmetros de maior relevância para a separação das amostras de referência e da região Sudeste das demais pode vir a ser utilizado como marcadores do látex de *E. umbellata*. Assim, na busca de análises rápidas e barateamento na comparação de amostras, as avaliações podem vir a ser realizadas utilizando, apenas, os parâmetros determinados como marcadores das amostras de referência. Para o grupo formado pelas amostras da região Sudeste e referências, os parâmetros mais relevantes são pH, densidade, viscosidade

dinâmica e cinemática e taxa de sedimentação, além de sedimento total. A maior solubilidade em solventes de menor polaridade, assim como o aspecto granular do precipitado também pode ser utilizado como fator de determinação do látex de *E. umbellata* nas preparações. Para o grupo formado pelas amostras da região Norte, a massa seca do precipitado e da fração aquosa, assim como as cinzas totais foram os parâmetros mais significativos. Nas amostras do Nordeste, a coloração e o aspecto firme (pouco maleável) do precipitado são os parâmetros que se destacaram.

A variação entre os parâmetros físico-químicos ao comparar-se amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” também foi observada por Soares *et al.* (2016) em seu trabalho que visava a avaliação de amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” da cidade de Fortaleza no Ceará – Brasil. A coloração, aspecto geral e pH das amostras do Nordeste avaliadas neste estudo se assemelham àquelas descritas por Soares *et al.* (2016) para o látex de *H. drasticus*. A espécie *Hancornia speciosa* Gomes foi identificada por Soares *et al.* (2016) como possível fonte para adulterar algumas amostras de “leite de Janaguba/Janaúba” comerciais. As amostras providas do Acre adquiridas para este trabalho se assemelham em aspecto e cor àquelas descritas por Pinheiro *et al.* (2020) para a espécie *H. speciosa*.

4.9. Comparação das amostras de referência com as amostras comerciais a partir de DI-MS, UV-VIS, ATR-FTIR e análises físico-químicas

Para verificar os métodos mais relevantes, que permitem a separação das amostras de referência e da região Sudeste das demais, foi construído um conjunto de dados contendo os resultados das análises espectrométricas, espectroscópicas e físico-químicas. Dessa forma, visando análises que se utilizavam, apenas, de variáveis significativas, os dados utilizados foram os íons marcadores determinados por DI-MS, as regiões mais significativas dos dados espectroscópicos (UV-VIS e ATR-FTIR), assim como os parâmetros físico-químicos de maior relevância. Devido às diferentes naturezas dos dados, estes foram escalonados a partir de centralização na média geral e divisão pelo desvio padrão de cada variável. O conjunto de dados continha 33 amostras e 98

variáveis. Duas PC's (*principal components*) explicaram 93,5% da distribuição dos dados (Figura 30). As faixas de maior relevância nas análises em ATR-FTIR, assim como os íons marcadores identificados por DI-MS se destacaram como os fatores mais significativos para a separação das amostras de referência e da região Sudeste (Figura 31). Dessa forma, as análises por ATR-FTIR ou por DI-MS, se realizadas independentes de outras análises, são robustas o suficiente para determinar amostras semelhantes ao látex de *E. umbellata* (amostras de referência). As análises utilizando estes métodos podem vir a ser realizados em varredura ou na busca ativa das faixas e íons marcadores determinados neste estudo. Os parâmetros físico-químicos mais significativos também podem auxiliar na determinação das amostras de referência e da região Sudeste, porém não são tão robustos quanto os métodos ATR-FTIR e DI-MS. Assim, podem ser utilizados como análises complementares na identificação da presença do látex de *E. umbellata* em preparações populares. Os demais parâmetros físico-químicos, assim como o método de análise por UV-VIS não foram significativos na separação das amostras de referência e da região Sudeste, mostrando-se pouco confiáveis quando aplicados independente de outras análises para determinação da presença do látex de *E. umbellata* em amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba”.

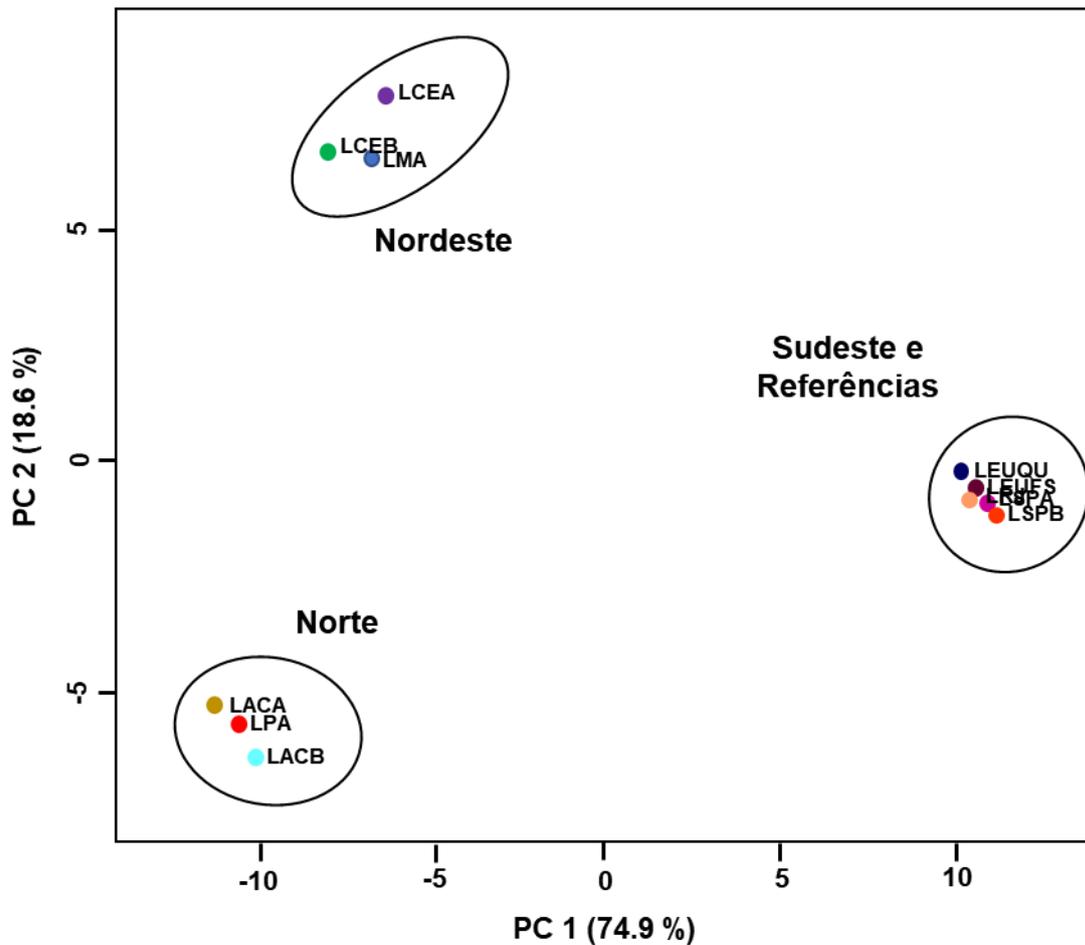


Figura 30: Scores plot por PCA dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados brutos obtidos por DI-MS; UV-VIS; ATR-FTIR e análises físico-químicas. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

