



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LARISSA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPONENTES DO LÁTEX DE
ESPÉCIES DE APOCYNACEAE

FORTALEZA

2024

LARISSA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPONENTES DO LÁTEX DE
ESPÉCIES DE APOCYNACEAE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F936c Freitas, Larissa Barbosa Nogueira.
Caracterização físico-química de componentes do látex de espécies de Apocynaceae / Larissa Barbosa Nogueira Freitas. – 2024.
104 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
1. Borracha natural. 2. Partículas de borracha. 3. Cis-1,4-poliisopreno. 4. Cristais de cálcio. 5. Látex vegetal. I. Título.

CDD 572

LARISSA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPONENTES DO LÁTEX DE
ESPÉCIES DE APOCYNACEAE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dr. Brandon Ferraz e Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha família.

Ao Prof. Dr. Márcio Viana Ramos, pela orientação ao longo de todos esses anos de pós-graduação.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Plantas Laticíferas, onde desenvolvi os projetos de mestrado e doutorado com orientação do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

A todos os membros do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da UFC, que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste projeto.

A professores, técnicos e alunos do Departamento de Física e da Central Analítica da UFC, que ajudaram no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos professores Odair Pastor Ferreira e Antônio Gomes Souza, pela colaboração nas análises realizadas com o equipamento Zetasizer no Departamento de Física.

A Thiago Moura, pela colaboração nas análises de espectroscopia Raman da Central Analítica.

Ao professor Jeanlex Soares de Sousa e sua aluna Isis, pela colaboração nas análises por Microscopia de Força Atômica.

Ao professor José Marcos Sasaki e a Pós Doutoranda Clara pela colaboração nas medidas de fluorescência de raios-X.

Ao professor Alejandro Pedro Ayala, do Laboratório de Cristalografia Estrutural do departamento de Física da UFC, por realizar os ensaios de difração de raios-X e por toda a sua colaboração nas análises e refinamento das estruturas dos cristais.

A professora Sandra de Aguiar Soares, ao técnico Wesley Rocha e ao Pós Doutorando Johnny Peter, do Laboratório de Ligantes Asfálticos do Departamento de Engenharia de Transportes, pela colaboração nas análises de reologia.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), por todo suporte necessário no desenvolvimento deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro.

RESUMO

As espécies vegetais *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* e *Himatanthus drasticus* apresentam um sistema celular formado por células especializadas, denominadas de laticíferos. Além da variedade de metabólitos produzidos nessas células, ocorre a formação de partículas de borracha (PBs), que ficam em suspensão no látex. Essas partículas agregam alto valor comercial ao látex de *Hevea brasiliensis*, que tem sido, até o momento, a única fonte de borracha natural (BN) para o setor industrial. BNs também são produzidas a partir dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, no entanto, não há estudos publicados. Muito pouco é conhecido sobre a estrutura (tamanho, concentração, composição química e propriedades mecânicas) dessas PBs de outras espécies de plantas, além das de *H. brasiliensis*. Quanto às funções desempenhadas por essas partículas, nas plantas, não há dados consolidados. Este trabalho avaliou propriedades intrínsecas dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* e caracterizou suas respectivas PBs. Os látices foram avaliados na forma diluída e na forma íntegra. O potencial zeta dessas amostras exibiram baixos valores negativos e até valores positivos, indicando baixa estabilidade coloidal nas condições testadas. Estudos reológicos indicaram adaptações contra pequenos herbívoros e para a cicatrização de feridas na planta. Análises por AFM e MEV identificaram SRPs (PBs com diâmetro igual ou inferior a 0,4 μm) e LRPs (PBs com diâmetro igual ou superior a 0,5 μm) nos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*. A identificação de poliisopreno nos látices foi confirmada por espectroscopia de infravermelho e de Raman. Além disso, ao longo desse trabalho foi observado cristais no látex de *P. pudica*, os quais foram identificados como cristais de malonato de cálcio. Uma análise comparativa desses cristais foi realizada com outra espécie do gênero *Plumeria*, onde foi identificado cristais com anel de carbono na composição. Este trabalho fornece novas possibilidades de pesquisa sobre novas espécies de plantas fontes de BN. Pela primeira vez, BNs e PBs obtidas dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram avaliadas. Também foi o primeiro relato de cristais de malonato de cálcio e cristais de cálcio com anel de carbono em látex de plantas.

Palavras-chave: borracha natural; partículas de borracha; *cis*-1,4-poliisopreno; cristais de cálcio; látex vegetal.

ABSTRACT

The plant species *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* and *Himatanthus drasticus* have a cellular system formed by specialized cells, called laticifers. In addition to the variety of metabolites produced in these cells, rubber particles (RPs) are formed, which remain suspended in the latex. These particles add high commercial value to the latex from *Hevea brasiliensis*, which has been, to moment, the only source of natural rubber (NR) for the industrial sector. NRs are also produced from the latices of *C. procera*, *P. pudica* and *H. drasticus*, however, there are no published studies. Very little is known about the structure (size, concentration, chemical composition and mechanical properties) of these RPs from plant species other than those from *H. brasiliensis*. Regarding the functions performed by these particles in plants, there is no consolidated data. This work evaluated intrinsic properties of the latices from *C. procera*, *P. pudica* and *H. drasticus* and their PBs. The latices were evaluated in diluted and whole forms. The zeta potential of these samples exhibited low negative values and even positive values, indicating low colloidal stability in the conditions tested. Rheological studies indicated adaptations against small herbivores and for wound healing in the plant. AFM (Atomic Force Microscopy) and SEM (Scanning Electron Microscopy) analyzes identified SRPs (RPs with a diameter equal to or less than 0.4 μm) and LRPs (RPs with a diameter equal to or greater than 0.5 μm) in the latices from *C. procera*, *P. pudica* and *H. drasticus*. The identification of polyisoprene molecules in the latices was confirmed by infrared and Raman spectroscopy. Furthermore, throughout this work, crystals were observed in the latex of *P. pudica*, which were identified as calcium malonate crystals. A comparative analysis of these crystals was carried out with another species of the genus *Plumeria*, where crystals with a carbon ring in their composition were identified. This work provides new possibilities for research into new plant species that are sources of NR. For the first time, NR and RP obtained from the latices of *C. procera*, *P. pudica* and *H. drasticus* were evaluated. It was also the first report of calcium malonate crystals and carbon-ring calcium crystals in plant latex.

Keywords: natural rubber; rubber particles; *cis*-1,4-polyisoprene; calcium crystals; vegetable latex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Frações do látex fresco de <i>H. brasiliensis</i> após ultracentrifugação.....	17
Figura 2 -	Modelo simplificado de uma partícula de borracha.....	18
Figura 3 -	Modelo do complexo de biossíntese de moléculas de borracha associado a membrana de uma partícula de borracha.....	22
Figura 4 -	Vias de biossíntese de cadeias de poliisopreno em plantas.....	23
Figura 5 -	Morfologias de cristais de oxalato de cálcio de plantas.....	25
Figura 6 -	Imagens da planta <i>Calotropis procera</i> com alguns detalhes florais e látex exsudando.....	27
Figura 7 -	Imagens da planta <i>Plumeria pudica</i> com alguns detalhes florais e látex exsudando.....	28
Figura 8 -	Imagens da planta <i>Himatanthus drasticus</i> com alguns detalhes florais....	29
Figura 9 -	Imagens da planta <i>Plumeria rubra</i> com alguns detalhes florais e látex exsudando.....	29
Figura 10 -	Borrachas naturais obtidas a partir da coagulação ácida com ácido acético dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C).....	37
Figura 11 -	Sedimentação de componentes sólidos dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C).....	40
Figura 12 -	Imagens de microscopia óptica de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A, B, C e D), <i>Plumeria pudica</i> (E, F, G e H) e <i>Himatanthus drasticus</i> (I, J, K e L).....	41
Figura 13 -	Distribuição do diâmetro das partículas de borracha e de agregados dessas partículas de dispersões dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C).....	47
Figura 14 -	Teste de viscosidade de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A) e <i>Himatanthus drasticus</i> (B) processadas por centrifugação.....	49
Figura 15 -	Testes reológicos realizados com borracha natural de <i>Calotropis procera</i> (A, B e C) e de <i>Himatanthus drasticus</i> (D, E e F).....	51
Figura 16 -	Cruzamento nas curvas de G' e G'' na etapa de aquecimento de 25 °C a 90 °C do teste de <i>temperature sweep</i> realizado com borracha natural <i>Himatanthus drasticus</i>	52

Figura 17 -	Espectros do FTIR de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C).....	58
Figura 18 -	Espectros de Raman de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C).....	60
Figura 19 -	Imagens de AFM no modo tapping de partículas de borracha dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C).....	63
Figura 20 -	Frequência absoluta do diâmetro das partículas de borracha dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C).....	63
Figura 21 -	Imagens de AFM no modo tapping da solução de NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01% não sonicadas.....	64
Figura 22 -	Imagens de MEV de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C) diluídos em água destilada.....	65
Figura 23 -	Imagens de MEV de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C) diluídos em NaCl 0,15 M.....	66
Figura 24 -	Micrografias de MEV. Imagens de MEV e microanálise por EDS dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C) diluídos em água destilada.....	67
Figura 25 -	Imagens de MEV de partículas de borracha de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C) diluídos em água destilada.....	69
Figura 26 -	Imagens de MEV de partículas de borracha de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C) diluídos em NaCl 0,15 M.....	70
Figura 27 -	Frequência absoluta do diâmetro de partículas de borracha de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A) e <i>Plumeria pudica</i> (B) diluídos em água destilada.....	71
Figura 28 -	Frequência absoluta do diâmetro de partículas de borracha de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C) diluídos em NaCl 0,15 M.....	71

Figura 29 -	Imagens de MEV de borracha natural obtidas a partir da coagulação ácida dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B) e <i>Himatanthus drasticus</i> (C).....	73
Figura 30 -	Imagens de autofluorescência de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> (A), <i>Plumeria pudica</i> (B e C) e <i>Himatanthus drasticus</i> (D) obtidas por microscopia confocal.....	74
Figura 31 -	Exemplificação da coleta em triplicata dos látices de <i>Plumeria pudica</i> e <i>Plumeria rubra</i>	79
Figura 32 -	Morfologia de cristais identificados nos látices de <i>Plumeria pudica</i> e <i>Plumeria rubra</i>	81
Figura 33 -	Imagens de microscopia óptica dos cristais de <i>Plumeria pudica</i> ao longo de 96 horas.....	82
Figura 34 -	Imagens de microscopia óptica dos cristais de <i>Plumeria rubra</i> ao longo de 96 horas.....	83
Figura 35 -	Imagens de MEV de cristais identificados nos látices de <i>Plumeria pudica</i> (A) e <i>Plumeria rubra</i> (B).....	85
Figura 36 -	Estrutura molecular que compõe os cristais dos látices de <i>Plumeria pudica</i> e <i>Plumeria rubra</i>	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de pH, do conteúdo de sólidos totais, conteúdo de borracha seca e dos componentes não-borracha dos látices de <i>Calotropis procera</i> , <i>Plumeria pudica</i> e <i>Himatanthus drasticus</i>	37
Tabela 2 -	Diâmetro médio efetivo (Z-Average), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (ζ) de dispersões dos látices de <i>Calotropis procera</i> , <i>Plumeria pudica</i> e <i>Himatanthus drasticus</i>	46
Tabela 3 -	Bandas de absorção identificadas nos espectros FTIR de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> , <i>Plumeria pudica</i> e <i>Himatanthus drasticus</i> relativas aos modos vibracionais de <i>cis</i> -1,4-poliisopreno e <i>trans</i> -1,4-poliisopreno.....	59
Tabela 4 -	Bandas de absorção identificadas nos espectros Raman de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> , <i>Plumeria pudica</i> e <i>Himatanthus drasticus</i> relativas aos modos vibracionais de <i>cis</i> -1,4-poliisopreno e <i>trans</i> -1,4-poliisopreno.....	60
Tabela 5 -	Composição química de amostras dos látices de <i>Calotropis procera</i> , <i>Plumeria pudica</i> e <i>Himatanthus drasticus</i> , em porcentagem em massa, determinada por fluorescência de raios X.....	61
Tabela 6 -	Dados sobre a estrutura dos cristais do tipo areias cristalinas e prismáticos do látex de <i>Plumeria rubra</i> e do refinamento dessa estrutura.....	87
Tabela 7 -	Coordenadas atômicas e U_{eq} (\AA^2) de 2269012 (Número CCDC).....	101
Tabela 8 -	Comprimentos e ângulos de ligação de 2269012 (Número CCDC).....	101
Tabela 9 -	Ângulos de torção de 2269012 (Número CCDC).....	104

