

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Metodologias analíticas para determinação do perfil
químico, atividade imunomoduladora e citotóxica do látex
de *Euphorbia tirucalli* L.**

**Analytical methodologies to determine the chemical profile,
immunomodulatory and cytotoxic activity of *Euphorbia tirucalli* L. latex**

Larissa Silva de Souza

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2019**

Larissa Silva de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

Co-orientador(a): Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras

**VITÓRIA
2019**

Metodologias analíticas para determinação do perfil químico,
atividade imunomoduladora e citotóxica do látex de *Euphorbia*
tirucalli L.

Larissa Silva de Souza

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Química.

Aprovado(a) em /02/2019 por:

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador

Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Hildegardo Seibert França
Instituto Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Fevereiro de 2019

À minha mãe, Zenilda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo!

Agradeço a meus familiares, em especial à minha mãe por ser incrível, por me apoiar e acreditar que sou capaz sempre, mesmo sem entender o que realmente faço.

Ao Jorge por estar comigo em todos os momentos e por sempre acreditar em mim. Por me ouvir, me ajudar sempre que pôde, por ser minha válvula de escape, pela paciência, amor e por todo crescimento que tive ao seu lado. Obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia, Rodrigo, Dandara, Tamires, Poly, Fernanda, Clarissa, Dani, Kézia e Jô. Vocês são a verdadeira definição de companheirismo! Agradeço pela convivência, troca de conhecimento e amizade. Agradeço também a Cristina que muito me ajudou na parte biológica deste trabalho. Obrigada pela paciência, por estar sempre à disposição até pra cuidar de mim como farmacêutica particular! Por toda a amizade que construímos nesses últimos meses, obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada, Regina, Bárbara, Eclair, Mayara, Mariana, Rodrigo, Ana Paula e Lucas, agradeço pelos bons momentos juntos (dos cafés principalmente), almoço e trocas de conhecimento, claro. Momentos com vocês é riso na certa. Por mais congressos juntos também!

Ao Laboratório de Massas, em especial a Lindamara pelo auxílio na análise e por toda a paciência em explicar e apresentar as técnicas de ESI e APCI.

Agradeço ao Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais, UFES campus Maruípe, a Milena, Juliana e ao Professor Rodrigo Rezende Kitagawa, por todas as análises biológicas, sugestões e trocas de conhecimentos.

Ao Professor Ricardo M. Kuster, pela excelente orientação e principalmente, pela paciência que teve comigo nesses dois anos. Agradeço pelos ensinamentos, confiança e por estar sempre disposto a ajudar. Muito obrigada!

Agradeço ao Professor Paulo R. Filgueiras pela coorientação e pela boa recepção sempre.

Agradeço também a disponibilidade dos professores da banca de defesa e pela avaliação deste trabalho.

À Labpetro por proporcionar toda a estrutura necessária para a conclusão deste

trabalho

À CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química, coordenador e ao corpo docente que contribuiu para minha formação e por todo conhecimento que adquiri.

Por fim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão dessa mais uma etapa em minha vida.

“Confia ao Senhor tuas obras e terão êxito os teus projetos”
(*Provérbios 16:3*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar da espécie <i>Euphorbia tirucalli</i> L. com detalhamento dos (a) ramos e (b) látex após incisão no tronco.....	19
Figura 2: Principais núcleos diterpenoídicos da <i>E. tirucalli</i> e estruturas do 4-deoxyphorbol, phorbol e ingenol.....	21
Figura 3: Estrutura química dos triterpenos euphol, tirucallol e cicloartanos identificados no látex da <i>E. tirucalli</i>	23
Figura 4: Rota biossintética dos terpenos (Adaptado de DEWICK, 2000)	24
Figura 5: Proposta de mecanismo para os diterpenos e ésteres diterpênicos (DEWICK, 2000).....	25
Figura 6: Cromatograma de CG-EM da fração hexânica derivatizada do látex da <i>E. tirucalli</i>	37
Figura 7: Cromatograma de CG-EM da fração diclorometânica derivatizada do látex de <i>E. tirucalli</i>	37
Figura 8: Cromatograma de CG-EM do extrato bruto do látex sem a reação de derivatização.	38
Figura 9: Triterpenos previamente identificados em <i>Euphorbia tirucalli</i> L.	39
Figura 10: Diterpenos encontrados em látex de <i>E. tirucalli</i> e os respectivos valores de ¹ H e ¹³ C RMN do ingenol.....	42
Figura 11: Cromatograma de CG-EM obtida para a 6 ^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel.....	46
Figura 12: Cromatograma de CG-EM obtida para a 7 ^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel.....	46
Figura 13: Cromatograma de CG-EM sob novas condições cromatográficas obtidas para a 8 ^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel.....	46
Figura 14: Espectro de massas ESI(-) FT-ICR MS da 12 ^o fração obtida por cromatografia em coluna de sílica-gel.....	47
Figura 15: Proposta de fragmentação por MS/MS em íon <i>m/z</i> 511, um composto 4-deoxyphorbol.....	50
Figura 16: ESI (-) MS/MS para os íons (A) <i>m/z</i> 523 e (B) <i>m/z</i> 559.....	52
Figura 17: Proposta de fragmentação por MS/MS em íon <i>m/z</i> 523, um Ingenol 3-monoéster	53
Figura 18: Proposta de fragmentação por MS/MS em íon <i>m/z</i> 523, um Ingenol 3-monoéster	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ésteres diterpênicos isolados do látex da <i>Euphorbia tirucalli</i> L.....	22
Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do extrato bruto e da literatura.....	41
Tabela 3: Estruturas propostas para ácidos graxos ionizados como íons $[\text{M-H}]^-$	43
Tabela 4: Estruturas propostas para os triterpenóides ionizados ESI (-) e APCI (+) (C-30) e esteróides (C-29) como íons $[\text{M-H}]^-$ e $[\text{M-H}]^+$ ou M^{++}	44
Tabela 5: Ésteres diterpênicos obtidos pelo fracionamento do extrato bruto do látex de <i>E. tirucalli</i>	48

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Efeito da viabilidade de *E. tirucalli* e da cisplatina em macrófagos. Valores expressos como porcentagem de células viáveis em comparação ao controle de crescimento. *p < 0,001 em relação ao controle de crescimento.54
- Gráfico 2:** Efeito de *E. tirucalli* e cisplatina na cultura de células de adenocarcinoma gástrico (AGS). Resultados expressos em porcentagem de células viáveis. . *p < 0,001 em relação ao controle de crescimento.....55
- Gráfico 3:** Efeito inibitório na produção de óxido nítrico expresso como concentração de nitrito para *E. tirucalli* em macrófagos estimulados por LPS. *p<0,05 comparado ao padrão de inibição de L-NAME.....56
- Gráfico 4:** Efeito inibitório do látex de *E. tirucalli* na produção de TNF- α por macrófagos estimulados por LPS.....57
- Gráfico 5:** Efeito inibidor do látex de *E. tirucalli* na produção de IL-6 por macrófagos induzidos por LPS. *p<0,001 comparado ao grupo LPS.57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS – Adenocarcinoma Gástrico

ANVISA – Agência Brasileira de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica (*Atmospheric-pressure Chemical ionization*)

CC₅₀ – Concentração citotóxica de 50%

CE₅₀ – Concentração efetiva de 50%

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplado à espectrometria de massas

COSY – Espectroscopia de correlação H-H (*Correlation spectroscopy*)

DBE – Número de insaturações e anéis (*Double bonds equivalent*)

DMAPP – Dimetilalil difosfato

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*

ESI – Ionização por Eletrospray (*Electrospray Ionization*)

ESI FT-ICR MS – Espectrometria de Massas com Ionização por electrospray e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (*Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*)

FT-ICR MS – Espectrometria de massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier

GFPP – Geranil Farnesil difosfato

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50%

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPP – Pirofosfato de Isopentila

IS – Índice de Seletividade

IL-6 – Interleucina 6

L-NAME – N(ω)-nitro-L-arginina metil ester

LPS – Lipopolissacarídeo

MS – Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

m/z – Razão massa-sobre-carga

MTT-tetrazólio – *Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide*

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

NO – Óxido nítrico

Ppm – Partes por milhão

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TOF – Tempo de voo (*time-of-flight*)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

bar - barômetro

cm – centímetros

Da – Dalton

dd – duplo dupleteo

eV – eletron-volts

g – grama

hex - hexano

Hz – Hertz

kV - kilovolts

M – Molar

m - multipleteo

µg/mL – micrograma por mililitro

mg – miligrama

mL – mililitros

nA – nano-âmperes

nd – não determinado

s – singleto

t – tripleto

V – volts

RESUMO

Euphorbia tirucalli L. é amplamente utilizada pela medicina popular brasileira, principalmente por sua atividade anticancerígena. No entanto, sua comercialização foi proibida pela ANVISA devido à presença de alguns compostos considerados tóxicos, como os ésteres diterpênicos. Logo, o presente estudo caracterizou o látex dessa planta por diferentes métodos analíticos como também analisou sua atividade imunomoduladora e citotóxica. O látex foi coletado por dois procedimentos, em solução de diclorometano: metanol (3:1, 100 mL) e em 100 mL de água destilada. O primeiro foi concentrado como um extrato bruto e o segundo foi particionado com hexano e diclorometano. As partições e o extrato bruto foram submetidos à análises fitoquímicas utilizando três métodos distintos: espectrometria de massas, técnicas FT-ICR MS (ESI (-) e APCI (+)), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC). O potencial citotóxico foi avaliado utilizando-se o extrato bruto sobre macrófagos RAW 264.7 e sobre células cancerosas gástricas AGS. A avaliação da atividade imunomoduladora foi feita através da avaliação da produção de óxido nítrico e citocinas como TNF- α e IL-6 por macrófagos. A técnica CG-EM mostrou a presença de alguns ésteres de ácidos graxos, como o mirístico, palmítico, esteárico, oleico e linoleico e, principalmente, triterpenos como euphol e tirucallol. Por RMN, a maioria dos sinais foi relacionada aos triterpenóides euphol e tirucallol. No entanto, quando o látex foi analisado por ESI (-) FT-ICR MS, foi encontrada uma grande variedade de moléculas de diferentes classes de produtos naturais (ácidos graxos, diterpenos, triterpenos, esteróides). Por APCI (+) FT-ICR MS, o íon em m/z 426,38, relacionado à massa dos triterpenos euphol e tirucallol foi o pico mais intenso, com erro de massa -0,11, indicando alta precisão. Os ésteres diterpênicos de núcleo 4-deoxyphorbol e ingenol foram identificados apenas por ESI (-) FT-ICR MS e por ESI (-) FT-ICR MS/MS. Quando avaliado biologicamente, o látex bruto apresentou atividade imunomoduladora, pois reduziu a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e NO, e o efeito na redução do NO foi mais expressivo, obtendo resultados semelhantes ao padrão L-NAME, bem como atividade citotóxica significativa ($\text{IC}_{50} = 69,43 \pm 1,29 \mu\text{g/mL}$) contra células de adenocarcinoma gástrico (AGS) sem danificar células saudáveis. Assim, verificou-se que o látex da *Euphorbia tirucalli* consiste principalmente dos triterpenos euphol e tirucallol, que podem ser os principais responsáveis pela atividade antineoplásica atribuída à planta, mas muitos outros compostos minoritários podem ser determinados por FT-ICR MS, como os ésteres diterpênicos. Possui potencial antitumoral, pois age seletivamente contra células cancerosas e ainda impede a progressão do tumor, pois possui importante efeito imunomodulador.

Palavras-chave: *Euphorbia tirucalli* L. Látex. Triterpenos. Ésteres diterpênicos. Atividade imunomoduladora. Atividade citotóxica.

ABSTRACT

Euphorbia tirucalli L. is widely used by Brazilian popular medicine, mainly for its anticancer activity. However, its commercialization was banned by ANVISA due to the presence of some compounds considered toxic, such as diterpene esters. Therefore, the present study characterized the latex of this plant by different analytical methods as well as analyzed its immunomodulatory and cytotoxic activity. The latex was collected by two procedures in dichloromethane: methanol solution (3:1, 100 mL) and in 100 mL of distilled water. The former was concentrated as a crude extract and the second was partitioned with hexane and dichloromethane. Partitions and crude extract were subjected to phytochemical analysis using three different methods: FT-ICR MS (ESI (-) and APCI (+)), GC-MS and NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, COSY, HSQC and HMBC). The cytotoxic potential was evaluated using the crude extract in RAW 264.7 and AGS macrophages. The evaluation of immunomodulatory activity was made through the detection of nitric oxide and cytokines such as TNF- α and IL-6. The GC-MS technique showed the presence of some esters of fatty acids, such as myristic, palmitic, stearic, oleic and linoleic and, mainly, triterpenes such as euphol and tirucallol. By NMR, most of the signals were related to the triterpenoids euphol and tirucallol. However, when the latex was analyzed by ESI (-) FT-ICR MS, a large variety of molecules of different classes of natural products (fatty acids, diterpenes, triterpenes, steroids) were found. By APCI (+) FT-ICR MS, the ion in m/z 426,38, related to the mass of the euphol and tirucallol triterpenes, was the most intense peak, with mass error -0.11, indicating high precision. The diterpene esters of 4-deoxyphorbol and ingenol were identified only by ESI (-) FT-ICR MS and by ESI (-) FT-ICR MS/MS. When biologically evaluated, the crude latex showed immunomodulatory activity, since it reduced the production of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and NO, and the effect on NO reduction was more expressive, obtaining results similar to the standard L-NAME, as well as significant cytotoxic activity ($\text{IC}_{50}=69.43 \pm 1.29 \mu\text{g/mL}$) against gastric adenocarcinoma cells (AGS) without damaging healthy cells. Thus, it was found that *Euphorbia tirucalli* latex consists mainly of the triterpenes euphol and tirucallol, which may be the main responsible for the antineoplastic activity attributed to the plant, but many other smaller compounds can be determined by FT-ICR MS, such as diterpene esters. It has antitumor potential, as it acts selectively against cancerous cells and still prevents the progression of the tumor, since it has an important immunomodulatory effect.

Keyword: *Euphorbia tirucalli*. Latex. Triterpenes. Immunomodulatory activity. Cytotoxic activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. <i>Euphorbia tirucalli</i> L. – Classificação botânica e aspectos gerais	19
1.2. Constituintes químicos e metabolismo secundário	20
1.3. Técnicas analíticas aplicadas a produtos naturais	25
1.4. Uso na medicina popular e atividade biológica	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo Geral	30
2.2. Objetivos Específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. Identificação e coleta do látex	31
3.2. Preparação da amostra	31
3.2.1. Procedimento 1	31
3.2.2. Procedimento 2	31
3.3. Fracionamento do látex de <i>E. tirucalli</i> por Cromatografia em Coluna em sílica-gel	31
3.4. Derivatização dos ácidos graxos	32
3.5. Condições de análise	32
3.5.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	32
3.5.2. Espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (ESI(-), ESI(-) MS/MS e APCI(+) FT-ICR MS)	33
3.5.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	34
3.6. Linhagem celular	34
3.7. Avaliação da citotoxicidade em macrófagos (RAW 264.7) e linhagem de adenocarcinoma gástrico (AGS)	34
3.8. Índice de Seletividade	35
3.9. Avaliação da atividade imunomoduladora através da produção de citocinas TNF- α e IL-6 e de óxido nítrico (NO)	35
3.10. Análise estatística	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Perfil químico do látex após derivatização	37
4.2. Perfil químico do extrato bruto do látex	39
4.3. Fracionamento do látex em coluna de sílica-gel para identificação de compostos minoritários	45
4.4. Atividade citotóxica	53
4.5. Atividade imunomodulatória	55
5. CONCLUSÃO	59

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7. ANEXO	66

1. INTRODUÇÃO

Euphorbia tirucalli L., pertencente à família Euphorbiaceae, é amplamente utilizada, no Brasil, tradicionalmente, para o tratamento do câncer. O látex suspenso em água ou uma tintura etanólica das partes aéreas são as duas maneiras mais comuns de uso popular da planta. No entanto, a ANVISA, por meio da Resolução 2.917, de 6 de julho de 2011, proibiu a distribuição e comercialização de medicamentos contendo a *Euphorbia tirucalli* L. A Resolução foi publicada porque a planta não foi submetida a testes de segurança e eficácia¹⁻³.

Um das razões alegadas para proibir o uso comercial da planta é a presença em seus extratos de ésteres diterpênicos, de núcleo tigliano e ingenano, alguns dos quais são conhecidos por serem co-carcinogênicos⁴⁻⁶. No entanto, muitas substâncias encontradas na planta são consideradas anticancerígenas. O euphol, por exemplo, é o principal triterpeno encontrado no látex da planta⁷. Quando testado em células de câncer de mama humano T47D, este triterpeno reduziu a viabilidade celular, que foi acompanhada por um acúmulo de células na fase G1. Este resultado possibilitou aos pesquisadores a concluir que o euphol é um ingrediente ativo de plantas contra o câncer⁸.

Atualmente, o látex tem sido utilizado para o tratamento da gastrite, uma doença precursora do câncer⁹. No Brasil os tumores do estômago aparecem em terceiro lugar na incidência entre homens e em quinto, entre as mulheres, segundo as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2018). Algumas evidências científicas mostraram os benefícios anticancerígenos de *Euphorbia tirucalli* em ensaios com células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) onde o euphol inibiu seletivamente o crescimento de células AGS por indução de apoptose mediada por ERK 1/2¹⁰.

Do ponto de vista toxicológico, o látex de *E. tirucalli* não apresentou alta citotoxicidade às culturas de linfócitos humanos primários ($CC_{50} = 548,8 \mu\text{g} / \text{mL}$), embora tenha mostrado alta citotoxicidade em células tumorais^{11,12}. Portanto, embora ensaios biológicos tenham demonstrado a atividade antiproliferativa do látex de *Euphorbia tirucalli*, bem como sua baixa toxicidade para células saudáveis, dúvidas persistem no Brasil quanto à sua eficácia e segurança para uso em humanos.

A presença de ésteres diterpênicos na planta cultivada em território brasileiro

ainda não foi bem caracterizada, embora já tenham sido isolados em amostras africanas e asiáticas. Nesta dissertação, três métodos analíticos, CG-EM, FT-ICR MS (ESI (-) e APCI (+)), RMN (^1H -RMN, ^{13}C -RMN) e RMN bidimensional (COSY, HSQC e HMBC) foram utilizados para uma ampla caracterização química do látex. Além disso, foi avaliada sua atividade imunomoduladora e citotóxica, contra células de adenocarcinoma gástrico, visando uma melhor compreensão de suas propriedades medicinais.

1.1. *Euphorbia tirucalli* L. – Classificação botânica e aspectos gerais

Euphorbia tirucalli pertence à família Euphorbiaceae, onde o gênero *Euphorbia* é o mais amplo, constituído por mais de 2000 espécies, compreendido por árvores, arbustos e ervas. Conhecida popularmente como cega-olho, dedo-do-diabo, coroa-de-cristo, cachorro pelado, gaiolinha, árvore do lápis, mata-verrugas, e comumente chamada no Brasil de Aveloz, a *E. tirucalli* é uma planta arbustiva de porte grande, podendo atingir uma altura de dez metros, com tronco e ramos lenhosos, suculentos e cilíndricos de cor verde. Suas folhas são pouco visíveis por serem pequenas, e as flores são raramente produzidas^{13,14}.

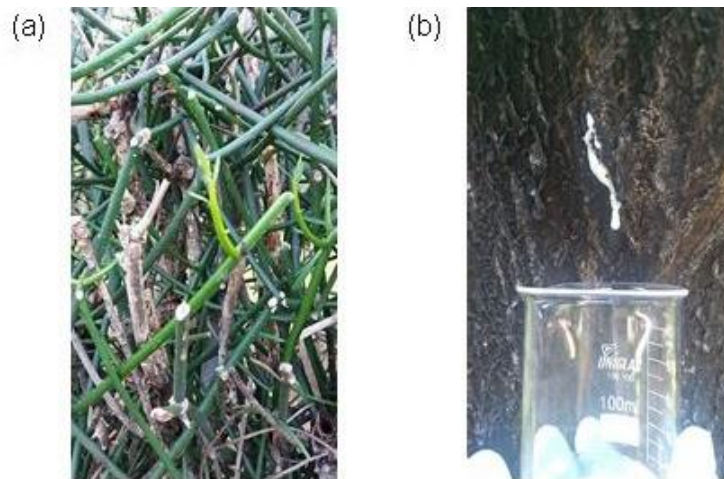


Figura 1: Exemplar da espécie *Euphorbia tirucalli* L. com detalhamento dos (a) ramos e (b) látex após incisão no tronco

Nativa da África, a Aveloz está atualmente distribuída no sul da Europa, Ásia e nas Américas, firmemente introduzida devido a suas características ornamentais e medicinais. Ela possui a capacidade de sobreviver em vários *habitats* como em áreas áridas, tropicais com pouca chuva, solos pobres erodidos e solos salinos^{14,15}.

Seus caules e troncos são abundantes de um látex esbranquiçado com ação irritante à pele e tóxico (Figura 1), apresentando registros de acidentes toxicológicos resultantes do contato humano com o látex, como distúrbios gastrointestinais, conjuntivites, irritação e edemas oculares e até cegueira, além de reações inflamatórias e necrose quando em contato com a pele¹⁶⁻¹⁸. Ensaios farmacológicos já mostraram que o látex pode ser responsável pela ativação do vírus Epstein-Barr, que está ligado ao desenvolvimento do linfoma de Burkitt, entretanto, o consumo do látex, em doses baixas, já foi relatado em 1968, pelo médico Lauro Neiva, quem o

indicava para o tratamento de câncer via resposta imunológica^{4,19}. Atualmente, a população tem usado o látex para o tratamento da gastrite, com alguma comprovação científica²⁰.

1.2. Constituintes químicos e metabolismo secundário

Antes de tudo, estudos de Furstenberguer e Hecker (1986) indicaram uma provável existência de quimiotipos da Aveloz, quando amostras de duas regiões africanas, África do Sul e Madagascar, foram comparadas²¹. Eles afirmaram que o éster de núcleo 4-deoxyphorbol (Figura 2) estava presente na espécie colhida em Madagascar, mas não colhida na África do Sul. Isso indica que diversos fatores podem influenciar na composição química da planta, alterando constituintes minoritários ou majoritários²².

Em geral, é descrito na literatura, que a composição química do látex da aveloz, compreende ácidos graxos²³ e terpenos. Dentre os terpenos, os diterpenos, ésteres diterpênicos^{21,24}, e triterpenos²⁵. Os ácidos graxos até então foram relatados de forma geral, possuindo cadeia longa de forma saturada ou insaturada. Os ésteres de ácido málico glicosilados, também conhecidos como as maloilglucanas, foram recentemente descritas².

A diversidade estrutural dos terpenos é imensa. Os diterpenos presentes no látex são normalmente de núcleo tigliano, denominado phorbol e 4-deoxyphorbol como também de núcleo ingenano, ingenol (Figura 2). O phorbol contém cinco grupos hidroxilas que possuem diferentes níveis de reatividade em relação à esterificação, sendo considerado um dos principais álcoois formadores de ésteres diterpênicos de núcleo tigliano, ou neste caso, ésteres de phorbol. A maioria desses ésteres existe como 12,13 ou 13, 20-diésteres, embora algumas moléculas também existam na forma de 12,13, 20-triésteres^{21,26,27}.

Quando o phorbol está substituído por hidrogênio no carbono na posição 4, este é designado 4-deoxyphorbol. As estruturas podem ser observadas na Figura 2. Esses são os mais encontrados na planta, sendo muitos de seus ésteres correlacionados com a irritabilidade e toxicidade atribuída ao látex da Aveloz como também de outras plantas da mesma família^{24,26,28}. Quando esterificados, o número crescente de carbonos e insaturações, na posição acila, conduzem a um aumento da atividade irritante do látex, bem como com algumas cadeias carbônicas saturadas. Por outro lado, na presença de ligações duplas conjugadas, a

irritabilidade diminui, indicando que nem todos os ésteres diterpênicos possuem tal atividade²¹

A caracterização dos ingenóis nos extratos vegetais está associada à hidrólise de seus ésteres. O ingenol possui quatro hidroxilas e, em relação à sua forma esterificada, os 3-monoésteres são os mais encontrados em *Euphorbia tirucalli*^{21,29}. A Tabela 1 descreve os ésteres diterpênicos encontrados na aveloz descritos até o momento.

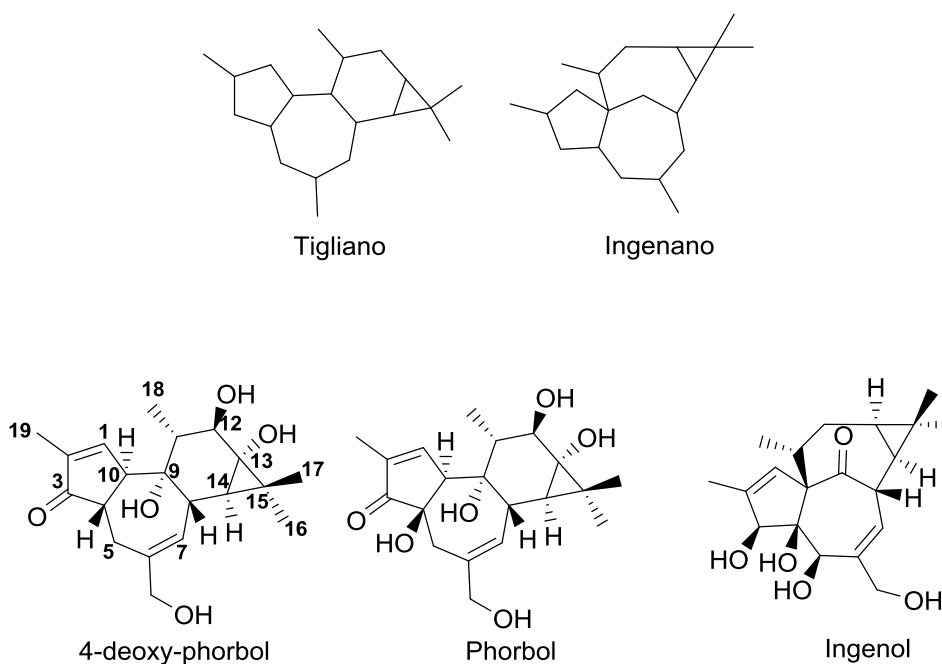


Figura 2: Principais núcleos diterpenoídicos da *E. tirucalli* e estruturas do 4-deoxy-phorbol, phorbol e ingenol

Tabela 1: Ésteres diterpênicos isolados do látex da *Euphorbia tirucalli* L.

Substância	Fórmula molecular	Massa Molecular	Referência
Núcleo tigliano			
Phorbol 12-acetate-13-(2,4,6,8,10-tetradecapentaenoate)	C ₃₆ H ₄₆ O ₈	606,31	Furstenberger and Hecker, 1986
Phorbol 12-[(2Z,4E)-2,4-octadienoate]-13-acetate	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	528,26	
Phorbol 12-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoate]-13-acetate	C ₃₂ H ₄₂ O ₈	554,28	
Phorbol 12-(2,4,6,8-tetradecatetraenoate)-13-acetate	C ₃₆ H ₄₈ O ₈	608,33	
Phorbol 12-(2,4,6,8,10-tetradecapentaenoate)-13-acetate	C ₃₆ H ₄₆ O ₈	606,32	Furstenberger and Hecker, 1972
4-deoxyphorbol 12-acetate-13-(2,4-octadienoate)	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512,27	
4-deoxyphorbol 12-acetate-13-(1-octenoate)	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514,28	
4-deoxyphorbol 12-acetate-13-(2,4-decadienoate)	C ₃₂ H ₄₄ O ₇	540,3	Furstenberger and Hecker, 1977
4-deoxyphorbol 12-acetate-13-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoate] (Ti ₂)	C ₃₂ H ₄₂ O ₇	538,28	
4-deoxyphorbol 12-acetate-13-(2,4,6-dodecatrienoate]	C ₃₅ H ₄₈ O ₇	580,33	Furstenberger and Hecker, 1972
4-deoxyphorbol 12-acetate-13-(2,4,6,8-dodecatetraenoate)	C ₃₅ H ₄₆ O ₇	578,31	
4-deoxyphorbol 12-acetate-13-(2,4,6,8-tetradecatetraenoate) (Ti ₄)	C ₃₆ H ₄₈ O ₇	592,33	Furstenberger and Hecker, 1977
4-deoxyphorbol 12-acetate-13-(2,4,6,8,10-tetradecapentaenoate (Ti ₃))	C ₃₈ H ₅₀ O ₇	618,36	
4-deoxy(4α)phorbol 12-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoate 13-acetate	C ₃₂ H ₄₂ O ₇	538,29	
4-deoxy(4α)phorbol 12-acetate-13-(2,4,6,8-tetradecatetraenoate) (α-Ti ₄)	C ₃₆ H ₄₈ O ₇	592,34	
4-deoxy-(4α)phorbol-12-13-20-triacetate	C ₂₅ H ₃₂ O ₈	460,21	Kinghorn, 1979
Núcleo ingenano			
Ingenol 3-(2,4-decadienoate)	C ₃₀ H ₄₂ O ₆	498,29	Furstenberger and Hecker, 1986
Ingenol 3-[(2E,4E,6E) decatrienoate]	C ₃₀ H ₄₀ O ₆	496,27	
Ingenol 3-(2,4,6-dodecatrienoate)	C ₃₂ H ₄₄ O ₆	524,3	
Ingenol 3-(2,4,6,8-dodecatetraenoate)	C ₃₂ H ₄₂ O ₆	522,29	
Ingenol 3-(2,4,6,8-tetradecatetrienoate)	C ₃₄ H ₄₆ O ₆	550,32	
Ingenol 3-(2,4,6,8,10-tetradecapentaenoate)	C ₃₄ H ₄₄ O ₆	548,3	

Os triterpenos, por sua vez, são abundantes na planta, sendo os mais comuns, euphol e tirucallol^{25,30,31}. Eles são diastereoisômeros (C₃₀H₅₀O), diferenciados apenas por sua estereoquímica em C-20, com configuração 20*R* e 20*S*, respectivamente. Cicloartanos como cicloeuphordenol, cicloeuphornol e ciclotirucanenol também foram isolados do látex da *E. tirucalli*^{32,33}. Esses compostos ocorrem na natureza como glicosídeos e ésteres de ácidos orgânicos já descritos em plantas do gênero *Euphorbia*³⁴⁻³⁶.