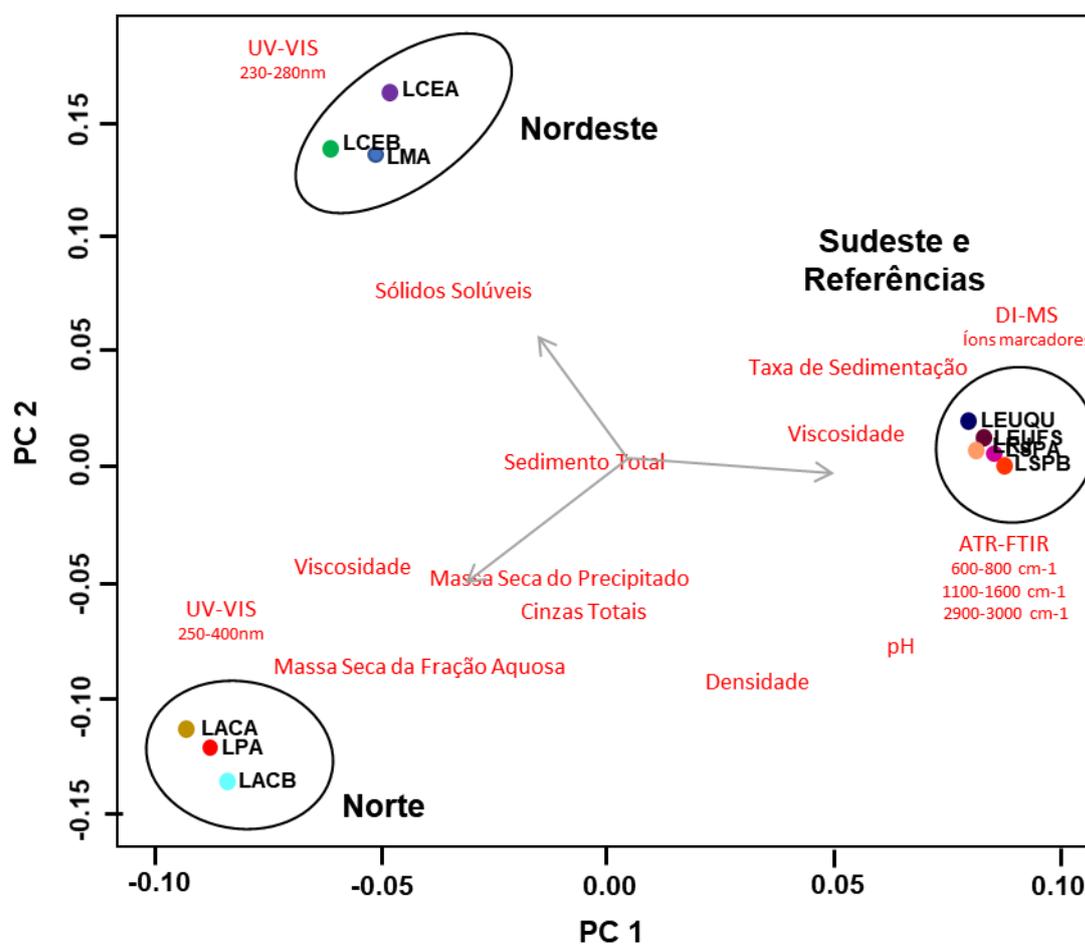


Figura 31: Gráfico de *loadings* dos agrupamentos das amostras de referência e comerciais, por similaridade estatística dos dados brutos obtidos por DI-MS; UV-VIS; ATR-FTIR e análises físico-químicas. LEUQU: Látex de *E. umbellata* da estação quente e úmida; LEUFS: Látex de *E. umbellata* da estação fria e seca; LRJ: amostra do Rio de Janeiro; LSPA: amostra de São Paulo; LSPB: amostra de São Paulo; LPA: amostra do Pará; LCEA: amostra do Ceará; LCEB: amostra do Ceará; LACA: amostra do Acre; LACB: amostra do Acre; LMA: amostra do Maranhão.

Buscas dos registros de ocorrência das espécies vegetais citadas neste estudo no banco de dados dos herbários nacionais hospedados em ReFlora Virtual Herbarium - JBRJ, 2020 (ReFlora, 2018) e nos compêndios de levantamentos e revisões de espécies brasileiras em Flora do Brasil - JBRJ (Flora do Brasil, 2019) auxiliaram no entendimento das prováveis espécies de onde o látex que constitui o “leite de Janaguba/Janaúba” é extraído. A espécie *E. umbellata* tem registro de ocorrência, apenas, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. *H. speciosa* é pandêmica das regiões brasileiras, semelhante a *H. drasticus* que tem ausência de registro apenas na região Sul. Apesar do Sudeste apresentar a ocorrência de *E. umbellata*, *H. drasticus* e *H. speciosa*, o conjunto de informações obtido nos ensaios químicos e físico-químicos torna possível

determinar *E. umbellata* como parte da composição dos preparados obtidos desta região. A possibilidade do uso do látex de *E. umbellata* em amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” é preocupante, já que este estudo mostrou a possibilidade de presença de íons semelhantes a diterpenos, promotores tumorais e cáusticos e a indicação da presença de triterpenos, possivelmente citotóxicos. Apesar das amostras comerciais, por vezes, acabarem por ter parte de seu material precipitado e este eventualmente ser descartado pelo consumidor, ainda há parte do material solubilizado na água que compõe a amostra. Assim como descrito no item 4.3 (Quadro 5; Figuras 15 e 16), a água é capaz de solubilizar e reter parte das substâncias encontradas no látex. Caso o precipitado seja realmente descartado a concentração de substâncias potencialmente danosas pode ser mais baixa, porém, se não houver precipitação, o consumidor reemulsionar os preparados ou ingerir os precipitados espontaneamente, a concentração de substâncias que podem vir a gerar riscos à saúde é aumentada.

4.10. Avaliação da ação proliferativa e/ou citotóxica das amostras comerciais e de referência

Os resultados dos ensaios preliminares que visaram a triagem das concentrações de tratamento a serem utilizados nos ensaios que buscaram verificar o potencial proliferativo/antiproliferativo das amostras comerciais e de referência estão dispostos na Figura 32. A faixa de concentração selecionada para realizar os ensaios foi a de 12,5-400 µg/mL (Figura 33). A concentração máxima estipulada foi aquela em que as amostras comerciais e de referência conseguiram alcançar a concentração inibitória de 50% da viabilidade celular frente a linhagem MDA-MB-231. A concentração mínima foi aquela em que a viabilidade celular foi semelhante ao do controle (não-estimulado). As amostras LACA, LACB e LPA não alcançaram a viabilidade celular semelhante ao do controle, mesmo na concentração mais baixa testada. Desta forma, a concentração mínima selecionada para as amostras da região Sudeste, Nordeste e referências foi fixada para as amostras da região Norte, visando a homogeneidade dos ensaios.