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Estruturas secretoras de plantas.....	14
1.2	Laticíferos.....	14
1.3	Látex vegetal.....	15
1.3.1	<i>Partículas de borracha.....</i>	17
1.3.2	<i>Lutóides e complexos de Frey-Wyssling.....</i>	19
1.3.3	<i>Soro-C.....</i>	20
1.4	Borracha natural.....	20
1.4.1	<i>Síntese de borracha natural.....</i>	22
1.5	Idioblastos.....	24
1.6	Cristais idioblásticos.....	24
1.7	Família Apocynaceae.....	26
1.7.1	<i>Calotropis procera.....</i>	26
1.7.2	<i>Plumeria pudica.....</i>	27
1.7.3	<i>Himatanthus drasticus</i>	28
1.7.4	<i>Plumeria rubra.....</i>	29
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivos gerais.....	31
2.2	Objetivos específicos.....	31
3	CAPÍTULO 1 - LÁTICES DE <i>Calotropis procera</i>, <i>Plumeria pudica</i> E <i>Himatanthus drasticus</i> COMO FONTES DE BORRACHA NATURAL.....	32
3.1	Procedimentos experimentais.....	33
3.1.1	<i>Material vegetal.....</i>	33
3.1.2	<i>Coleta do látex.....</i>	33
3.1.3	<i>Conteúdo de sólidos totais.....</i>	33
3.1.4	<i>Conteúdo de borracha seca</i>	34
3.1.5	<i>Componentes não-borracha.....</i>	34
3.1.6	<i>Sedimentação de componentes sólidos.....</i>	35
3.1.7	<i>Análise estatística.....</i>	35
3.1.8	<i>Análise por microscopia óptica.....</i>	35

3.2	Resultados e discussão.....	37
3.2.1	<i>Caracterização dos látices.....</i>	37
3.2.2	<i>Aspectos dos fluidos laticíferos observados com uso de microscopia óptica.....</i>	40
4	CAPÍTULO 2 - ESTUDO DO POTENCIAL ELÉTRICO E DAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DOS LÁTICES DE <i>Calotropis procera</i>, <i>Plumeria pudica</i> E <i>Himatanthus drasticus</i>.....	43
4.1	Procedimentos experimentais.....	44
4.1.1	<i>Material vegetal.....</i>	44
4.1.2	<i>Tamanho e potencial zeta de partículas de borracha.....</i>	44
4.1.3	<i>Propriedades Reológicas.....</i>	44
4.2	Resultados e discussão.....	46
4.2.1	<i>Tamanho e potencial zeta de partículas de borracha.....</i>	46
4.2.2	<i>Propriedades reológicas.....</i>	48
5	CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DAS PÁRTÍCULAS DE BORRACHA DOS LÁTICES DE <i>Calotropis procera</i>, <i>Plumeria pudica</i> E <i>Himatanthus drasticus</i>.....	54
5.1	Procedimentos experimentais.....	55
5.1.1	<i>Material vegetal.....</i>	55
5.1.2	<i>Caracterização de polímeros por espectroscopia.....</i>	55
5.1.2.1	<i>Espectroscopia de Infravermelho.....</i>	55
5.1.2.2	<i>Espectroscopia Raman.....</i>	55
5.1.3	<i>Fluorescência de Raios X.....</i>	56
5.1.4	<i>Microscopia de força atômica (AFM).....</i>	56
5.1.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	56
5.1.6	<i>Microscopia Confocal.....</i>	57
5.2	Resultados e discussão.....	58
5.2.1	<i>Espectroscopia de Infravermelho.....</i>	58
5.2.2	<i>Espectroscopia Raman.....</i>	59
5.2.3	<i>Fluorescência de Raios X.....</i>	61
5.2.4	<i>Microscopia de força atômica (AFM).....</i>	62
5.2.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	64
5.2.6	<i>Microscopia Confocal.....</i>	74

5.3	Conclusão.....	76
6	CAPÍTULO 4 - CRISTAIS DE CÁLCIO NOS LÁTICES DE <i>Plumeria pudica e Plumeria rubra</i>	78
6.1	Procedimentos experimentais.....	78
6.1.1	<i>Material vegetal e coleta do látex</i>	78
6.1.2	<i>Microscopia óptica</i>	78
6.1.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	79
6.1.4	<i>Difração de Raio-X</i>	79
6.2	Resultados e discussão.....	81
6.3	Conclusão.....	90
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A - DADOS CRISTALOGRAFICOS DE 2269012 (NÚMERO CCDC)	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estruturas secretoras de plantas

Plantas são organismos capazes de sintetizar uma rica variedade de substâncias. A natureza sésil desses organismos é uma das razões de disporem dessa diversidade de compostos químicos, os quais amplificam suas defesas naturais. Além disso, por conta dessa característica sésil, as plantas estão mais expostas as variações das condições ambientais. No entanto, as plantas compensam sua imobilidade com a sua capacidade de produzir uma diversidade de substâncias e estruturas que podem atuar nas mais variadas funções e protegê-la das condições adversas (Tissier, 2018, p. 73).

As estruturas especializadas que sintetizam essa variedade de compostos, as estruturas secretoras, podem ser classificadas de acordo com a sua localização na planta e podem ser denominadas de acordo com os produtos que sintetizam e exsudam (Crang; Lyons-Sobaski; Wise, 2018, p. 444). Conforme essa classificação, essas estruturas são denominadas de estruturas secretoras de superfície ou internas. Na primeira, os produtos sintetizados são liberados externamente sobre a superfície da planta, tais como os tricomas glandulares, nectários, hidatódios e as glândulas salinas (Crang; Lyons-sobaski; Wise, 2018, p. 444; Tissier, 2018, p. 73). Essas estruturas de superfície também podem armazenar os produtos sintetizados (Tissier, 2012, p. 52). Já nas estruturas secretoras internas, os produtos são liberados internamente em células e armazenados. Essas estruturas incluem canais e cavidades, como os canais resiníferos, os laticíferos e os idioblastos (Tissier, 2018, p. 74).

1.2 Laticíferos

Os laticíferos são células vegetais especializadas que sintetizam e armazenam látex. Essas células formam um sistema de estruturas secretoras internas, e o látex possui uma estreita relação com os mecanismos defensivos das plantas produtoras (Ramos *et al.*, 2019, p. 2). Foram relatadas 12.500 espécies de plantas produtoras de látex, abrangendo cerca de 43 famílias botânicas, sendo as angiospermas o principal grupo, com 41 famílias (Kekwick, 2001, p. 1; Teixeira; Marinho; Leme, 2020, p. 45).

Os laticíferos podem ser distinguidos em dois tipos principais, com base em seu desenvolvimento e morfologia geral: articulados e não articulados (Hagel; Yeung; Facchini, 2008, p. 631). Os laticíferos articulados, ou vasos laticíferos, são formados por múltiplas células

alinhas, em fileira única, as quais podem ter sua parede celular transversal intacta, ou tornar-se porosa ou ser totalmente degradada ao longo do desenvolvimento da planta. Nesta última condição, no qual há a fusão do protoplasto de células, os laticíferos articulados serão multinucleados. Em contrapartida, os laticíferos não articulados, são formados por uma única célula multinucleada que se alonga durante o crescimento da planta (Teixeira; Marinho; Leme, 2020, p. 28).

Esses dois tipos de laticíferos, articulado e não articulado, formam um sistema de ductos que pode se estender ao longo de todos os tecidos da planta, por meio do processo de ramificação e/ou através de células anastomosadas (Teixeira; Marinho; Leme, 2020, p. 29). A ramificação dos laticíferos é causada pelo crescimento de projeções laterais na parede celular, enquanto a formação de anastomoses é um processo que envolve a degeneração de partes da parede lateral dos laticíferos e das suas células adjacentes. Essas células adjacentes que são incorporadas aos laticíferos adquirem suas características celulares (Canaveze *et al.*, 2019, p. 143; Teixeira; Marinho; Leme, 2020, p. 29).

A distribuição dos laticíferos no corpo da planta facilita a liberação do látex em resposta à danos físicos. Essa característica assegura uma resposta rápida e local aos danos causados por herbívoros ou por outros fatores, demonstrando a importância dos laticíferos na defesa da planta sobre seus inimigos naturais (Ramos *et al.*, 2019, p. 2). Além disso, o látex detém uma variedade de metabólitos em sua composição com funções de defesa já bem estabelecidas (Ramos *et al.*, 2019, p. 11; Ramos *et al.*, 2020, p. 16). Logo, a importância desse sistema laticífero na defesa das plantas é reconhecida, no entanto, não há informações consolidadas sobre os mecanismos funcionais integrando toda a maquinaria química do látex.

1.3 Látex vegetal

O látex é um sistema coloidal e polifásico, que varia na aparência e na composição. É um fluido leitoso de cor variável, podendo ser branco, amarelo, castanho-amarelado, marrom ou transparente, dependendo da espécie de planta que o produz (Evert, 2006, p. 486; Konno, 2011, p. 1514). O látex corresponde ao conteúdo presente no protoplasto das células laticíferas e, portanto, possui em sua composição todas as estruturas subcelulares comuns às células vegetais, tais como mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de golgi, plastídios e vacúolos (Teixeira *et al.*, 2020, p. 31).

Esse fluido é reconhecido por armazenar uma variedade de metabólitos secundários e proteínas, e por ser uma excelente ferramenta na defesa contra herbivoria (Crang; Lyons-

Sobaski; Wise, 2018, p. 461; Konno, 2011, p. 1514; Ramos *et al.*, 2007, p. 356). Algumas das classes de metabólitos secundários já identificadas no látex são os flavonóides, alcalóides, cumarinas, esteróides, saponinas, polifenóis e os terpenóides (Ramos *et al.*, 2020, p. 5). Quanto à composição proteica, as principais proteínas solúveis encontradas são as proteases, oxidases, lectinas, proteínas de ligação à quitina, quitinases, glucosidases e fosfatases (Konno, 2011, p. 1514). Todos esses compostos têm suas funções descritas na literatura relacionadas aos mecanismos de defesa da planta contra insetos e animais herbívoros e/ou microrganismos patogênicos, além de serem comuns, também, em plantas não laticíferas (Konno, 2011, p. 1515; Ramos *et al.*, 2020, p. 5). Compostos inorgânicos, como cristais de oxalato e malato também podem estar em abundância em látices de plantas (Evert, 2006, p. 486).