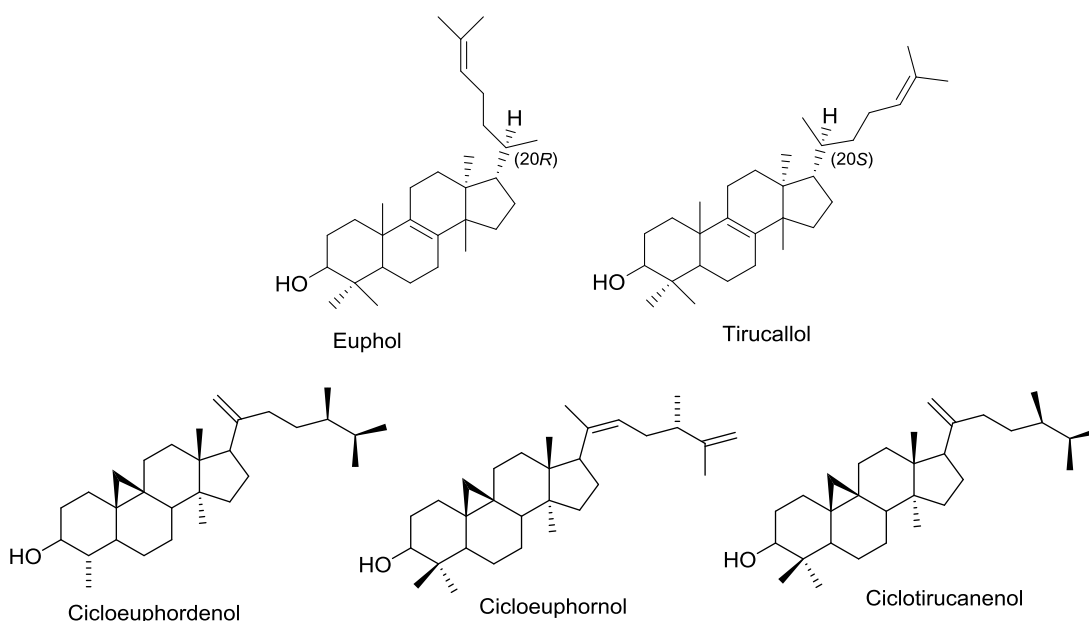


Figura 3: Estrutura química dos triterpenos euphol, tirucallol e cicloartanos identificados no látex da *E. tirucalli*

Essas estruturas são originadas a partir do metabolismo secundário, mais especificamente, da rota biossintética do ácido mevalônico, partindo da estrutura básica dos terpenos, o isopreno (C₅). A estrutura básica dessa classe é derivada da condensação aldólica de três moléculas de acetil-CoA, que, após etapas reacionais, originam o ácido mevalônico ou mevalonato, o qual, após reações de pirofosforilação e descarboxilação resulta no pirofosfato de isopentenila (IPP). O IPP e seu isômero DMAPP (dimetilalil difosfato) são precursores da biossíntese dos terpenos. Eles combinam-se por meio de reações de condensação para formar moléculas maiores, onde monoterpenos são formados pela junção de duas unidades (IPP e DMAPP), os sesquiterpenos, por três unidades de IPP e assim por diante, com os diterpenos (4 unidades), sesterterpenos (5 unidades) e triterpenos (6 unidades) (Figura 4)^{37,38}.

Os triterpenos não são formados por uma extensão do processo agora familiar de adicionar IPP à cadeia crescente. Em vez disso, duas moléculas de pirofosfato de farnesila (GFPP) são unidas por um mecanismo cauda-cauda para produzir o esqualeno, estrutura básica originária dos triterpenos tetracíclicos ³⁷.

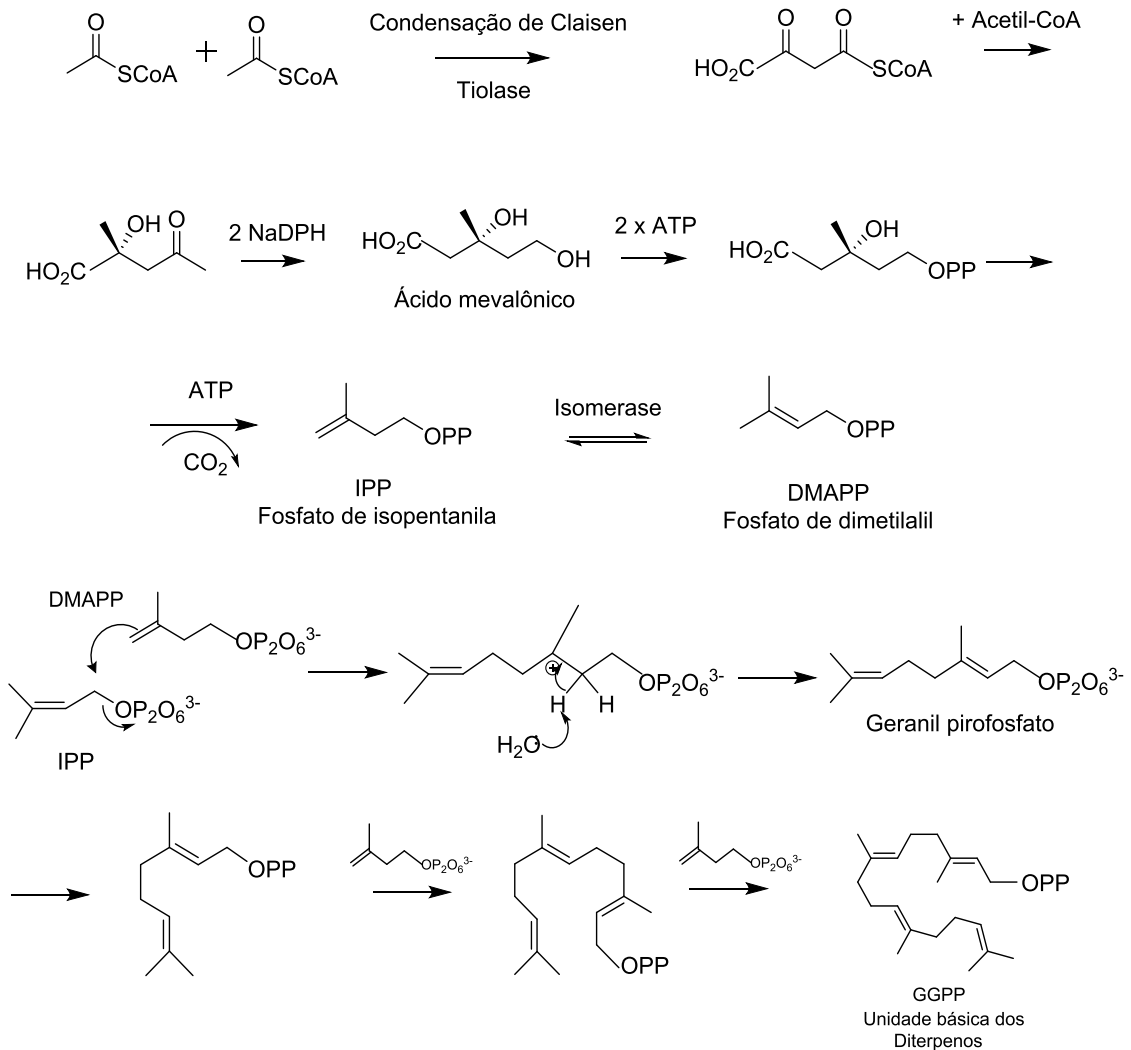


Figura 4: Rota biossintética dos terpenos (Adaptado de DEWICK, 2000)

Uma proposta de mecanismo para a formação do phorbol e seus ésteres foi feito por Dewick (2000). A ciclização do GGPP gera um cátion contendo um sistema de anel de catorze membros. A perda de um próton com a formação de anel ciclopropano leva ao casbano, um metabólito antifúngico produzido pela mamona (*Ricinus communis*) pertencente à família Euphorbiaceae. Assim, através do fechamento do anel do casbano e por reações de oxigenações, o precursor do diterpeno phorbol é formado.

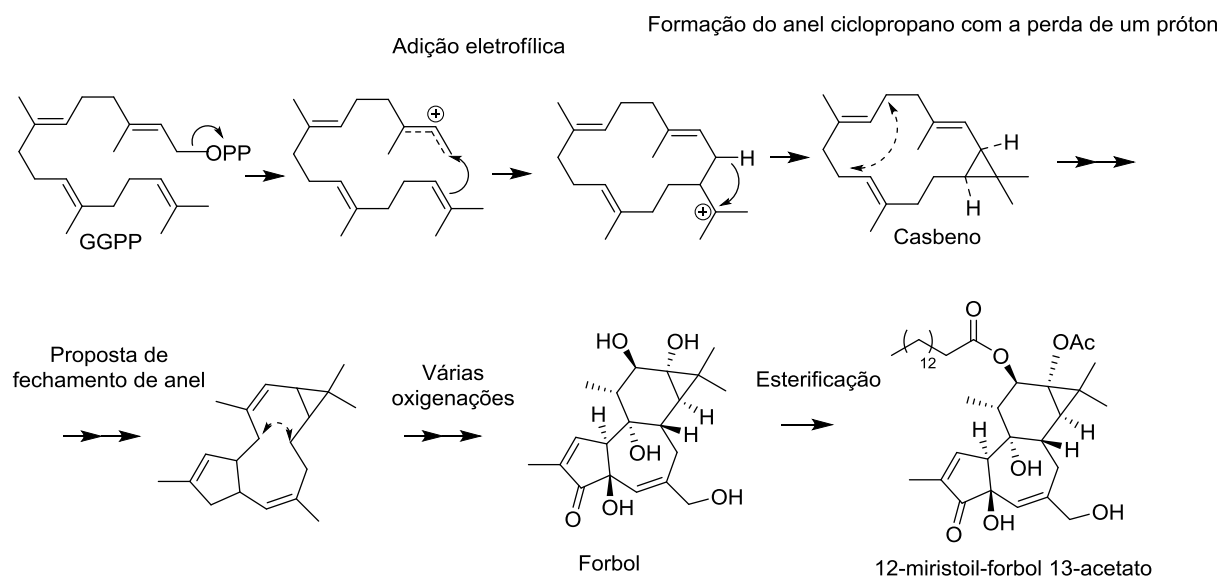


Figura 5: Proposta de mecanismo para os diterpenos e ésteres diterpênicos (DEWICK, 2000).

Muitas espécies do gênero *Euphorbia* e da família Euphorbiaceae são consideradas como potencialmente tóxicas, causando efeitos irritantes graves, onde a maioria dos efeitos biológicos é devido aos ésteres diterpênicos. Algumas explicações afirmam que esses compostos ativam a proteína quinase C, uma enzima importante e amplamente distribuída no organismo. Acredita-se que a ativação permanente dessa proteína leva ao crescimento descontrolado da célula cancerígena^{37,39-41}.

1.3. Técnicas analíticas aplicadas a produtos naturais

Para a separação eficiente de metabólitos, boa seletividade e sensibilidade de detecção, juntamente com a capacidade de fornecer informações estruturais, as técnicas hífenadas são as mais requisitadas para esta função. Esta combinação de

técnicas possibilita a caracterização de um produto natural desconhecido, de forma rápida, tendo apenas uma quantidade mínima de amostra. Técnicas hífenadas são métodos que combinam duas ou mais técnicas analíticas, normalmente uma cromatográfica e outra espectroscópica ou espectrométrica^{22,42}.

Diante disso, para a obtenção de informações estruturais que levem à identificação dos componentes de extratos brutos, ou seja, solucionar problemas estruturais de produtos naturais complexos, a cromatografia gasosa (CG) e/ou a cromatografia líquida são geralmente acopladas a técnicas espectroscópicas como o ultravioleta, espectrometria de massas (EM ou MS do inglês, *Mass spectrometry*), infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN)⁴³.

A cromatografia é uma técnica de separação baseada na distribuição de um composto entre uma fase móvel e outra estacionária. A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica analítica amplamente utilizada, especialmente para a separação de compostos voláteis, apesar de compostos hidroxilados possam ser analisados através do processo de derivatização com o intuito de aumentar sua volatilidade. Seu acoplamento à espectrometria de massas (CG-EM) fornece informações que auxiliam na identificação estrutural de cada componente, oferecendo mais informações estruturais. Yusoff e colaboradores (2017) analisaram alguns constituintes voláteis do caule da *E. tirucalli* por essa técnica identificando 46 compostos, dentre eles o majoritário euphol (13,60%)⁴⁴. A CG-EM demonstra ser uma técnica analítica valiosa para análise de componentes não polares e produtos naturais voláteis ou volatilizáveis, como por exemplo, mono, sesqui e triterpenos^{42,43}.

O acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas (CL-EM) é uma ferramenta analítica com poder de resolução cromatográfica, alta seletividade, sensibilidade de detecção e capacidade de identificação de compostos não voláteis ou instáveis termicamente, para os quais a cromatografia gasosa não pode ser utilizada, obtendo um campo de aplicação extremamente vasto^{42,45}. O avanço dessa técnica possibilitou a metodologia de desreplicação, que se baseia no estudo de um extrato bruto sem a necessidade do isolamento das substâncias. Esse método foi utilizado em estudos de Nothias-Scaglia e colaboradores (2015) com base na CL-EM² identificando três diterpenóides de extratos de plantas do gênero *Euphorbia* com atividade anti-Chikungunya⁴⁶.

As técnicas de separação são comumente acopladas ao espectrômetro de

massas para análise de uma mistura complexa. A espectrometria de massas (EM) se baseia na ionização das moléculas de interesse e separação dos íons com base em suas diferentes razões massa/carga a fim de se obter informações da massa molar e de características estruturais de substâncias presentes na amostra. É considerada uma das técnicas mais sensíveis de análise molecular, com capacidade de determinar o peso molecular e obter informações estruturais do analito, como o número de insaturações e anéis. Devido ao seu alto poder de separação de massas, ótimas seletividades podem ser obtidas. Ganha destaque também por seu baixo limite de detecção, velocidade de análise, diversidade de aplicação a partir de várias fontes de ionização e analisadores de massas, e entre outras potencialidades ⁴⁷.

As fontes de ionização determinam a versatilidade da técnica de espectrometria de massas, pois são responsáveis pelos tipos de analitos que podem ser analisados. Métodos como a ESI (Ionização por “Electrospray”) e a APCI (Ionização Química à Pressão Atmosférica) são fontes de ionização comumente utilizadas para análises de produtos naturais. A ESI é utilizada para ionização de moléculas de baixo e alto peso molecular, alta polaridade e complexidade estrutural. Seu princípio básico se baseia na nebulização da solução em gotículas carregadas (protonadas ou desprotonadas) produzidas pelo campo elétrico (2-5 kV), liberando os íons a partir das gotículas formadas e transportados da região da pressão atmosférica da fonte de ionização para região de alto vácuo do analisador de massas ^{48,49}. Os íons podem ser observados como adutos, como por exemplo, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ e $[M+Cl]^-$ ⁴⁸.

Já a APCI é uma técnica utilizada para ionização de compostos polares como para compostos de baixa polaridade, com massa molecular de até 1500 Da. Se trata de um método semelhante à ionização química, utilizando reações do tipo íon-molécula em fase gasosa, sob pressão atmosférica, produzindo íons monocarregados ($[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$ ou radicalares (M^{*+}) através de uma descarga corona ⁴⁸. Hidrocarbonetos e triterpenos neutros (que possuem apenas um grupo hidroxila em sua estrutura) são facilmente ionizados pela APCI ^{42,50}.

Outra técnica espectroscópica empregada para resolver problemas estruturais é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). É uma técnica que fornece informações sobre o número de núcleos atômicos com propriedades magnéticas e momento angular de *spin*, ou seja, que tenha massa ímpar ou número atômico ímpar ou ambos. Vários núcleos podem ser estudados, porém os mais disponíveis são o ¹H e

¹³C. O RMN bidimensional também facilita na caracterização estrutural, fornecendo informações detalhadas como a disposição dos grupos, a estereoquímica, etc. Porém, apesar do alto potencial da técnica, apresenta uma baixa sensibilidade devido à baixa abundância de núcleo que tenha a propriedade de *spin* natural, com exceção do hidrogênio ⁴⁹.

1.4. Uso na medicina popular e atividade biológica

As atividades terapêuticas da planta e o grande uso por comunidades tradicionais estão relacionados a uma grande variedade de substâncias químicas encontradas no látex da *E. tirucalli*. Conforme descrito na literatura, o látex tem sido utilizado pela medicina popular em casos de gonorréia, sífilis, verrugas, tumores e para a cura do câncer. Além disso, esse líquido esbranquiçado é indicado para asma, tosse, neuralgia, reumatismo, impotência sexual, hemorroidas, analgésico, cicatrizante e verrugas. O cozimento dos ramos e raízes é administrado para cólicas e dor no estômago. Na África, os caules são cozidos para compressa em locais doloridos (DUKE, 1983; PRABHA *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2014).

Pesquisas recentes descrevem sobre o uso frequente do látex da aveloz como recurso fitoterapêutico por comunidades. Neto, Barros e Silva (2015), em estudos do uso de plantas medicinais em comunidades rurais no estado do Piauí, Nordeste do Brasil, citam o uso do suco dos ramos da aveloz com ação anticancerígena. Ribeiro e colaboradores (2017) identificaram a *Euphorbia tirucalli* como sendo uma das plantas utilizada pela população ribeirinha em uma microrregião do estado de Mato Grosso para o tratamento de infecção em geral e para o câncer.

Embora ainda não existam ensaios clínicos, estudos farmacológicos recentes mostram um potencial anticancerígeno da Aveloz. Llanes-Coronel e colaboradores (2011) avaliaram extratos de plantas da família Euphorbiaceae com atividade em linfócitos humanos e, em especial, a *Euphorbia tirucalli* induziu fortemente a proliferação e a apoptose de células tumorais, apresentando baixa citotoxicidade em culturas de linfócitos humanos (CC₅₀ = 548,8 µg/mL). Lin e colaboradores (2012) mostraram que o euphol isolado da *E. tirucalli* inibiu seletivamente o crescimento de células cancerosas gástricas humanas através da indução de apoptose mediada por ERK1/2. Franco-Sala e colaboradores (2016) avaliaram a influência do látex da *E. tirucalli*, numa concentração de 25µL/mL, no carcinoma espinocelular da laringe resultando num crescimento celular reduzido e indicando o envolvimento do látex na

expressão alterada de genes envolvidos em processos cancerígenos, sugerindo potencialmente sua aplicação como indicador terapêutico de câncer de laringe.

Devido aos resultados promissores obtidos nessas pesquisas, tornou-se ainda mais evidente a importância da caracterização de metabólitos secundários para obtenção de produtos com maior potencial medicinal, que possam ser submetidos a bioensaios para avaliação de atividades biológicas. Essas análises geralmente são acessíveis, fáceis, reprodutíveis e de rápida execução, com possibilidade de testar muitas amostras de diferentes concentrações (HOSTETTMANN *et al.*, 1997; ILBEKWE e AMEH, 2015).

Testes biológicos como a viabilidade de macrófagos e a avaliação da produção de óxido nítrico (NO) bem como outras citocinas, associados a ensaios anticancerígenos, são importantes para relacionar os constituintes do extrato bruto da planta com atividades anticancerígena seletiva e imunomodulatória. Os macrófagos são células normais de defesa imunológica, que sintetizam o NO e outras citocinas como TNF- α e IL-6. O óxido nítrico, em altas concentrações, entretanto, leva à formação de radicais livres que propiciam a formação de mutações em células normais, e conseqüentemente, ao desenvolvimento de um câncer. Dessa forma, a inibição da produção excessiva de NO e de outras citocinas pró-inflamatórias, por uma substância isolada ou extrato vegetal pode indicar que tais agentes possuem promissora atividade imunomoduladora (WILKINS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar quimicamente o látex da *Euphorbia tirucalli* L. através de métodos analíticos (CG-EM, FT-ICR MS (ESI(-) e APCI(+)) e RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC) e biologicamente por ensaios citotóxicos e imunomodulatórios.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter um extrato bruto do látex de *E. tirucalli* L.
- Obter frações do látex aquoso por extração líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades;
- Derivatizar quimicamente as frações obtidas pela extração líquido/líquido;
- Fracionar o extrato bruto do látex por Cromatografia em Coluna de sílica-gel;
- Caracterizar o perfil químico de cada extração por diferentes técnicas analíticas (CG-EM, FT-ICR MS (ESI(-) e APCI(+)), RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC);
- Submeter o extrato bruto a ensaios citotóxicos e imunomodulatórios.

3. METODOLOGIA

3.1. Identificação e coleta do látex

O látex da *Euphorbia tirucalli* L. foi coletado no Instituto de Produtos Naturais (IPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em maio de 2017, pela Prof^a. Dr^a. Naomi Kato Simas e identificado pela Prof^a. Lucy de Senna Valle (RFA-31675).

3.2. Preparação da amostra

3.2.1. Procedimento 1

Após a incisão das hastes da planta, o látex foi coletado gota a gota, cerca de 20 mL, entre 8 e 9 horas da manhã, e diluído diretamente em 100 mL de água destilada. A partição do látex aquoso foi feita três vezes com hexano e diclorometano, sequencialmente, com 100 mL de cada solvente. As frações foram reunidas (300 mL de cada), concentradas pelo rotaevaporador e pesadas (67,7 e 88,0 mg, respectivamente). Uma concentração de 1 mg/mL da fração hexânica foi solubilizada em tolueno para análise pela APCI(+) FT-ICR MS e 1 mg de cada partição foi solubilizada em acetonitrila:água (1:1) para análise em ESI(-) FT-ICR MS.

3.2.2. Procedimento 2

Após a incisão das hastes da planta, o látex foi coletado gota a gota, cerca de 20 mL, entre 8 e 9 horas da manhã, e diluído diretamente em uma solução de diclorometano:metanol (3:1, 100 mL). A solução foi agitada durante 2 minutos, filtrada em algodão e concentrada num rotaevaporador até a secura (67,26 mg). Cerca de 40 mg do extrato bruto foram solubilizados em CDCl_3 para análise em RMN e 1 mg foi solubilizado em acetonitrila:água (1:1) para análise em ESI(-) FT-ICR MS.

3.3. Fracionamento do látex de *E. tirucalli* por Cromatografia em Coluna em sílica-gel

Uma nova amostra do látex em diclorometano:metanol (3:1, 100 mL) foi coletado e concentrado como descrito no Procedimento 2. Cerca de 411,5 mg do

extrato bruto foi submetido a Cromatografia em Coluna de sílica-gel (30 cm, 9,7 g; 230-400 Mesh) e eluído com misturas de hexano e diclorometano, de acordo com o gradiente de concentração estabelecido: 1° com 100% *n*-hexano, 2° (*n*-hex:CH₂Cl₂/9:1), 3° (*n*-hex:CH₂Cl₂/8:2), 4° (*n*-hex:CH₂Cl₂/7:3), 5° (*n*-hex:CH₂Cl₂/6:4), 6° (*n*-hex:CH₂Cl₂/5:5), 7° (*n*-hex:CH₂Cl₂/4:6), 8° (*n*-hex:CH₂Cl₂/3:7), 9° (*n*-hex:CH₂Cl₂/2:8), 10° (*n*-hex:CH₂Cl₂/1:9), 11° com 100% CH₂Cl₂ e finalmente, para a 12°, 100 mL de metanol foram adicionados para remover os compostos mais polares aderidos a sílica-gel. Todas as frações foram concentradas pelo rotaevaporador (1,5 mg, 1,3 mg, 2,5 mg, 6,5 mg, 2,4 mg, 182,9 mg, 91,6 mg, 14,8mg, 2,1 mg, 2,6 mg, 3,4 mg and 52,4, respectivamente), solubilizados em diclorometano (5000 ppm) e injetado em CG-EM, exceto a 12° fração. Esta foi injetada em ESI(-) (1 mg/mL).

3.4. Derivatização dos ácidos graxos

O processo de derivatização foi feito através de reações de saponificação e metilação⁵¹. A reação de saponificação foi realizada com as amostras obtidas pelo Procedimento 1. Cada amostra (0,8 g) foi solubilizada em 10 mL de 0,5 M de KOH. A solução foi submetida a refluxo durante 10 minutos, agitada ocasionalmente. Depois disso, foi esfriada e adicionou-se 5 mL de BF₃. A mistura foi refluxada durante mais 10 minutos. A solução foi novamente esfriada e transferida para um funil de separação, onde foram adicionados 10 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio juntamente com 20 mL de hexano sob agitação. Após remoção da partição de hexano, foi filtrada sobre algodão e concentrada para análise GC-MS.

3.5. Condições de análise

3.5.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

A análise foi realizada usando um detector Agilent 7890B (Agilent, Califórnia, EUA) e Agilent 5977A MSD Mass. Uma coluna capilar HP-5MS (30m x 250µm x 0,25µm) foi utilizada. O sistema CG foi usado no modo dividido (split 1:10). O hélio foi usado como gás de arraste. A vazão foi ajustada para o modo constante (1mL/min). As condições de temperatura da coluna para identificação dos ácidos graxos e triterpenos foram as seguintes: temperatura inicial de 80°C aumentada para 210°C a 15°C/min, mantida por 10 minutos, e aumentada para 245°C a 2°C/min por 19

minutos e finalmente para 310°C a 10°C/min por 22 minutos. Um segundo método foi utilizado para identificação específica dos triterpenos com as seguintes condições: temperatura inicial de 180°C por 1 minuto, seguido de um aumento para 310°C a 5°C/minuto por 20 minutos. A detecção do MS prosseguiu no modo de impacto de elétrons, utilizando uma energia de ionização de 70 eV. A faixa de varredura m/z foi de 50 a 500 unidades de massa atômica. Os picos e o índice de retenção foram identificados usando o banco de dados NIST.

3.5.2. Espectrometria de massas de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier (ESI(-), ESI(-) MS/MS e APCI(+)) FT-ICR MS

A análise foi realizada num espectrômetro de massas, modelo 9.4 T Solarix (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A amostra (1mg/mL), solubilizada em acetone:água (1:1), foi infundida na fonte Electrospray (ESI) a uma taxa de 5 μ L/min e operada no modo negativo ou foi solubilizada em tolueno e infundida na fonte de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e operada em modo positivo para ionização de moléculas na faixa de massas entre m/z 150-1500. As condições da fonte de ESI foram as seguintes: **i)** pressão de gás nebulizador de 0,5-1,0 bar; **ii)** voltagem capilar de 3,0–3,5 kV; **iii)** temperatura do capilar de 250°C. Os espectros ESI(-) MS/MS foram adquiridos utilizando **(i)** taxa de fluxo de infusão: 5 μ L/min; **(ii)** voltagem capilar: 3,0 kV; **(iii)** temperatura de nebulização: 250°C; **(iv)** argônio com gás de colisão; **(v)** tempo de acumulação iônica: 1s; **(vi)** janela de isolamento: 1,0 (unidades m/z); e **(vii)** energia de colisão: 25-45%. Os parâmetros para a APCI são: **i)** voltagem capilar de 2100 V; **ii)** *end plate offset* = -500 V; **iii)** temperatura e fluxo do gás secagem: 180°C e 4,0L/min; **iv)** pressão e temperatura do gás nebulizador: 1,0 bar e 350°C; **v)** *skimmer*: 25,0 V; **vi)** collision voltage: -2,0 V; **vii)** descarga corona: 4000 nA; **viii)** TOF: 0,750 s. O grau de insaturação para cada molécula foi determinado a partir do seu valor de DBE (Double Bond Equivalent) da equação $DBE=C - H/2 + N/2 + 1$, onde C,H e N são os números de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio. As análises de MS/MS foram realizadas num analisador quadrupolo acoplado ao espectrômetro de massas FT-ICR MS. Os espectros de massa foram adquiridos e processados utilizando o pacote de software Compass Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.5.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises RMN (RMN ^1H , RMN ^{13}C e COSY) foram realizadas em espectrômetro Varian 400MHz, com sonda 5 mm ATB broadband, a partir de 40 mg do látex dissolvido em CDCl_3 e TMS como padrão interno. Os deslocamentos químicos foram indicados em ppm, em relação ao TMS.

3.6. Linhagem celular

Os macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) e as células de adenocarcinoma gástrico humano AGS (ATCC® CRL-1739) foram fornecidos pelo banco de células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram mantidas em garrafas com Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro bovino fetal a 10% (v/v) e incubadas durante diferentes períodos a 37°C e 5% de CO_2 até atingir a confluência de aproximadamente 70-90%. Depois de obter a confluência desejada, as células foram dissociadas utilizando um raspador de células (RAW 264.7) ou tripsinizadas (AGS) e contadas numa câmara de Neubauer para obter valores de concentração de células.

3.7. Avaliação da citotoxicidade em macrófagos (RAW 264.7) e linhagem de adenocarcinoma gástrico (AGS)

Alíquotas (0,2 mL) de meio contendo macrófagos murinos de células RAW 264.7 e AGS foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços a 5×10^5 células/mL e 6×10^4 células/mL, respectivamente, e incubadas a 37°C sob 5% de CO_2 por 2 horas (RAW) ou 24 horas (AGS). Após este período, o meio foi removido e as células foram tratadas com várias concentrações de *E. tirucalli* (3,125 - 200 $\mu\text{g/mL}$) em meio DMEM e incubadas por 24 horas e 48 horas, para as células RAW 264,7 e AGS, respectivamente, sob mesmas condições. Depois, o meio foi removido e as placas foram preparadas para o ensaio de MTT-tetrazólio⁵². Após uma breve agitação, a densidade óptica de cada poço foi medida usando um filtro de 540 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm. Análise de regressão linear com limite de confiança de 95% foi usada para definir a curva dose-resposta e para calcular a concentração necessária para reduzir a absorvância do sistema em 50% (IC_{50}), o chamado ponto médio citotóxico. A cisplatina foi utilizada como agente citotóxico de referência. As concentrações do extrato bruto que manteve a

viabilidade dos macrófagos acima de 90% foram utilizadas posteriormente em testes de citocinas e produção de NO.