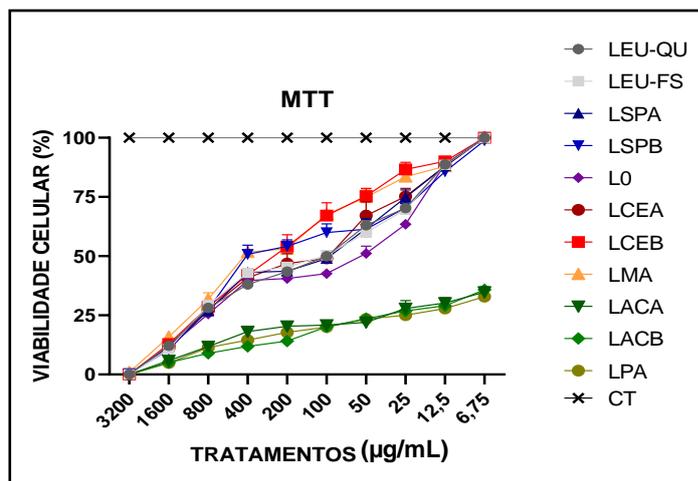


Figura 32: Atividade citotóxica frente à linhagem MDA-MB-231 das amostras comerciais e referência com concentrações variando de 6,75-3200 µg/mL. CT= controle positivo de viabilidade (não-estimulado).

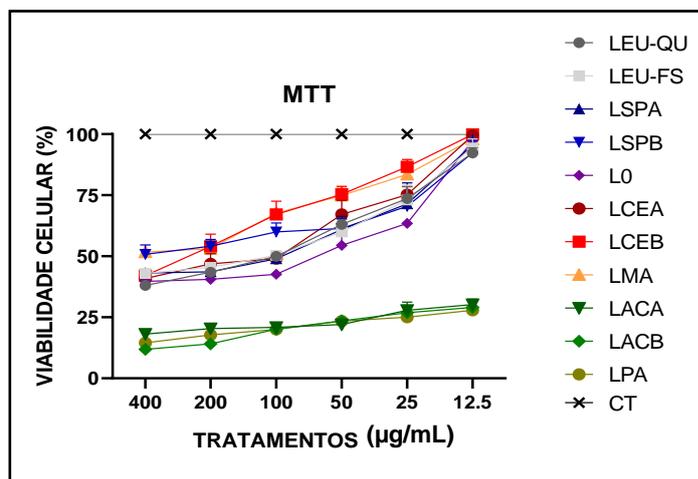


Figura 33: Zoom da faixa de concentração selecionada para avaliação atividade citotóxica frente a linhagem MDA-MB-231 das amostras comerciais e referência. Concentrações variando de 12,5-400 µg/mL. CT= controle positivo de viabilidade (não-estimulado).

As IC_{50} determinadas para cada amostra evidenciaram uma considerável atividade citotóxica das amostras de referência e das preparações comerciais (Quadro 10). Para as amostras comerciais obtidas da região Sudeste e amostras de referência, as concentrações inibitórias de 50% da viabilidade celular apresentaram média em torno de $107,6 \mu\text{g/mL} \pm 6,3 \mu\text{g/mL}$. Para as amostras da região Nordeste a média foi de $99,1 \mu\text{g/mL} \pm 7,4 \mu\text{g/mL}$, enquanto para as amostras originárias da região Norte, a média ($1,44 \mu\text{g/mL} \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$) foi extrapolada estatisticamente, já que as IC_{50} avaliadas para cada amostra desta

região não se encaixavam dentro do espaço de concentrações selecionadas para as experiências.

Quadro 10: IC₅₀ das amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” e amostras de referência frente à linhagem MDA-MB-231.

Amostra	IC₅₀ (µg/mL)	R²
LSPA- São Paulo	99,5	1,0
LSPB- São Paulo	104,8	1,0
LRJ- Rio de Janeiro	117,5	1,0
LCEA- Ceará	92,1	1,0
LCEB- Ceará	95,9	1,0
LMA- Maranhão	109,4	1,0
LACA- Acre	1,47	0,90
LACB- Acre	1,57	0,80
LPA- Pará	1,28	0,80
LEUQU- Referência (Quente-Úmido)	104,4	1,0
LEUFS- Referência (Frio-Seco)	111,7	1,0

A toxidez de *Euphorbia* spp. é bem conhecida na literatura, tornando previstos os resultados obtidos frente à linhagem MDA-MB-231 para as amostras de referência. Shin *et al.* (2016); Asadi-Shamani *et al.* (2019) e Basu *et al.* (2019) relataram a citotoxicidade elevada dos extratos do látex isolado ou dos órgãos (caule e raiz) macerados de diferentes espécies do gênero *Euphorbia* L. (*Euphorbia szovitsii* Fisch. & C. A. Mey; *Euphorbia humifusa* Willd; *Euphorbia bicolor* Engelm. & A. Gray; *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns). As amostras da região Sudeste apresentaram valores de IC₅₀ semelhantes aos das amostras de referência. Dessa forma, pode-se indicar a semelhança entre os materiais quanto à citotoxicidade frente a MDA-MB-231. As substâncias responsáveis por essa atividade em *Euphorbia* spp. não estão elucidadas, assim como seus mecanismos de ação. Portanto, a investigação de alvos químicos nos produtos