A composição química do látex tem maior grau de diversidade quando comparado com outros tipos de exsudados de plantas, tais como mucilagem, floema, resina e óleo essencial (Abarca *et al.*, 2019). Além do que, é importante ressaltar que o perfil químico do látex pode ser diferente entre as espécies de plantas (Ramos *et al.*, 2019, p. 1).

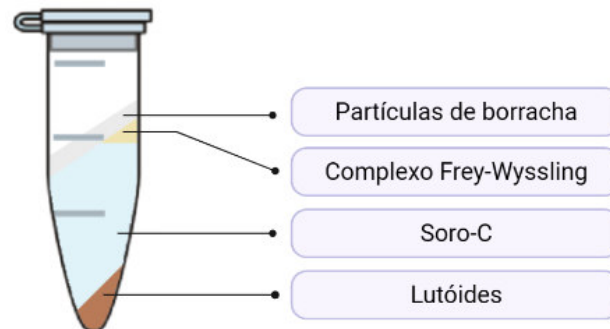
Outra propriedade do látex é o seu aspecto pegajoso. Quando esse fluido é liberado dos tecidos vegetais, ele sofre um processo de enrijecimento que lembra a coagulação sanguínea, e passa a ter um aspecto viscoso e grudento, semelhante ao de cola (Ramos *et al.*, 2019, p. 6). Essa característica traz uma grande vantagem às plantas laticíferas em relação à sua defesa contra o ataque de insetos herbívoros. A propriedade de aderência, identificada no látex exsudado, é bastante eficiente para conter pequenos insetos herbívoros, afetando o desempenho de seu aparelho bucal e dificultando que continue o processo de mastigação dos tecidos vegetais. Agindo como um selante, no local do dano tecidual, o látex também tem um efeito protetor contra a invasão por microrganismos. Essas características são particularidades do látex vegetal e é resultado da presença de partículas de borracha (PBs) em sua composição (Yamashita; Takahashi, 2020, p. 4).

As partículas de borracha ficam em suspensão no látex, mas não estão presentes em todas as plantas laticíferas. São essas partículas que agregam valor comercial aos látices, por torná-lo matéria prima na produção de borracha natural (BN).

Além das PBs, também estão presentes no látex os lutóides, as partículas do complexo de Frey-Wyssling, e a fase aquosa ou sérica, denominada de soro-C. No látex fresco de *Hevea brasiliensis*, principal fonte de borracha natural e de dados sobre essas partículas, é possível fracionar esses quatro componentes através da ultracentrifugação: PBs na fração superior (fase creme), partículas do complexo Frey-Wyssling e soro-C na fração intermediária

e lutóides na fração inferior sedimentada (Figura 1) (Yamashita *et al.*, 2018; Yamashita; Takahashi, 2020).

Figura 1 - Frações do látex fresco de *H. brasiliensis* após ultracentrifugação.



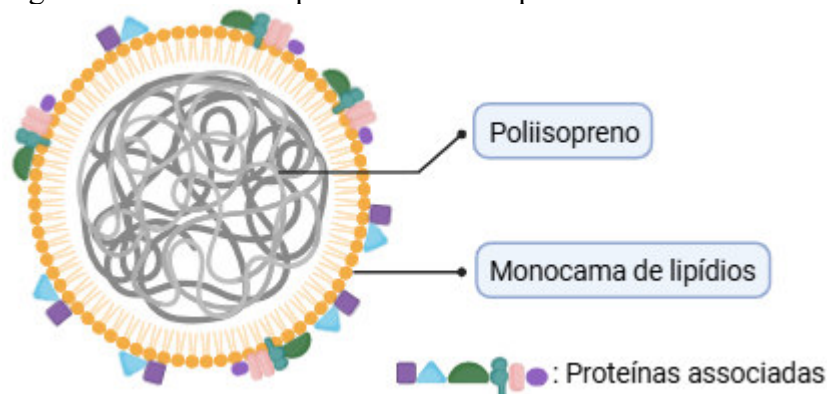
Fonte: elaborada pelo autor.

Entretanto, este protocolo não se aplica ao látex de outras espécies, o que infere que cada fluido laticífero tem propriedades intrínsecas próprias, reflexo de suas constituições qualitativas e quantitativas de elementos, o que justifica uma investigação de outros fluidos, além do que já foi estabelecido para o látex de *H. brasiliensis*.

1.3.1 Partículas de borracha

As PBs de látex vegetal são estruturas de formato esférico, com o centro hidrofóbico e superfície carregada negativamente. No centro hidrofóbico dessas partículas, estão as moléculas de borracha, que são cadeias de 1,4-poliisopreno de isomeria *cis* ou *trans*, envoltas por uma monocamada de lipídeos e de proteínas associadas, que conferem a carga negativa de sua superfície (Figura 2) (Wood; Cornish, 2000, p. 441; Yamashita; Takahashi, 2020, p. 824). Essas proteínas criam uma interface com o meio aquoso, conferindo estabilização dessas partículas no fluido. Uma estratégia que recorda a estrutura de lipoproteínas no sangue humano.

Figura 2 – Modelo simplificado de uma partícula de borracha.



Fonte: elaborada pelo autor.

O diâmetro das PBs é bastante variável entre plantas de espécies diferentes e até de mesmas espécies. Na *H. brasiliensis*, foi observado uma distribuição de tamanho bimodal, que foram classificadas pelos autores como grandes partículas de borracha (LRPs - *Large Rubber Particles*) as de diâmetro entre 0,20-0,35 μm , e pequenas partículas de borracha (SRPs - *Small Rubber Particles*) com diâmetro entre 0,08-0,19 μm (Wang *et al.*, 2016, p. 37). Já no trabalho de Sing *et al.* (2003, p. 987), foi observado PBs de *H. brasiliensis* que variavam de 0,08-0,75 μm de diâmetro. Nas espécies *Ficus carica* e *Ficus benghalensis* foram observados PBs com diâmetro maior, em relação as de *H. brasiliensis*. Em *F. carica*, as LRPs tinham diâmetro de 3,7-6,5 μm e as SRPs de 1,6-3,0 μm , enquanto *F. benghalensis* tinham LRPs de diâmetro de 3,0-6,0 μm e as SRPs de 1,6-2,3 μm (Sing *et al.*, 2003, p. 987).

A ocorrência de PBs de diferentes diâmetros no látex influencia nas propriedades mecânicas da borracha natural (*cis*-poliisopreno), tais como a elasticidade, viscosidade e resistência à tração, e essas características têm implicações para o uso industrial (Chan *et al.*, 2015, p. 256). A diferença nessas propriedades é reflexo da composição de proteínas e lipídios na monocamada/membrana das PBs (Chan *et al.*, 2015, p. 254).

Lípídeos extraídos da borracha natural de *H. brasiliensis* foram identificados e divididos em três classes: lipídios neutros, fosfolípídios e glicolípídios (Wadeesirisak *et al.*, 2017, p. 203). Os lipídios neutros identificados foram esteróis livres, ácidos graxos livres, γ -tocotrienol, triacilgliceróis e ésteres de esterol. Dentre os fosfolípídios, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e vestígios de lisofosfatidilcolina foram detectados. Os glicolípídios correspondiam à digalactosildiácilglicerol, estéril-glicosídeo, monogalactosildiácilglicerol e estéril-glicosídeo esterificado (Wadeesirisak *et al.*, 2017, p. 302).

Os fosfolípídios foram reportados como sendo os principais constituintes da monocamada de lipídios das PBs dos látices de *H. brasiliensis* e *Taraxacum kok-saghyz* (Bae

et al., 2020, p. 9). Tem sido sugerido que a composição lipídica das PBs pode ser afetada pelo ambiente intracelular, que sofre alterações à medida que a planta precisa se adaptar às condições de estresse (Bae *et al.*, 2020, p. 9).

Além disso, as principais proteínas presentes nas membranas das PBs, as proteínas de pequenas partículas de borracha (SRPP - *Small Rubber Particle Protein*) e os fatores de alongamento da borracha (REF - *Rubber Elongation Factor*), interagem de diferentes maneiras com as três classes de lipídios que compõem essa membrana. Essas interações podem estar relacionadas com os processos de coagulação das PBs (Wadeesirisak *et al.*, 2017, p. 207).

Tem-se sugerido que as SRPP1 interagem preferencialmente com a porção polar dos fosfolipídios e glicolipídios, e sua estrutura secundária não sofre alteração. As SRPP1 ficam mais próximo da superfície das PBs e sua adsorção na monocamada de lipídios ocorre de forma homogênea. Em contraste, a REF1, por ser mais hidrofóbica que a SRPP1, formam interações mais fortes com os lipídios. Além disso, REF1 induz a segregação de glicolipídios na monocamada e sua interação com os lipídios neutros lhes causa alterações na estrutura secundária, com o aumento/diminuição das α -hlices/ β folhas. Essa mudança na estrutura secundária de REF1 foi observada na formação de agregados densos, sugerindo que essa proteína pode ter um papel-chave na coagulação irreversível das PBs de *H. brasiliensis* (Wadeesirisak *et al.*, 2017, p. 208).

1.3.2 Lutóides e complexos de Frey-Wyssling

Os lutóides consistem em um tipo especial de plastídeo e são o segundo componente principal do látex de *H. brasiliensis*, representando até 20% do volume de látex (D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018, p. 23). Estes são estruturas vacuolares circundados por uma única membrana de fosfolipídios, composta quase exclusivamente por ácido fosfatídico, com 1-5 μm de diâmetro e são altamente osmossensíveis (Dupont *et al.*, 1976, p. 1215; D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018, p. 23). A composição de sua membrana confere aos lutóides cargas negativas, que por sua vez contribuem na estabilidade coloidal ao látex. Vale ressaltar, que o ácido fosfatídico não está presente na membrana das PBs (Dupont *et al.*, 1976, p. 1216).

O conteúdo interno dos lutóides é chamado de soro B e comporta íons e solutos, em especial Ca^{2+} e Mg^{2+} , que provoca a floculação (agregação) das PBs (D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018, p. 82). Os lutóides comportam também hidrolases ácidas, e por isso são comparados com lisossomos (D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018, p. 23). Além disso, os lutóides contêm uma série de proteínas relacionadas com a resistência da planta aos patógenos e doenças, biossíntese do

látex e da borracha, fotossíntese, e proteínas alergênicas (Dupont *et al.*, 1976, p. 1216; Habib *et al.*, 2017, p. 21). Esses compostos alergênicos reconhecidos pela União Internacional das Sociedades Imunológicas (IUIS), são identificados com os seguintes IUIS code: Hev b - 2, 4, 6 e 10, que correspondem a β -1,3-glucanase, glucosidase cianogênica, heveína e superóxido dismutase, respectivamente (Yeang *et al.*, 2002, p. 34).