3.8. Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi expresso entre células neoplásicas e não neoplásicas e foi determinado pela razão dos valores de IC₅₀ obtidos dessas linhagens. Um valor significativo de SI maior ou igual a 2,0 demonstra seletividade para células neoplásicas (BADISA *et al.*, 2009).

3.9. Avaliação da atividade imunomoduladora através da produção de citocinas TNF- α e IL-6 e de óxido nítrico (NO)

Para o teste de citocinas e inibição do NO, foram utilizadas as concentrações de extrato bruto que mantiveram a viabilidade dos macrófagos acima de 90%, as quais foram determinadas previamente através do ensaio de viabilidade por MTT-tetrazólio. Assim, para as citocinas e ensaio de NO, as células foram semeadas em placas de 24 poços com meio DMEM completo a concentrações aproximadas de 2×10^6 células viáveis / mL para os ensaios de IL-6 e NO e 2×10^5 células/mL para o ensaio de TNF- α . Após 2 horas de incubação (37°C e 5% CO₂) para a adesão celular, o sobrenadante foi removido e as células incubadas foram removidas e as células incubadas no meio com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) (1 μ g/mL) mais diferentes concentrações de *E. tirucalli* (3,125 - 200 μ g/mL). As placas foram incubadas durante a noite (37°C/5% CO₂). Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados a 2500 rpm (4°C) e utilizados para detecção e quantificação das citocinas (TNF- α e IL-6) pelo método imunoenzimático (eBioscience, San Diego, CA, EUA) e NO pelo método Griess. Para os ensaios de citocinas, os dados foram apresentados em concentrações de citocinas (pg / mL) usando uma curva padrão com citocina purificada e os dados de NO foram apresentados em concentrações de NO₂⁻ (μ M) usando uma curva padrão com NaNO₂⁵². Adicionalmente, avaliações de citotoxicidade foram realizadas após todos os ensaios através do método MTT.

3.10. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média dos ensaios realizados com seus respectivos desvio padrão. A interpretação dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias com teste post-hoc de Bonferroni, onde o nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$.

A curva dose-efeito (concentração x absorvância) para determinação do IC_{50} e CE_{50} , concentração que reduz em 50% a absorvância espectrofotométrica, foi obtida a partir da análise de regressão linear e não linear. Para realização de análise de dados, foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism 5* (versão 5,01 CA, USA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil químico do látex após derivatização

A avaliação do extrato por CG-EM após a reação de derivatização foi realizada para acessar o perfil dos ácidos graxos do látex da *E. tirucalli*. Após a reação da fração hexânica (Figura 6) e diclorometânica (Figura 7), a análise por CG-EM mostrou a presença de sinais com tempos de retenção de 38,8 e 39,4 minutos para os triterpenos euphol **(1)** e tirucallol **(2)**, respectivamente, e sinais menos intensos a 10,7 12,9, 15,6, 15,7 e 16,1 minutos para os ésteres dos ácidos graxos mirístico **(3)**, palmítico **(4)**, linoleico **(5)**, oleico **(6)** e esteárico **(7)**, respectivamente.

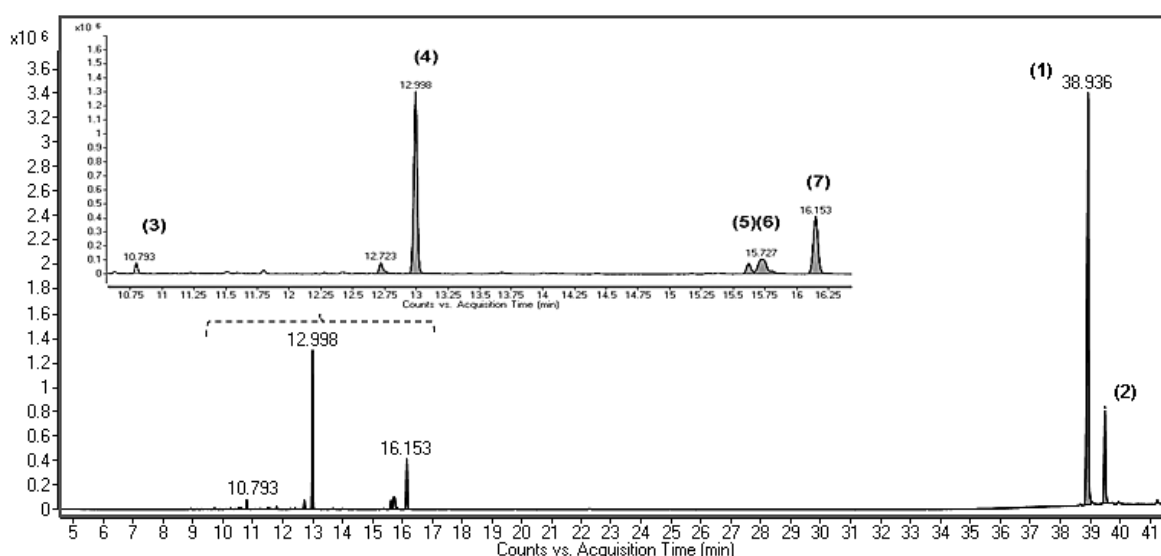


Figura 6: Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica derivatizada do látex da *E. tirucalli*

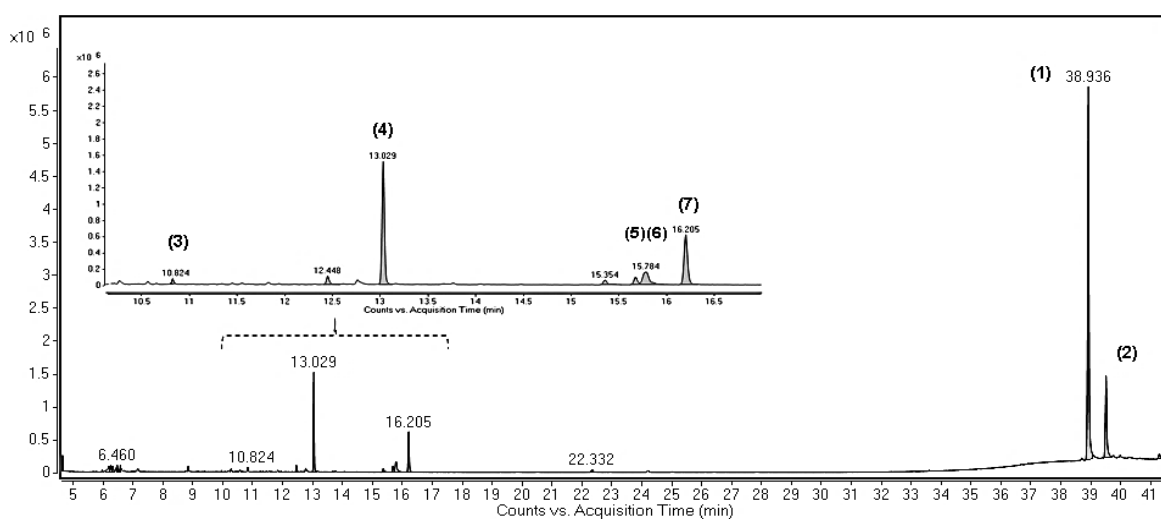


Figura 7: Cromatograma obtido por CG-EM da fração diclorometânica derivatizada do látex de *E. tirucalli*

Esses compostos já foram identificados na *E. tirucalli*, com exceção do ácido oleico. Os ácidos graxos, palmítico e linoleico, foram identificados na fração hexânica do caule da *E. tirucalli* por Yamamoto, Mizuguchi e Yamada (1981) como ésteres metílicos por CG-EM⁵³. Yusoff e colaboradores (2017) observaram os ácidos graxos do caule da aveloz pela técnica de CG-EM, com tempos de retenção, em minutos, de 11,8, 12,7, 13,4 e 13,46 para os ácidos mirístico, palmítico, linoleico e esteárico, respectivamente⁴⁴. É importante notar que são poucos trabalhos que verificam esses compostos no látex desta planta. Fürstenberger e Hecker (1986), por exemplo, indicou a presença de ácidos graxos como grupos acilas ligados a diterpenos, ou seja, dos ésteres diterpênicos, de forma geral, descrevendo-os como ácidos graxos saturados e insaturados²¹.

Em relação à região triterpênica do cromatograma, onde há a presença dos picos (1) e (2), o mesmo comportamento foi observado por Lin e colaboradores (2000) em estudos com a raiz da *Euphorbia kansui* Liou, por GC-MS, identificando o euphol e tirucallol, onde o euphol foi o pico majoritário, assim como na *E. tirucalli*⁵⁴⁻⁵⁶. No entanto, sem o preparo da amostra, apenas o euphol e o tirucallol foram identificados por essa técnica, quando comparados às amostras derivatizadas (Figura 8). Dessa forma, esses dados podem indicar que, grande parte da existência desses compostos estão associados à diterpenos, em forma de ésteres.

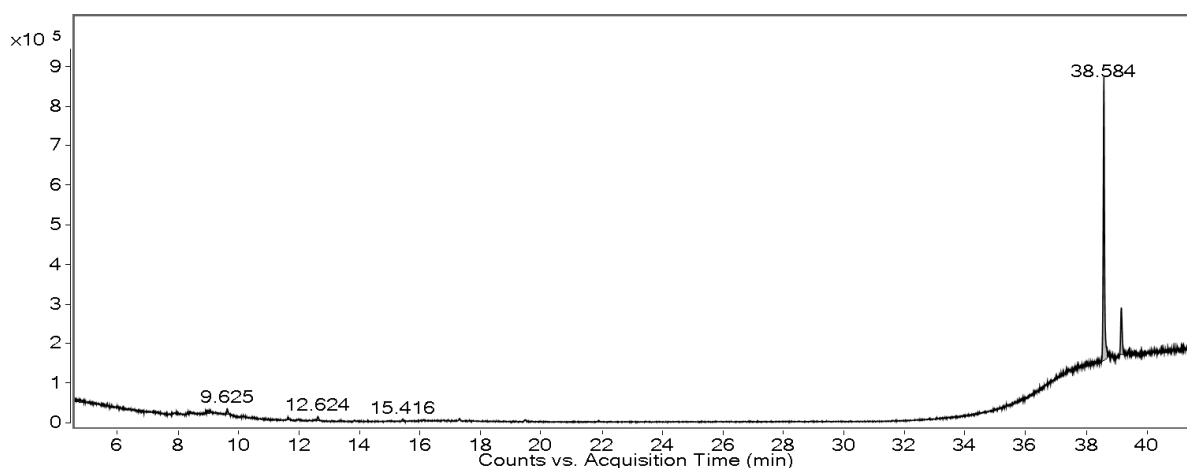


Figura 8: Cromatograma de CG-EM do extrato bruto do látex sem a reação de derivatização.

4.2. Perfil químico do extrato bruto do látex

O espectro de RMN ^1H do látex bruto de *E. tirucalli* (Anexo, Figura 1A, p.66) forneceu vários sinais, a maioria deles na região de 0 a 2 ppm, característico de compostos triterpenoídicos ⁵⁷. Nesta região, 8 singletos com δ_{H} 0,73, 0,78, 0,82, 0,85, 0,93, 0,98, 1,58 e 1,66 ppm apareceram indicando grupos metilas (Figura 2A, p.67). Em δ_{H} 3,2 e 5,07 ppm estão presentes um sinal de duplo duplete e um sinal de multiplete (Figura 3A, p.68), que foram atribuídos a H-3 (hidrogênio axial num carbono contendo oxigênio) e H-24, um hidrogênio olefínico, respectivamente (Figura 9).

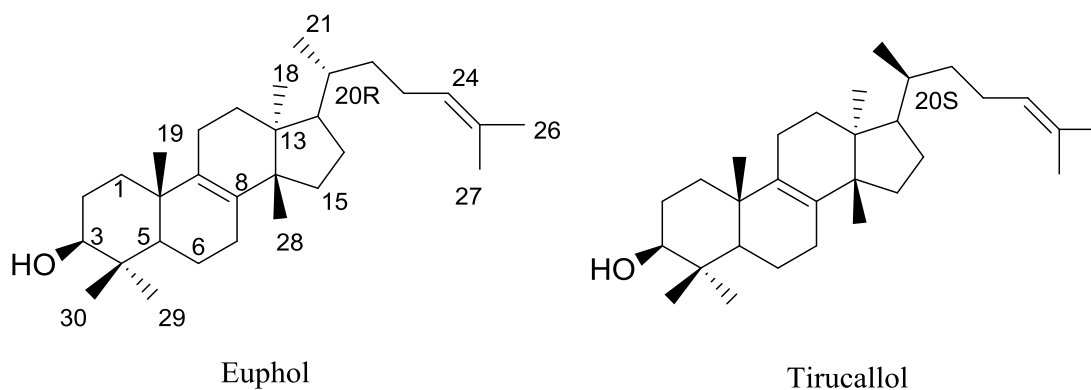


Figura 9: Triterpenos previamente identificados em *Euphorbia tirucalli* L.

Estes dez sinais, juntamente com vários outros aglomerados na região entre 0 e 2 ppm estão correlacionados aos triterpenos euphol e tirucalol, compostos conhecidos em *E. tirucalli* (SPINO *et al.*, 1995; NYIGO *et al.*, 2016). A presença destes dois triterpenos estereoisoméricos em mistura pode ser notada pelo multiplete entre 5,07 e 5,10 ppm (Figura 4A, p. 69) para o H-24. Como este hidrogênio está próximo ao centro estereogênico (C-20), uma pequena diferença em deslocamento químico será notada para ambas as estruturas. De fato, para o composto puro, o sinal para H-24 terá multiplicidade tripla (Tabela 2). Para a mistura dos dois, um sinal múltiplo será encontrado em virtude da sobreposição dos dois sinais triplos próximos. Digno de nota é também a presença de um único sinal a δ_{H} 1,23 ppm representando grupos metilenos magneticamente equivalentes de ácidos graxos (KNOTHE e KENAR, 2004). Espectro de RMN ^{13}C (Figura 5A, p.70) da mesma amostra apresentou 30 picos principais permitindo observar na região de maior frequência de absorção sinais correspondentes ao C24 e C25, em 125,33 e

130,98 ppm, respectivamente, e sinais em 134,11 e 133,64 ppm atribuídos aos carbonos quaternários C8 e C9, respectivamente ^{58,59}.

Os dados de RMN de ¹H encontrados na literatura do euphol e tirucallol foram comparados com o espectro de ¹H RMN do extrato bruto do látex (Tabela 2). Os deslocamentos químicos concordaram bem com os valores experimentais, mostrando pouca diferença entre eles, bem como os valores da literatura de ¹³C RMN. Esses dados mostram que numa mistura de dois triterpenos estereoisoméricos, seus deslocamentos químicos são muito semelhantes, destacando-se as diferenças, entretanto, nas imediações do centro estereogênico, como comentado acima para o H-24. Ou seja, na sobreposição de dois tripletos, um sinal multipletto sinalizou a presença destes dois isômeros ópticos.

Por ¹H-¹H COSY (*Figura 6A, p.71*) foi possível correlacionar os prótons H-24 aos hidrogênios metílicos em δ_H 1,65 ppm, referentes ao H-26 através de um acoplamento alílico. Este fato é interessante, pois mostra a dependência do ângulo diedro entre os dois sinais acoplantes para o valor do acoplamento. Embora o sinal metílico em δ_H 1,58 ppm seja também alílico em relação a H-24, tal correlação não apareceu no espectro COSY. Outra correlação importante foi aquela entre H-24 e H-23 (δ_H 2,04 ppm), referente a um acoplamento geminal e responsável pelo sinal triplo de H-24 para o euphol e tirucallol. Tal sinal em 2,04 ppm correlaciona com o carbono C-23 em δ_C 24,87 ppm no espectro HSQC.

O espectro HMBC (*Figura 7A, p.72*) mostrou correlações ³J de hidrogênio metínico H-24 com dois carbonos metílicos C-26 e C-27 a 17,82 e 25,89 ppm e com C-23 (24,87 ppm). O H-3 (1H, dd) exibiu correlações com os carbonos C-29 (28,29 ppm) e C-30 (15,74 ppm). Os prótons metílicos H-26 e H-27 estão correlacionados com os carbonos vinílicos C-24 e C-25 (125,17 e 130,8 ppm, respectivamente). O próton metílico H-28 mostrou correlações ³J com os carbonos C-13 (44,20 ppm), C-15 (31,01 ppm) e C-9 (133,64 ppm). Esses dados estão de acordo com a literatura, embora poucas são as informações de RMN 2D para essas moléculas ⁶⁰. Por HSQC foi possível correlacionar o próton H-3 e H-24 aos carbonos C-3 (79,11 ppm) e C-24 (125,33 ppm), respectivamente (*Figura 8A, p.73*).

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do extrato bruto e da literatura

Posição do Carbono	Experimental [†]		Dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura			
			Euphol ^{58*}		Tirucalol ^{30*}	
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
1	1,55 (m) e 1,15 (m)	35,37		35,49		35,23
2	1,66 (m) e 1,89 (m)	27,80		27,9		27,65
3	3,2 (dd)	79,11	3,21 (dd)	79,2	3,22 (dd)	78,99
4		37,38		37,5		38,93
5	1,08 (dl)	51,07		51,2		50,93
6	1,38 (m) e 1,62 (m)	19,06		19,17		18,93
7	1,65 (m) e 1,89 (m)	28,04		28,16		27,92
8		134,11		134,3		133,52
9		133,64		133,8		134,04
10		39,05		39,2		37,25
11		21,66		21,7		21,45
12		28,18		28,3		28,04
13		44,2		44,4		44,08
14		50,14		50,3		49,93
15	1,70 (m) e 1,57 (m)	31,01		31,1		30,76
16	1,18 (m) e 1,49 (m)	29,88		29,9		29,81
17	1,48 (m)	49,73		49,9		49,09
18	0,78 (s)	15,67	0,78 (s)	15,74	0,78 (s)	15,42
19	0,93 (s)	20,27	0,93 (s)	20,36	0,93 (s)	20,13
20	1,45 (m)	36,01		36,07		35,91
21	0,82 (d)	19,06	0,83(d)	19,12	0,84(d)	18,67
22	2,26 (m) e 1,74 (m)	35,12		35,66		37,25
23	2,04 (m) e 1,82 (m)	24,87		24,74		24,92
24	5,07 (m)	125,33	5,08 (t)	125,43	5,08 (t)	125,24
25		130,98		131,03		130,91
26	1,66 (s)	17,82	1,66 (s)	17,88	1,66 (s)	17,62
27	1,58 (s)	25,89	1,58 (s)	25,93	1,58 (s)	25,71
28	0,85 (s)	24,60	0,85 (s)	24,68	0,89 (s)	24,36
29	0,98 (s)	28,29	0,98 (s)	28,27	0,98 (s)	27,92
30	0,73 (s)	15,74	0,73 (s)	15,85	0,73 (s)	15,51

* Para as análises, os autores utilizaram o CDCl_3 como solvente.

[†]As atribuições do δ de ^1H e ^{13}C foram feitas com auxílio dos espectros RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY e HSQC. O solvente utilizado para as experimentações foi o CDCl_3 .

Os deslocamentos químicos característicos dos sinais de ^1H de diterpenos de núcleo tigliano (Figura 10), H-1 e H-7, de 7,63 ppm e 5,45 ppm, respectivamente, e de ^{13}C , dos carbonos C-1, C-2, C-3, C-6, C-7, de 160,6 ppm, 132,9 ppm, 209,2 ppm, 140,4 ppm e 130,4 ppm, respectivamente, foram investigados, mas estavam completamente ausentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C ^{27,61}. Os sinais relacionados ao diterpeno de núcleo ingenano também estavam ausente nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , como mostra na Figura 10.

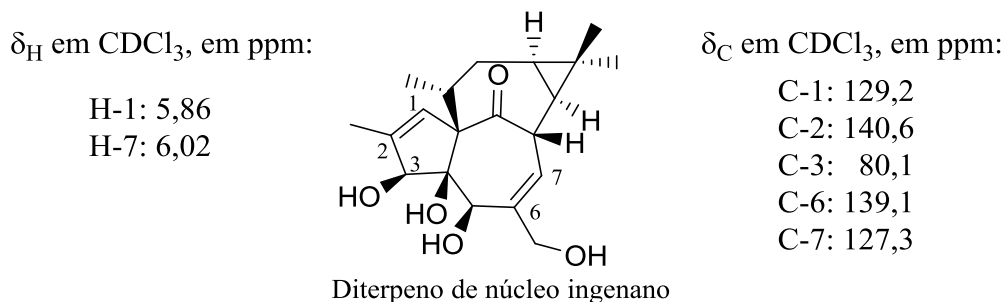
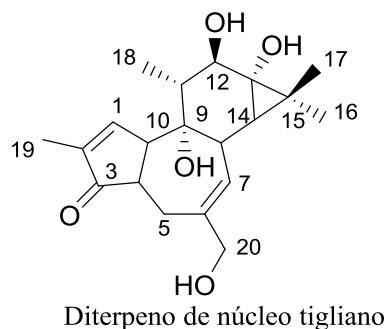


Figura 10: Diterpenos encontrados em látex de *E. tirucalli* e os respectivos valores de 1H e ^{13}C RMN do ingenol

As análises por ESI(-) FT-ICR MS do extrato bruto do látex de *E. tirucalli* mostram três classes de compostos naturais: ácidos graxos, diterpenos e triterpenos (Figura 9A, p.74). Para os compostos ou classes de produtos naturais identificados foram listados na Tabela 3-4: íons pseudomoleculares como $[M-H]^-$, intensidade de sinal, fórmula molecular exata com erros muito baixos, número de insaturações (DBE) e fragmentos MS/MS quando disponíveis. Os ácidos graxos livres detectados no látex bruto estão presentes na Tabela 3. Alguns desses ácidos graxos ainda não foram previamente descrito na literatura para o látex da *E. tirucalli*. Entre eles, o sinal m/z 255 para o ácido palmítico foi o mais intenso.

Por CG-EM, apenas cinco ácidos graxos, como ésteres metílicos, foram detectados. Quando o látex foi analisado por ESI(-) FT-ICR MS, esse número subiu para dez. A análise por FT-ICR MS fornece um melhor limite de detecção quando comparado ao CG-EM (Marshal *et al.*, 1998).

Tabela 3: Estruturas propostas para ácidos graxos ionizados como íons $[M-H]^-$

$[M-H]^-$	Intensidade do sinal (%)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	DBE	Classe ou Proposta de Substância
227,20166	9,6	C ₁₄ H ₂₇ O ₂	- 0,04	1,0	Ácido mirístico
241,21733	7,5	C ₁₅ H ₂₉ O ₂	- 0,11	1,0	Ácido pentadecanoico ou isômero
253,21733	10,3	C ₁₆ H ₂₉ O ₂	- 0,09	2,0	Ácido palmitoleico
255,23297	52,4	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	- 0,06	1,0	Ácido palmítico
267,23296	2,0	C ₁₇ H ₃₁ O ₂	- 0,03	2,0	Ácido heptadecenoico
269,2486	4,4	C ₁₇ H ₃₃ O ₂	0,02	1,0	Ácido heptadecanoico ou isômero
279,23296	3,5	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	0,01	3,0	Ácido linolenico
281,24861	12,2	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	- 0,04	2,0	Ácido oléico
283,26426	26,2	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	- 0,03	1,0	Ácido esteárico
297,24342	0,9	C ₁₈ H ₃₃ O ₃	0,33	2,0	Ácido ricinoleico ou isômero

Muitos triterpenóides contendo dois e três oxigênios foram detectados no látex por ESI(-) FT-ICR MS. Eles ainda não foram descritos para *E. tirucalli*, mas alguns deles são conhecidos de *Euphorbia kansui* como Kansuinona, Kansenona, epikansenona, kansenonol e outros isômeros deles (Tabela 4)^{62,63}. Triterpenos sem oxigênio ou com um oxigênio na fórmula molecular, como euphol, tirucalol, lupeol (C₃₀H₅₀O, 426,38567) e dehidroesqualeno (C₃₀H₄₈, 409,38295), identificados por GC-MS, foram detectados por FT-ICR MS, no entanto, apenas quando o método de ionização foi alterado para APCI(+) (Figura 10A, p.75). A identificação desses compostos somente por APCI mostra a eficiência desse método em ionizar triterpenos neutros e com polaridades mais baixas, diferente da ESI. Além disso, reações em série favorecem a ionização de compostos cíclicos⁵⁰. Também por APCI(+), os esteróides foram detectados como C₂₉H₄₅ (393,35213), C₂₉H₄₅O (409,34685) e C₂₉H₄₇O (411,36249) referindo-se a íons $[M-H]^+$ (Tabela 4)⁶²⁻⁶⁵.

Tabela 4: Estruturas propostas para os triterpenóides ionizados ESI (-) e APCI (+) (C-30) e esteróides (C-29) como íons $[M-H]^-$ e $[M-H]^+$ ou M^{++} .

Classe ou Proposta de Substância	ESI ^a					APCI ^b				
	$[M-H]^-$	Fórmula Molecular	Intensidade do sinal (%)	Erro (ppm)	MS/MS	$[M+H]^+/M^{++}$	Fórmula Molecular	Intensidade do sinal (%)	Erro (ppm)	DBE
Esteróide	-	-	-	-	-	393,35213	C ₂₉ H ₄₅	22,3	-1,42	8,0
Esqualeno	-	-	-	-	-	409,38295	C ₃₀ H ₄₉	62,0	-0,17	7,0
Esteróide	-	-	-	-	-	409,34685	C ₂₉ H ₄₅ O	11,5	-0,88	8,0
Esteróide	-	-	-	-	-	411,36249	C ₂₉ H ₄₆ O	45,7	-0,85	7,0
Triterpeno	-	-	-	-	-	425,37815	C ₃₀ H ₄₉ O	31,8	-0,84	7,0
Euphol, Tirucallol, Lupeol	-	-	-	-	-	426,38567	C ₃₀ H ₅₀ O	100,0	-0,11	6,0
Triterpeno	439,35815	C ₃₀ H ₄₇ O ₂	27,5	0,0	423.3, 201.4	441,37283	C ₃₀ H ₄₉ O ₂	20,7	-0,28	7,0
Triterpeno	453,33748	C ₃₀ H ₄₅ O ₃	13,4	-0,14	423.2, 201.2	455,35208	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	5,8	-0,23	8,0
Triterpeno	455,35309	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	12,3	-0,06	439.3, 201.2	457,36784	C ₃₀ H ₄₉ O ₃	5,0	-0,47	7,0
Triterpeno	457,36876	C ₃₀ H ₄₉ O ₃	12,8	-0,08	456.3, 441.3, 439.3, 429.3	458,37559	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	6,3	-0,31	6,0

^a $[M-H]^-$ refere-se a perda de cátion (H^+)^b $[M-H]^+$ refere-se a perda de ânion hidreto (H^-) M^{++} refere-se a perda de um elétron.

A presença dos ésteres diterpênicos, de núcleo tigliano e ingenano, destaca-se pela intensidade de sinal muito baixa quando caracterizada no látex bruto pelo ESI(-) FT-ICR MS.

4.3. Fracionamento do látex em coluna de sílica-gel para identificação de compostos minoritários

Doze frações foram obtidas da cromatografia em coluna de sílica-gel. A soma de massa obtida das frações eluídas foi de 364,0 mg com uma recuperação estimada de 88,4%. Do material recuperado, essas frações combinadas (6-8) contendo a mistura de triterpenos forneceram 289,3 mg, representando 79,5% das substâncias contidas no material recuperado. Com relação à fração considerada mais polar (12°), que eluiu da coluna com metanol e contendo ésteres diterpênicos, triterpenos e ácidos graxos oxigenados representaram 14,4% das substâncias recuperadas.

Com respeito aos cromatogramas CG-EM obtidos das frações 1-11, foi obtida uma caracterização mais ampla. A fração 1 (*Figura 11A, p.76*) mostrou a presença de *n*-alcanos e, na segunda fração (*Figura 12A, p.77*), o dehidroesqualeno foi o pico principal, além de alguns *n*-alcanos. Os cromatogramas das frações 3 a 5 (*Figura 13A, 14A e 15A, p. 78-80*) mostraram basicamente a presença de *n*-alcanos e de alguns esteróides e cicloartanos, identificados pela biblioteca NIST, porém com índice de similaridade abaixo de 65%. Até a nona fração (*Figura 17A, p.82*) a presença de *n*-alcanos foi notada, além de compostos característicos de triterpenos e esteróides, onde esses também foram evidentes nas frações 10 e 11, porém com baixo índice de similaridade (<68%) (*Figura 18A e 19A, p. 83-84*).

A fração 6 (*Figura 11*) continha euphol/tirucallol na proporção de 89%:11%, que também estavam presentes na fração 7 (71%:11%) (*Figura 12*). Os triterpenos euphol (1) e tirucallol (3), além de outros compostos menores (*Figura 6*), ocorreram da 6° a 8° frações (*Figura 16A, p.81*). Uma nova análise CG-EM com a fração 8 foi realizada para expandir a região dos triterpenos como mostrado na *Figura 13*.