comerciais é dificultada. Apenas alguns estudos apresentam inferências químicas sobre as substâncias responsáveis pelas atividades proliferativa/antiproliferativa em *Euphorbia* spp. E, na maioria das vezes, estas são associadas à classe dos terpenoides. Nos estudos conduzidos por Choodej & Pudhon (2020) foram identificados triterpenos de esqueleto cicloartano isolados de *Euphorbia neriifolia* L. com significativa (IC_{50} variando de 21,12-27,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$) atividade citotóxica frente à linhagem MDA-MB-231. Wang *et al.* (2013) e Choene & Motadi (2016) também evidenciaram em seus trabalhos a atividade de triterpenos de esqueletos cicloartano e tirucalano isolados de *Euphorbia macrostegia* Boiss. e *Euphorbia tirucalli* L frente a esta linhagem celular. Jian *et al.* (2018) verificaram a atividade de diterpenos de esqueleto *ent*-abietano, isolados de *Euphorbia fischeriana* Steud., que têm a propriedade de diminuir a proliferação celular e induzir a apoptose de células de câncer de mama (MDA-MB-231). No mesmo ano, Lu *et al.* (2008) identificou diterpenos de esqueletos *ent*-abietano e jatrofano isolados de *Euphorbia helioscopia* L. com IC_{50} de 2,1 e 13 μM , respectivamente, frente à mesma linhagem celular. Apesar de neste estudo não haver dados para comparação das amostras das regiões Norte e Nordeste com alguma(s) espécie(s) vegetal(is), os valores de IC_{50} dessas amostras também chamam atenção, assim como para as amostras associadas a *E. umbellata*, já que caso a atividade observada não seja específica, ou seja, atuando apenas sobre células tumorais - não normais, o comércio e consumo difundido desses produtos pode gerar riscos para a saúde pública.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Os agrupamentos obtidos a partir de cálculos quimiométricos permitem separar as amostras comerciais provenientes do Sudeste (LSPA; LSPB; LRJ), semelhantes às de referência (LEUQU e LEUFS), das demais amostras comerciais originárias da região Norte e Nordeste. Desta forma, é possível inferir que o látex de *E. umbellata* está presente nas amostras comerciais da região Sudeste, considerando os dados químicos e físico-químicos, assim como a semelhança de citotoxicidade frente a MDA-MB-231.

Os perfis do látex de *E. umbellata* (amostras de referência) obtidos através da caracterização por estudos químicos e físico-químicos apresentam-se como potenciais padrões para a parametrização do látex desta espécie, fornecendo informações que podem vir a ser utilizados na busca da presença dessa espécie vegetal nos preparados de “leite de Janaguba/Janaúba” comercializados no Brasil.

Através de estudos de espectrometria de massas foram determinados 25 íons (*VIP score*): 279; 297; 313; 338; 363; 409; 414; 426; 428; 437; 444; 449; 468; 490; 534; 562; 593; 612; 614; 619; 627; 640; 649; 685; 749 e 16 substâncias: tetratetracontano; tetracontano; nonacosano; tricosanona; heneicosano; lanosterol; tirucalol; fernenol; eufol; acetato de lupeol; cicloartenol; taraxasterol; ciclolaudenol; lupeol; friedelin-3 β -ol; friedelina, possivelmente marcadoras do látex das amostras de referência de *E. umbellata* (LEUQU e LEUFS), que podem ser buscados em amostras comerciais, visando a associação desta espécie como origem do látex utilizado para preparo das amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba”.

Os ensaios biológicos a partir do método de MTT frente à linhagem tumoral de câncer de mama triplo negativo MDA-MD-231 mostraram a citotoxicidade *in vitro* das amostras comerciais. Mais estudos são necessários para confirmar o risco de consumo desses produtos e/ou atribuir especificidade (somente frente a linhagens tumorais) da citotoxicidade verificada. Da mesma forma, são necessários mais estudos para atribuir a qual(is) substância(s) esta citotoxicidade está associada.

Relatos de citotoxicidade dos triterpenos frente a linhagens normais e tumorais, assim como as conhecidas atividades associadas aos diterpenos (ésteres de forbol) promotores de mutações, tumores e metástases, além de sua causticidade (causando irritação), podem contribuir para a compreensão inicial dos riscos que o consumo de amostras comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” contendo o látex de *E. umbellata* podem vir a causar.

Os métodos aqui aplicados, desenvolvidos e otimizados podem ser utilizados como estratégias para estudos mais aprofundados do látex da espécie vegetal. Utilizar o látex como matriz é desafiador, já que não há muitos estudos na

literatura que apoiem os ensaios realizados. Dessa forma, o presente trabalho apresenta técnicas que podem vir a ser utilizadas com sucesso nos estudos químicos, físico-químicos e biológicos de matrizes laticíferas. Por fim, os cálculos matemáticos e quimiométricos também podem vir a ser utilizados no tratamento inicial e como ferramentas complementares para busca da identidade botânica de preparados populares.

Apesar de verificar íons semelhantes, possivelmente, aos dos ésteres de forbol não foi possível confirmar a presença de substâncias deste grupo utilizando os solventes e métodos aplicados neste estudo. Os solventes extratores, assim como o método de fracionamento (cromatografia em camada preparativa) e/ou o método de separação e identificação (cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas) precisam ser reavaliados, já que a ausência desses íons pode estar associada aos métodos selecionados para análise. A separação e identificação de ésteres de forbol, possivelmente, pode ser obtida através de métodos mais rebuscados de análise como a extração em fase sólida, a separação utilizando polímeros molecularmente impressos – MIP's, a cromatografia em fase líquida preparativa e a cromatografia contra-corrente, assim como a espectrometria de massas de alta resolução. A busca, identificação e confirmação da presença de ésteres de forbol nos preparados comerciais de “leite de Janaguba/Janaúba” torna-se perspectiva de estudos futuros sobre este tema tão complexo.

6. Referências Bibliográficas

AKIHISA, Toshihiro; WIJERATNE, E. M. Kithsiri; TOKUDA, Harukuni; ENJO, Fumio; TORIUMI, Masakazu; KIMURA, Yumiko; KOIKE, Kazuo; NIKAIDO, Tamotsu; TEZUKA, Yasuhiro; NISHINO, Hoyoku. Eupha-7,9(11),24-trien-3 β -ol (“Antiquol C”) and Other Triterpenes from *Euphorbia antiquorum* Latex and Their Inhibitory Effects on Epstein–Barr Virus Activation. **Journal of Natural Products**, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 158-162, fev. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np010377y>.

ALBINO, Rayane C.; ANTONIASSI, Rosemar; FARIA-MACHADO, Adelia F. de; FERRARIS, Fausto K.; AMENDOEIRA, Fábio C.; RAMOS, Daniela F.; SILVA, Pedro E.A.; LEITÃO, Suzana G.; OLIVEIRA, Danilo R. Traditional detoxification of *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 241, p. 111970, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2019.111970>.

ALONSO-CASTRO, Angel J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, Elizabeth; DOMÍNGUEZ, Fabiola; LÓPEZ-TOLEDO, Gabriela; CHÁVEZ, Marco; ORTIZ-TELLO, Angel J.; GARCÍA-CARRANCA, Alejandro. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 140, n. 2, p. 438-442, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.009>.

ANDERSEN, Øyvind M.; JORDHEIM, Monica; BYAMUKAMA, Robert; MBABAZI, Angella; OGWENG, George; SKAAR, Irene; KIREMIRE, Bernard. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, [S.L.], v. 71, n. 13, p. 1558-1563, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.025>.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7985json-file-1>. Acesso em: 10 dez. 2019.

AOAC - Association of Official Analytical Chemist. **Official methods of analysis of AOAC International**, 20th Ed. Maryland, EUA, 2016. Disponível em: <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019>. Acesso em: 10 ago. 2019.