As partículas do complexo de Frey-Wyssling são cromoplastos especializados, com formato mais ou menos esférico, envoltos por uma dupla membrana lipídica e com diâmetro que varia de 3-6 μ m (Gomez; Hamzah, 1989, p. 76; D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018, p. 19). Elas comumente se apresentam em clusters, por isso são denominadas de complexo (Gomez; Hamzah, 1989, p. 85). Essas partículas possuem carotenoides em sua composição, conferindo cor amarelada a borracha natural e ao látex. Estão presentes também em látices de cor branco, mas podem estar em menor quantidade (Gomez; Hamzah, 1989, p. 76; D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018, p. 19).

1.3.3 Soro-C

O soro-C consiste na fase aquosa do citoplasma dos laticíferos, onde todas as organelas estão suspensas e onde há uma grande variedade de enzimas do metabolismo celular sendo, portanto, a fração metabolicamente ativa do látex (Yeang *et al.*, 2002, p. 33). Nesse soro há compostos de diferentes classes químicas, tais como: proteínas, lipídios livres, carboidratos, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), aminoácidos e eletrólitos (D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018). Nele também estão presentes alergênicos reconhecidos pela IUIS, identificadas pelos IUIS code: Hev – 5, 7, 8 e 10, que correspondem a proteínas ácidas, homólogos de patatina, profilina e enolase, respectivamente (Yeang *et al.*, 2002, p. 34). O perfil de proteoma do látex de *H. brasiliensis* identificou 348 proteínas presentes apenas na fração do soro-C. Proteínas que são predominantes nas PBs também foram identificadas na fração do soro-C, tais como SRPP e REF (Wang *et al.*, 2018, P. 58).

1.4 Borracha natural

A BN consiste principalmente de polímeros formados por moléculas de *cis*-1,4-poliisopreno, chegando até a 98% em relação aos poliisoprenos de isomeria *trans*. O polímero é do tipo homogêneo formado de unidades repetidas de isopreno, o qual, por sua vez, é um metabólito formado no metabolismo secundário de plantas (Chouytan *et al.*, 2018, p. 236;

Yamashita; Takahashi, 2020, p. 2). Cerca de 2.500 espécies de plantas produzem BN, no entanto, a sua produção comercial em todo o mundo depende exclusivamente do látex extraído do caule da seringueira (*H. brasiliensis*), que pertence à família Euphorbiaceae (Bonner, 1991 *apud* Crang; Lyons-Sobaski; Wise, 2018, p. 493; Mooibroek; Cornish, 2000, p. 365).

Outras espécies de planta produzem polímero de borracha de isomeria trans, como *Palaquium gutta*, *Mimusops balata* e *Eucommia ulmoides*. Esses trans-1,4-poliisoprenos não são chamados de BN, são denominados de *gutta percha* e possuem propriedades físicas distintas a da BN, limitando o seu uso comercial (Yamashita; Takahashi, 2020, p. 2).

O volume e a qualidade da BN produzido por *H. brasiliensis* é economicamente viável, em relação a outras espécies produtoras de borracha. A BN é utilizada na produção de mais de 40.000 produtos, exercendo grande impacto na economia. Além disso, a qualidade da BN é superior à de outras borrachas, tais como a borracha composta por moléculas de trans-1,4-poliisopreno e a borracha sintética. Devido, especialmente, ao elevado peso molecular e a estrutura dos polímeros cis-1,4-poliisopreno, a BN possui propriedades que conferem a ela alto desempenho, como melhor resiliência, elasticidade, maior resistência à abrasão e ao impacto, dispersão eficiente do calor, e maleabilidade a baixas temperaturas (Cornish, 2001, p. 1124). Essas características únicas da BN a torna insubstituível em algumas produções que exigem matéria-prima de alta qualidade, como a de pneus de aeronaves e produtos médicos (Van Beilen; Poirier, 2007, p. 522; Yamashita; Takahashi, 2020, p. 3).

As culturas de *H. brasiliensis* são formadas em quase sua totalidade por clones, o que restringe sua diversidade genética (Cornish, 2001, p. 1124). A pouca diversidade genética torna essas culturas susceptíveis a patógenos, como infecções fúngicas (Cornish, 2017, p. 246). Além disso, a seringueira requer condições ambientais de crescimento rigorosas (clima subtropical) que impedem sua expansão para outras áreas geográficas, trabalhos manuais laboriosos de colheita, e sua BN possui elevada concentração de proteínas alergênicas (Van Beilen; Poirier, 2007, p. 524). Esses fatores têm motivado a busca por novas fontes de BN.

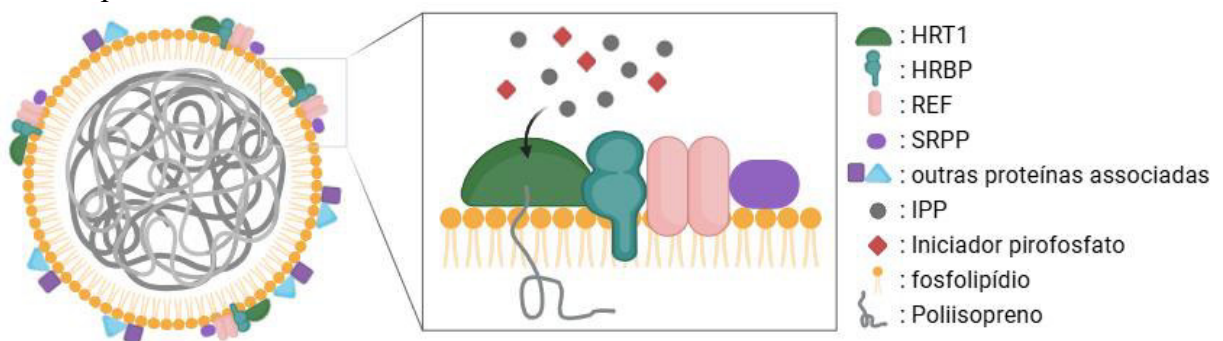
No entanto, para uma espécie ser considerada promissora na produção comercial de BN, ela deve produzir grandes quantidades de BN e esta deve ter elevado peso molecular, além de superar alguns dos fatores limitantes encontrados no cultivo de *H. brasiliensis*, tais com: adaptação a climas diferentes, de modo que facilmente seja possível a expansão de seus cultivos em áreas geográficas distintas, resistência a microrganismos patogênicos que possam afetar negativamente a produção de borracha e que tenham um menor conteúdo de proteínas alergênicas, ou que seja possível reduzir sua concentração no produto final da borracha.

1.4.1 Síntese de borracha natural

A síntese da BN ocorre na superfície das partículas de borracha suspensas no látex. Foi proposto que as PBs se originam do retículo endoplasmático (RE) ou do complexo de Golgi, por possuírem em sua estrutura elementos comuns do RE, tais como o REF, SRPP, proteína tipo *cis*-preniltransferase (CPTL - *cis-prenyltransferase-like protein*), clatrina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Men *et al.*, 2018, p. 5).

Além disso, um complexo proteico associado a membrana das PBs foi proposto como elemento específico na biossíntese da borracha (Figura 3). Esse complexo proteico é formado por transferase (HRT1 - *Hevea brasiliensis rubber transferase 1*), proteína de ligação HRT1-REF (HRBP - *HRT1-REF bridging protein*) e REF (Yamashita *et al.*, 2016, p. 18). A REF demonstrou exercer um papel de estabilização desses complexos nas membranas das PBs.

Figura 3 – Modelo do complexo de biossíntese de moléculas de borracha associado a membrana de uma partícula de borracha.



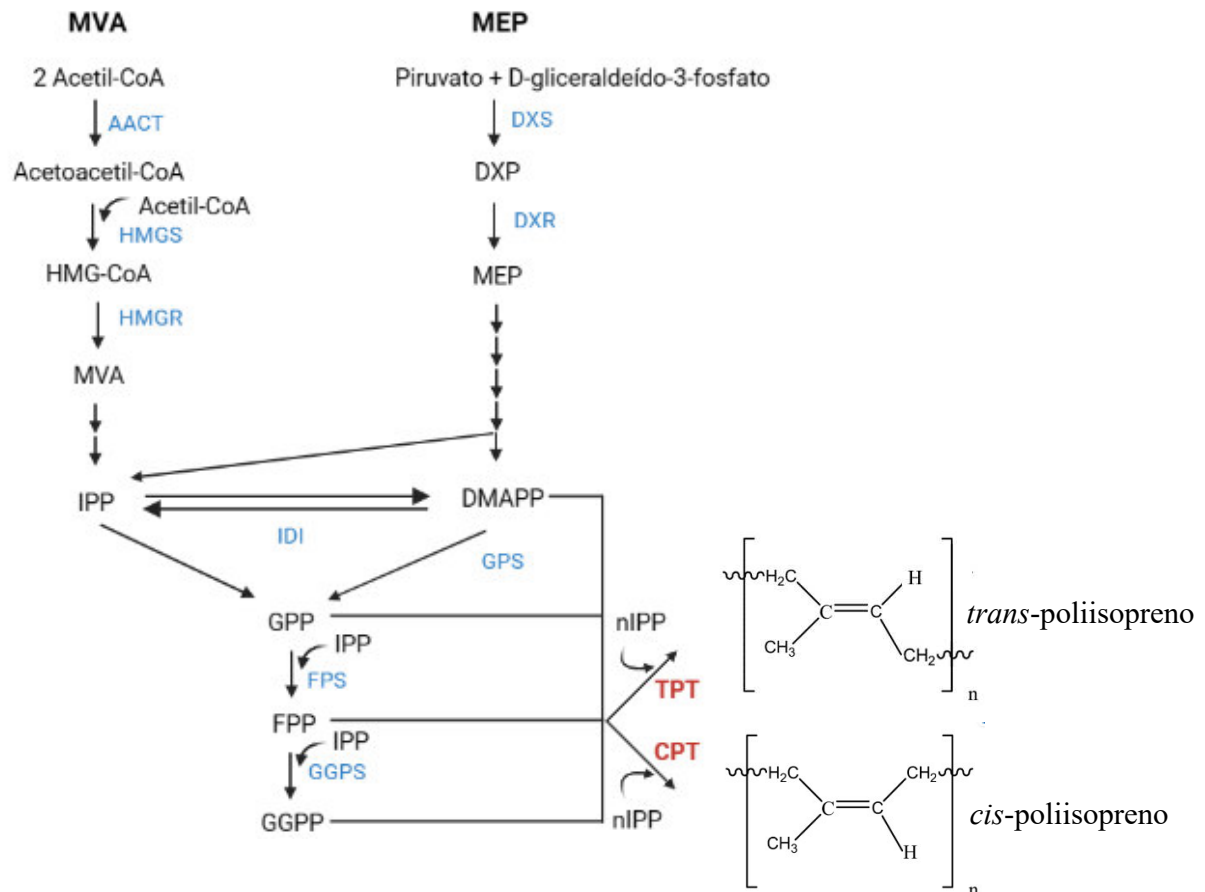
Fonte: elaborada pelo autor. Abreviaturas: HRT1, *Hevea brasiliensis rubber transferase 1*; HRBP, proteína de ligação HRT1-REF; REF, rubber elongation factor; SRPP, small rubber particle protein; IPP, isopentenil pirofosfato.