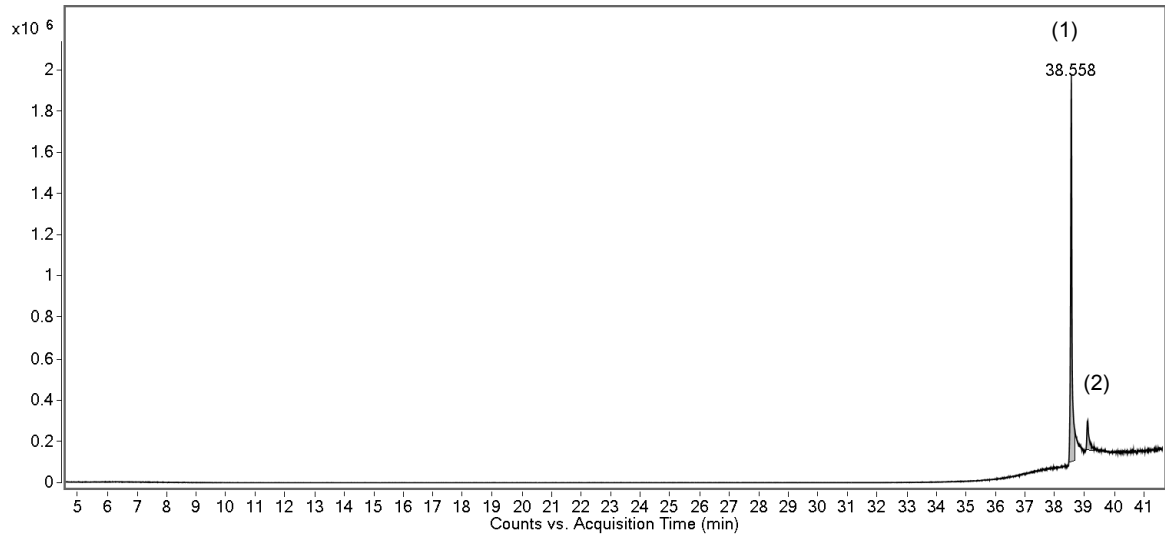


Figura 11: Cromatograma obtido por CG-EM para a 6ª fração da cromatografia em coluna de sílica-gel

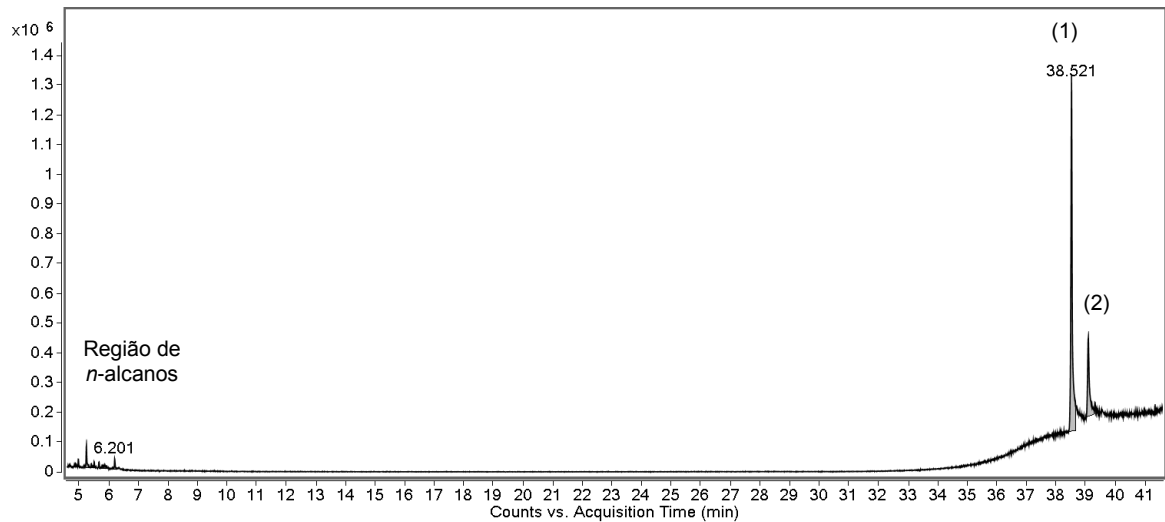


Figura 12: Cromatograma obtido por CG-EM para a 7ª fração da cromatografia em coluna de sílica-gel

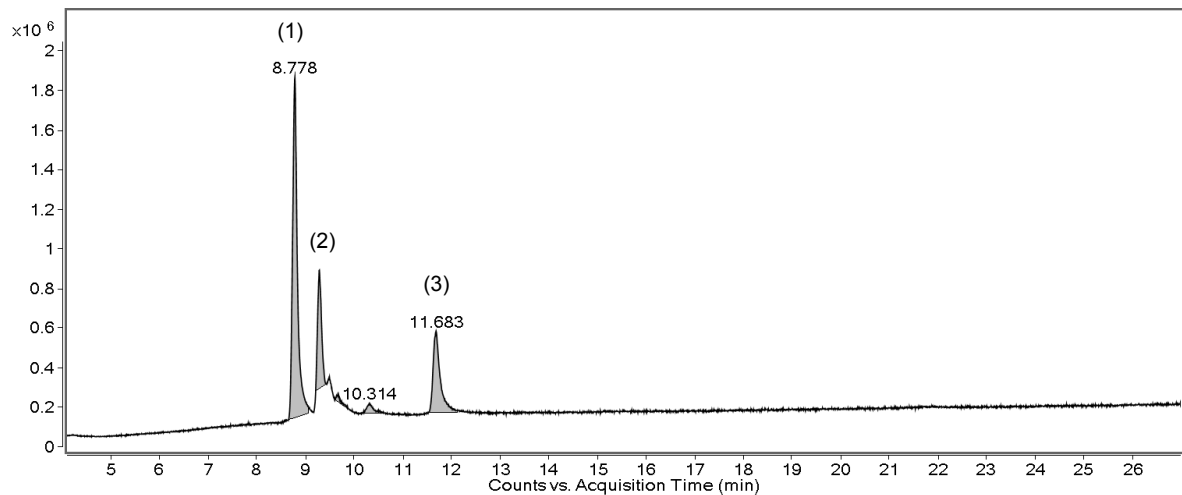


Figura 13: Cromatograma de CG-EM sob novas condições cromatográficas obtidas para a 8ª fração da cromatografia em coluna de sílica-gel

Aos 8,7 e 9,2 minutos (Figura 13) são euphol (1) e tirucallol (2), respectivamente, conforme determinado por comparação entre os seus espectros de massas com os da biblioteca NIST (Índice de similaridade de 82% e 80%, respectivamente). Aos 11,68 minutos, lupeol (3), outro isômero de euphol/tirucallol ($C_{30}H_{50}O$) pôde ser identificado com um índice de similaridade de 81%. Os picos menores entre tirucallol e lupeol não puderam ser identificados pela técnica por apresentar baixo índice de similaridade. Pelo espectro de APCI(+) FT-ICR MS desta fração (Figura 10A, p.75) apresentou um pico principal em m/z 426,38611 (M^+ , $C_{30}H_{50}O$) ou 425,37836 ($[M-H]^+$, $C_{30}H_{49}O$) para euphol, tirucallol e lupeol e sinais pequenos em m/z 421.34702 ($[M+H]^+$, $C_{30}H_{45}O$), 423.3627 ($[M+H]^+$, $C_{30}H_{47}O$) para triterpenos menos abundantes.

A fração 12, eluída da sílica-gel com metanol, apresentou, quando analisada por ESI(-) FT-ICR MS (Figura 20A, p.85), diversos sinais característicos de ésteres diterpênicos, bem como diversos ácidos graxos e triterpenos di- e tri-oxigenados já conhecidos da Tabela 3 e 4. Fórmulas moleculares com erros muito baixos e DBEs de 7 a 13 indicaram os diterpenos 4-deoxyphorbol e ingenol, bem como seus ésteres conforme listado na Tabela 5 e na Figura 14.

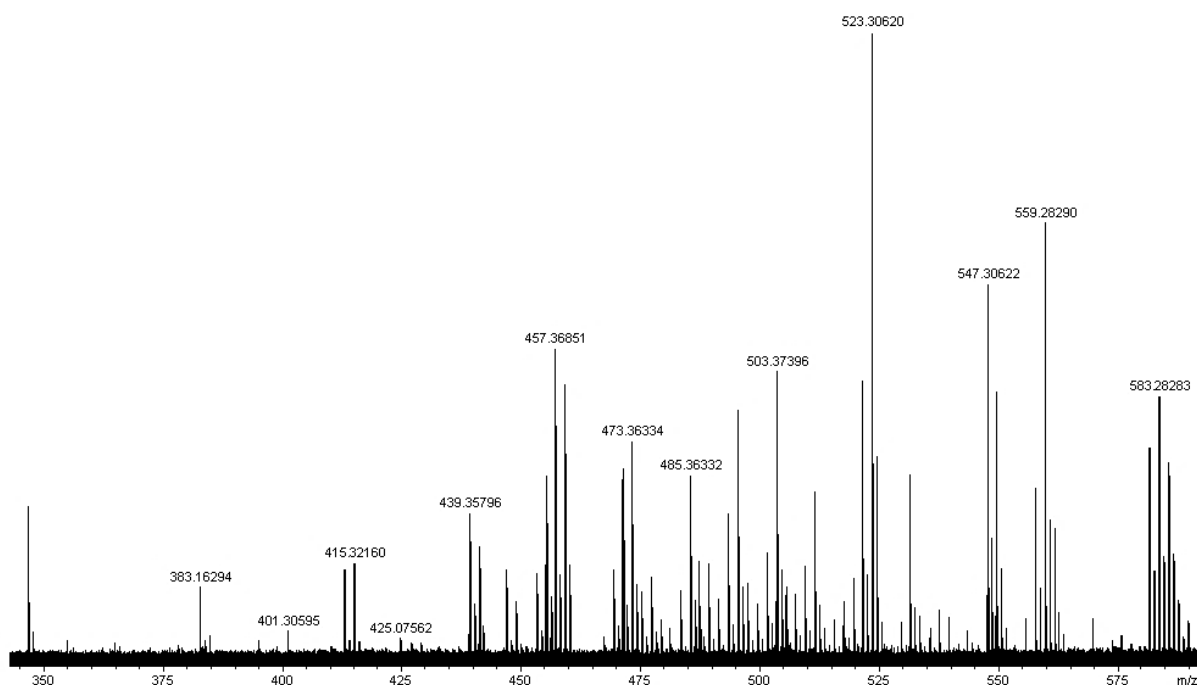


Figura 14: Espectro de massas ESI(-) FT-ICR MS da 12^o fração obtida por cromatografia em coluna de sílica-gel

Tabela 5: Ésteres diterpênicos obtidos pelo fracionamento do extrato bruto do látex de *E. tirucalli*

[M-H] ⁻	Intensidade (%)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	DBE	Classe ou proposta de substância	MS/MS
347,18679	15,4	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	-1,13	7,0	Ingenol e/ou 4-deoxyphorbol	329, 311
363,18168	1,4	C ₂₀ H ₂₇ O ₆	-1,00	7,0	Phorbol	nd ^a
383,16352	97,3	C ₂₀ H ₂₈ ClO ₅	-1,16	7,0	Ingenol e/ou cloreto de 4-deoxyphorbol	347, 329, 311
497,2909	2,6	C ₃₀ H ₄₁ O ₆	0,32	10,0	Ingenol 3-(2,4)-decadienoato	nd ^a
495,27583	0,16	C ₃₀ H ₃₉ O ₆	-1,25	11,0	Ingenol 3-(2,4,6)-decadienoato	nd ^a
511,27102	9,7	C ₃₀ H ₃₉ O ₇	0,51	11,0	12-octa-2,4-dienoato, 13-acetato-4-deoxyphorbol	493,467, 448, 415,348, 371, 329, 311, 293
521,29060	9,6	C ₃₂ H ₄₁ O ₆	0,50	12,0	Ingenol 3-(2,4,6-8)-dodecatetraenoato	nd ^a
523,30620	36,6	C ₃₂ H ₄₃ O ₆	0,60	11,0	Ingenol 3-(2,4,6)-dodecadienoato	347, 329, 311
531,25287	20,7	C ₃₀ H ₄₀ ClO ₆	-1,85	11,0	Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6)-decadienoato	nd ^a
537,28544	2,9	C ₃₂ H ₄₁ O ₇	0,62	12,0	12-deca-2,4,6-trienoato, 13-acetato-4-deoxyphorbol	nd ^a
539,30113	3,8	C ₃₂ H ₄₃ O ₇	0,55	11,0	12-acetato, 13-deca-2,4-dienoato-4-deoxyphorbol	nd ^a
547,30622	15,1	C ₃₄ H ₄₃ O ₆	0,54	13,0	Ingenol 3-(2,4,6-8-10)-tetradecapentaenoato	529,487, 471,347, 329,311, 217
549,32183	10,2	C ₃₄ H ₄₅ O ₆	0,61	12,0	Ingenol 3-(2,4,6-8)-tetradecatetraenoato	531,347, 329,311
557,26851	41,4	C ₃₂ H ₄₂ ClO ₆	-1,72	12,0	Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6-8)-dodecatetraenoato	nd ^a
559,28290	88,5	C ₃₂ H ₄₄ ClO ₆	0,52	10,0	Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6)-dodecadienoato	553, 329, 311
583,28318	25,8	C ₃₄ H ₄₄ ClO ₆	0,20	13,0	Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6-8-10)-tetradecapentaenoato	nd ^a
585,29884	18,3	C ₃₄ H ₄₆ ClO ₆	0,10	12,0	Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6-8)-tetradecatetraenoato	nd ^a

^and = não determinado

Em *m/z* 347,18679 (C₂₀H₂₇O₅), *m/z* 383,16352 (C₂₀H₂₈ClO₅) e *m/z* 363,18168 (C₂₀H₂₇O₆) ocorreram os álcoois diterpênicos ingenol, 4-deoxyphorbol e phorbol que,

por esterificação natural, originaram os ésteres diterpênicos. Experimentos MS² do íon m/z 383,16365 (os adutos de cloreto de ingenol e/ou 4-deoxyphorbol) forneceram os fragmentos em m/z 347 $[M - Cl - H]^-$, 329 $[347 - H_2O]^-$ e 311 $[329 - H_2O]^-$ (Figura 21A, p.86). Também os experimentos de MS² em alguns ésteres diterpênicos forneceram tais fragmentos (329 e 311), confirmando ésteres diterpênicos como uma classe de produto natural presente no látex de *E. tirucalli* (Tabela 5)^{5,21,66}.

O éster diterpênicos m/z 511, conhecido como pedilstatina, bem como 537,28544 (C₃₂H₄₁O₇) e 539,30113 (C₃₂H₄₃O₇) foram identificados como diésteres 4-deoxyphorbols, previamente isolados da planta^{5,67}. A presença dos íons em m/z 383 ($[M + Cl]^-$, C₂₀H₂₈ClO₅) e em m/z 347 ($[M-H]^-$, C₂₀H₂₇O₅) para os diterpenos isoméricos 4-deoxyphorbol/ingenol com intensidade muito maior que a de m/z 363 ($[M-H]^-$, C₂₀H₂₇O₆) para phorbol sugere menor presença de ésteres de forbol. Todos os outros picos foram identificados como 3-monoésteres de ingenol, também conhecidos de *E. tirucalli*^{29,67}.

De fato, Fürstenberger e Hecker (1977), estudando *E. tirucalli* de origem na África do Sul, identificaram os ésteres 4-deoxyphorbols como os principais diterpenos da planta e ésteres de phorbol e ingenol como os menores. Por outro lado, quando os mesmos autores investigaram o látex de *E. tirucalli* de Madagascar, ocorreu o contrário, ou seja, foi detectada uma quantidade maior de ésteres de phorbol⁶⁶. Os autores sugeriram a presença de diferentes quimiotipos vegetais.

Kinghorn (1979), quando investigou o látex de *E. tirucalli* da Colômbia, encontrou 12-O-2Z-4E-octadienoil-4-deoxyphorbol-13-acetato como principal éster diterpênico da planta naquela região²⁴. Essa substância também foi identificada neste trabalho (Tabela 5) na fração 12. Foi obtido um íon a m/z 511.27102 ($[M-H]^-$, C₃₀H₃₉O₇), que sob a experiência MS/MS gerou os fragmentos m/z 493, 467, 448, 415, 371, 329, 311 e 293 (Figura 22A, p.87) como esquema proposto na Figura 15.

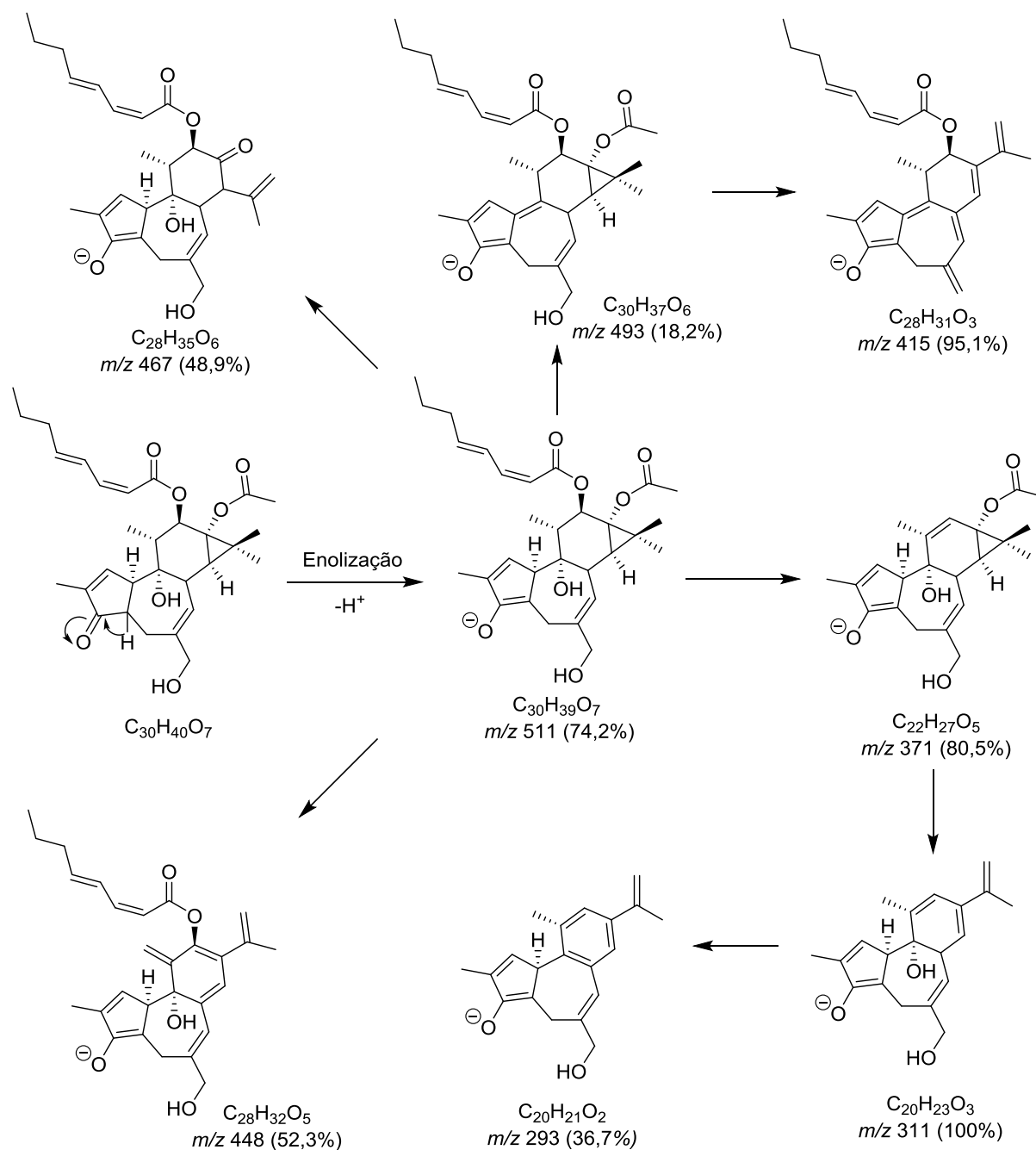


Figura 15: Proposta de fragmentação por MS/MS em íon m/z 511, um composto 4-deoxyphorbol

A formação do íon negativo $[M-H]^-$ a m/z 511, na fonte ESI, foi proposta para ocorrer retirando o hidrogênio alfa para carbonila (C-3) conduzindo a um íon enolato. Embora os álcoois sejam mais ácidos do que esses hidrogênios, o enolato formado torna-se conjugado à dupla ligação após perda subsequente de H_2O (m/z 493), ácido acético/ H_2 com abertura do anel ciclopropano e perda de H_2O de C-20 (m/z 415). A perda de ácido octadienóico a partir de C-12 levou ao íon intenso m/z 371 (80,5%), que com perda de ácido acético a partir de C-13 e H-2 com abertura do anel ciclopropano formou o pico base a m/z 311 (100%). A perda subsequente de

H₂O resultou em m/z 293. A perda de ácidos graxos e água, como moléculas neutras, também é conhecida a partir de ésteres de ingenol e 4-deoxyphorbols⁶⁸. No entanto, os dados da literatura mostram valores de íons positivos. Nestes casos, os íons m/z 311 e m/z 293 tornam-se m/z 313 e m/z 295, respectivamente.

Na época do trabalho de Hecker e Fürstenberger, a estereoquímica em torno do carbono 4 não havia sido determinada. No entanto, Pettit e colaboradores (2002) isolaram um composto de *Pedilanthus* sp., com estrutura semelhante, que foi denominado pedilstatina. Esta substância tinha sua estereoquímica em C-4 definida como (R). Constatou-se que a pedilstatina inibe significativamente o crescimento da linha celular de leucemia linfocítica P388, a proteção (a 80%) das células CEM-SS linfoblásticas derivadas de humanos da infecção e a morte celular pelo HIV-1 e a inibição da proteína quinase C⁶⁹. Outros ésteres 4-deoxyphorbols já conhecidos foram identificados no látex por ESI(-) FT-ICR MS. Eles foram o 12-O-2Z-4E-decadienoil-4-deoxyphorbol-13-acetato ([M-H]⁻, 537,28544, C₃₂H₄₁O₇) e o 12-O-2Z-4E-dodecadienoil-4-deoxyphorbol-13-acetato ([M-H]⁻, 539,30113, C₃₂H₄₃O₇).

Como visto na Tabela 5, os ésteres 4-deoxyphorbol representam os ésteres diterpênicos minoritários da *E. tirucalli* brasileira. Por outro lado, os ésteres de ingenol são os principais. Ingenol 3-(2,4,6)-dodecadienoato ([M-H]⁻, 523,30732, C₃₂H₄₃O₆), também representado pelo seu aduto de cloreto a m/z 559,28290 (C₃₂H₄₄ClO₆) (Figura 23A, p.88), foram os picos mais intensos do espectro de massas, quando comparado aos demais ésteres diterpênicos (Figura 20A, p.85). Como na Figura 17, o fragmento a m/z 193.12353 para o ácido graxo C₁₂H₁₇O₂ e os de m/z 329.17623 para C₂₀H₂₅O₄ e m/z 311.16555 para C₂₀H₂₃O₃ confirmaram a identidade do composto. A perda de um resíduo neutro representado por um ácido graxo cujo éster está ligado em C-3 conduziu ao fragmento m/z 329, o pico base do espectro MS² (Figura 16).

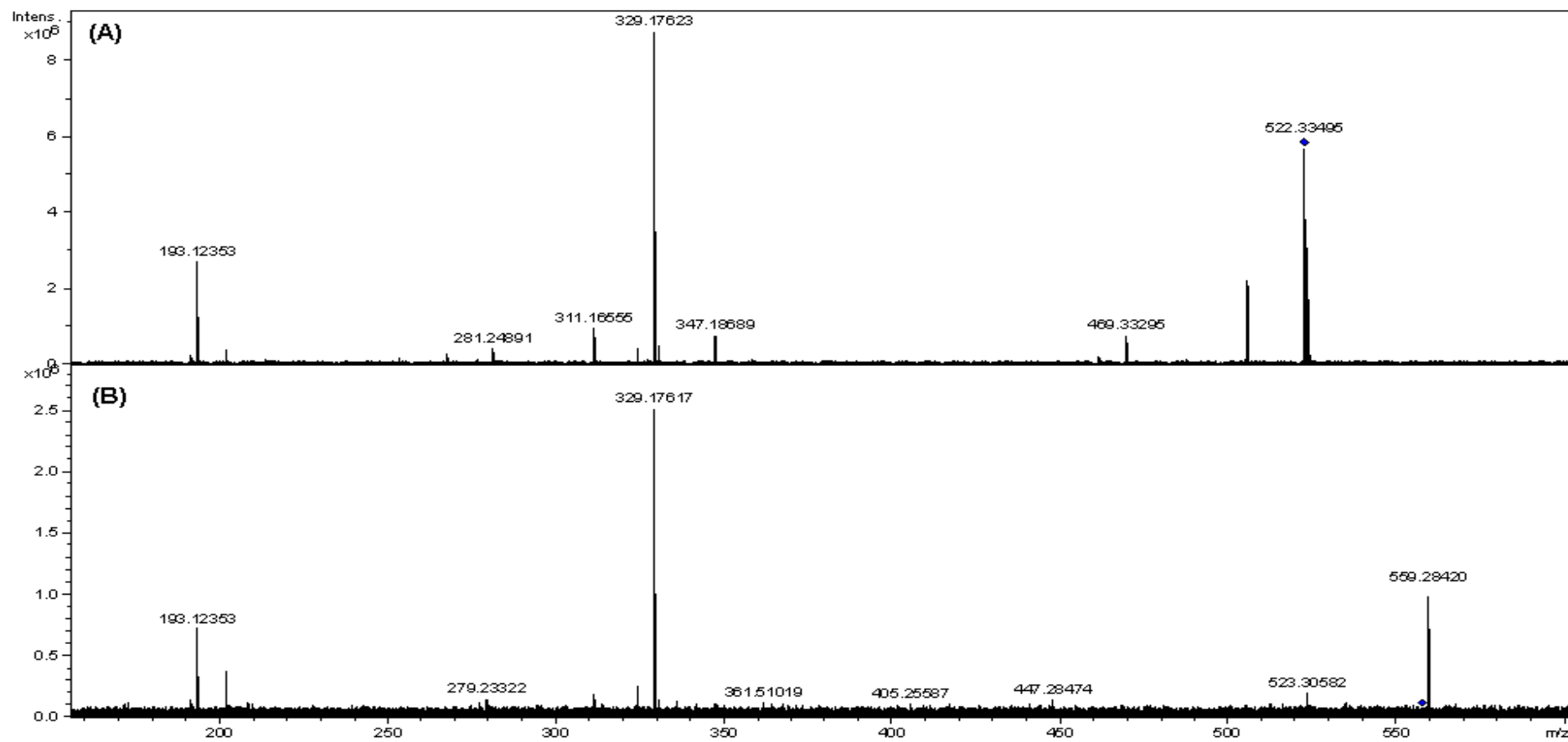


Figura 16: ESI (-) MS/MS para os íons (A) m/z 523 e (B) m/z 559

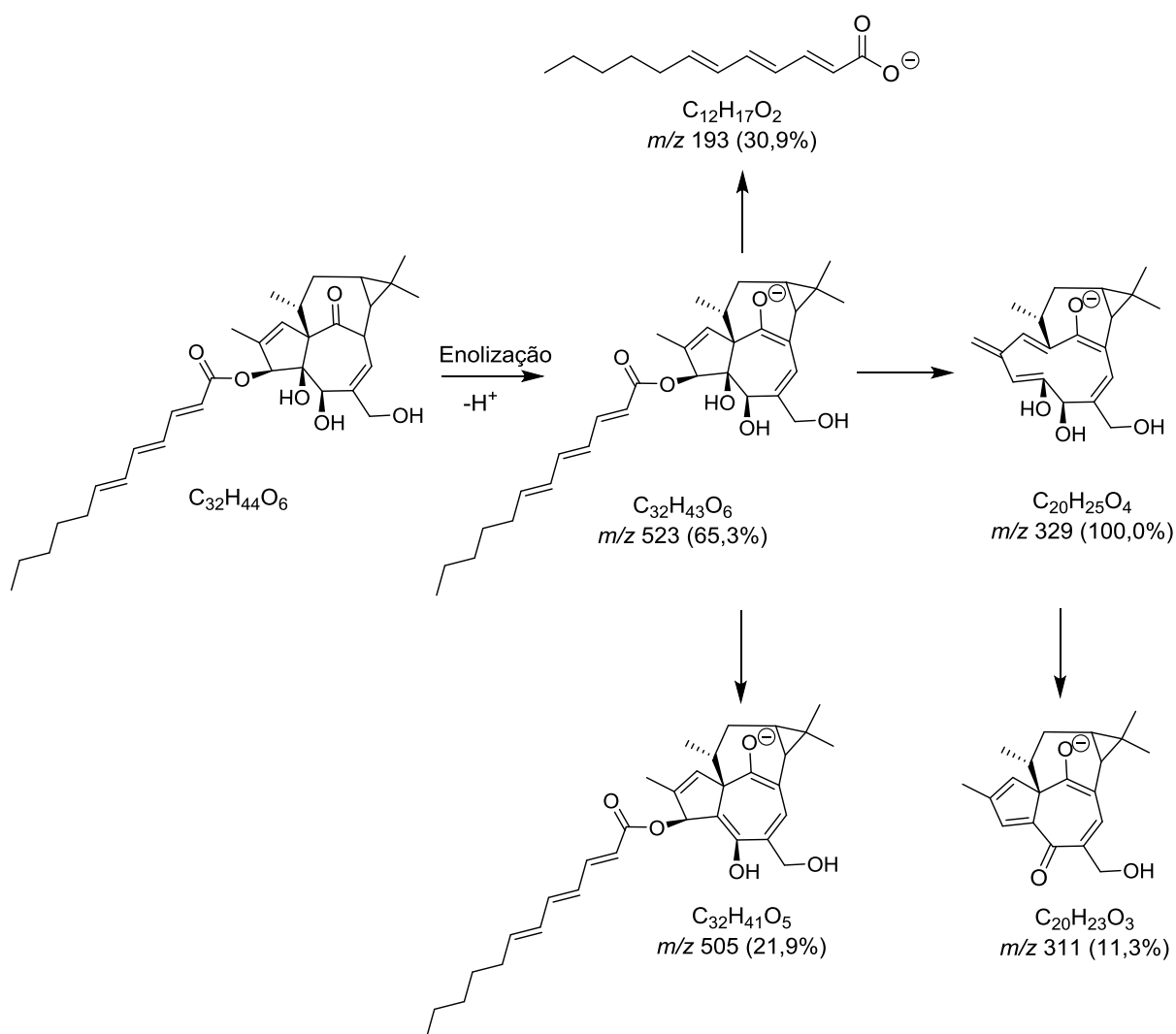


Figura 17: Proposta de fragmentação por ESI (-) MS/MS em íon m/z 523, um Ingenol 3-monoéster

Todos os monoésteres de ingenol mostraram este íon como pico base. Pelo contrário, m/z 329 era um pico baixo e intenso a partir de diésteres de 4-deoxyphorbol. Esta informação pode ser uma ferramenta de diagnóstico para distinguir os dois tipos de diterpenos em *E. tirucalli*.