ASADI-SAMANI, Majid; RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud; LORIGOOINI, Zahra; SHIRZAD, Hedayatollah. The effect of *Euphorbia szovitsii* Fisch. & C.A.Mey extract on the viability and the proliferation of MDA-MB-231 cell line. **Bioscience Reports**, [S.L.], v. 39, n. 1, jan. 2019. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20181538>.

BARATA-SILVA, Cristiane; HAUSER-DAVIS, Rachel A.; SILVA, André L. O.; MOREIRA, Josino C. Desafios ao controle da qualidade de medicamentos

no Brasil. **Cadernos Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 362-370, 28 set. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-462x201700030075>.

BARROS NETO, Benício; SCARMINIO, Ieda S.; BRUNS, Roy E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 1401-1406, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422006000600042>.

BASU, Paramita; MEZA, Elizabeth; BERGEL, Michael; MAIER, Camelia. Estrogenic, Antiestrogenic and Antiproliferative Activities of *Euphorbia bicolor* (Euphorbiaceae) Latex Extracts and Its Phytochemicals. **Nutrients**, [S.L.], v. 12, n. 1, 25 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12010059>.

Bioinformatics & Evolutionary Genomics. **Venn Diagram**. Disponível em: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Acesso em: 06 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 10 ago. 2020.

BROEKAERT, José A. C. Daniel C. Harris: quantitative chemical analysis, 9th ed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 407, n. 30, p. 8943-8944, 24 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-9059-6>.

CABRAL, Laerty G. S.; ALVES, M. G.; CONCEIÇÃO, Thais O.; OLIVEIRA, Thalles A. D.; GOMES, Amanda; LAISO, Rosa A. N.; MARIA, Durvanei A. Natural bioactive from *Euphorbia umbellata* latex as a modulator of mitochondrial activity in breast cancer cells. **Journal of Pharmacognosy And Phytochemistry**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 823-829, 1 set. 2020. AkiNik Publications. <http://dx.doi.org/10.22271/phyto.2020.v9.i5l.12326>.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. **Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios**. Gazeta Médica da Bahia, vol. 78, n. 1, p. 98-106, 2008. Disponível em:

http://www.gmbahia.ufba.br/adm/arquivos/artigo19_2008sup1.pdf. Acesso em: 23 mai. 2020.

CHOENE, Mpho; MOTADI, Lesetja R. Validation of the antiproliferative effects of *Euphorbia tirucalli* extracts in breast cancer cell lines. **Molecular Biology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 98-110, jan. 2016. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0026893316010040>.

CHONG, Jasmine; WISHART, David S.; XIA, Jianguo. Using Metaboanalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, [S.L.], v. 68, e86, set. 2019. Wiley. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>.

CHOODEJ, Siwattra; PUDHOM, Khanitha. Cycloartane triterpenoids from the leaves of *Euphorbia neriifolia*. **Phytochemistry Letters**, [S.L.], v. 35, p. 1-5, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2019.10.005>.

CIMANGA, Richard K.; LUTETE, Gaston T.; LUYINDULA, N.; MESIA, Kahunu; LUSAKIBANZA, M.; MUSUAMBA, Flora T.; APERS, Sandra; BRUYNE, Tess; VAN MIERT, Sabine; HERMANS, Nina; TOTTÉ, J.; PIETERS, Luc; VLIETINCK, Arnold J. In vitro antiplasmodial activity of callus culture extracts and fractions from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae): part 2. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 95, n. 2-3, p. 399-404, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.014>.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 456p.

CORREIA, Paulo R. M.; FERREIRA, Márcia M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 481-487, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200042>.

COSTA, Larissa L. G.; DAVID, Vanessa C.; PINTO, Rodrigo M. C.; MINOZZO, Bruno R.; KOZLOWSKI JUNIOR, Vitoldo A.; CAMPOS, Letícia A.; SILVA, Rosi Z.; BELTRAME, Flávio L. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 1070-1078,

out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2012005000050>.

CRUZ, Luiza S.; KANUNFRE, Carla C.; ANDRADE, Evelyn A.; OLIVEIRA, Alexandre A.; CRUZ, Laura S.; MOSS, Mariane F.; SASSAKI, Guilherme L.; MENEZES, Leociley R. A.; WANG, Mei; KHAN, Ikhlas A. Enriched Terpenes Fractions of the Latex of *Euphorbia umbellata* Promote Apoptosis in Leukemic Cells. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], 2 set. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202000369>.

DANTAS, V. S.; DANTAS, I. C.; CHAVES, T. P.; FELISMINO, D. C.; SILVA, H. DANTAS, G. D.S. Análise das garrafadas indicadas pelos raizeiros na cidade de Campina Grande – PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v.3, n. 1, p. 7-13. 2008.

DAOUBI, Mourad; MARQUEZ, Nieves; MAZOIR, Noureddine; BENHARREF, Ahmed; HERNÁNDEZ-GALÁN, Rosario; MUÑOZ, Eduardo; COLLADO, Isidro G. Isolation of new phenylacetylglucoside derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from *Euphorbia officinarum* latex. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 15, n. 13, p. 4577-4584, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.04.009>.

DENG, Yongfeng; ZHANG, Yan; LEMOS, Bernardo; REN, Hongqiang. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 46687e, 24 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep46687>.

DE SOUZA, Larissa S.; PUZIOL, Letícia C.; TOSTA, Cristina L.; BITTENCOURT, Milena L. F.; ARDISSON, Juliana S.; KITAGAWA, Rodrigo R.; FILGUEIRAS, Paulo R.; KUSTER, Ricardo M. Analytical methods to access the chemical composition of a *Euphorbia tirucalli* anticancer latex from traditional Brazilian medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 237, p. 255-265, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.041>.

DEVAPPA, Rakshit K.; MAKKAR, Harinder; BECKER, K. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from Jatropha oil. **Biomass and**

Bioenergy, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 1125-1133, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.001>.

DORLING, Konrad M.; BAKER, Matthew J. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. **Trends in Biotechnology**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 327-328, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.010>.

DU, Qizhen; ZHAO, Yongchun; LIU, Hongchun; TANG, Chunping; ZHANG, Minmin; KE, Changqiang; YE, Yang. Isolation and Structure Characterization of Cytotoxic Phorbol Esters from the Seeds of *Croton tiglium*. **Planta Medica**, [S.L.], v. 83, n. 17, p. 1361-1367, 12 maio 2017. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0043-110227>.

ERUKAINURE, Ochuko L.; NARAINPERSAD, Nicholisha; SALAU, Veronica F.; SINGH, Moganavelli; KOORBANALLY, Neil A.; ISLAM, Md. Shahidul. Phytochemical constituents of sterol-rich fraction from *Allium cepa* L. and its cytotoxic effect on human embryonic kidney (HEK293) cells. **Journal of Food Biochemistry**, [S.L.], p. 1-10, 16 dez. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.13586>.