Vale ressaltar que SRPP e REF pertencem a uma família de proteínas relacionadas ao estresse da planta, sendo ambas os principais alérgenos identificados no látex de *H. brasiliensis*. Estão presentes, também, nos produtos da borracha natural e são denominadas de Hevb-3 e Hevb-1, respectivamente (Berthelot *et al.*, 2014, p. 7).

A borracha é constituída de monômeros de isopentenil pirofosfato (IPP), também chamado de isopentenil difosfato, e as reações envolvendo os eventos da biossíntese das cadeias de 1,4-poliisopreno são catalisadas pela transferase. Essa enzima requer cátions divalentes, tais como Mg^{2+} e Mn^{2+} (Men *et al.*, 2018, p. 2). Os monômeros de IPP empregados aqui são produzidos a partir das vias do mevalonato (MVA) e 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). A via MVA gera moléculas de IPP que podem ser convertidas em dimetilalil pirofosfato

(DMAPP) pela ação da IPP isomerase (IDI). Enquanto a via MEP gera ambas as moléculas, IPP e DMAPP, nas proporções de 5:1 a 6:1 (Figura 4) (Yamashita; Takahashi, 2020, p. 8).

Figura 4 – Vias de biossíntese de cadeias de poliisopreno em plantas.



Fonte: adaptado de Men *et al.* (2018, p. 3). Abreviaturas: MVA, melavonato; MEP, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato; AACT, Acetil-CoA C-acetiltransferase; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA; HMGS, HMG-CoA sintase; HMGR, HMG-CoA redutase; DXP, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato; DXS, DXP sintase; DXR, DXP redutoisomerase; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; IDI, IPP isomerase; GPS, geranyl pirofosfato sintase; GPP, geranyl pirofosfato; FPP, farnesil pirofosfato; FPS, farnesil pirofosfato sintase; GGPP, geranylgeranyl pirofosfato; GGPS, geranylgeranyl pirofosfato sintase; TPT, *trans*-preniltransferase; CPT, *cis*-preniltransferase.

Moléculas de DMAPP são empregadas na biossíntese da BN como iniciadores. Esse processo de biossíntese, requer um iniciador de pirofosfato para iniciar a reação. Além do DMAPP, o geranyl pirofosfato (GPP), geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) e o farnesil pirofosfato (FPP) também atuam como iniciadores na síntese da borracha. O FPP tem sido apontado como o principal iniciador em *H. brasiliensis* (Cornish, 2001, p. 184).

A polimerização das cadeias começa com a ionização de uma ligação C-O do iniciador pelo cofator bivalente enzimático, levando a produção de um cátion no iniciador. Em seguida, o grupo vinilideno do IPP é incorporado ao grupo catiônico recentemente formado no iniciador, pela ação da transferase. Nessa reação há a liberação de prótons e formação da dupla

ligação de isomeria *cis* ou *trans*. A isomeria geométrica *cis-trans* depende da estereoquímica da transferase. Essa etapa de polimerização catalisada pela transferase, também denominada de “polimerização carbocatiônica”, há a incorporação contínua dos monômeros de IPP (Men *et al.*, 2018, p. 2). Sobre a fase de terminação, pouco se conhece sobre esse processo, etapa, na qual, determina o peso molecular da BN (Cornish, 2001, p. 186; Men *et al.*, 2018, p. 2).

1.5 Idioblastos

Os idioblastos são células secretoras internas individuais e isoladas, e que podem estar presentes em qualquer tecido ou órgão vegetal. Sua morfologia, conteúdo e função são diferentes em relação às células vizinhas presentes no mesmo tecido (Taiz *et al.*, 2017, p. 781; Crang; Lyons-Sobaski; Wise, 2018, p. 462). Vale ressaltar, que o termo “idioblasto” é de uso mais abrangente e não está relacionado a um aspecto morfológico ou fisiológico específico (Foster, 1956, p. 185).

Os idioblastos são amplamente distribuídos nas espécies vegetais e parecem exercer uma grande variedade de funções. Algumas das funções atribuídas à essas células são deduzidas devido a sua rigidez. Já foi descrito idioblastos parcialmente lignificados, sugerindo um papel secundário dessas células no suporte estrutural e defesa da planta (Losada; Díaz; Holbrook, 2019, p. 19). Além disso, foi proposto que os idioblastos também atuam na captação de água entre a atmosfera e os tecidos foliares (Losada; Díaz; Holbrook, 2019, p. 20). No entanto, a maioria dos dados documentados na literatura sobre essas células são sobre sua capacidade de secreção e armazenamento de metabólitos secundários, tais como taninos e alcaloides, e, especialmente, de cristais de oxalato de cálcio (CaOx) (Santos *et al.*, 2013, p. 410; Crang; Lyons-Sobaski; Wise, 2018, p. 462).

1.6 Cristais idioblásticos

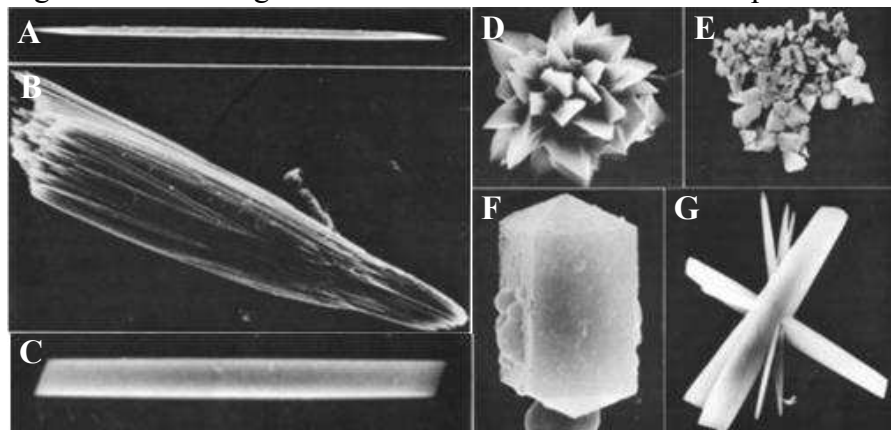
Os cristais idioblásticos podem ser encontrados em uma diversidade de espécies de plantas, tendo uma distribuição bastante variável entre essas espécies. A produção desses cristais nas plantas é um processo fisiológico comum, sendo considerado produtos de processos metabólicos celulares, que são, geralmente, depositados no citoplasma ou nos vacúolos (Franceschi; Nakata, 2005, p. 45; Cruz *et al.*, 2020, p. 3).

Cristais de CaOx são os mais comuns descritos na literatura e relatados em mais de 200 famílias de plantas (Franceschi; Horner, 1980, p. 381, Cruz *et al.*, 2020, p. 3). No entanto,

cristais de oxalatos de sódio, de potássio e de amônio, malato de cálcio, carbonato de magnésio e carbonato de cálcio também já foram identificados em tecidos vegetais (Crang; Lyons-Sobaski; Wise, 2018, p. 462; Cruz *et al.*, 2020, p. 3). Cristais de oxalato e malato já foram identificados em látex de plantas (Evert, 2006, p. 486).

Os cristais exibem uma variedade de formas e recebem denominações diferentes de acordo com o seu formato (Figura 5). Cristais isodiamétricos com facetas pontiagudas são denominados de drusas, enquanto os de formato de agulha/aciculares são denominados de ráfides ou estilóides. As ráfides ocorrem em feixes de até dezenas de cristais individuais e os estilóides são solitários (Crang; Lyons-Sobaski; Wise, 2018, p. 463). Há os cristais de areia, ou areias cristalinas, que são aglomerados de pequenos cristais semelhantes a cubos, espalhados pelo citoplasma celular. Já os cristais prismáticos são estruturas maiores, individuais e podem apresentar extremidades pontiagudas (Crang; Lyons-Sobaski; Wise, 2018, p. 465).

Figura 5 – Morfologias de cristais de oxalato de cálcio de plantas.



Fonte: Franceschi; Horner (1980, p. 380). A e B: feixes de cristais de ráfides; C: cristal estilóide; D: cristal de drusa; E: areia cristalina; F: cristal prismático; G: complexo de cristais agregados.

O tamanho desses cristais pode variar de acordo com as características das células em que os cristais são formados e da quantidade de substrato disponível, sendo induzível e dependente de cálcio (Ca) (Borchert, 1985, p. 309). Além disso, Cruz *et al.* (2020, p. 3) afirmou que suas formas geométricas são características das espécies que produz (Cruz *et al.*, 2020, p. 3).

Em relação aos cristais de CaOx, a morfologia e a distribuição espacial são conservadas, de modo que essas propriedades são utilizadas como base para propor hipóteses sobre suas funções nas plantas (Franceschi; Nakata, 2005, p. 46). Algumas dessas funções já mencionadas na literatura são: a regulação dos níveis de Ca, proteção contra herbivoria,

desintoxicação de metais pesados, equilíbrio iônico e o de suporte estrutural ao tecido (Franceschi; Nakata, 2005, p. 46).

Em relação a regulação dos níveis de Ca na planta, foi demonstrado que a perda de água pela superfície por evaporação causa o acúmulo de Ca dissolvido, e o excesso pode se precipitar como CaOx, que é osmoticamente inativo (Franceschi; Nakata, 2005, p. 46) Além disso, foi observado que houve a formação de mais cristais de drusas e de tamanhos maiores, quando era disponibilizado maiores concentrações de Ca para a planta (Volk *et al.*, 2002, p. 34).

Paiva (2019), também argumenta em seu trabalho algumas possibilidades de como os cristais de CaOx podem atuar na regulação e na homeostase de Ca na planta. Além de funcionarem como reserva de Ca, esses cristais podem estar relacionados aos mecanismos de eliminação do excesso de Ca, uma vez que, em muitas plantas, eles ocorrem em tecidos e órgãos que são descartados, tais como folhas velhas (Paiva, 2019, p. 1707).

1.7 Família Apocynaceae

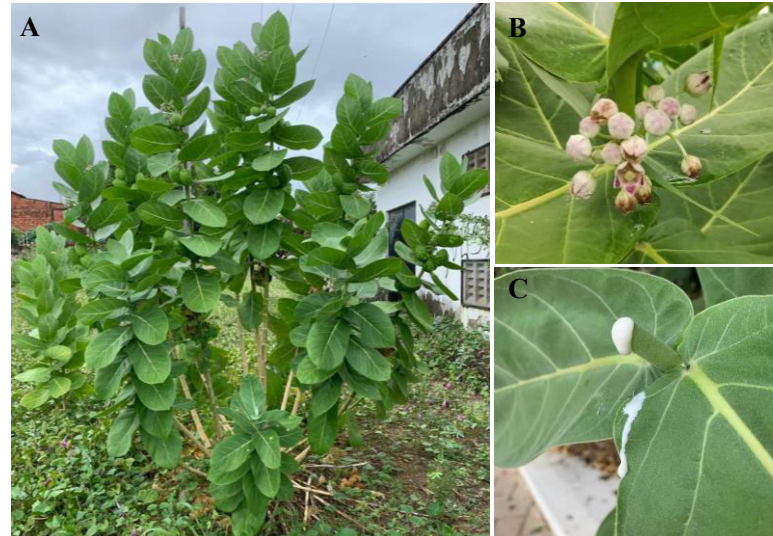
Em Apocynaceae, a produção de látex é uma característica universal (Demarco; Kinoshita; Castro, 2006, p. 135). Esta família abrange cerca de 366 gêneros, distribuídos em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Periplocoideae, Secamonoideae, Asclepiadoideae e Apocynoideae (Endress; Liede-Schumann; Meve, 2014, p. 175). Apocynaceae compreende espécies de hábitos diversos, que vão de árvores, arbustos, ervas, suculentas e trepadeiras (Islam; Lucky, 2019, p. 41). As plantas dessa família ocorrem normalmente em regiões subtropicais, tropicais e em zonas temperadas (Bihani, 2021, p. 4). A seguir são destacadas algumas espécies desta família que foram utilizadas neste trabalho.