4.4. Atividade citotóxica

Para verificar a atividade citotóxica do látex de *E. tirucalli*, seus efeitos foram inicialmente em macrófagos RAW 264.7. Como resultado, os macrófagos apresentaram alta viabilidade em todas as concentrações testadas, mostrando que o látex não possui efeito tóxico significativo contra essas células em relação ao controle positivo (Gráfico 1). Em $215,14 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$ houve redução da viabilidade de apenas 10%. Os valores de IC_{50} para *E. tirucalli* e cisplatina foram $521,6 \pm 0,01$

$\mu\text{g/mL}$ e $4,40 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Portanto, todas as concentrações avaliadas neste teste foram utilizadas para investigar os efeitos anticancerígenos.

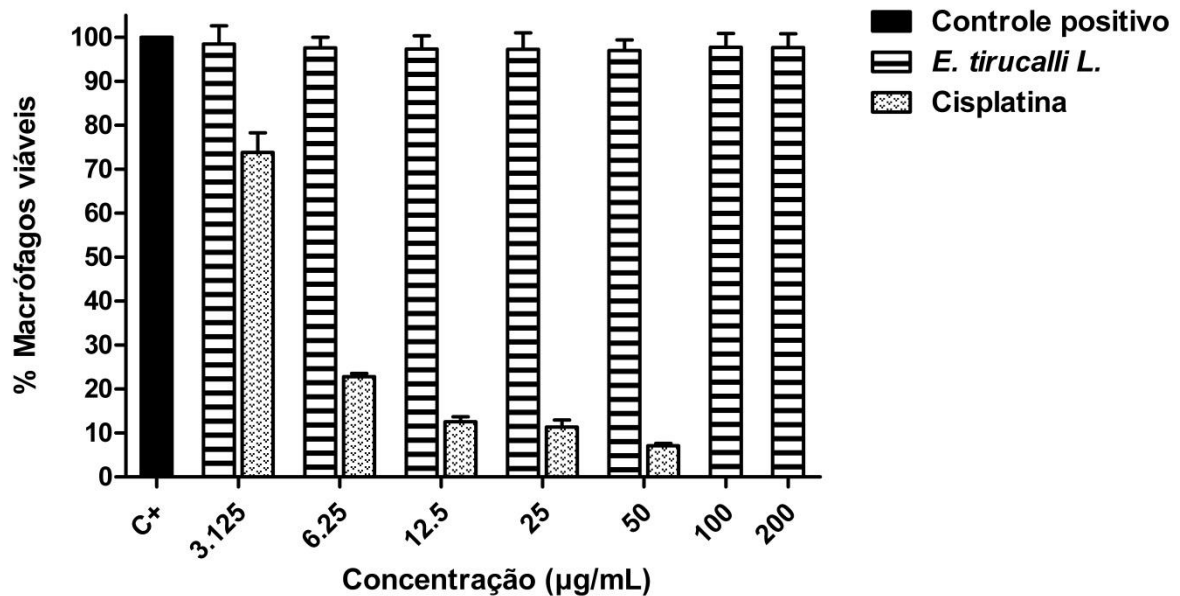


Gráfico 1: Efeito da viabilidade de *E. tirucalli* e da cisplatina em macrófagos. Valores expressos como porcentagem de células viáveis em comparação ao controle de crescimento. * $p < 0,001$ em relação ao controle de crescimento.

O efeito citotóxico do látex de *E. tirucalli* nas células tumorais do adenocarcinoma gástrico foi bastante significativo quando comparado ao padrão cisplatina, como pode ser visto no Gráfico 2. Todas as concentrações testadas mostraram no crescimento celular uma diferença significativa em relação ao controle positivo. Os valores de IC_{50} encontrados foram $69,43 \pm 1,29 \mu\text{g/mL}$ e $4,35 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ para a *E. tirucalli* e cisplatina, respectivamente. É importante notar que o látex na concentração de $200 \mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade das células AGS em 95%, indicando um potencial efeito citotóxico. Considerando que o látex de *E. tirucalli* é uma mistura complexa de compostos, a atividade citotóxica apresentada foi relevante para um extrato bruto. Além disso, o látex bruto apresentou um alto grau de seletividade para a linhagem de AGS ($\text{IS} = 7,52$), quando comparado com a cisplatina ($\text{IS} = 1,01$).

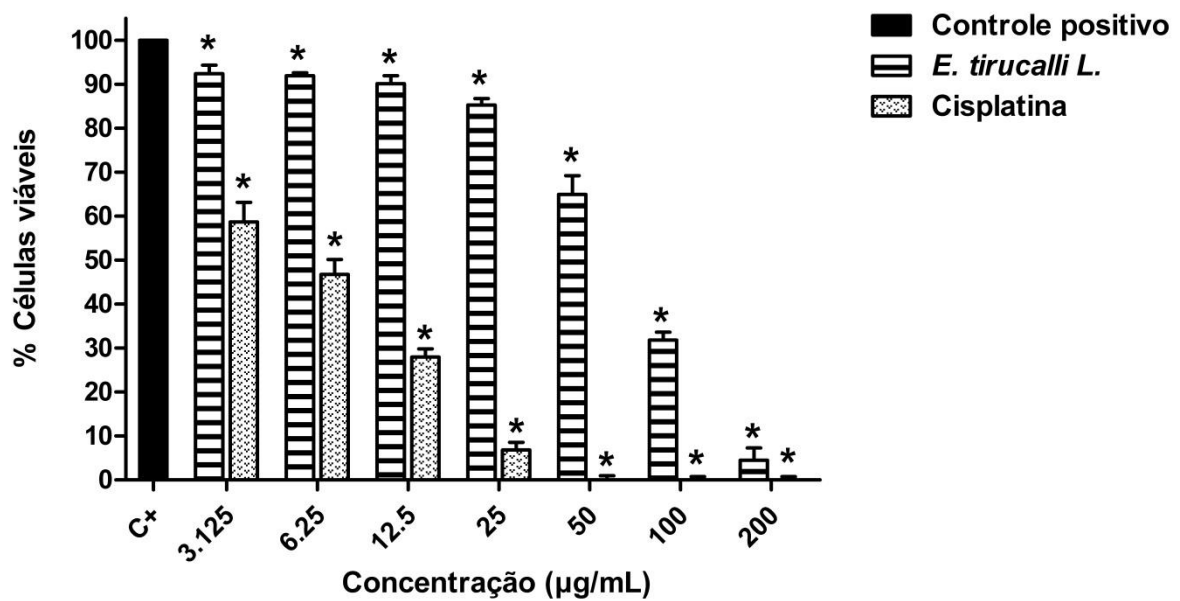


Gráfico 2: Efeito de *E. tirucalli* e cisplatina na cultura de células de adenocarcinoma gástrico (AGS). Resultados expressos em percentagem de células viáveis. *p < 0,001 em relação ao controle de crescimento.

Logo, o látex não apresentou citotoxicidade significativa em macrófagos RAW 247.6 nas concentrações testadas, mostrando que o extrato bruto não reduz a viabilidade das células normais. Entretanto, ele é tóxico para as células AGS, uma vez que nas concentrações de 100 e 200 µg/mL reduziu a viabilidade em 70 e 95%, respectivamente. Esses resultados sugerem alta seletividade para células cancerígenas quando comparado a quimioterápico já utilizado clinicamente, como a cisplatina, epirrubicina e fluorocila⁷⁰. O triterpeno euphol, composto majoritário encontrado no látex da *E. tirucalli* neste estudo, mostrou potencial anticancerígeno em estudos recentes. Por exemplo, Lin *et al* (2000) mostrou que o IC₅₀ deste triterpeno foi de 14.7 µg/mL para células de adenocarcinoma gástrico (LIN *et al.*, 2000). Já em glioblastoma, o valor de IC₅₀ encontrado foi de 19.3 µg/mL (SILVA *et al.*, 2018). Estes dados sugerem que o euphol apresenta citotoxicidade em diferentes tipos de câncer.

4.5. Atividade imunomodulatória

Para avaliar a atividade imunomoduladora do látex de *E. tirucalli*, foram avaliados seus efeitos na produção de NO e citocinas por macrófagos estimulados,

como TNF- α e IL-6. Os resultados obtidos em relação à inibição da produção de NO, em macrófagos estimulados por lipolissacarídeo (LPS), são mostrados na Gráfico 3. O látex demonstrou ter menor atividade inibidora da produção de NO em relação ao padrão L-NAME, uma vez que o extrato apresentou EC₅₀ 104,6 \pm 1,9 μ g/mL, enquanto o EC₅₀ para L-NAME foi de 13,55 \pm 0,29 μ g/mL. No entanto, em concentrações mais altas, o efeito inibitório do látex foi semelhante ao do L-NAME.

Curiosamente, a essa alta concentração, o látex não reduziu significativamente a viabilidade dos macrófagos.

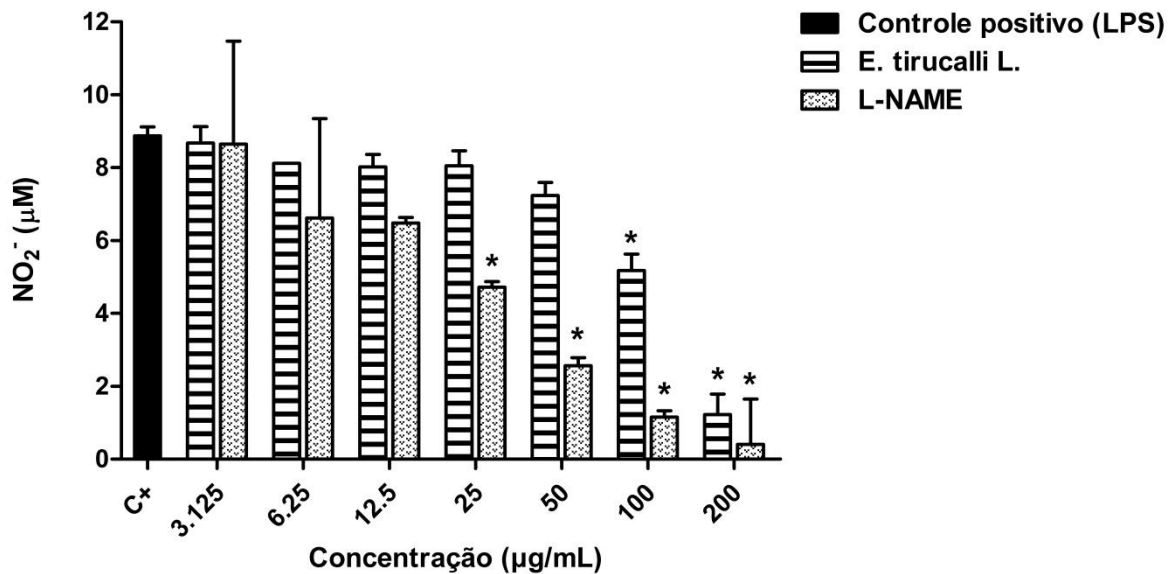


Gráfico 3: Efeito inibitório na produção de óxido nítrico expresso como concentração de nitrito para *E. tirucalli* em macrófagos estimulados por LPS. * $p < 0,05$ comparado ao padrão de inibição de L-NAME.

O látex inibiu a produção de TNF- α por macrófagos estimulados por LPS. Na concentração mais alta testada, a inibição foi de 39,15% (Gráfico 4). Considerando que os macrófagos produzem TNF- α no início do estudo, sem a sua estimulação pelo LPS, foi necessário realizar testes para avaliar o efeito inibitório do látex na liberação de mediadores inflamatórios que são produzidos apenas por estímulo externo. Em relação a IL-6, houve inibição de cerca de 25% em 100 e 200 μ g/mL (Gráfico 5).

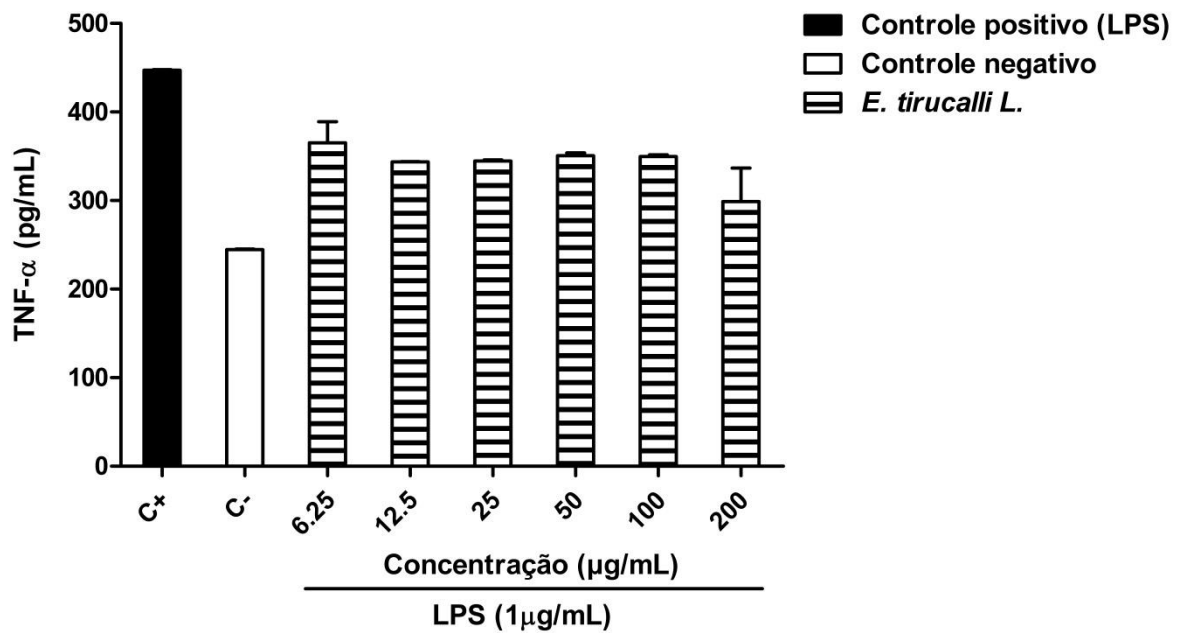


Gráfico 4: Efeito inibitório do látex de *E. tirucalli* na produção de TNF- α por macrófagos estimulados por LPS.

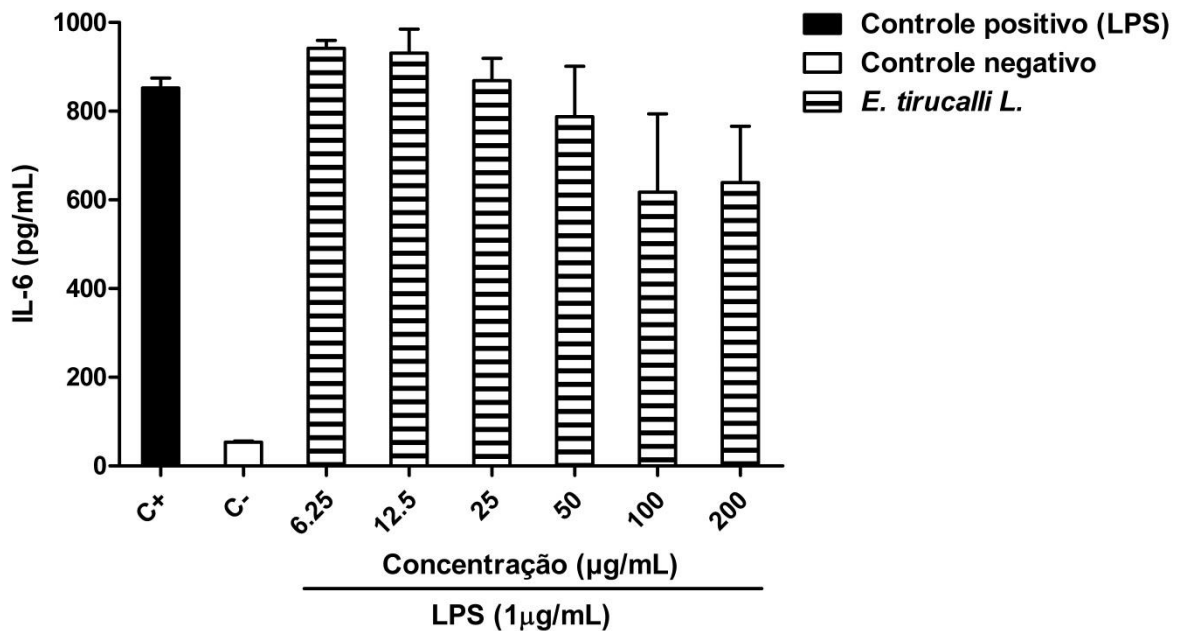


Gráfico 5: Efeito inibidor do látex de *E. tirucalli* na produção de IL-6 por macrófagos induzidos por LPS. * $p < 0,001$ comparado ao grupo LPS.

Estes resultados sugerem que o extrato bruto apresenta importante atividade imunomoduladora, pois reduziu a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ,

IL-6 e NO, sendo que o efeito na redução do NO foi mais significativo, obtendo resultados semelhantes ao padrão L-NAME na concentração de 200 µg/mL. Este efeito parece ser promissor, pois, em excesso, o NO pode gerar compostos genotóxicos resultantes da reação do NO com o oxigênio e o superóxido (N_2O_3 e $ONOO^-$), levando a danos diretos e indiretos ao DNA, como formação de aduto induzido por peroxinitrito, quebra de fita simples ou inibição das enzimas de reparação do DNA [LALA, 1998; LALA E CHAKRABORTY, 2001]. Essas ações demonstram o papel ativo do NO na carcinogênese.

É importante destacar a importância da avaliação química e biológica do látex bruto, que é a forma de consumo da população. Diante disso, é importante ressaltar o efeito do látex bruto na redução da produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados. De fato, há evidências de aumento do NO em pacientes com câncer, o que torna o látex da *E. tirucalli* uma droga em potencial nesses casos. Embora a liberação de citocinas IL-6 e TNF- α não tenha sido altamente inibida pelo látex, o euphol, seu principal composto, na dose de 30 mg/kg em camundongos com colite inibiu, entre outras citocinas, os níveis de TNF- α e IL-6 em 40 e 75%, respectivamente, sugerindo ação anti-inflamatória (DUTRA et al., 2011).

Em conclusão, o látex de *E. tirucalli* apresenta potencial antitumoral pois age seletivamente contra células cancerígenas e ainda previne a progressão tumoral, pois possui importante efeito imunomodulador, principalmente por inibir a produção de NO.

5. CONCLUSÃO

Os diferentes métodos e técnicas analíticas com suas respectivas sensibilidades permitiram a caracterização de um perfil químico para o látex de *Euphorbia tirucalli*, evidenciando a espectrometria de massas (FT-ICR MS), com diferentes métodos de ionização, como a técnica mais adequada na determinação deste perfil químico. Euphol foi a principal substância e pôde ser identificado por todas as técnicas utilizadas, mais sensíveis e menos sensíveis, enquanto os ésteres diterpênicos foram os minoritários, e foram detectados apenas por ESI(-) FT-ICR MS. Nossos resultados e de outras pesquisas mostraram que, embora os ésteres diterpênicos estejam presentes no látex de *Euphorbia tirucalli*, não foram encontrados efeitos tóxicos sobre as células saudáveis. Os dados obtidos a partir de análises químicas e biológicas neste trabalho apoiam o uso tradicional do látex de *E. tirucalli* no Brasil contra o câncer, por ser seletivamente tóxico para as células cancerosas, além de ter atividade imunomoduladora.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cataluña, P. & Rates, S. M. K. The traditional use of the latex from *Euphorbia tirucalli* Linnaeus (Euphorbiaceae) in the treatment of cancer in South Brazil. *Acta Horticulturae* **501**, 289–295 (1999).
2. Kuster, R. M. *et al.* Identification of maloyl glucans from *Euphorbia tirucalli* by ESI-(-)-FT-ICR MS analyses. *Phytochem. Lett.* **12**, 209–214 (2015).
3. Ribeiro, R. V., Bieski, I. G. C., Balogun, S. O. & Martins, D. T. de O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **205**, 69–102 (2017).
4. Aya, T. *et al.* Chromosome translocation and c-MYC activation by Epstein-Barr virus and *Euphorbia tirucalli* in B lymphocytes. *Lancet* **337**, 1190 (1991).
5. Fürstenberger, G. & Hecker, E. Zum Wirkungsmechanismus Cocarcinogener Pflanzeninhaltsstoffe. *Planta Med.* **22**, 241–266 (1972).
6. HECKER, E. Tumour promoters of the irritant diterpene ester type as risk factors of cancer in man. *Bot. J. Linn. Soc.* **94**, 197–219 (1987).
7. McDonald, A. D., Warren, F. L. & Williams, J. M. S 33. The *Euphorbia* resins. Part I. Euphol. *J. Chem. Soc.* S155 (1949). doi:10.1039/jr949000s155
8. Wang, L. *et al.* Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Mol. Med. Rep.* **8**, 1279–1285 (2013).
9. Riboli, E. & Norat, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, (2003).
10. Lin, M. W. *et al.* Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 4333–4339 (2012).
11. Llanes-Coronel, D. S. *et al.* New promising Euphorbiaceae extracts with activity in human lymphocytes from primary cell cultures. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **33**, 279–290 (2011).
12. Valadares, M. C., Carrucha, S. G., Accorsi, W. & Queiroz, M. L. S. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-

- bearing mice. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 294–299 (2006).
13. Webster, G. L. Irritant plants in the spurge family (Euphorbiaceae). *Clin. Dermatol.* **4**, 36–45 (1986).
 14. Lorenzi, H. & Matos, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e exóticas.* **2**, (Instituto Plantarum, 2008).
 15. Gildenhuys, S. The three most abundant tree Euphorbia species of the Transvaal (South Africa). *Euphorbia World* (2006).
 16. Hickey, T. A., Worobec, S. M., West, D. P. & Kinghorn, A. D. Irritant contact dermatitis in humans from phorbol and related esters. *Toxicon* **19**, 841–850 (1981).
 17. Shlamovitz, G. Z., Gupta, M. & Diaz, J. A. A Case of Acute Keratoconjunctivitis from Exposure to Latex of Euphorbia Tirucalli (Pencil Cactus). *J. Emerg. Med.* **36**, 239–241 (2009).
 18. Batista, E. K. F. *et al.* Avaliação do efeito de formulações com o látex da Euphorbia tirucalli na terapêutica tópica de feridas cutâneas: Aspectos clínicos e histopatológicos. *Med. Vet.* **8**, 1–11 (2014).
 19. MacNeil, A., Sumba, O. P., Lutzke, M. L., Moormann, A. & Rochford, R. Activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle by the latex of the plant Euphorbia tirucalli. *Br. J. Cancer* **88**, 1566–1569 (2003).
 20. Santos, O. J. dos *et al.* Cicatrização gástrica com uso do extrato da Euphorbia Tirucalli L.: estudo em ratos. *ABCD. Arq. Bras. Cir. Dig. (São Paulo)* **26**, 256–259 (2013).
 21. Fürstenberger, G. & Hecker, E. On the Active Principles of the Euphorbiaceae, XII. Highly Unsaturated Irritant Diterpene Esters from Euphorbia Tirucalli Originating from Madagascar. *J. Nat. Prod.* **49**, 386–397 (1986).
 22. Gobbo Neto, L. Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. (Universidade de São Paulo, 2007).
 23. Uzabakiliho, B., Largeau, C. & Casadevall, E. Latex constituents of Euphorbia candelabrum, E. grantii, E. tirucalli and Synadenium grantii. *Phytochemistry* **26**, 3041–3045 (1987).
 24. Kinghorn, A. D. Characterization of an Irritant 4-Deoxyphorbol Diester From Euphorbia Tirucalli. *J. Nat. Prod.* **42**, 112–115 (1979).
 25. Haines, D. W. & Warren, F. L. 323. The euphorbia resins. Part IV. A

- comparative study of euphol and tirucallol. *J. Chem. Soc.* 1562 (1950).
doi:10.1039/jr9500001562
26. Goel, G., Makkar, H. P. S., Francis, G. & Becker, K. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. *Int. J. Toxicol.* **26**, 279–288 (2007).
 27. Wang, H. B., Wang, X. Y., Liu, L. P., Qin, G. W. & Kang, T. G. Tigliane Diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae Families. *Chem. Rev.* **115**, 2975–3011 (2015).
 28. Fürstenberger, G. & Hecker, E. On the Active Principles of the Spurge Family (Euphorbiaceae) XI. [1] the Skin Irritant and Tumor Promoting Diterpene Esters of Euphorbia Tirucalli L. Originating from South Africa. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **40**, 631–646 (1985).
 29. Appendino, G. Ingenane Diterpenoids. in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 102* (ed. Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J.) **102**, 1–90 (Springer International Publishing, 2016).
 30. Lin, J. H. *et al.* Preparative isolation and gas chromatography-mass spectrometry analysis of triterpenoids in kansui radix. *J. Food Drug Anal.* **8**, 278–282 (2000).
 31. Alves, E. M. & Nepomuceno, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (Euphorbia tirucalli), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em Drosophila melanogaster. *Perquirere* **9**, 125–140 (2012).
 32. KHAN, A. Q., AHMED, Z., KAZMI, N. U. H. & MALIK, A. The Structure and Absolute Configuration of Cyclotirucanenol , a New Triterpene from Euphorbia tirucalli Linn. *J. Chem. Sci.* **43**, 1059–1062 (1988).
 33. Khan, A. Q., Rasheed, T., Najam-ul-Hussain Kazmi, S., Ahmed, Z. & Malik, A. Cycloeuphordenol, a new triterpene from Euphorbia tirucalli. *Phytochemistry* **27**, 2279–2281 (1988).
 34. Ragasa, C. Y. & Cornelio, K. B. Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. *Chin J Nat Med* **11**, 528–533 (2013).
 35. Baniadam, S. *et al.* Cycloartane triterpenoids from Euphorbia macrostegia with their cytotoxicity against MDA-MB48 and MCF-7 cancer cell lines. *Iran. J. Pharm. Res.* **13**, 135–141 (2014).
 36. Azimova, S. S. *Natural Compounds - Cycloartane triterpenoids and glycosides.* (Ed. Springer, 2013).
 37. Dewick, P. *Medicinal Natural products - A Biosynthetic Approach. Journal of*

- Bioscience and Bioengineering* **2**, (John Wiley & Sons, 2002).
38. Heldt, H. & Piechulla, B. *Plant Biochemistry*. (Elsevier, 2011).
doi:10.1016/C2009-0-63188-3
 39. Kiss, Z. Effects of phorbol ester on phospholipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* **29**, 141–166 (1990).
 40. Adolf, W., Opferkuch, H. J. & Hecker, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. *Phytochemistry* **23**, 129–132 (1984).
 41. Tsai, J. Y. *et al.* Isolation of phorbol esters from *euphorbia grandicornis* and evaluation of protein kinase c- and human platelet-activating effects of euphorbiaceae diterpenes. *J. Nat. Prod.* **79**, 2658–2666 (2016).
 42. Ibekwe, N. & Ameh, S. Hyphenated Techniques in Liquid Chromatography as Current Trends in Natural Products Analysis. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* **7**, 132–149 (2015).
 43. Patel, K., Patel, J., Patel, M., Rajput, G. & Patel, H. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharm. Methods* **1**, 2 (2010).
 44. Yusoff, E., Ahmad, A., Mohamad, S. & Farahana, N. GC-MS analysis of some volatile constituents extracted from stem of *Euphorbia tirucalli* Linn . **12**, 36–44 (2017).
 45. ARNASON, J. T., MARA, R. & ROMEO, J. T. *Phytochemistry of Medicinal Plants.* **29**, (Springer Science, 1995).
 46. Nothias-Scaglia, L. F. *et al.* LC-MS²-Based dereplication of *Euphorbia* extracts with anti-Chikungunya virus activity. *Fitoterapia* **105**, 202–209 (2015).
 47. Hoffmann, E. De & Stroobant, V. *Mass Spectrometry - Principles and Applications. Mass spectrometry reviews* **29**, (2007).
 48. PEREIRA, T. M. C. Aplicações da Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR MS) em Petrolômica. *Dissertação de Mestrado* (Universidade Federal do Espírito Santo, 2013).
 49. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. & Vyvyan, J. R. *Introdução à Espectroscopia*. (Cengage Learning, 2015).
 50. Rhourri-Frih, B. *et al.* Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. *J. Mass Spectrom.* **44**, 71–80 (2009).
 51. Knapp, D. R. Part II. Derivatization of particular compound types. in *Handbook*

- of Analytical Derivatization* 338–345 (John Wiley & Sons, 1979).
52. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
 53. Yamamoto, Y., Mizuguchi, R. & Yasuyuki, Y. Chemical constituents of cultured cells of *Euphorbia tirucalli* and *E. milli*. *Plant Cell Rep.* **1**, 29–30 (1981).
 54. Passos, G. F. *et al.* The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **698**, 413–420 (2013).
 55. Dutra, R. C. *et al.* The antinociceptive effects of the tetracyclic triterpene euphol in inflammatory and neuropathic pain models: The potential role of PKC ϵ . *Neuroscience* **303**, 126–137 (2015).
 56. Mallavadhani, U. V. *et al.* Development of diagnostic microscopic and chemical markers of some *Euphorbia* latexes. *J. Integr. Plant Biol.* **48**, 1115–1121 (2006).
 57. Famuyiwa, S. O., Oladele, A. T., Adeloye, A. O. & Fakunle, C. O. Terpenoid compounds from the latex of *Euphorbia drupifera*. *Ife J. Sci.* **16**, 1–5 (2014).
 58. Nyigo, V. A. *et al.* Isolation and identification of euphol and β - sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens*. *J. Phytopharm.* **5**, 100–104 (2016).
 59. Spino, C., Lal, J., Sotheeswaran, S. & Aalbersberg, W. Three prenylated phenolic benzophenones from *Garcinia myrtifolia*. *Phytochemistry* **38**, 233–236 (1995).
 60. Hamada, H. Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes : *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk. (Universite El Hadj Lakhdar Batna, 2008). doi:10.13140/RG.2.2.19541.22246
 61. Wu, Q. C. *et al.* ¹³C-NMR data of three important diterpenes isolated from *Euphorbia* species. *Molecules* **14**, 4454–4475 (2009).
 62. Guo, J. *et al.* Inhibition of 11 β -HSD1 by tetracyclic triterpenoids from *euphorbia kansui*. *Molecules* **17**, 11826–11838 (2012).
 63. Guo, J. *et al.* Kansuinone, a novel euphane-type triterpene from *Euphorbia kansui*. *Tetrahedron Lett.* **51**, 6286–6289 (2010).
 64. Carriere, F. *et al.* Paraffinic hydrocarbons in heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cell suspensions of *Euphorbia characias* L. *Plant Sci.* **71**, 93–98 (1990).