FATOPE, Majekodunmi O.; ZENG, Lu; OHAYAGHA, Joseph E.; MCLAUGHLIN, Jerry L. New 19-acetoxyingol diterpenes from the latex of *Euphorbia poissonii* (Euphorbiaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 1679-1683, out. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0968-0896\(96\)00157-5](http://dx.doi.org/10.1016/0968-0896(96)00157-5).

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Unicamp, 2015. 493 p.

FLORA DO BRASIL 2020. **Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>. Acesso em: 17 out. 2019.

GABRIËLS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Experimental designed optimization and stability evaluation of dry suspensions with artemisinin derivatives for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.L.], v.

283, n. 1-2, p. 19-34, set. 2004. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.033>.

GANGWAR, Mayank; GOEL, Ruchika K.; NATH, Gopal. *Mallotus philippinensis* Muell. Arg (Euphorbiaceae): ethnopharmacology and phytochemistry review. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2014, p. 1-13, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/213973>.

GAUTHIER, Charles; LEGAULT, Jean; LEBRUN, Maxime; DUFOUR, Philippe; PICHETTE, André. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 14, n. 19, p. 6713-6725, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.075>.

GOEL, Gunjan; MAKKAR, Harinder P. S.; FRANCIS, George; BECKER, Klaus. Phorbol Esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 279-288, jul. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/10915810701464641>.

GOVARDHAN, C.; REDDY, R. P.; SUNDARARAMAIAH, T. 3-Epicyclolaudenol and known triterpenes from *Euphorbia caudicifolia*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 411-413, jan. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)80342-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)80342-8).

HABA, Hamada; LAVAUD, Catherine; HARKAT, Hassina; MAGID, Abdulmagid Alabdul; MARCOURT, Laurence; BENKHALED, Mohammed. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 68, n. 9, p. 1255-1260, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.017>.

HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 95, n. 2, p. 180-185, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.049>.

HOHMANN, Judit; MOLNÁR, Joseph; RÉDEI, Dóra; EVANICS, Ferenc; FORGO, Peter; KÁLMÁN, Alajos; ARGAY, Gyula; SZABÓ, Pál. Discovery and Biological Evaluation of a New Family of Potent Modulators of Multidrug

Resistance: reversal of multidrug resistance of mouse lymphoma cells by new natural jatrophone diterpenoids isolated from Euphorbia species. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, n. 12, p. 2425-2431, jun. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm0111301>.

HUSNU, K.; BAŞER, K.H.C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. In: BERGER, R.G. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2007. Ch. 4, p.47.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. 4 ed., 1 ed. dig., São Paulo:IAL, 2008. 1020 p.

Iglesias, A. H. **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas**. 2016. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20%20espectrometria%20de%20massas.pdf>. Acesso em: 11 out. 2020.

JASSBI, Amir R. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia from Iran. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 67, n. 18, p. 1977-1984, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.030>.

JIAN, Baiyu; ZHANG, Hao; HAN, Cuicui; LIU, Jicheng. Anti-Cancer Activities of Diterpenoids Derived from Euphorbia fischeriana Steud. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 387, 11 fev. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23020387>.

JIANG, Lin; ZHANG, Yu-Bo; JIANG, Si-Qi; ZHOU, Yi-Duo; LUO, Ding; NIU, Qian-Wen; QIAN, Yi-Rui; LI, Yao-Lan; WANG, Guo-Cai. Phorbol ester-type diterpenoids from the twigs and leaves of *Croton tiglium*. **Journal of Asian Natural Products Research**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1191-1197, 4 abr. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10286020.2017.1307836>.

KANUNFRE, Carla C.; LEFFERS, Talissa; CRUZ, Luiza S.; LUZ, Livia E.C.; CRISMA, Amanda R.; WANG, Mei; AVULA, Bharathi; KHAN, Ikhlas A.; BELTRAME, Flávio L. *Euphorbia umbellata* bark extracts – an in vitro cytotoxic study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 206-213, mar.

2017. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.11.002>.

KARUNAKARAN, Thiruventhan; FIROUZ, Noor Syarafana; SANTHANAM, Rameshkumar; JONG, Vivien Yi Mian. Phytochemicals from *Calophyllum macrocarpum* Hook.f. and its cytotoxic activities. **Natural Product Research**, [S.L.], p. 1-6, 16 jul. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2020.1795658>.

KINGHORN, A. Douglas. Major skin-irritant principle from *synadenium grantii*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 69, n. 12, p. 1446-1447, dez. 1980. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600691228>.

KINOSHITA, Luiza S.; WANDERLEY, MARIA G. L.; SHEPHERD, George J.; MELHEM, Therezinha S.; MARTINS, Suzana E.; KIRIZAWA, Mizué; GIULIETTI, Ana M. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, vol. 4, p. 35-92, 2005.

KOOPS, Andries J.; BAAS, Wim J.; GROENEVELD, Henri W. The composition of phytosterols, latex triterpenols and wax triterpenoids in the seedling of *Euphorbia lathyris* L. **Plant Science**, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 185-191, jan. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90045-a](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(91)90045-a).

LANHERS, Marie-Claire; FLEURENTIN, Jacques; CABALION, Pierre; ROLLAND, Alain; DORFMAN, Pierre; MISSLIN, Rene; PELT, Jean-Marie. Behavioral effects of *Euphorbia hirta* L.: sedative and anxiolytic properties. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 189-198, maio 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90055-x](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(90)90055-x).

LANHERS, Marie-Claire; FLEURENTIN, Jacques; DORFMAN, Pierre; MORTIER, François; PELT, Jean-Marie. Analgesic, Antipyretic and Anti-Inflammatory Properties of *Euphorbia hirta*. **Planta Medica**, [S.L.], v. 57, n. 03, p. 225-231, jun. 1991. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-960079>.

LIMA, I.E.O.; NASCIMENTO, L.A.M.; SILVA, M.S. Comercialização de Plantas Medicinais no Município de Arapiraca-AL. **Revista Brasileira de**

Plantas Medicinais, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 462-472, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_201.

LIN, Lee-Juian; KINGHORN, A. Douglas. 8-methoxyingol esters from the latex of *Euphorbia hermentiana*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 2795-2799, jan. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)97699-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)97699-4).

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. 1 ed. Lisboa: Portugal IST Press, 2007. 272 p.

LU, Zhi-Qiang; GUAN, Shu-Hong; LI, Xing-Nuo; CHEN, Guang-Tong; ZHANG, Jin-Qiang; HUANG, Hui-Lian; LIU, Xuan; GUO, De-An. Cytotoxic Diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*. **Journal of Natural Products**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 873-876, maio 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np0706163>.

LUZ, Livia E.C.; PALUDO, Katia S.; SANTOS, Vera L.P.; FRANCO, Celia R.C.; KLEIN, Traudi; SILVA, Rozi Z.; BELTRAME, Flávio L.; BUDEL, Jane M. Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of *Euphorbia umbellata* (Janaúba). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 344-352, jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.005>.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 939-944, jan. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)82321-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)82321-3).