1.7.1 Calotropis procera

Calotropis procera (Subfamília Asclepiadoideae) é um arbusto perene de rápido estabelecimento, podendo atingir até 4 metros de altura (Figura 6). Essa espécie é bem conhecida por sua capacidade de produzir grandes quantidades de látex. Quando seu caule e folhas são cortados há a liberação do látex de cor branca. Sua distribuição é cosmopolita, ocorrendo nas regiões de clima temperado a tropical (Endress; Bruyns, 2000, p. 48), mas também é conhecida como uma espécie invasora e de fácil adaptação nas mais diversas

condições climáticas. No Brasil é popularmente denominada por flor-de-seda e leiteira (Pompelli *et al*, 2019, p. 796).

Figura 6 – Imagens da planta *Calotropis procera* com alguns detalhes florais e látex exsudando.



Fonte: arquivo pessoal. A: arbusto; B: inflorescência; C: látex exsudado.

A produção de látex por *C. procera* é contínua e abundante nas partes verdes da planta. Devido sua grande produção de látex, os trabalhos com essa espécie concentram-se no estudo desse fluído, na identificação de metabólitos e das atividades que esses estão envolvidos. Esses trabalhos seguem a linha de pesquisa voltada à defesa de planta contra herbívoros, pragas de cultura e usos medicinais (Ramos *et al.*, 2007, p. 356; Ramos *et al.*, 2019, p. 565; Wadhvani *et al.*, 2021, p. 35856; Kumar; Verma; Das, 2022, p. 6)

1.7.2 *Plumeria pudica*

Plumeria pudica (Subfamília Rauvolfioideae), conhecida também pelo nome jasmim e buquê de noiva, é um arbusto que pode atingir até 3 metros de altura (Figura 7). Essa espécie é muito cultivada como planta ornamental, e suas folhas concentram-se no ápice dos ramos, onde ocorre sua inflorescência. O látex produzido por essa planta tem aparência semelhante à de *C. procera*, de cor branca, mas um pouco translúcido. Além disso, sua produção de látex é inferior, em relação à de *C. procera*. *Plumeria pudica* é nativa da Colômbia, Venezuela e Panamá (Chamakuri; Suttee; Mondal, 2020, p. 2077).

Figura 7 – Imagens da planta *Plumeria pudica* com alguns detalhes florais e látex exsudando.



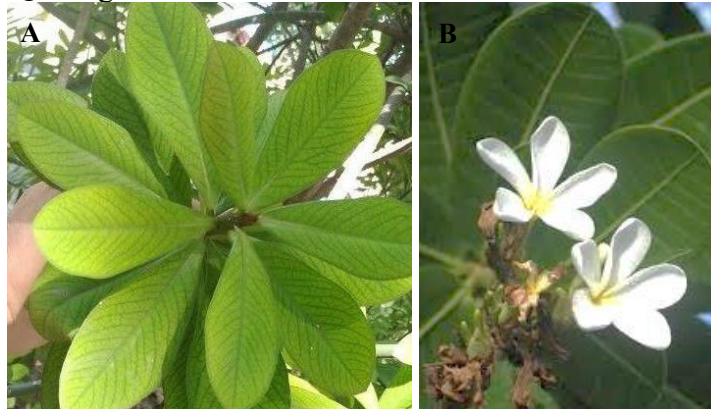
Fonte: arquivo pessoal. A: arbusto; B: inflorescência; C: látex exsudado.

Trabalhos sobre o látex de *P. pudica* tem demonstrado suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antialérgicas e antioxidantes, e no tratamento de doenças digestivas. Esses dados são resultados da rica composição metabólica desse látex e, demonstra seu potencial como fonte de possíveis fármacos (Fernandes *et al.*, 2015, p. 276; Oliveira *et al.*, 2019, p. 7; Sales *et al.*, 2022, p. 7).

1.7.3 *Himatanthus drasticus*

Himatanthus drasticus (Subfamília Rauvolfioideae), conhecida como janaguba, é uma árvore de tamanho médio que pode chegar até 7 metros de altura (Figura 8). Essa planta é comum na Amazônia, e tem distribuição desde o sudoeste do Brasil até Guiana Francesa, Suriname e Guiana (Amaro *et al.*, 2006, p. 450). *Himatanthus drasticus* tornou-se bem conhecida pelo uso empírico do seu látex no tratamento medicinal para algumas enfermidades, como para doenças inflamatórias e verminoses (Pereira *et al.*, 2022, p. 5). Logo, os trabalhos com essa planta têm-se concentrado em estudos sobre suas propriedades terapêuticas.

Figura 8 – Imagens da planta *Himatanthus drasticus* com alguns detalhes florais.



Fonte: Women's Christian College (link: [Himatanthus Drasticus - Women's Christian College, Chennai \(wcc.edu.in\)](http://www.wcc.edu.in)). A: folhas e B: inflorescência.

1.7.4 *Plumeria rubra*

Plumeria rubra (Subfamília Rauvolfioideae), bem conhecida pelo nome de jasmim, é uma árvore que pode atingir até 7-8 metros de altura (Figura 9). Assim, como muitas plantas do gênero *Plumeria*, essa é uma espécie ornamental. A cor de suas flores pode variar entre rosa e branco de tons amarelados. *P. rubra* é nativa do México, mas se distribuiu por todo o mundo e o seu látex tem aparência semelhante ao da *P. pudica* (Bihani, 2021, p. 4)

Figura 9 – Imagens da planta *Plumeria rubra* com alguns detalhes florais e látex exsudando.



Fonte: arquivo pessoal. A: arbusto; B: inflorescência; C: látex exsudado.

A literatura científica acerca do estudo de fluidos laticíferos é imensa e diversificada, abrangendo aspectos químicos, bioquímicos, histológicos, funcionais, farmacológicos, terapêuticos, dentre muitos outros. Em relação a PBs de látex vegetal, os dados de literatura disponível referem-se a maior parte às partículas do látex de *H. brasiliensis*. Não há dados, na literatura sobre aspectos de composição e caracterização de PBs dos látices das plantas inclusas neste trabalho, as quais têm demonstrado aplicações e várias frentes tecnológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Elucidar as propriedades físico-químicas intrínsecas do látex de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, e caracterizar suas respectivas PBs. Adicionalmente, realizar a caracterização de cristais do látex de *P. pudica* e *P. rubra*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* quanto a sua capacidade de produzir borracha;
- Avaliar a estabilidade coloidal dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*;
- Mensurar as propriedades reológicas dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* e de suas respectivas borrachas;
- Identificar poliisopreno nos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* e sua respectiva isomeria;
- Identificar e caracterizar PBs nos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*;
- Investigar a distribuição e morfologia das PBs dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*;
- Investigar os aspectos morfológicos de BNs obtidas dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*;
- Investigar a distribuição e morfologia de cristais dos látices de *P. pudica* e *P. rubra*; e
- Identificar a composição química dos cristais dos látices de *P. pudica* e *P. rubra*.

CAPÍTULO 1

LÁTICES DE *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* E *Himatanthus drasticus* COMO FONTES DE BORRACHA NATURAL

3.1 Procedimentos experimentais

3.1.1 Material vegetal

Três espécies diferentes de plantas laticíferas pertencentes à família Apocynaceae foram utilizadas: *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*. A autorização legal para acesso e uso, para propósitos científicos, do látex das três espécies foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) (<https://sisgen.gov.br/paginas/login.aspx>) sob o registro A689147.

Os látices foram coletados no período da manhã, de plantas crescidas na região metropolitana de Fortaleza-CE. Todas as espécies foram devidamente identificadas e exsiccadas foram produzidas e depositadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil. O número de identificação das exsiccadas de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram 64838, 64839 e 64837, respectivamente.

3.1.2 Coleta do látex

Para a coleta dos látices de *C. procera* e *P. pudica*, pequenas incisões perto das folhas mais jovens foram feitas manualmente e depois a suspensão foi recolhida em tubos apropriados (tipo Falcon ou eppendorf), contendo um volume de água destilada ou deionizada, ou soluções de coleta na proporção final de 1:1 (v:v). As diferentes soluções de coleta foram utilizadas com a finalidade de observar o comportamento coloidal dos látices. Essas soluções foram as seguintes: NaCl 0,15 M, NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01% e NaCl 0,15 M com Tween 20 0,3%. Em algumas análises foi utilizado o látex íntegro, sem adição de água ou solução de coleta. Amostras do látex de *H. drasticus* utilizadas em todo o trabalho foram obtidas de plantas crescidas em um mesmo terreno, sendo o látex colhido por exsudação no caule. A coleta desse látex é realizada por meio de incisões na casca da árvore e a suspensão é colocada em uma garrafa de vidro contendo um volume de água potável, na proporção final de 1:1 (v:v). Portanto, todas as amostras do látex de *H. drasticus* utilizadas nesse projeto foram produzidas a partir do látex já diluído, previamente, em água potável na proporção de 1:1 (v:v). Além disso, o pH de todos os látices foi mensurado imediatamente após a coleta.