65. Lu, Z. *et al.* Four New Lanostane Triterpenoids from *Euphorbia humifusa*. *Helv. Chim. Acta* **90**, 2245–2250 (2007).
66. Fürstenberger, G. & Hecker, E. The new diterpene 4-deoxyphorbol and its highly unsaturated irritant diesters. *Tetrahedron Lett.* **18**, 925–928 (1977).
67. Fürstenberger, G. & Hecker, E. New highly irritant euphorbia factors from latex of *Euphorbia tirucalli* L. *Experientia* **33**, 986–988 (1977).
68. Vogg, Gerd., Mattes, E., Rothenburger, J., Hertkorn, N., Achatz, S., Sandermann Jr, H. Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L. *Phytochemistry* **51**, 289–295 (1999).
69. Pettit, G. R. *et al.* Isolation and Structure of Pedilstatin from a Republic of Maldives *Pedilanthus*. *J. Nat. Prod.* 1262–1265 (2002). doi:10.1021/np020115b
70. BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes diagnósticas e terapêuticas - Adenocarcinoma de estômago. *CONITEC* 1–20 (2017). Available at: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2017/Relatorio_Diretriz_Diagnostica_e_Terepeutica_do_Adenocarcinoma_de_Estomago__CP_42_2017_1.pdf. (Accessed: 3rd December 2018)

7. ANEXO

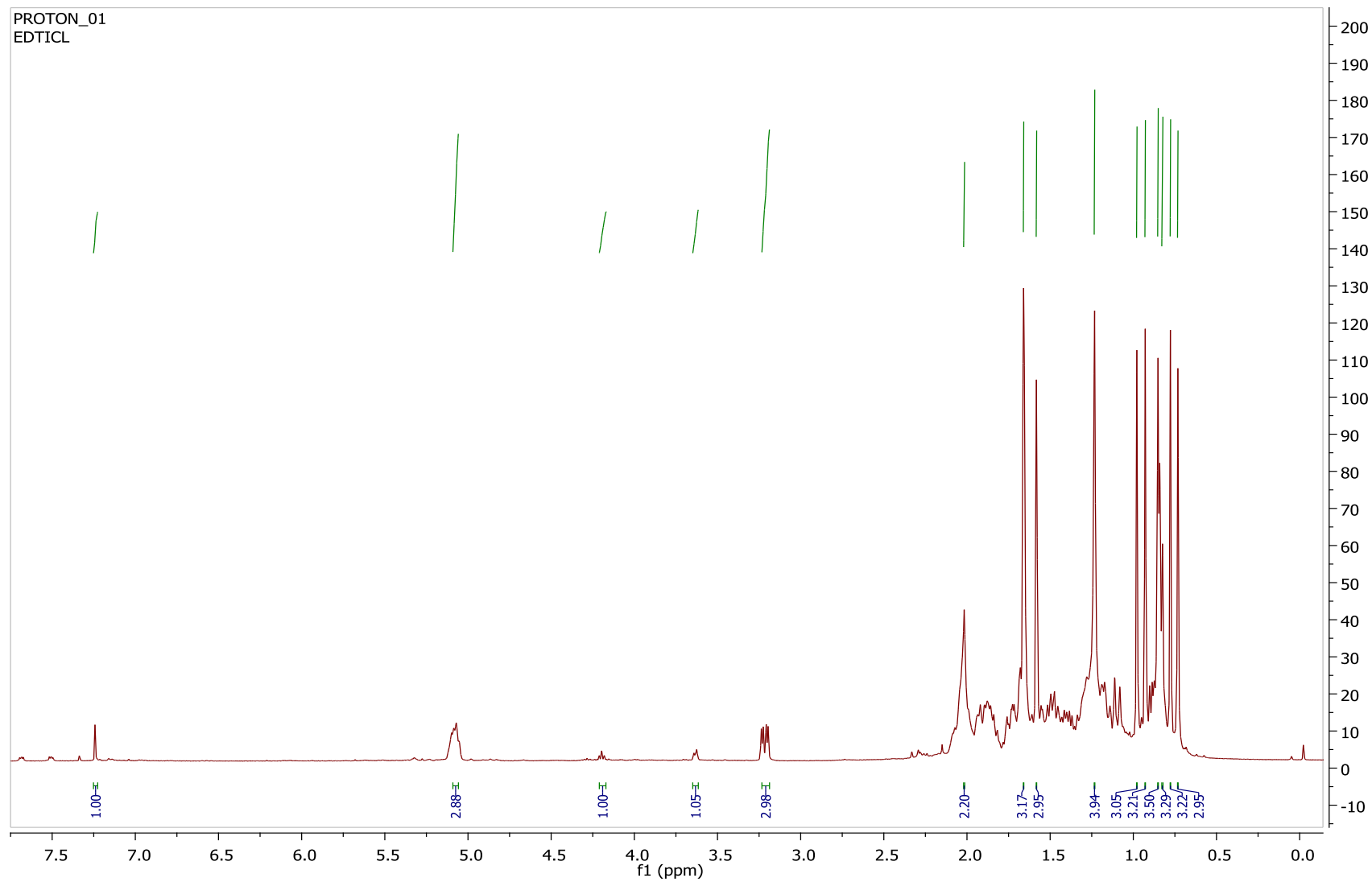


Figura 1A: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto do látex de *E. tirucalli*

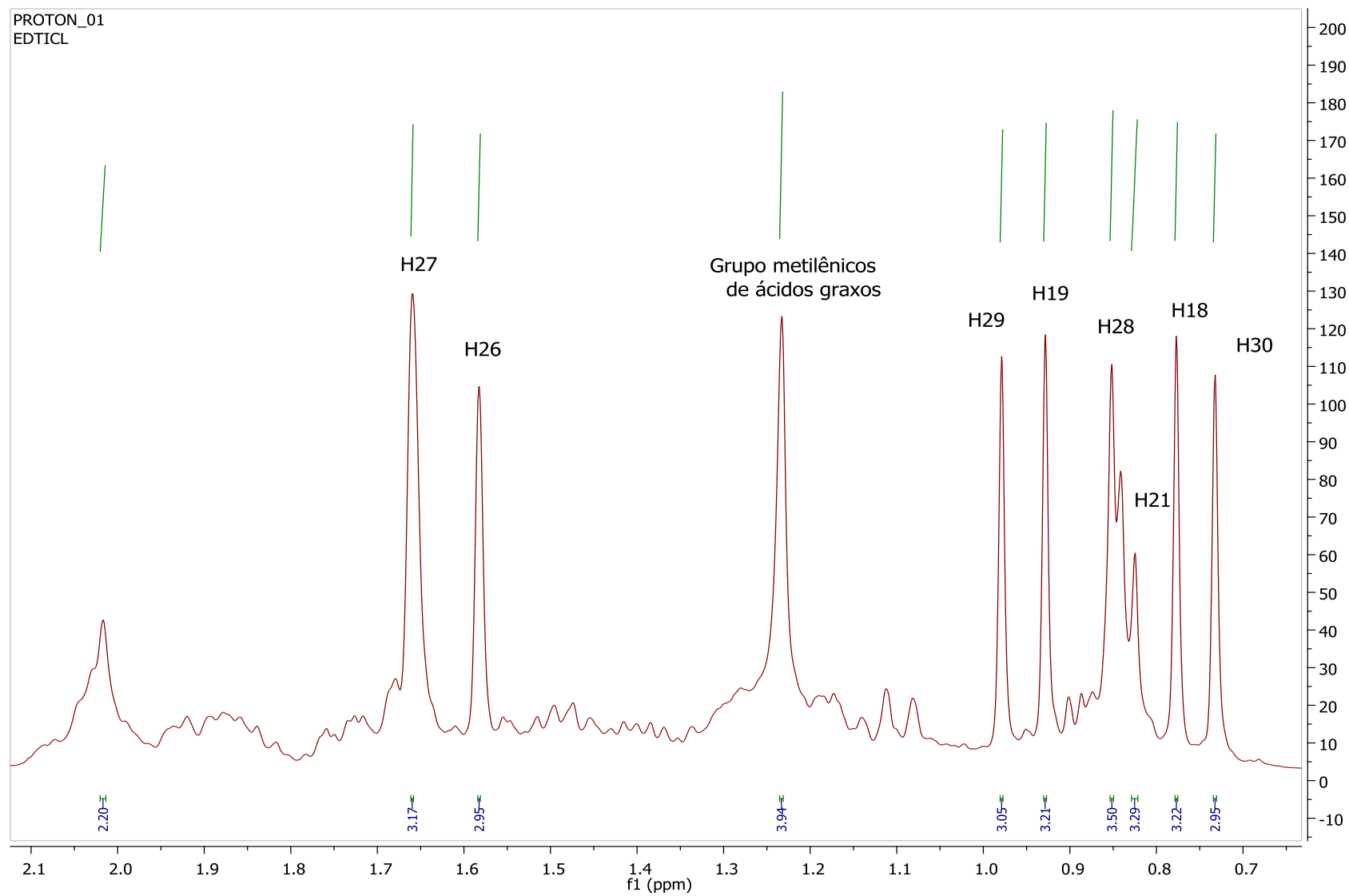


Figura 2A: Espectro de ^1H RMN com expansão da região de deslocamento químico entre 0,5 e 2,1ppm

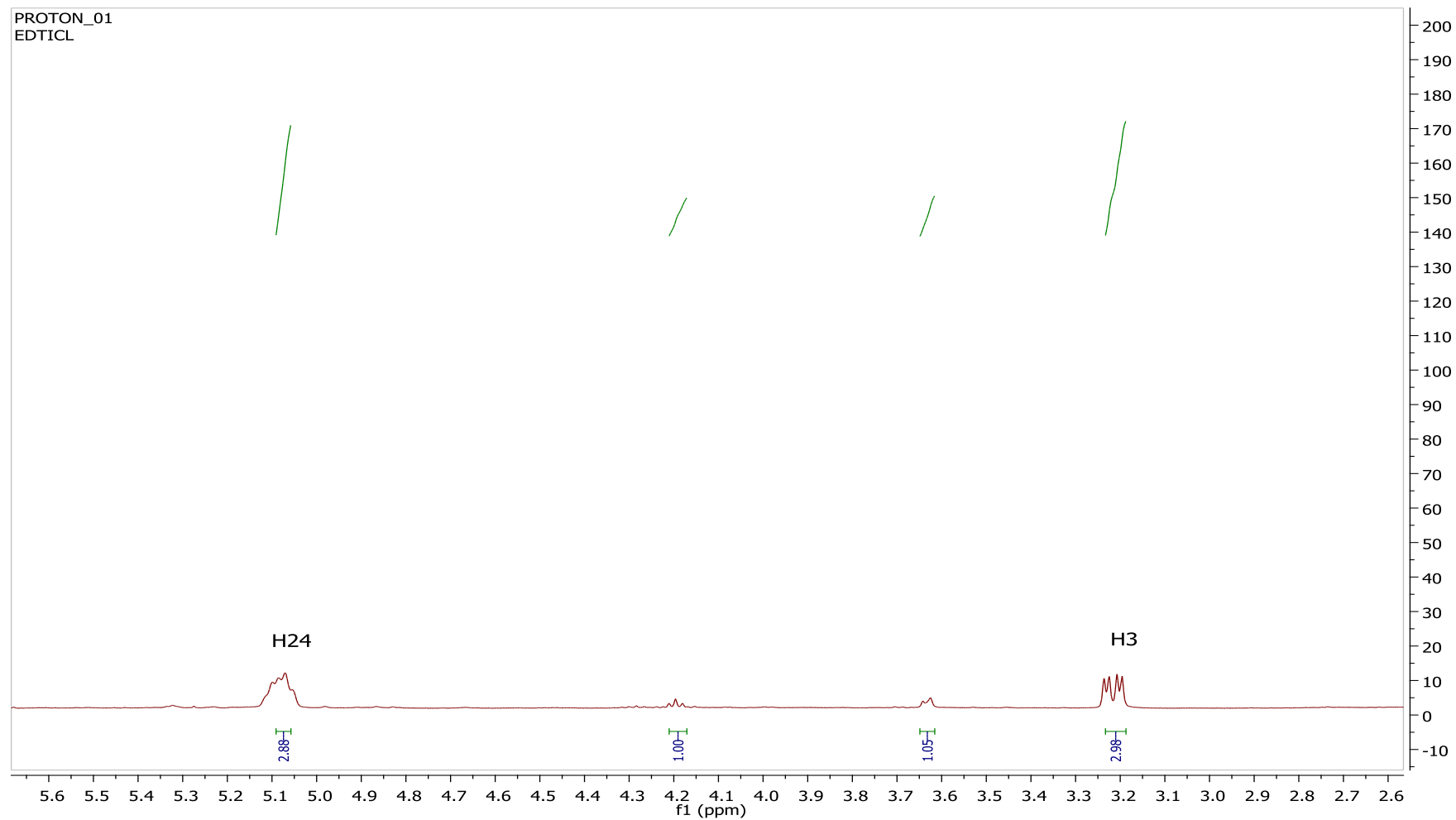


Figura 3A: Espectro de ^1H RMN com expansão da região de deslocamento químico entre 3,1 e 5,4 ppm

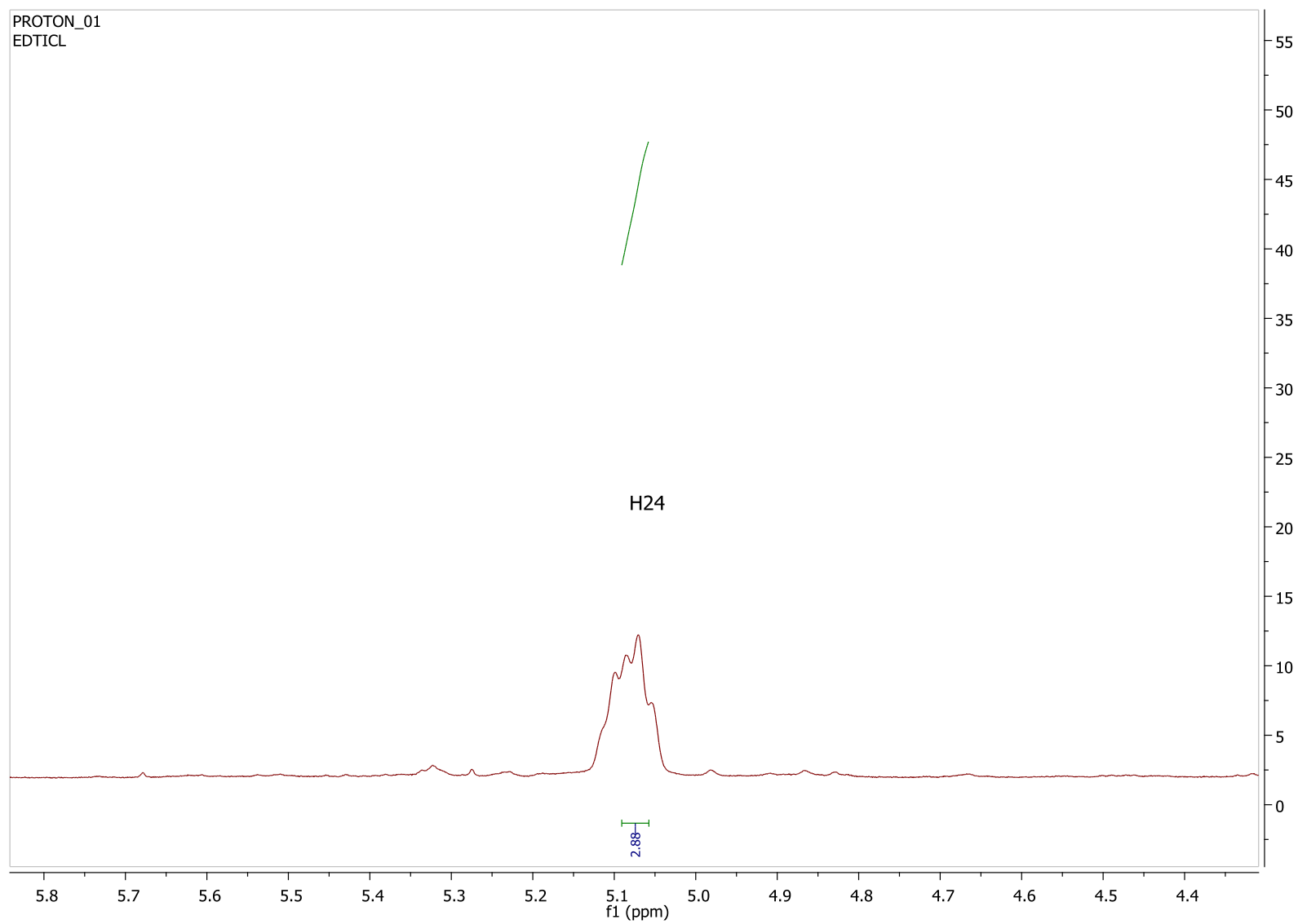


Figura 4A: Espectro de ^1H RMN com expansão da região de deslocamento químico em 5,07 ppm.

CARBON
EDTICL

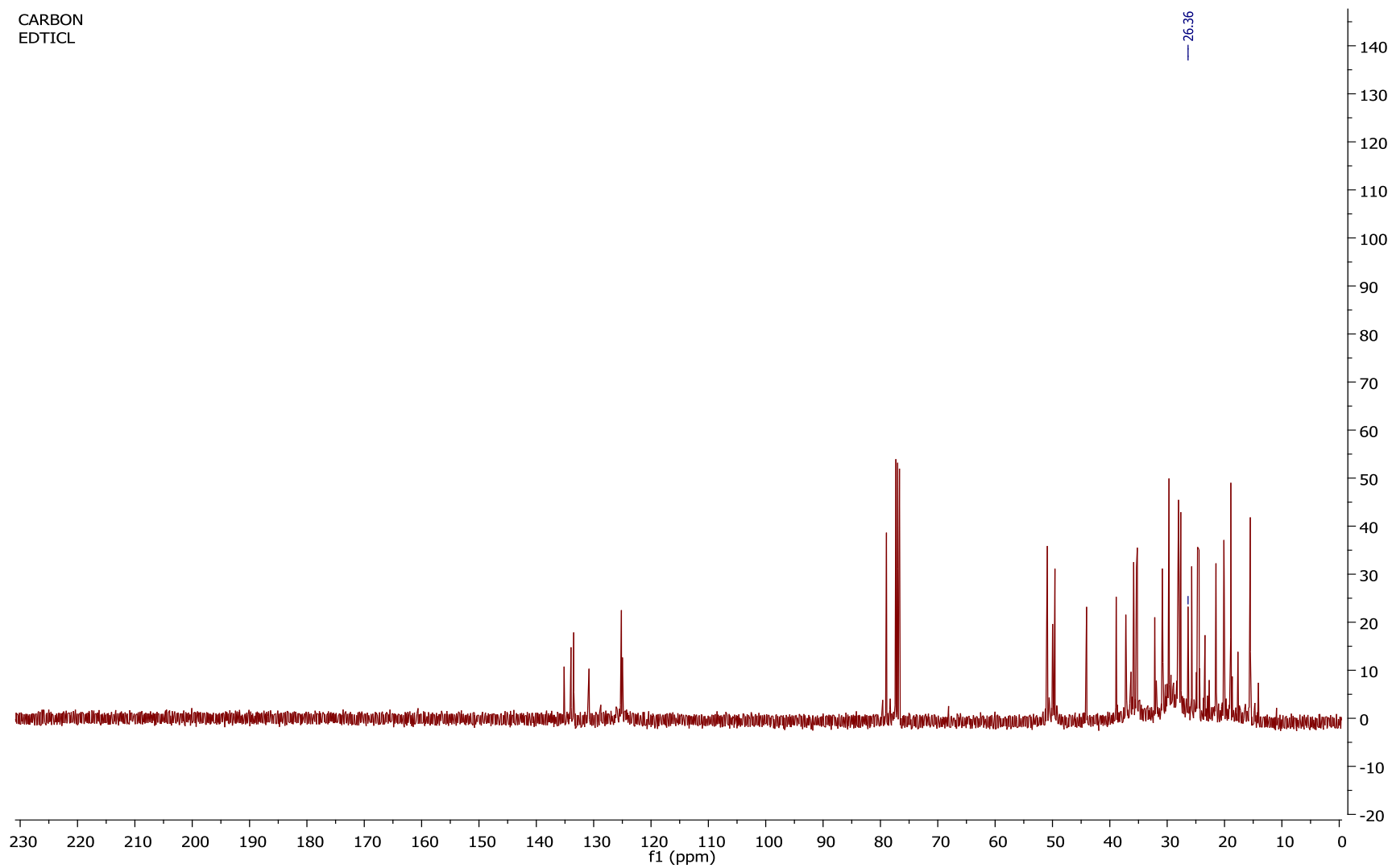


Figura 5A: Espectro RMN ^{13}C do extrato bruto do látex da *E. tirucalli*

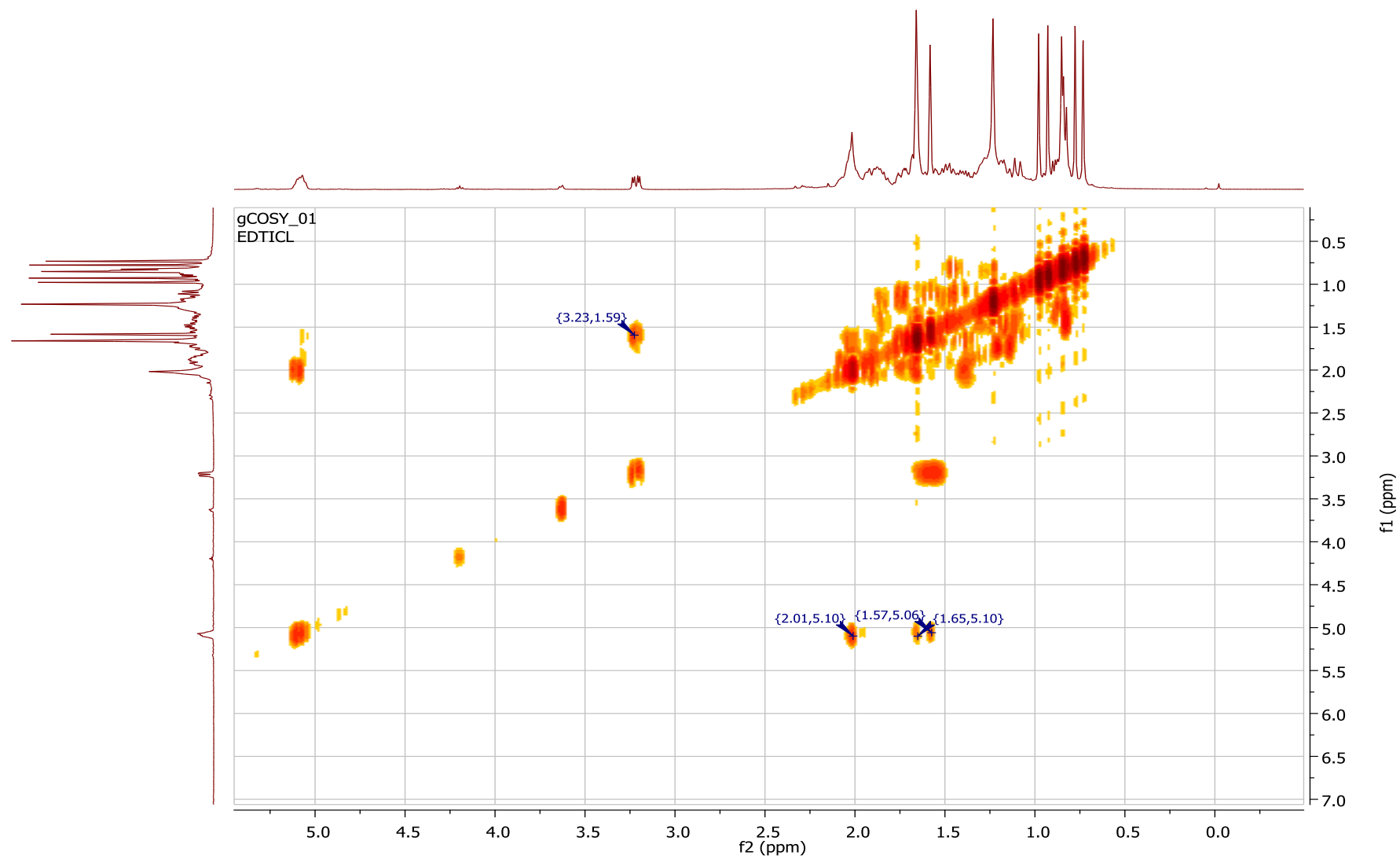


Figura 6A: Espectro de ^1H - ^1H COSY do extrato bruto do látex de *E. tirucalli*