MADLENER, Sibylle; SVACINOVÁ, Jana; KITNER, Milosla; KOPECKY, Jirí; EYTNER, Ruth; LACKNER, Andreas; VO, Than P.N.; FRISCH, Richard; GRUSCH, Michael; DE MARTIN, Rainer; DOLEZAL, Karel; STRNAD, Miroslav; KRUPITZA, George. (2009). In vitro anti-inflammatory and anticancer activities of extracts of *Acalypha alopecuroidea* (Euphorbiaceae). **International Journal of Oncology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 881-891, 2009.

MAKKAR, Harinder; KUMAR, Vikas; BECKER, Klaus. Use of detoxified jatropa kernel meal and protein isolate in diets of farm animals. In: FAO, Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Biofuel co-products as**

livestock feed – Opportunities and Challenges. Roma: Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2012. Cap. 21. p. 351-378.

MANGISA, Mandisa; TEMBU, Vuyelwa J.; FOCHE, Gerda; NTHAMBELENI, Rudzani; PETER, Xolani; LANGAT, Moses K. Ent-abietane diterpenoids from *Suregada zanzibariensis* Baill. (Euphorbiaceae), their cytotoxic and anticancer properties. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 9, p. 1-8, 2018.

MARASCHIN, Marcelo; ZEGGIO, Amélia R.S.; TOMAZZOLI, Maíra M.; OLIVEIRA, Simone K.; RAMLOV, Fernanda; VELEIRINHO, Maria B.; ROCHA, Miguel. Metabolômica e Quimiometria como ferramentas para análises quimio(bio) diversas. In: RESENDE, Rodrigo. R. **Biotecnologia Aplicada à Agroindústria: Fundamentos e Aplicações**, v. 4. 2017. Cap. 1. p. 17-49.

MARCO, J. A.; SANZ-CERVERA, Juan F; ROPERO, F. J.; CHECA, Javier; FRAGA, B. M. Ingenane and lathyrane diterpenes from the latex of *Euphorbia acurensis*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 1095-1099, out. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)01065-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(97)01065-0).

MARCONDES, Nhara S.P.; ESMERINO, Luís A. Qualidade microbiológica de plantas medicinais cultivadas em hortas domésticas. **Publicações Biológicas**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 133-138, 2010. <http://dx.doi.org/10.5212/Publ.Biologicas.v.16i2.0007>

MENON, Mrinalini; VITHAYATHIL, P.J; RAJU, S.M; RAMADOSS, C.S. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'. **Plant Science**, [S.L.], v. 163, n. 1, p. 131-139, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452\(02\)00085-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452(02)00085-7)

MONDAL, Sumanta; GHOSH, Debjit; RAMAKRISHNA, K. A complete profile on blind-your-eye mangrove *Excoecaria agallocha* L. (Euphorbiaceae): ethnobotany, phytochemistry, and pharmacological aspects. **Pharmacognosy Reviews**, [S.L.], v. 10, n. 20, p. 123-138, 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.194049>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological**

Methods, [S.L.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

NICHOLSON, M. J., 2008. *Euphorbia pseudograntii* Bruyns. In: Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). **PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale)**, Wageningen, Netherlands. Disponível em: [https://uses.plantnet-project.org/en/Euphorbia_pseudograntii_\(PROTA\)#Euphorbia_triangolensis](https://uses.plantnet-project.org/en/Euphorbia_pseudograntii_(PROTA)#Euphorbia_triangolensis). Acesso em: 20 nov. 2020.

NOGUEIRA, Iara A. L.; LEÃO, Aryane B. B.; VIEIRA, Marcelo S.; BENFICA, Polyana L.; CUNHA, Luiz C.; VALADARES, Marize C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 120, n. 3, p. 474-478, dez. 2008. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.026>.

OLIVEIRA, Danilo R.; LEITÃO, Gilda G.; COELHO, Tatiane S.; SILVA, Pedro E. Almeida da; LOURENÇO, Maria Cristina S.; LEITÃO, Suzana G. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 793-806, out. 2011. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000084>.

OLIVEIRA, Thais L.; MUNHOZ, Antônio C. M.; LEMES, Bruna M.; MINOZZO, Bruno R.; NEPEL, Angelita; BARISON, Andersson; FÁVERO, Giovanni M.; CAMPAGNOLI, Eduardo B.; BELTRAME, Flávio L. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 150, n. 1, p. 263-269, out. 2013. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.033>.

OLIVEIRA, Thais Latansio de; FONTANA, Pâmela Dias; BAVIA, Lorena; CRUZ, Luiza Stolz; CRISMA, Amanda Rabello; SASSAKI, Guilherme Lanzi; MENEZES, Leociley Rocha Alencar; WANG, Mei; BELTRAME, Flávio Luís;

MESSIAS-REASON, Iara Jose. Effects of *Euphorbia umbellata* extracts on complement activation and chemotaxis of neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 265, p. 1-10, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2020.113348>.

ORTÊNCIO, W.B. **Medicina popular do centro-oeste**. 3. ed. Brasília: Thesaurus, 1997. 459p.

PASSOS, Márcia M. B.; ALBINO, Rayane C.; FEITOZA-SILVA, Michele; OLIVEIRA, Danilo R. A disseminação cultural das garrafadas no Brasil: um paralelo entre medicina popular e legislação sanitária. **Saúde em Debate**, [S.L.], v. 42, n. 116, p. 248-262, jan. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104201811620>.

PATERSON, Ian; ANDERSON, Edward A. CHEMISTRY: the renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, [S.L.], v. 310, n. 5747, p. 451-453, 21 out. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1116364>.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 733p.

PICMAN, Anna K.; RANIERI, R.L.; TOWERS, G.H.N.; LAM, Jørgen. Visualization reagents for sesquiterpene lactones and polyacetylenes on thin-layer chromatograms. **Journal of Chromatography A**, [S.L.], v. 189, n. 2, p. 187-198, fev. 1980. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)81518-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(00)81518-6).

PINHEIRO, E.; PINHEIRO, F. S. V.; DA CONCEIÇÃO, H. E. O.; VIÉGAS, I. O látex e a borracha da mangabeira. **Embrapa Amazônia Oriental- Documentos (INFOTECA-E)**. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63595/1/Oriental-Doc202.PDF>. Acesso em: 10 set. 2020.

RAHMAN, Hafizur. Antioxidant, Cytotoxic and Hypolipidemic Activities of *Plumeria alba* L. and *Plumeria rubra* L. **American Journal of Life Sciences**, [S.L.], v. 2, n. 6, p. 11-15, 2014. Science Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.11648/j.ajls.s.2014020601.13>.

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. **Biochimie**, [S.L.], v. 88, n. 10, p. 1313-1322, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2006.06.007>.