3.1.3 Conteúdo de sólidos totais

O conteúdo de sólido totais (CST) dos látices foi determinado através da secagem de 2 mL de látex em placas de Petri, espalhando a amostra por toda a área da placa. Em seguida, as amostras foram colocadas em estufa a 70 °C, até a estabilização da massa. Nessa análise foi utilizado o látex íntegro de *C. procera* e *P. pudica*, enquanto o látex de *H. drasticus* estava diluído em água potável na proporção de 1:1 (v:v). Os ensaios foram realizados em triplicata. O resultado foi obtido através da seguinte equação (ASTM-D1076, 2015):

$$CST (\%) = \frac{(C - A)}{(B - A)} \times 100$$

Onde:

A = Massa da placa de *Petri* (g)

B = Massa da placa de *Petri* mais a massa da amostra líquida (g)

C = Massa da placa de *Petri* mais a massa da amostra seca (g)

3.1.4 Conteúdo de borracha seca

O conteúdo de borracha seca (CBS) foi determinado através da coagulação de 9 a 10 mL de látex. Nessa análise foi utilizado o látex íntegro de *C. procera* e *P. pudica*, enquanto o látex de *H. drasticus* estava diluído em água potável na proporção de 1:1 (v:v). A coagulação dos látices foi induzida pela adição de ácido acético P.A. Um volume de ácido acético foi lentamente adicionado a um volume igual da amostra de látex sob agitação constante durante 5 minutos, em seguida essa amostra de látex acidificada com ácido acético foi colocada em banho maria a 70 °C durante 30 minutos em repouso. Nesse momento, foi possível observar a coagulação da fração de borracha e sua separação do soro límpido. O soro foi descartado e o material coagulado foi lavado em água destilada 5 vezes e prensado manualmente, a fim de remover qualquer excesso de água. Em seguida, esse material coagulado foi colocado em estufa a 70 °C, até a estabilização da massa. Os ensaios foram realizados em triplicata. O resultado do DRC foi obtido através da seguinte equação (ASTM-D1076, 2015):

$$CBS (\%) = \frac{\text{massa do coágulo seco (g)}}{\text{massa da amostra líquida (g)}} \times 100$$

3.1.5 Componentes não-borracha

O teor dos componentes não-borracha (CNB) dos látices foi determinado através da seguinte equação (ASTM-D1076, 2015):

$$\text{Conteúdo não – borracha (\%)} = \text{CST (\%)} - \text{CBS (\%)}$$

3.1.6 Sedimentação de componentes sólidos

Para observar o comportamento de sedimentação dos componentes sólidos dos látices, foram utilizados 57,5 a 62,5 mL de amostras de látex diluído em água na proporção de 1:1 (v:v). Para os látices de *C. procera* e *P. pudica* foi utilizado água destilada, e água potável para o látex de *H. drasticus*. As amostras foram homogeneizadas e seu volume foi distribuído em 5 tubos de vidro, ficando cada tubo com cerca de 11,5 a 12,5 mL. O processo de sedimentação dos componentes sólidos foi registrado a cada 30 minutos ao longo de 4 horas e após esse período os tubos de vidro foram centrifugados a 4.000 rpm (centrifugadora centríbio, com rotor de 120 mm), por 10 minutos, a 25 °C. Duas frações foram formadas na centrifugação, o sobrenadante e o pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi pesado e em seguida liofilizado. O pellet liofilizado foi novamente pesado e foi utilizado para definir o teor de sólidos (%).

3.1.7 Análise estatística

A análise estatística dos valores de CST, CBS, CNB e do teor de sólidos (%) foi realizada por análise Two-way ANOVA, com o teste de comparação múltipla de Tukey. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para todas as análises estatísticas. Os dados foram processados utilizando o GraphPad Prism 10.

3.1.8 Análise por microscopia óptica

Para auxiliar na caracterização dos látices e de suas respectivas PBs, amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram visualizadas por microscópio óptico (MediLux), utilizando a objetiva de 100x. Nessa etapa, foram utilizadas amostras de látices diluídas em água destilada e nas soluções de coleta (NaCl 0,15 M, NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01% e NaCl 0,15 M com Tween 20 0,3%), todas na proporção de 1:1 (v/v). Essas amostras foram submetidas a processos de diluição em série, por um fator de diluição de 2. Um volume de 1 mL dessas amostras foi utilizado para as diluições em série. Nessas diluições foram utilizados dez tubos de vidro, já contendo 1 mL de água destilada ou da respectiva solução de coleta. O látex de *H. drasticus* também foi submetido aos processos de diluição em série em água

destilada, NaCl 0,15 M, NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01% e NaCl 0,15 M com Tween 20 0,3%, como já descrito. Totalizando assim, 40 amostras (diluições de látex) de cada espécie. Essas amostras foram analisadas com auxílio do microscópio óptico em diferentes intervalos de tempo após a coleta. Esses intervalos foram de 0 horas (dia da coleta), 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a coleta. Ao longo desse período, as amostras foram armazenadas nos tubos de vidro devidamente vedados. Para visualização das diluições dos látices, um volume de 30 μ L de cada amostra (diluição), previamente homogeneizada, foi adicionado sobre a lâmina e uma lamínula foi posta sobre a amostra. Além disso, as amostras do tubo 5 (diluição 1/32) preparado em água destilada foram encaminhadas para análises por espectroscopia de infravermelho e Raman, e para a Microscópio de Força Atômica (AFM - *Atomic Force Microscopy*) e Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). O preparo mais detalhado das amostras para essas análises é descrito no capítulo 3.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Caracterização dos látices

Os valores de pH, CST, CBS e CNB dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* são apresentados na Tabela 1 e as peças de borracha produzidas a partir da coagulação com ácido acético estão na Figura 10.

Tabela 1 - Valores de pH, do conteúdo de sólidos totais, conteúdo de borracha seca e dos componentes não-borracha dos látices de *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* e *Himatanthus drasticus*.

Espécie	pH*	CST (%)	CBS (%)	CNB (%)
<i>Calotropis procera</i>	5,3	14,14 ± 0,80 ^a	6,73 ± 0,14 ^a	7,41 ± 0,75 ^a
<i>Plumeira pudica</i>	5,7	20,22 ± 0,09 ^b	7,33 ± 0,06 ^b	12,89 ± 0,14 ^b
<i>Himatanthus drasticus</i>	5,2	3,45 ± 0,02 ^c	2,00 ± 0,13 ^c	1,45 ± 0,12 ^c

*pH dos látices diluídos em água destilada (*C. procera* e *P. pudica*) e potável (*H. drasticus*) na proporção de 1:1. Abreviaturas: CST; conteúdo de sólidos totais; CBS: conteúdo de borracha seca; e CNB: dos componentes não-borracha. ^a, ^b, ^c – letra diferentes representam valores estatisticamente diferentes. (Two-way ANOVA. P < 0,05)

Figura 10 – Borrachas naturais obtidas a partir da coagulação ácida com ácido acético dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C).



Amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* exibiram pH ácido (Tabela 1), bem diferente ao do látex fresco da *H. brasiliensis*, que tem um pH na faixa de 6,5 – 7,0 (Bottier, 2019, p. 203). O pH do látex é um parâmetro diretamente relacionado a sua estabilidade coloidal. Um pH ácido, como foi observado nos três látices avaliados aqui, causa a desestabilização desse sistema coloidal. Essa desestabilização leva ao processo de coagulação do látex.

A estabilidade coloidal do látex é dependente da associação entre a carga superficial das PBs e a natureza iônica da fração soro-C do látex (Ng; Othman; Yusog, 2022, p. 3). As membranas das PBs são carregadas negativamente, devido aos grupos carboxílicos das

proteínas e os grupos fosfatos dos fosfolipídios adsorvidos em sua superfície (Sakdapipanich *et al.*, 2015, p. 102). Essa carga superficial negativa causa a repulsão entre as PBs, impedindo ou dificultando a colisão e adesão entre elas e, conseqüentemente, impede ou dificulta a aglomeração e coagulação do látex (Sakdapipanich *et al.*, 2015, p. 105). Assim, à medida que o pH do látex diminui, essas forças de repulsão entre as PBs são reduzidas, e elas passam a não repulsar umas com as outras, facilitando a sua aglomeração e desencadeamento do processo de coagulação.

No entanto, ao avaliar o pH do látex, deve-se também considerar que os lutóides podem influenciar nesse parâmetro. Por serem osmoticamente sensíveis, facilmente se rompem e liberam no soro-*C* o seu conteúdo interno, o soro-*B*, que além de possuir um pH ácido, possuem agentes desestabilizadores, como Mg^{2+} , Ca^{2+} , hidrolases ácidas e proteínas carregadas positivamente (D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018, p. 82; Ng; Othman; Yusog, 2022, p. 3). Portanto, a ruptura dos lutóides pode estar relacionado ao baixo pH exibido pelas amostras de látex de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, quando coletados. Este pH pode não refletir o pH em condições fisiológicas da planta, quando não há injúria ao sistema.

Com relação aos valores de CST, CBS e dos CNB apresentados na Tabela 1, vale ressaltar que foram obtidos a partir do látex íntegro de *C. procera* e *P. pudica*, e do látex diluído de *H. drasticus*. A metodologia descrita pela norma D1076 de 2015 é específica apenas para a fase creme do látex centrifugado, e não para o látex íntegro ou diluído (ASTM-D1076, 2015). No entanto, os látices trabalhados nesse projeto não exibem o mesmo padrão de fracionamento do látex de *H. brasiliensis* quando é centrifugado, o qual há a formação de três frações, como demonstrado na Figura 1. Portanto, já era esperado que os valores de CST e CBS estivessem abaixo dos valores citados na literatura referentes ao látex de *H. brasiliensis*.

De acordo com a norma D1076, os látices de clones de *H. brasiliensis* exibem valores de CST e CBS que podem chegar até a 66% e 64%, respectivamente (ASTM-D1076, 2015). Já na literatura, os valores de CST e CBS dos látices de clones de *H. brasiliensis* variam entre 36-41% e 33-38%, respectivamente (Silva *et al.*, 2021, p. 3).

O CNB dos látices correspondem a proteínas, lipídeos, carboidratos e substâncias inorgânicos e orgânicos (Tanaka; Tarachiwin, 2009, p. 284). Na literatura, vem sendo destacado a importância do CNB, devido a sua influência na estabilidade coloidal e nas propriedades mecânicas do látex. O CNB da fase creme do látex de *H. brasiliensis* pode chegar até a 6% (Tanaka; Tarachiwin, 2009, p. 284).

Dentre os CNB, as proteínas e os fosfolipídios são os que mais contribuem na estabilidade coloidal do látex, uma vez que são os responsáveis por conferirem carga superficial

negativa às PBs (Wei *et al.*, 2020, p. 1265). Além disso, as proteínas e os fosfolipídios se associam com grupos terminais das cadeias de poliisopreno por meio de ligações de hidrogênio, levando a formação de uma rede na BN. Essa rede contribui para a elevada propriedade mecânica da BN, que não é observada nas borrachas sintéticas (Tanaka; Tarachiwin, 2009, p. 302).

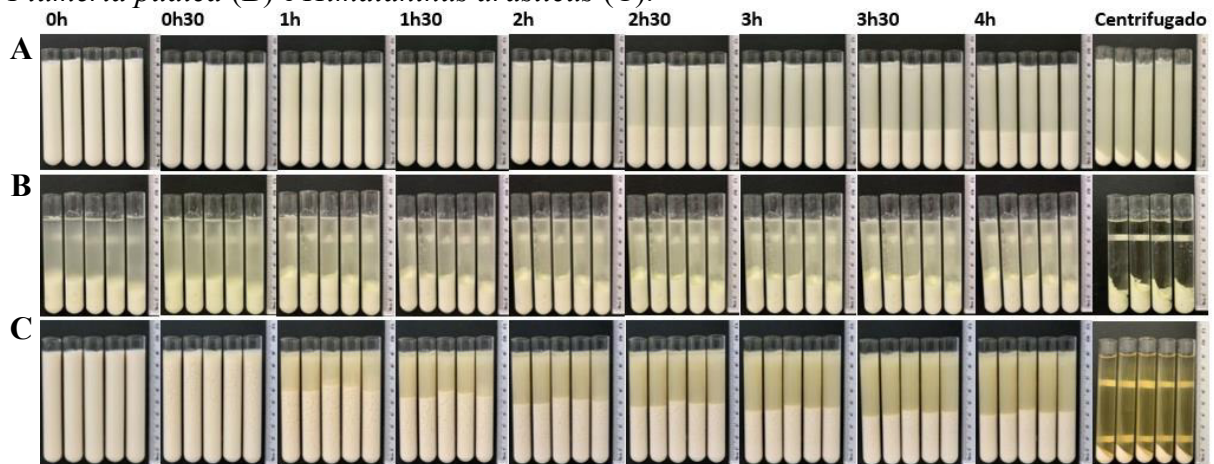
Outra característica é a participação das proteínas e fosfolipídios no processo de reticulação, no qual atuam como pontos de reticulação na BN vulcanizada, além de acelerarem esse processo de reticulação, aumentam a densidade de reticulação e melhoram a resistência do filme de BN (Wei *et al.*, 2019, p. 5).