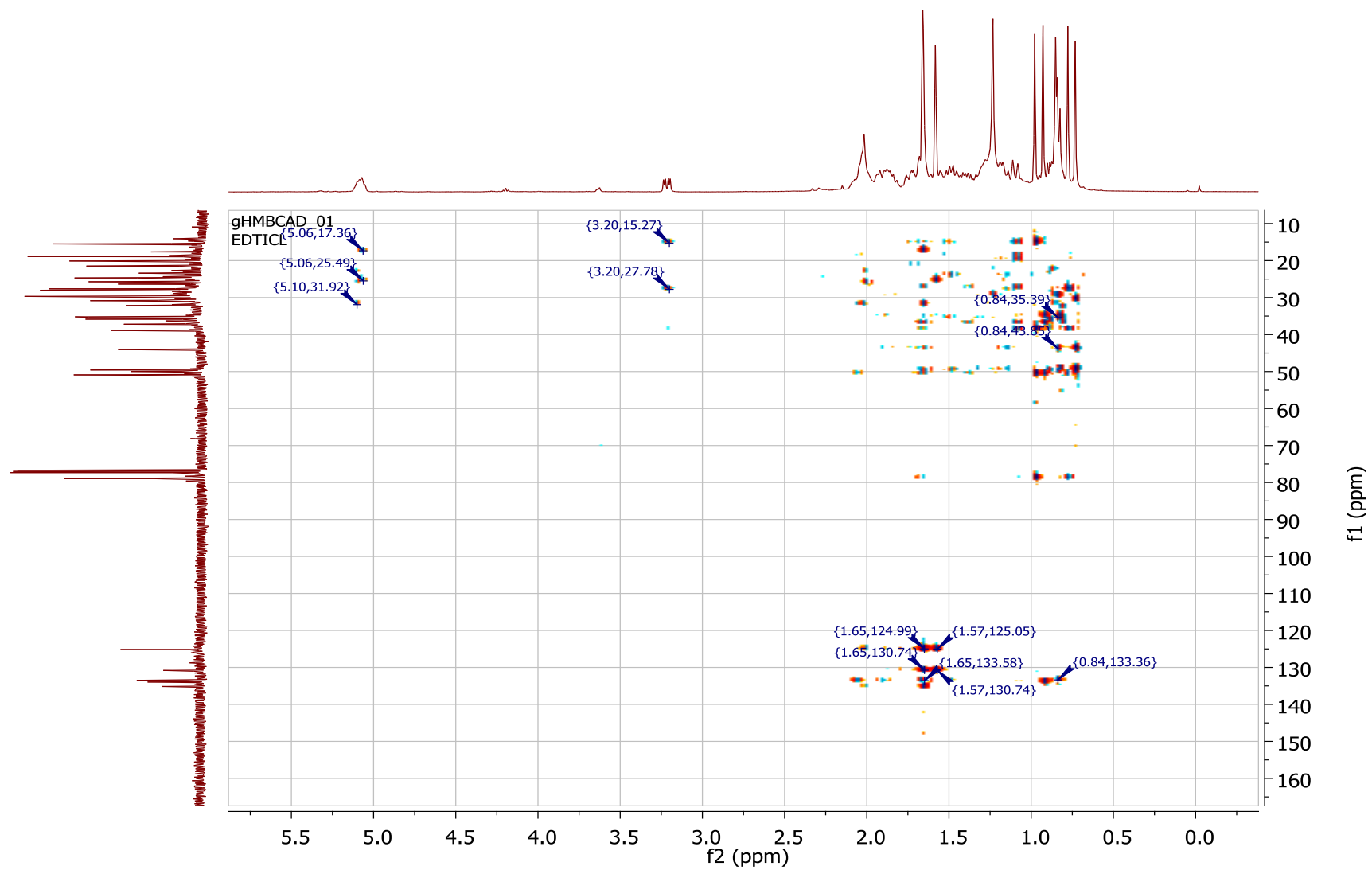


Figura 7A: Espectro HMBC do extrato bruto do látex de *E. tirucalli*

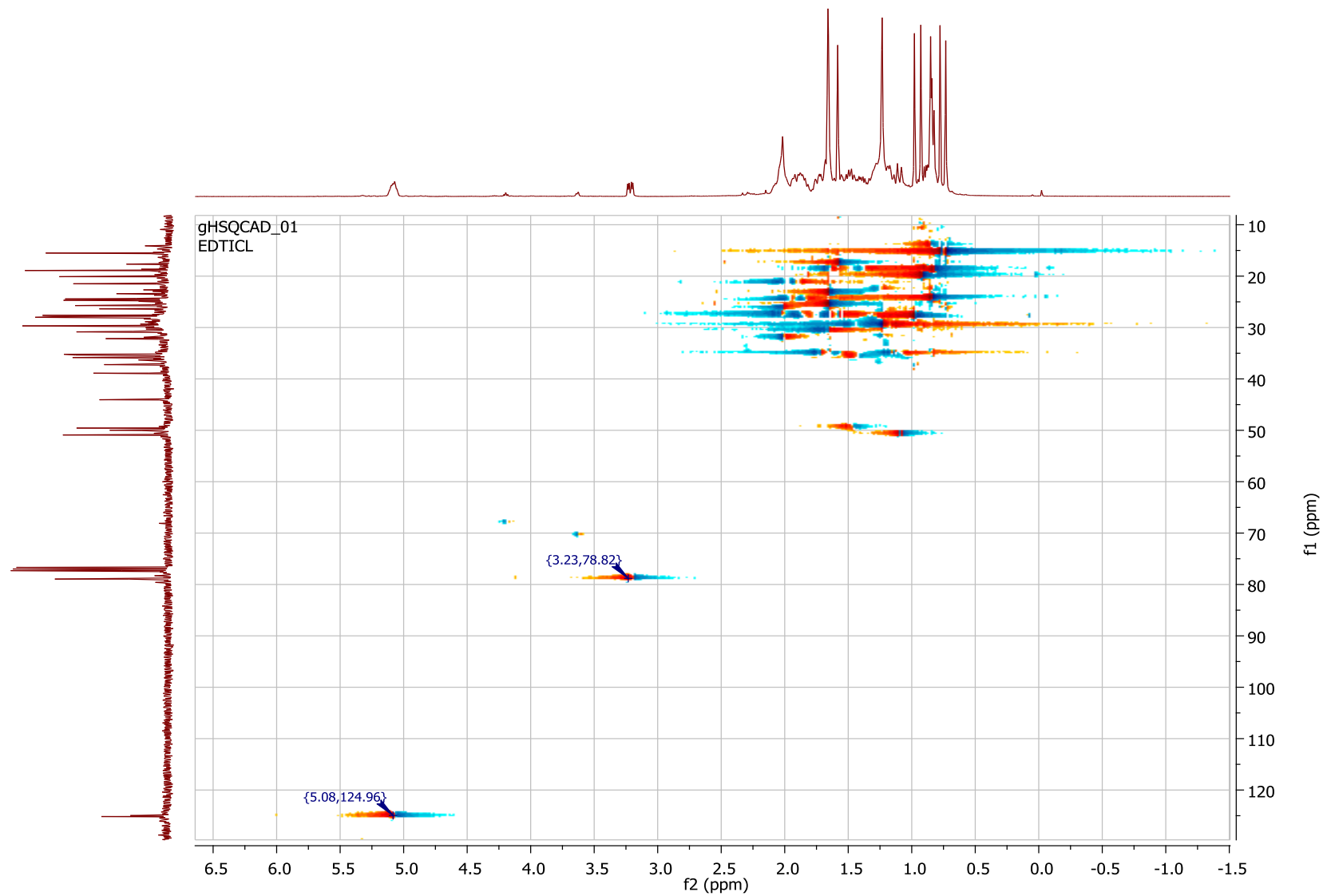


Figura 8A: Espectro HSQC do extrato bruto do látex de *E. tirucalli*

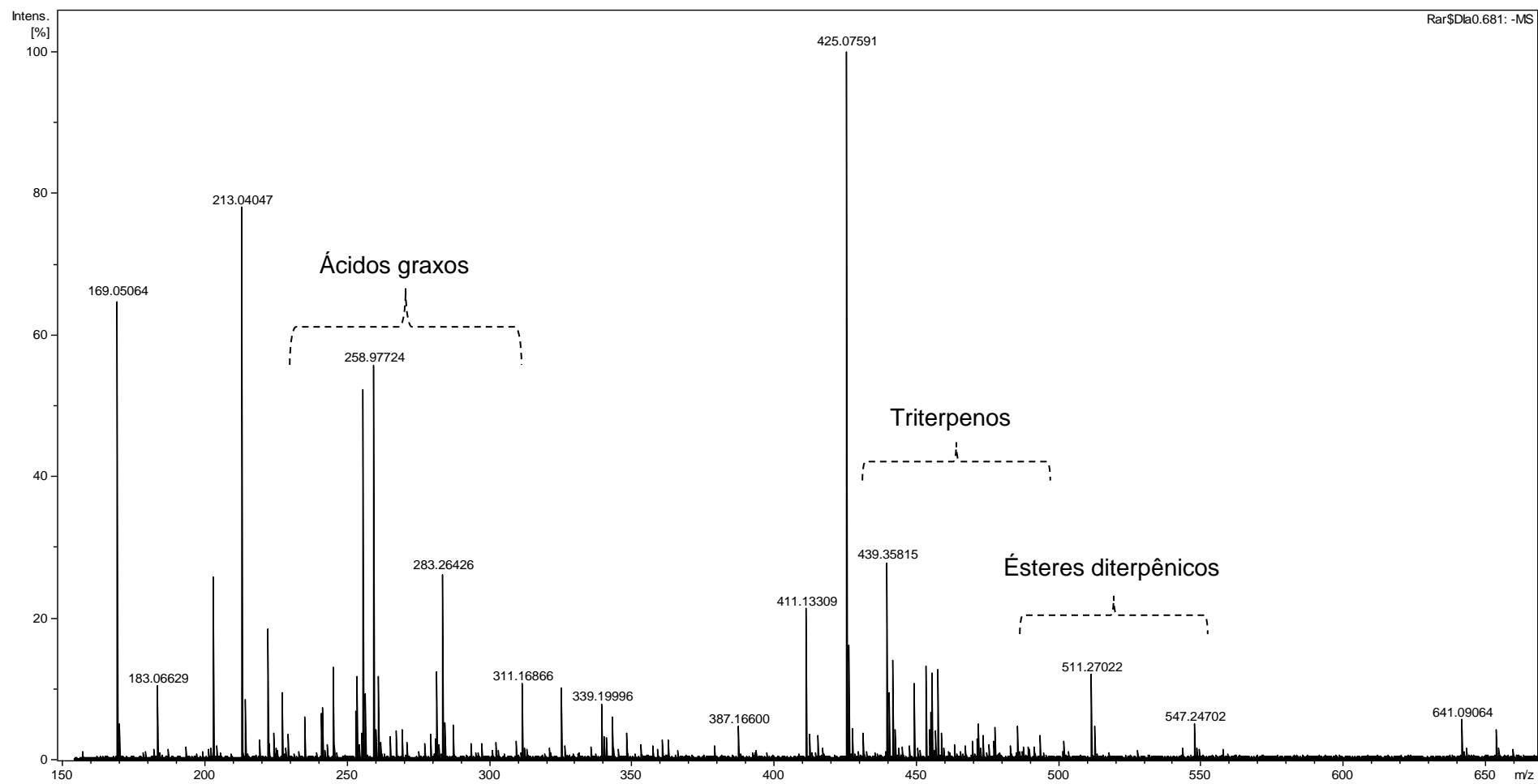


Figura 9A: Espectro de ESI(-) FT-ICR MS do látex de *E. tirucalli*

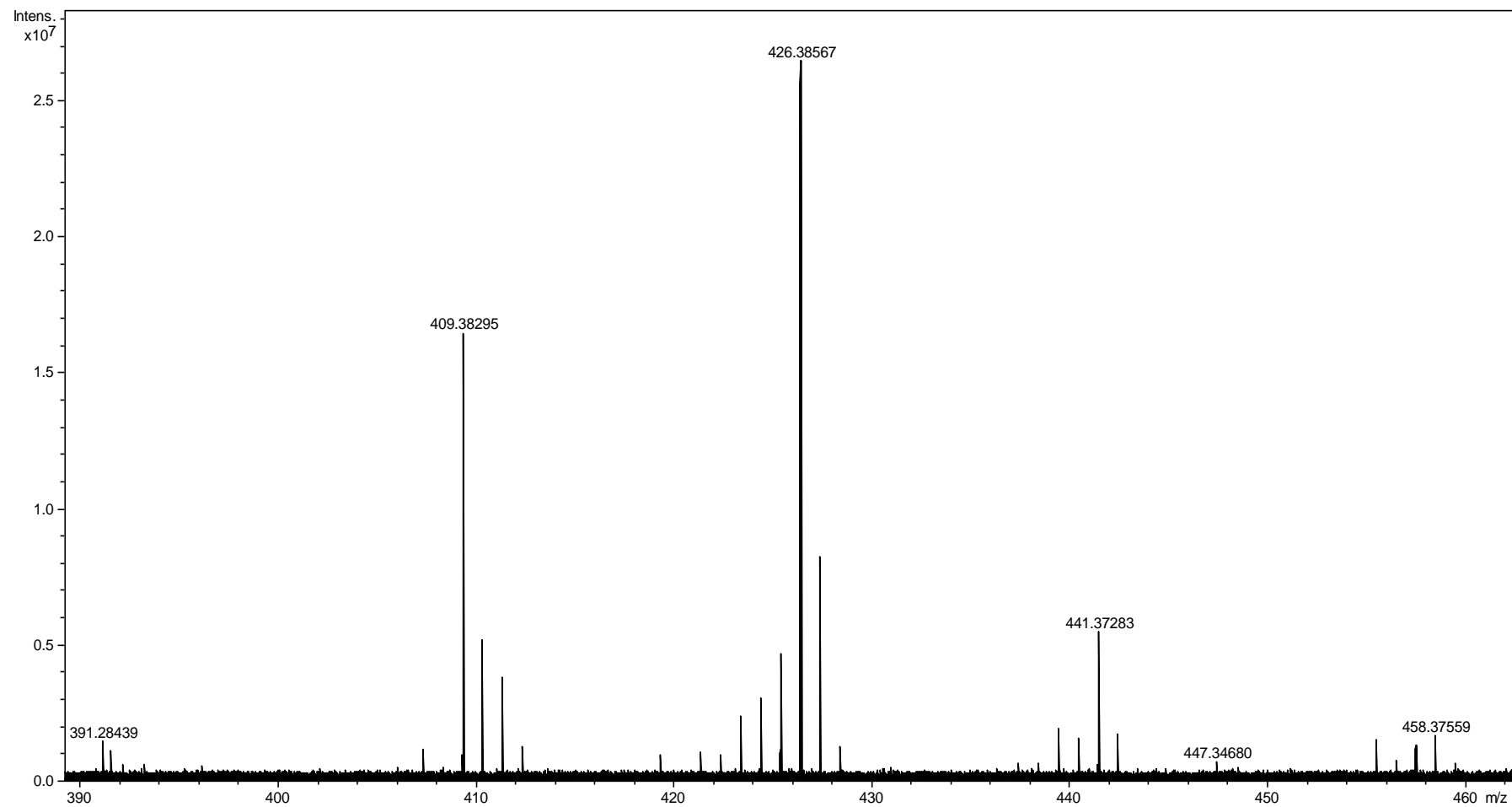


Figura 10A: Espectro de APCI(+)-FT-ICR MS da fração hexânica do látex de *E. tirucalli*

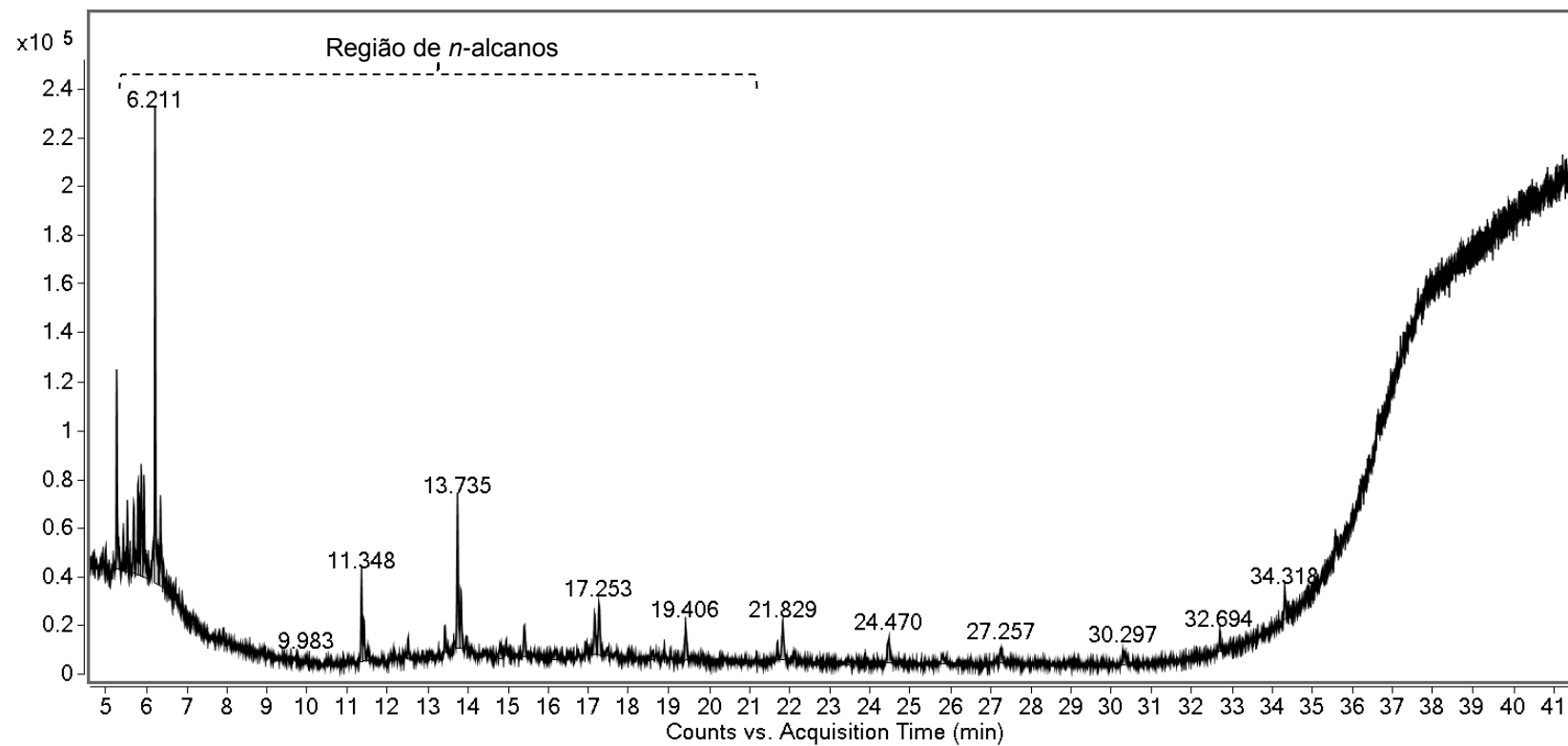


Figura 11A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 1^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

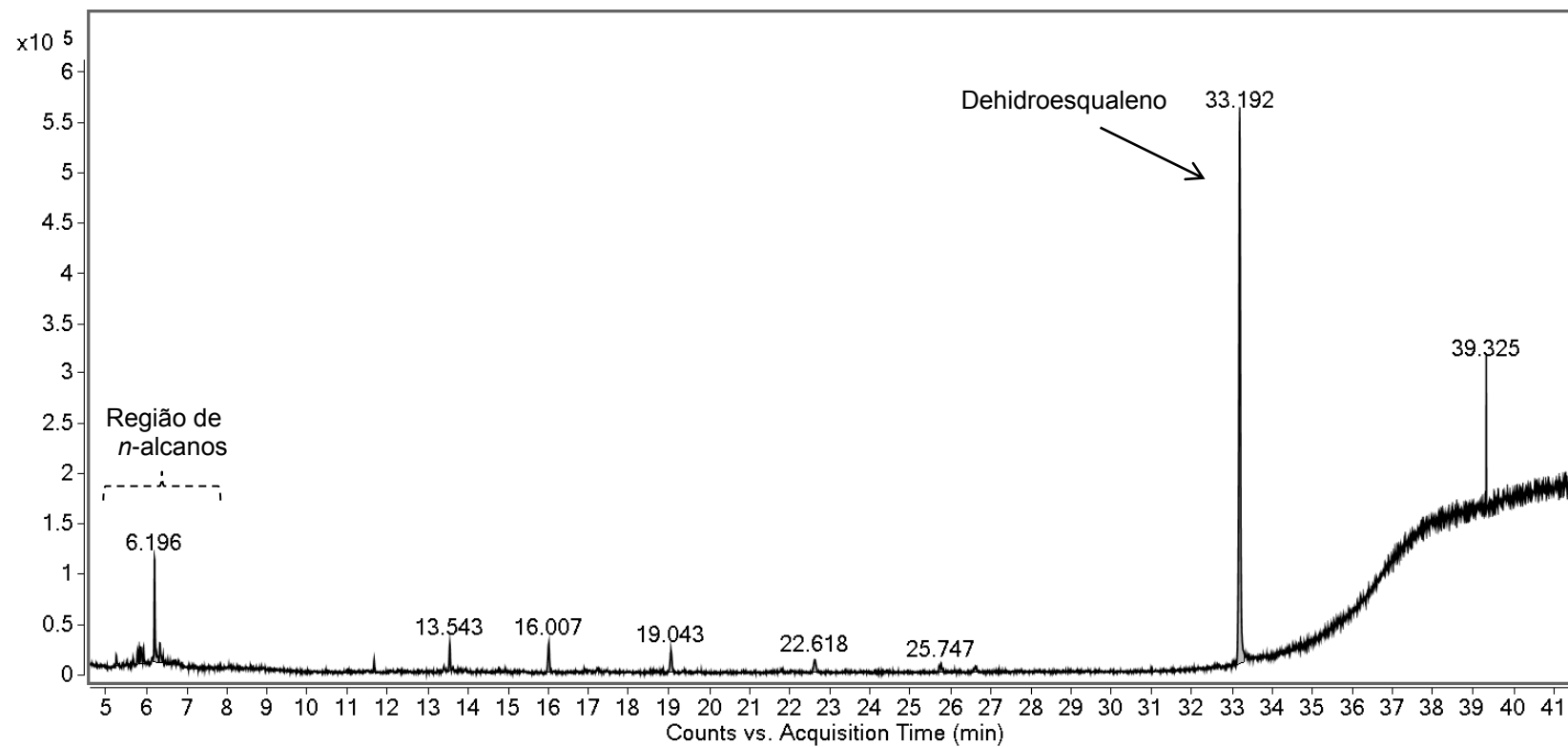


Figura 12A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 2^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

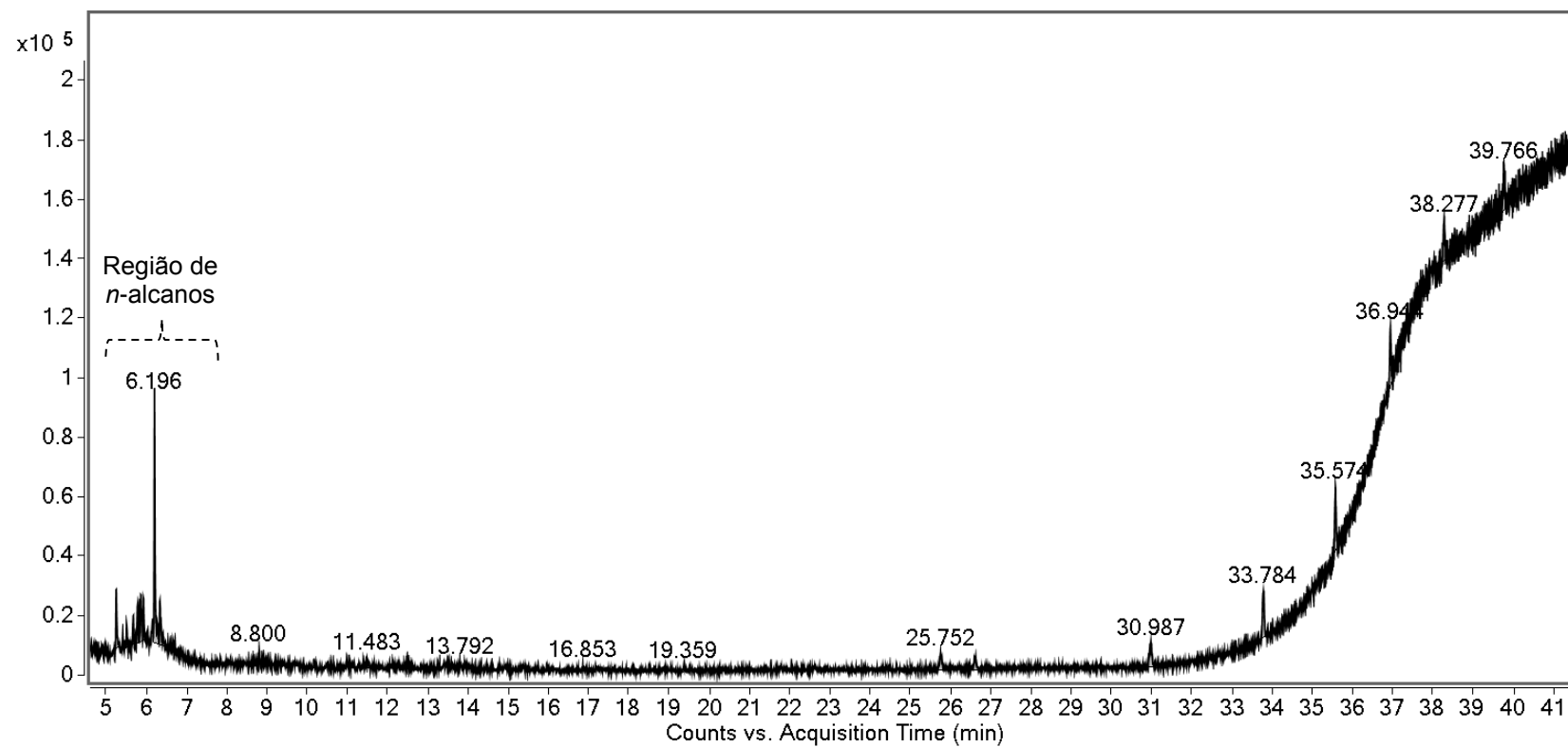


Figura 13A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 3^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

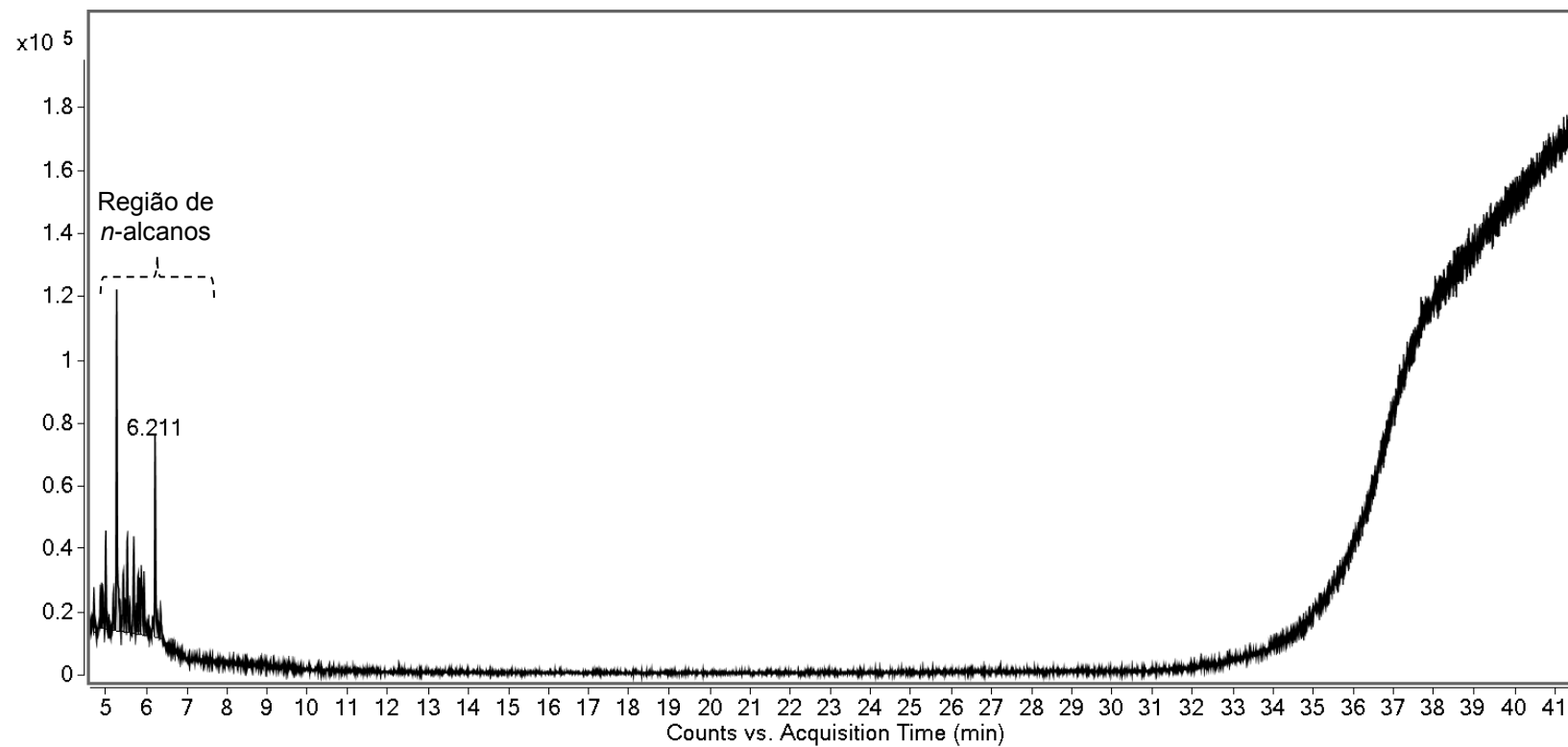


Figura 14A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 4^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

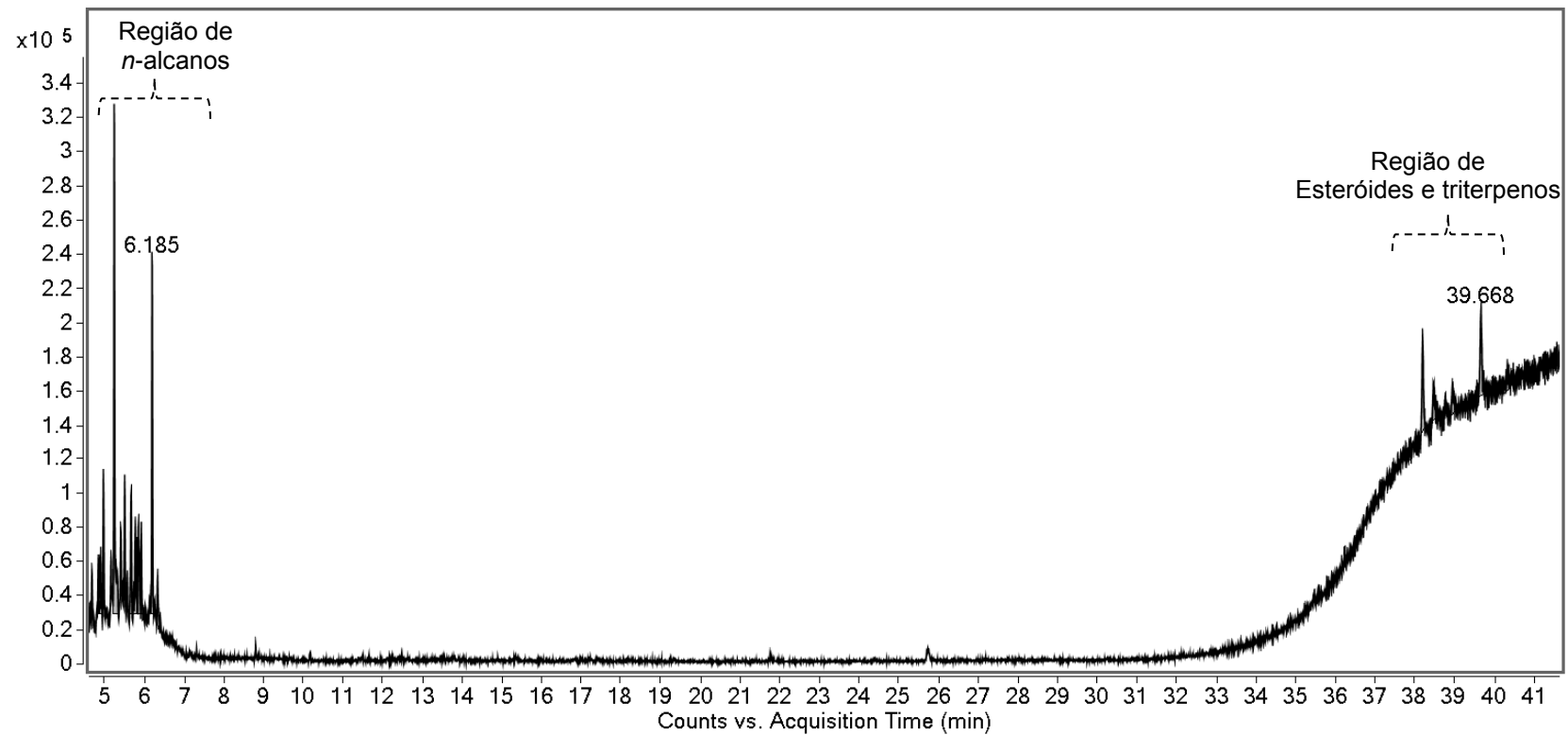


Figura 15A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 5^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