RAMALHO, Suelem; PINTO, Meri; FERREIRA, Douglas; BOLZANI, Vanderlan. Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. **Planta Medica**, [S.L.], v. 84, n. 09/10, p. 558-567, 23 nov. 2017. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0043-122604>.

REFAHY, Laila A. Study on flavonoids and triterpenoids content of some Euphorbiaceae plants. **Journal of Life Sciences**, vol. 5, p. 100-107, 2011.

Reflora - Virtual Herbarium. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>. Acesso em: 01 out. 2018.

RIZK, Abdel-Fattah M. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of The Linnean Society**, [S.L.], v. 94, n. 1-2, p. 293-326, jan. 1987. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.1987.tb01052.x>.

RODRIGUES, M.O.; ABRANTES, N.; GONÇALVES, F.J.M.; NOGUEIRA, H.; MARQUES, J.C.; GONÇALVES, A.M.M. Impacts of plastic products used in daily life on the environment and human health: what is known? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S.L.], v. 72, p. 103239, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2019.103239>.

SALATINO, Antonio; SALATINO, Maria L. F.; NEGRI, Giuseppina. Traditional uses, chemistry, and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532007000100002>.

SCHIRINZI, Gabriella F.; PÉREZ-POMEDA, Ignacio; SANCHÍS, Josep; ROSSINI, Cesare; FARRÉ, Marinella; BARCELÓ, Damià. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial

human cells. **Environmental Research**, [S.L.], v. 159, p. 579-587, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.043>.

SEIGLER, David S. Phytochemistry and Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of The Missouri Botanical Garden**, [S.L.], v. 81, n. 2, p. 380-401, 1994. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2992104>.

SHIN, Soon Y.; KIM, Chang G.; JUNG, You J.; JUNG, Yearam; JUNG, Hyeryoung; IM, Jihyun; LIM, Yoongho; LEE, Young H. *Euphorbia humifusa* Willd exerts inhibition of breast cancer cell invasion and metastasis through inhibition of TNF α -induced MMP-9 expression. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [S.L.], v. 16, n. 1, 24 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1404-6>.

SILVA, Viviane; ROSA, Marcela; TANSINI, Aline; OLIVEIRA, Renato; MARTINHO, Olga; LIMA, João Paulo; PIANOWSKI, Luiz; REIS, Rui. *In vitro* screening of cytotoxic activity of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer-derived cell lines. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S.L.], p. 557-566, 31 maio 2018. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2018.6244>

SILVEIRA, Patrícia F.; BANDEIRA, Mary A. M.; ARRAIS, Paulo S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 618-626, dez. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000400021>.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. São Paulo: LTC, 2006. 530 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2016. 502 p.

SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Universidade/ UFRGS, 2001. 1104 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 888 p.

SKOV, T.; HONORÉ, A. H.; JENSEN, H.M.; NAES, T.; ENGELSEN S. B. Chemometrics in foodomics: Handling data structures from multiple analytical platforms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 60, p. 71-79, set 2014. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.05.004>

SOARES, F. P.; FRAGA, A. F.; NEVES, J. P. O.; ROMERO, N. R.; BANDEIRA, M. A. M. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba/Janaúba). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.L.], v. 17, n. 42, p. 900-908, 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/14_086.

SOARES, F.P.; ALMEIDA, F.S.; MIRANDA, C.C.; CARVALHO, P.H.L.; ROMERO, N.R.; BANDEIRA, M.A.M. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de leite de Janaguba/Janaúba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel) em Fortaleza – Ceará. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 399-407, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_198.

SOUZA, Fernando S.; MACIEL, Carla C. S. Produtos fitoterápicos e a necessidade de um controle de qualidade microbiológico. **Revista Eletrônica de Ciências**, v. 3, n. 2, p. 22-30, dez. 2010.

STELMAN, C. M.; SIMÕES, O. M.; MENTZ, A. L.; SCHENKEL, P. E.; IRGANG, E. B. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Editora UFRS. 3° ed. 1989.

THE PLANT LIST. **The Plant List - Version 1**. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em: 4 mar. 2020.

TOLEDO, Ana C. O.; HIRATA, Lilian L.; BUFFON, Marilene C. M.; MIGUEL, Marilis D.; MIGUEL, Obdulio G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. ½, p. 7-13, dez. 2003.

TRÓPICOS. **Tropicos.org. Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <https://www.tropicos.org/name/100190804/>. Acesso em: 18 ago. 2020.

UZABAKILIHU, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)84589-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)84589-6).

VALADÃO, Ana L. C.; PEZZUTO, Paula; SILVA, Viviane A. O.; GONÇALVES, Barbara S.; ROSSI, Átila D.; CUNHA, Rodrigo D.; SIANI, Antonio C.; TOSTES, João B. F.; TROVÓ, Marcelo; DAMASCO, Paulo. Reactivation of latent HIV-1 in vitro using an ethanolic extract from *Euphorbia umbellata* (Euphorbiaceae) latex. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 11, 27 nov. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0207664>.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; MELLO, João Carlos P. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 464-471, set. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000300022>.

VOGG, G. Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 289-295, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(99\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(99)00016-3).

WANG, Lin; WANG, Guiying; YANG, Dandan; GUO, Xudong; XU, Yanxin; FENG, Bo; KANG, JiuHong. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 1279-1285, 22 ago. 2013. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2013.1650>.

WHELAN, L.C.; RYAN, Michael F. Ethanolic extracts of *Euphorbia* and other ethnobotanical species as inhibitors of human tumour cell growth. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 53-58, jan. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/094471103321648665>.

WOOD, C.A.; LEE, K.; VAISBERG, A.J.; KINGSTON, D.G.; NETO, C.C., HAMMOND, G.B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 49, n. 11, p. 1477-1478, nov. 2001. [10.1248/cpb.49.1477](https://doi.org/10.1248/cpb.49.1477)

YENER, Ismail; ERTAŞ, Abdulselam.; YILMAZ, Mustafa A.; ÖLMEZ, Tokul Ö.; YILMAZ, Pelin K.; YEŞİL, Yeter; KAPLANER, Erhan; ÖZTÜRK, Mehmet; TEMEL, Hamdi; KOLAK, Ufuk; TOPÇU, Gulaçti. Characterization of the Chemical Profile of Euphorbia Species from Turkey by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS), Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), and Liquid Chromatography–Ion Trap–Time-of-Flight–Mass Spectrometry (LC-IT-TOF-MS) and Chemometric Analysis. **Analytical Letters**, [S.L.], v 52, n. 7, p. 1031-1049, 2018. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1512608>

ZHANG, Xiao-Long; KHAN, Ashfaq-Ahmad; WANG, Lun; YU, Kai; LI, Fu; WANG, Ming-Kui. Four new phorbol diesters from *Croton tiglium* and their cytotoxic activities. **Phytochemistry letters**, [S.L.], v. 16, p. 82-86, 2016. <https://doi.org/10.1016>