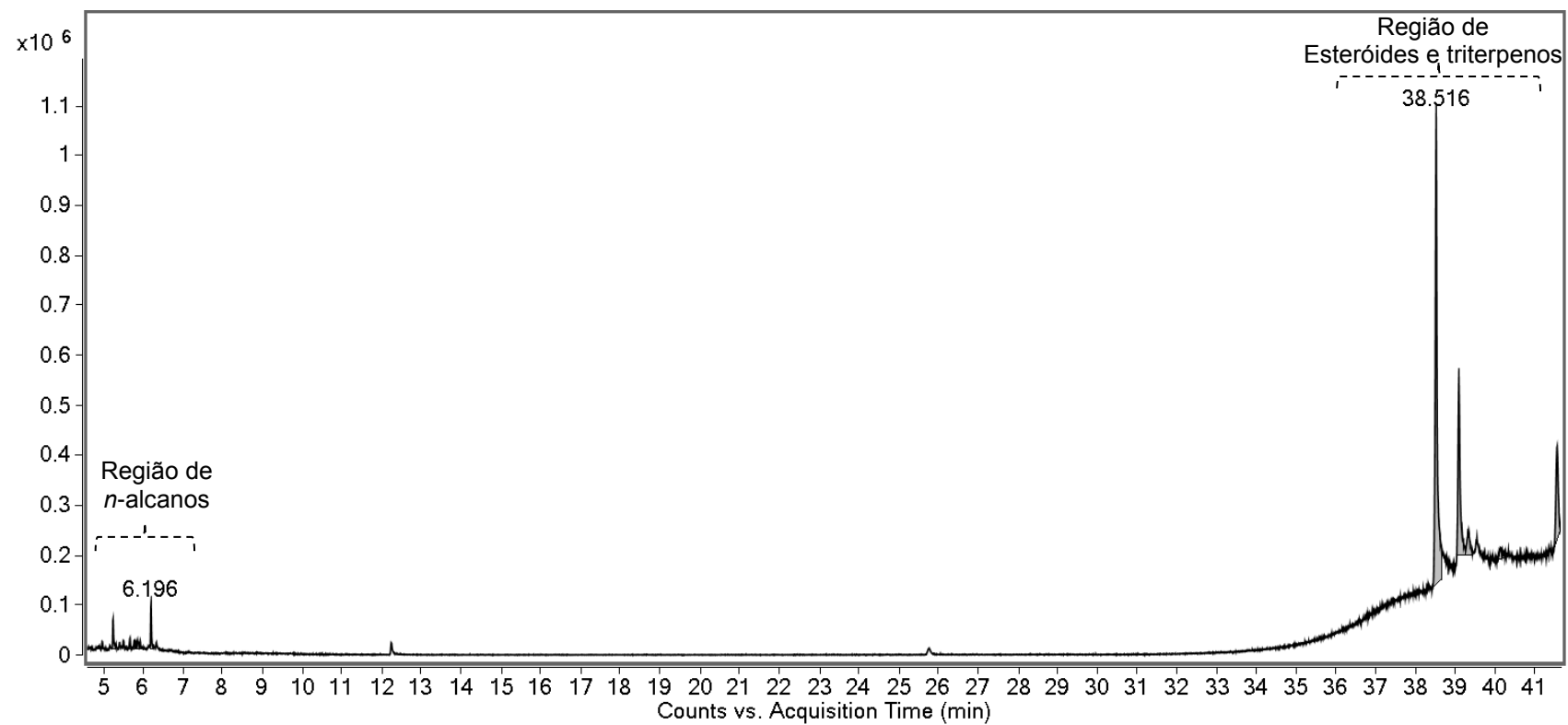


Figura 16A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 8^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

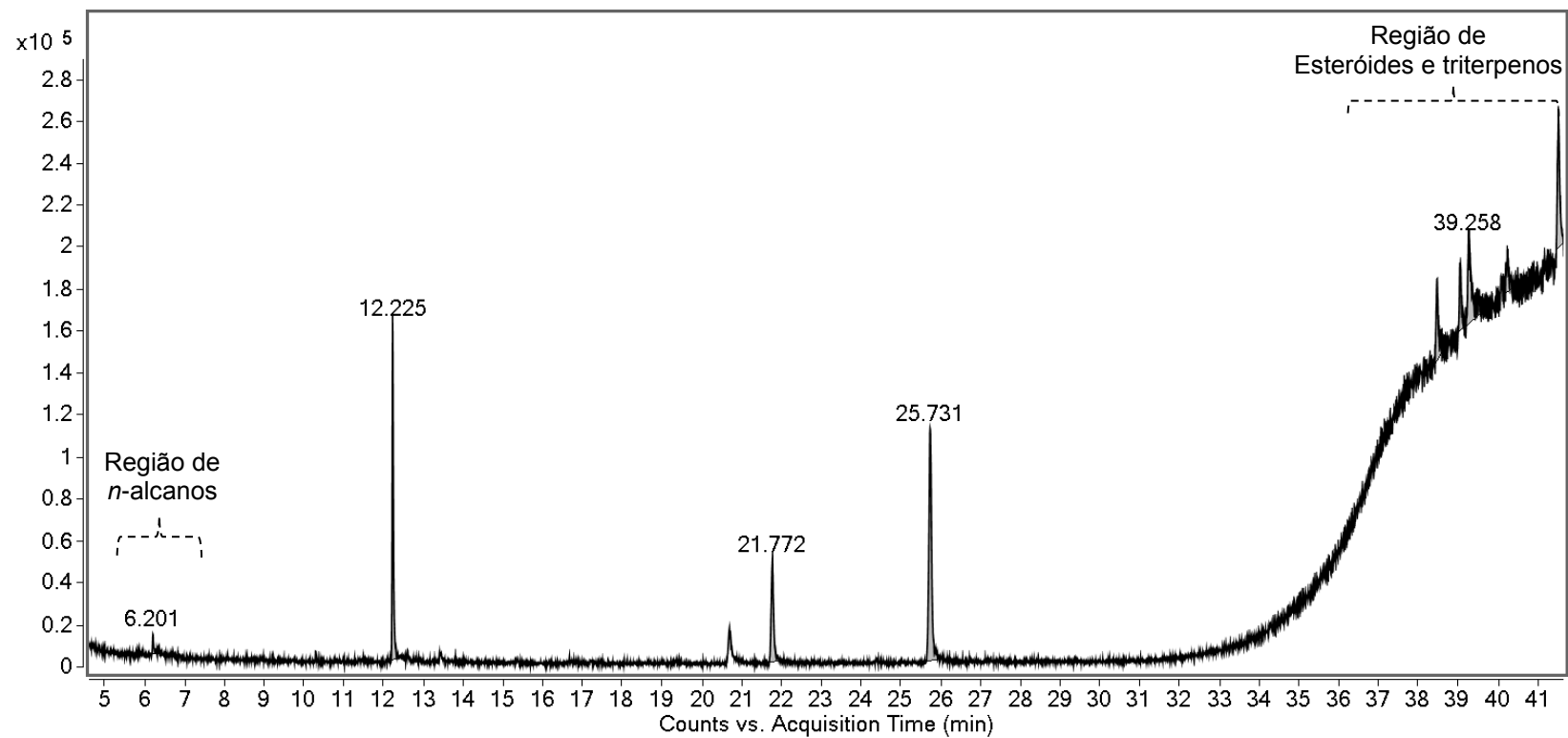


Figura 17A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 9ª fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

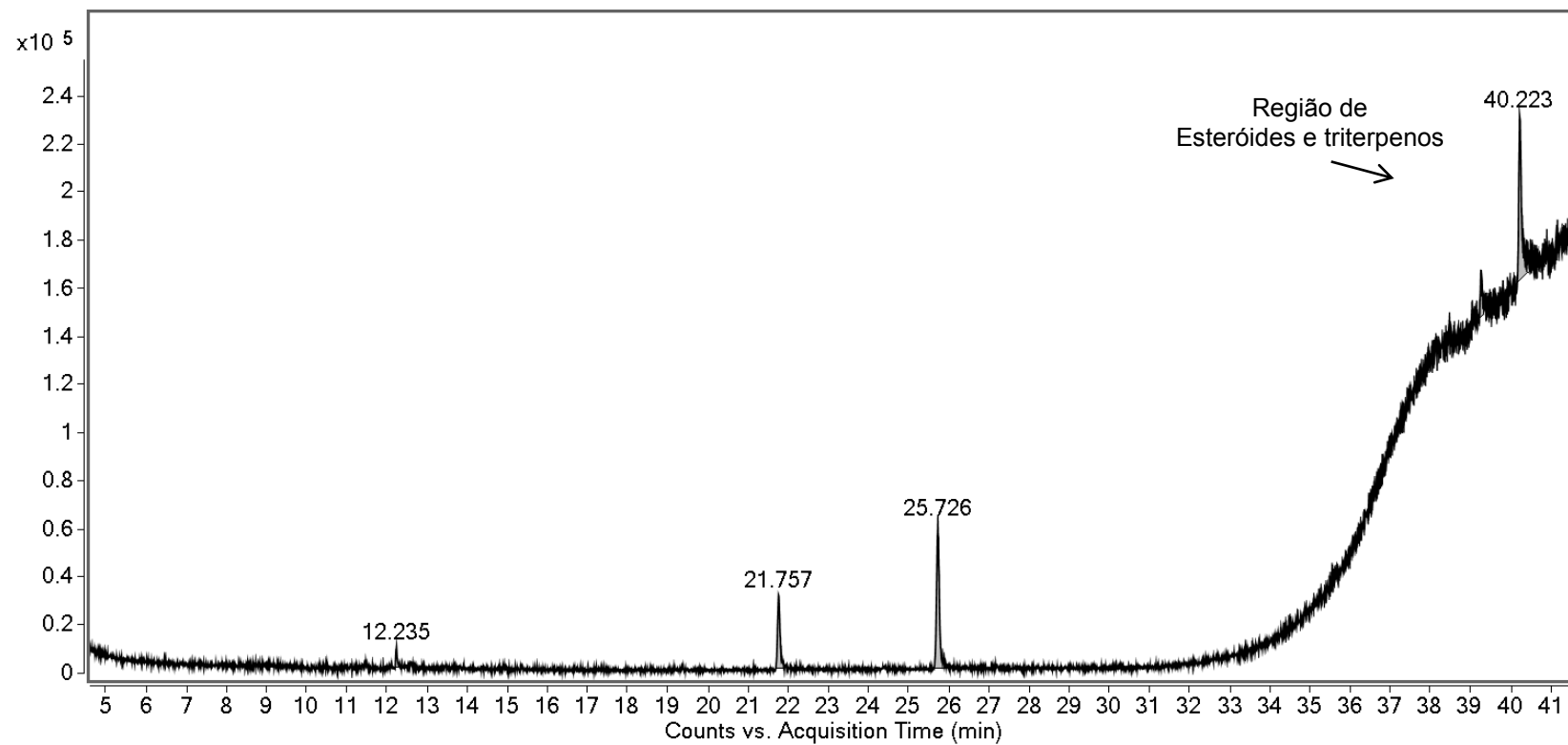


Figura 18A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 10^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

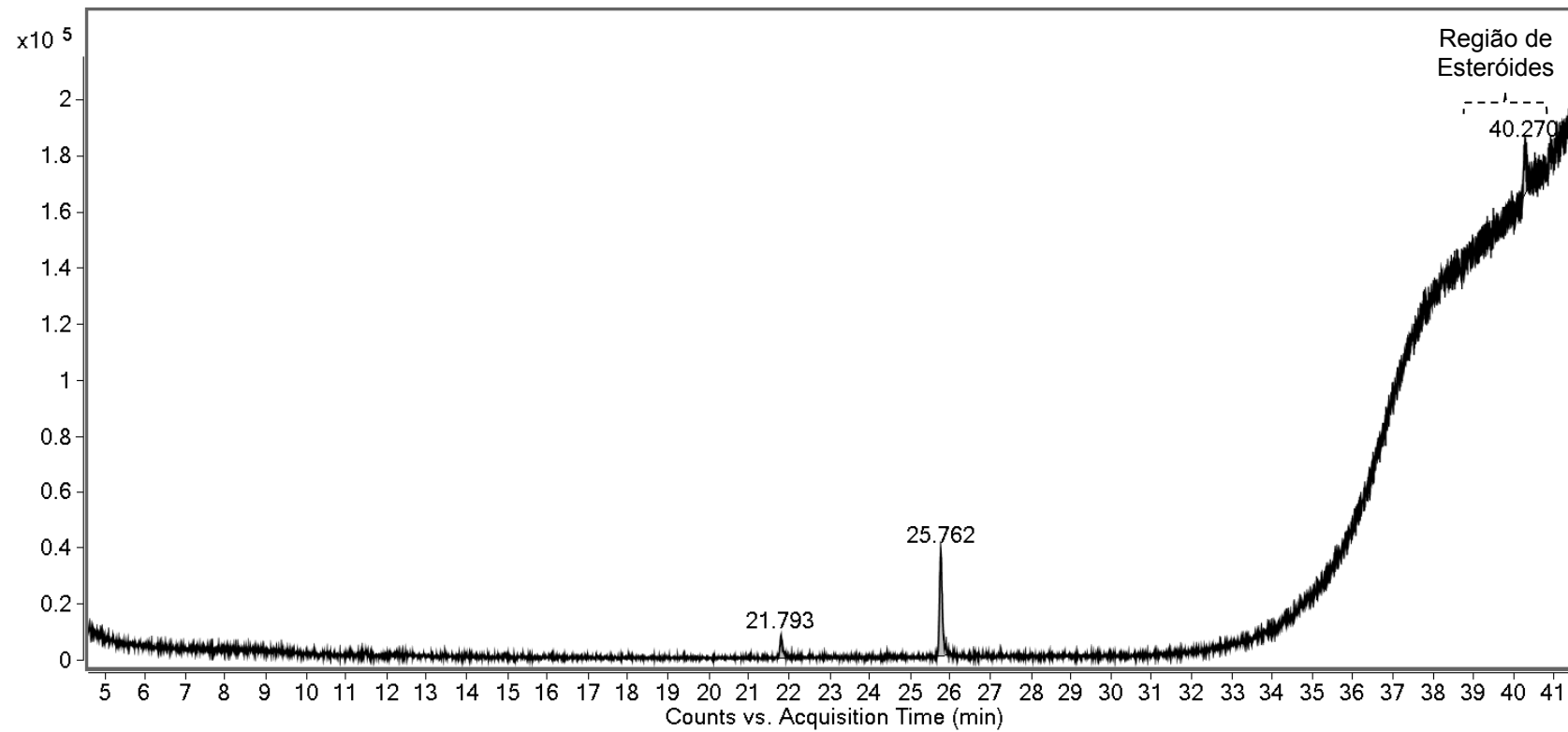


Figura 19A: Cromatograma obtido por CG-EM para a 11^o fração da cromatografia em coluna de sílica-gel do látex bruto de *E. tirucalli*

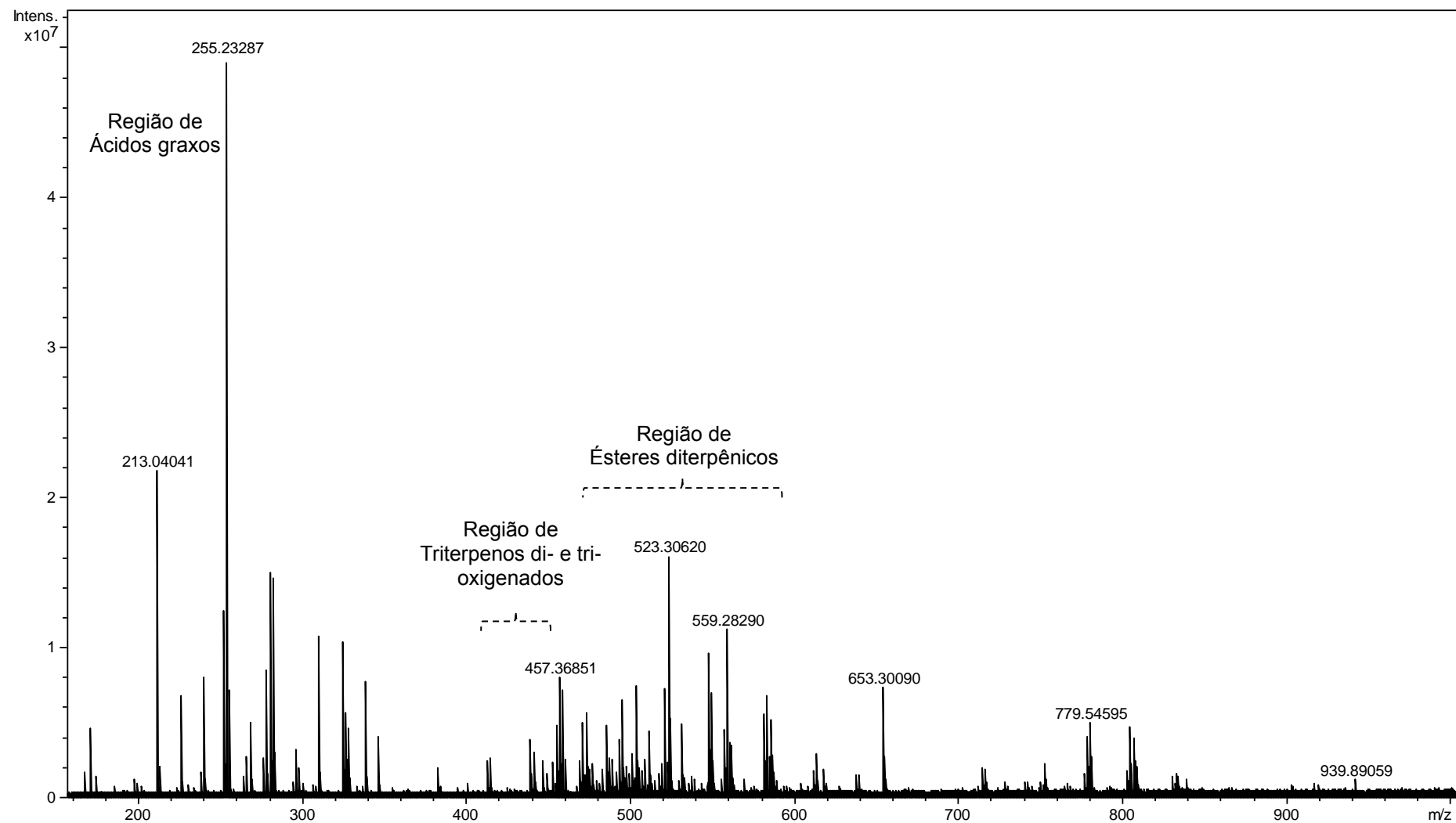


Figura 20A: Espectro de massas ESI(-) FT ICR MS para a 12^o fração obtida por cromatografia em coluna por sílica-gel

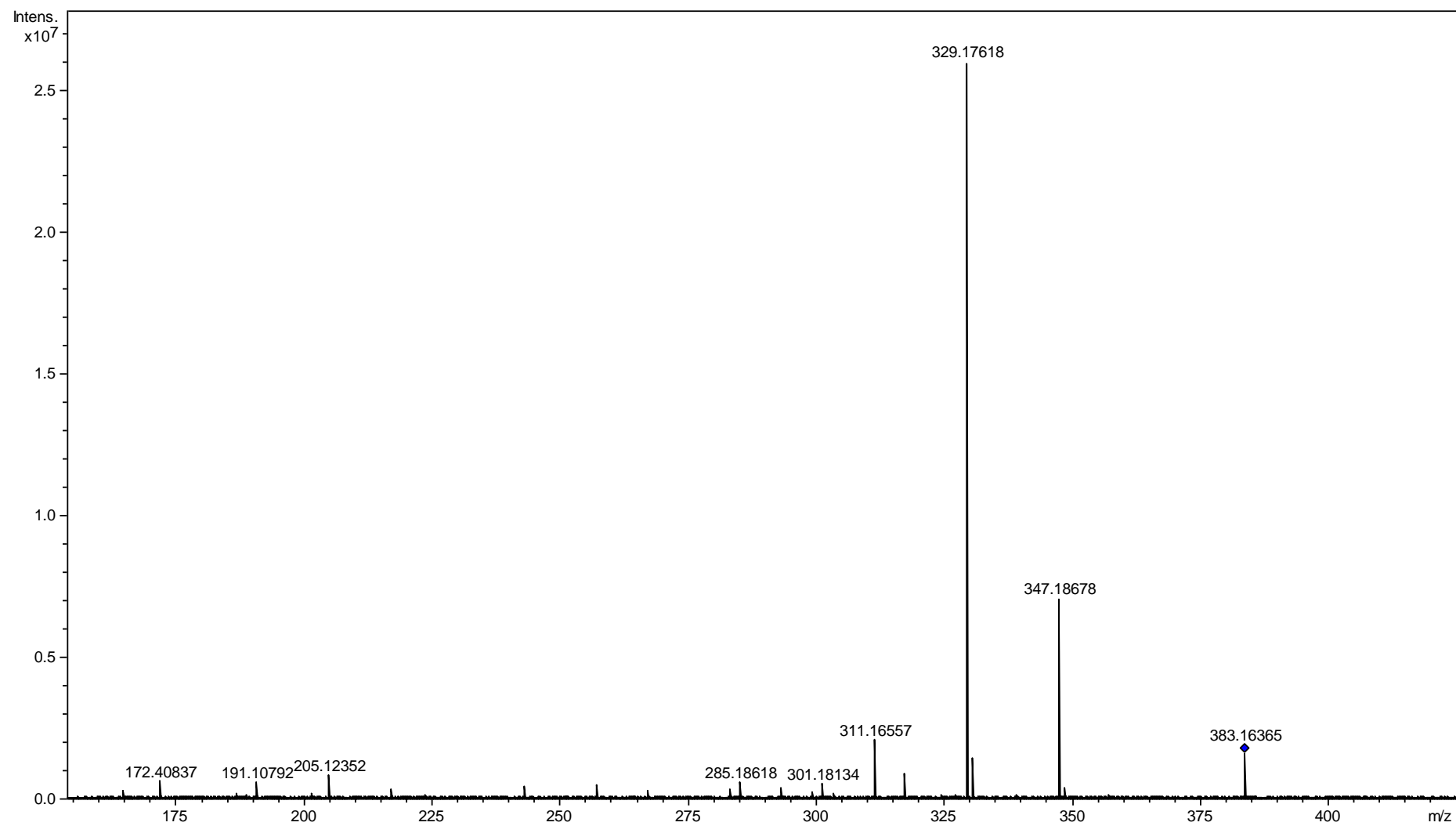


Figura 21A: ESI (-) FT-ICR MS/MS para o íon [M+Cl]⁻ m/z 383

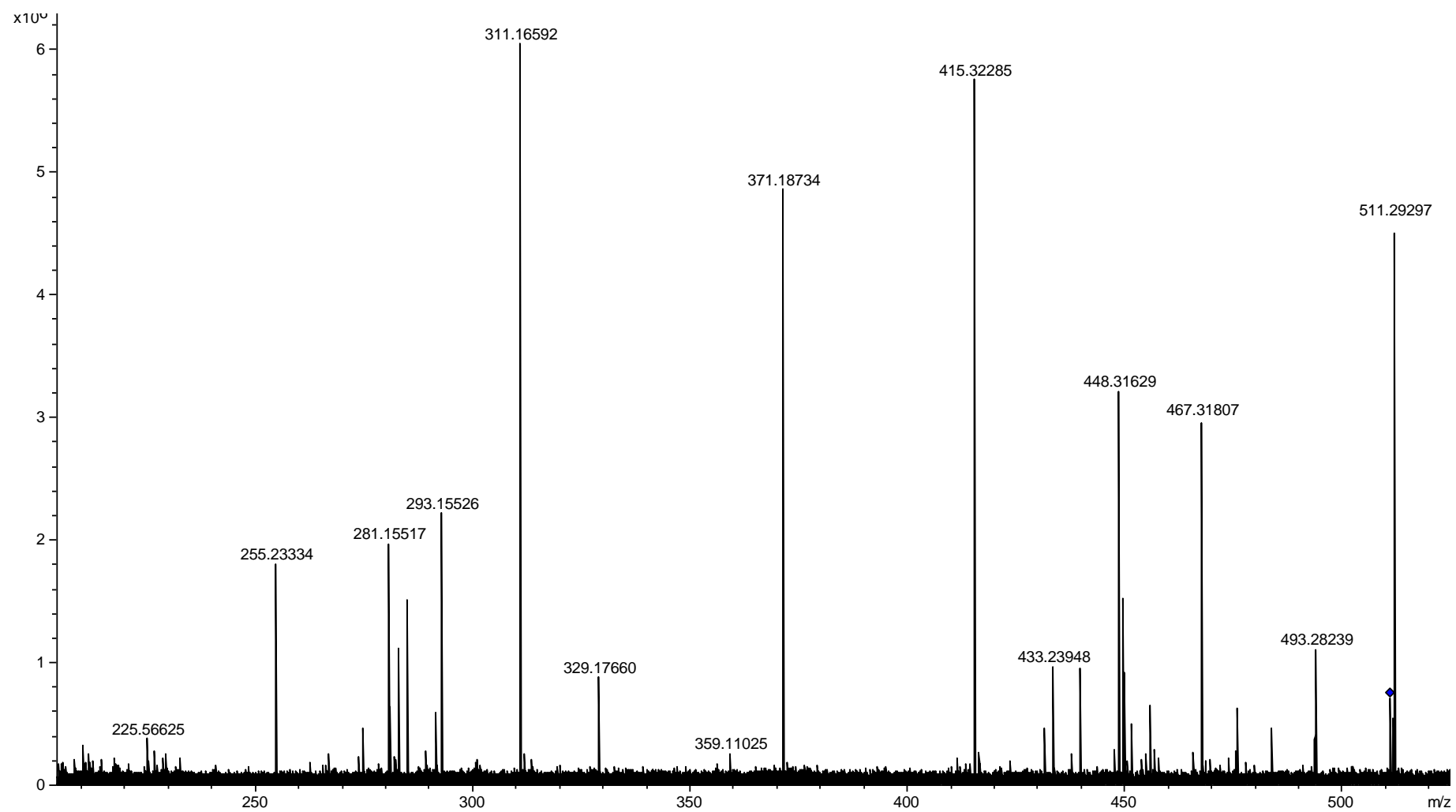


Figura 22A: ESI (-) FT-ICR MS/MS para o íon m/z 511

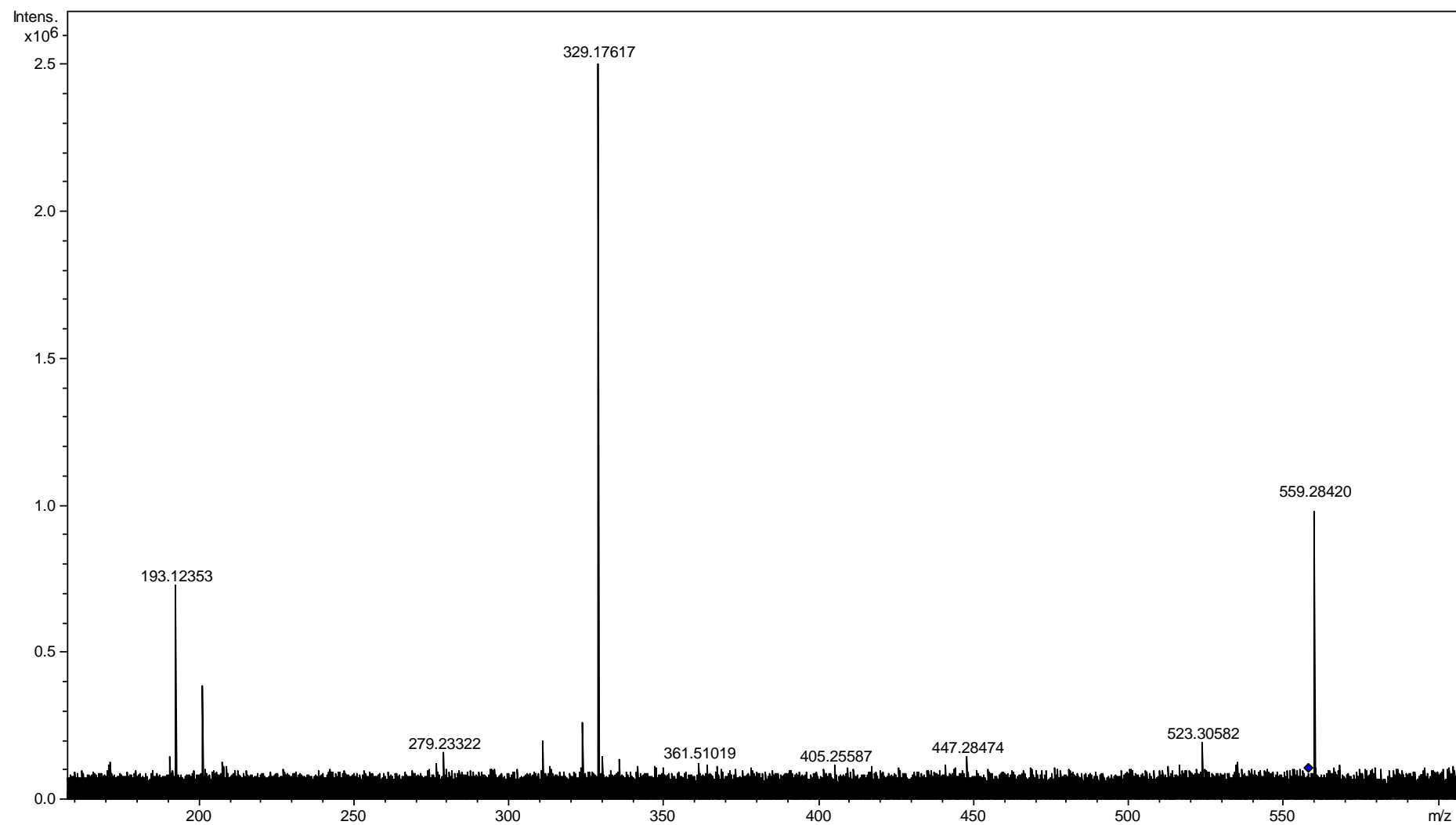


Figura 23A: ESI (-) FT-ICR MS/MS para o íon m/z 559