É por conta dessa influência do CNB na coagulação e nas propriedades mecânicas que sua medição é importante na caracterização de látices produtores de BN e, portanto, está inclusa na Norma D1076. No entanto, outros parâmetros devem ser considerados ao trabalhar com látices produtores de BN, como a mensuração da carga superficial e o tamanho das PBs.

Sobre a produção de BNs a partir dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, apesar de exibirem um pH ácido, foi necessário reduzir ainda mais o pH, com a adição de ácido acético, para induzir a coagulação e possibilitar a obtenção da BN. Assim, foi possível recuperar as BNs a partir dos látices das três espécies avaliadas e, portanto, pode-se confirmar a presença de PBs nesses látices (Figura 10). No entanto, apenas o látex de *H. drasticus* foi capaz de produzir uma borracha em peça única (Figura 10 C). As borrachas dos demais látices tinham aspectos de areia molhada, que podiam facilmente ser moldadas e desmanchadas em seguida, especialmente a de *C. procera*. Além disso, a borracha de *P. pudica* após ser seca em estufa, foi a que apresentou um aspecto mais pegajoso, em relação as borrachas de *C. procera* e *H. drasticus*.

Outra característica avaliada neste capítulo foi o comportamento de sedimentação dos componentes sólidos dos látices e o teor de sólidos (%) dos pellets após centrifugação (Figura 11).

Figura 11 - Sedimentação de componentes sólidos dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C).



Látices diluídos em água destilada (*C. procera* e *P. pudica*) e potável (*H. drasticus*) na proporção de 1:1 (v:v). Cada tubo de vidro possui cerca de 11,5 a 12,5 mL de látex diluído. A cada 30 minutos imagens de cada látex diluído foi registrada até completar o período de 4 horas (nona coluna). A primeira coluna corresponde a imagens registradas no intervalo de 0h, a segunda coluna corresponde a imagens registradas no intervalo de 0:30h, a terceira coluna corresponde a imagens registradas no intervalo de 01:30h, e assim por diante até a nona coluna. A décima coluna corresponde aos látices após centrifugação (4.000 rpm, por 10 minutos, a 25 °C).

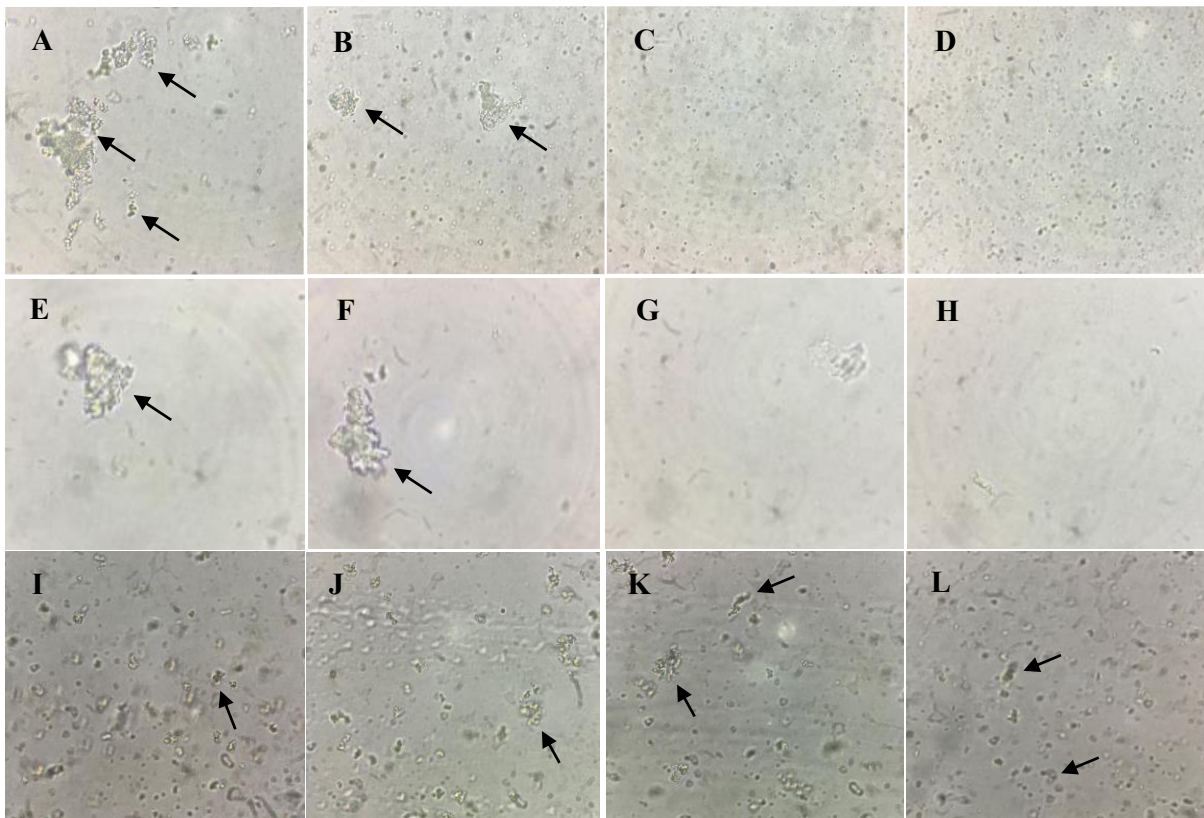
Apesar do látex de *P. pudica* exibir um maior percentual de CNB, que pode indicar uma maior estabilidade do látex, o contrário é observado na Figura 11 (B). É possível notar a desestabilização da suspensão coloidal desse látex imediatamente após a coleta, através da separação de uma fase sólida com a fase sérica, soro-C (Figura 11 B, intervalo de 0h). Ao longo desse projeto, cristais foram identificados no látex de *P. pudica*, o que pode justificar esse comportamento de decantação rápida e elevado CNB. A identificação e caracterização desses cristais são abordados no capítulo 4.

O teor de sólidos (%) dos pellets gerados na centrifugação, em relação ao volume total dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foi de 3,80 % \pm 0,06, 7,25 % \pm 0,07 e 5,60 % \pm 3,33, respectivamente. Esses percentuais são menores que os apresentados no CST por não considerar o CNB do soro-C, uma vez que corresponde apenas ao peso seco do pellet formado durante a centrifugação. Além de que o maior teor de proteínas e fosfolipídios dos látices são do soro-C (Wang *et al.*, 2010, p. 3). Vale ressaltar, que o maior valor atribuído ao pellet de *P. pudica* (7,25%) pode ser devido a presença de cristais, que precipitam na centrifugação.

3.2.2 Aspectos dos fluidos laticíferos observados com uso de microscopia óptica

Por meio do microscópio óptico foi observado o comportamento das PBs dos látices em água e nas diferentes soluções de coleta, NaCl 0,15 M, NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01% e NaCl 0,15 M com Tween 20 0,3%. (Figura 12). Estruturas de formatos irregulares foram visualizadas nos três látices avaliados e identificadas como agregados de PBs. A presença desses agregados foi mais intensa nas amostras de látex diluído em água destilada, e menos frequente nas soluções de coleta. Portanto, essas soluções tiveram um efeito estabilizante nos látices.

Figura 12 - Imagens de microscopia óptica de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A, B, C e D), *Plumeria pudica* (E, F, G e H) e *Himatanthus drasticus* (I, J, K e L).



As imagens correspondem as amostras de látex da diluição 1/32 da diluição em série com fator de diluição de 2. Essas amostras estão diluídas em água destilada (primeira coluna, A, E e I), NaCl 0,15 M (segunda coluna, B, F e J), NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01% (terceira coluna, C, G e K) e NaCl 0,15 M com Tween 20 0,3% (quarta coluna, D, H e L). As imagens foram feitas imediatamente após a coleta do látex e visualizadas com a objetiva de 100x. As setas pretas indicam possíveis agregados de PBs.

Além disso, foi possível a visualização de partículas de formato esférico e com movimento browniano. Isso foi observado com maior frequência nos látices diluídos nas soluções de coleta, confirmando o potencial estabilizante dessas soluções. A partir das observações citadas neste capítulo, em particular a capacidade de produção de BNs a partir dos

látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, é válido ampliar os estudos sobre as PBs dos respectivos látices e elucidar suas propriedades.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DO POTENCIAL ELÉTRICO E DAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DOS LÁTICES DE *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* E *Himatanthus drasticus*

4.1 Procedimentos experimentais

4.1.1 Material vegetal

As amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* utilizadas nas análises deste capítulo foram obtidas conforme o item 3.2, do capítulo 1 deste trabalho. No entanto, foram também realizadas coletas de látex em solução aquosa de tween 20 0,5%, na proporção final de 1:1 (v:v).

4.1.2 Tamanho e potencial zeta de partículas de borracha

O diâmetro médio efetivo (Z-Average, raio) e o potencial zeta (ζ) de PBs dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* e de agregados dessas partículas, foram mensurados no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Swavesey, Cambridge, UK) por meio das técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS - *Dynamic Light Scattering*) e de espalhamento de luz eletroforético (ELS - *Electrophoretic Light Scattering*), respectivamente. Essa etapa também teve a finalidade de observar o comportamento de aglomeração dessas PBs ao longo de 4 horas. Para isso, foram produzidas dispersões de látex em água deionizada e em solução aquosa de tween 20 0,5%. Esse surfactante foi utilizado com a finalidade de produzir dispersões estáveis. Foi utilizada uma cubeta de poliestireno (Malvern Panalytical, da Inglaterra). O comprimento de onda do laser foi de 633 nm e o ângulo de 173°, a 25 °C. A partir de amostras de látices coletados em água deionizada e em solução aquosa de tween 20 0,5%, na proporção de 1:1 (v/v), foram produzidas dispersões de ~0,05% (v/v). O látex de *H. drasticus*, ao chegar no laboratório também foi utilizado para produção das dispersões de ~0,05% (v/v). Essas dispersões eram preparadas apenas no momento da análise, diluindo 5 μ L do látex coletado, em 1 mL de água deionizada e em solução aquosa de tween 20 0,5%. A análise no equipamento, de uma única amostra, era feita a cada 30 minutos, até concluir 4 horas. Ao total foram produzidas dezoito novas amostras (dispersões) para cada látex de cada espécie de planta estudada (nove dispersões em água deionizada e nove dispersões em solução aquosa de tween 20 0,5%), que foram lidas nos seguintes intervalos: 0h (imediatamente após a coleta), 0h30, 1h, 1h30, 2h, 2h30, 3h, 3h30 e 4h. Cada medida foi realizada com 10 varreduras

4.1.3 Propriedades Reológicas

As propriedades reológicas dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, e de suas respectivas BNs foram avaliadas utilizando o reômetro de cisalhamento dinâmico modelo AR 2000 (TA Instruments). Os ensaios foram realizados com uma geometria de placa paralela de 25 mm de diâmetro. Duas metodologias foram utilizadas. A primeira avaliou a viscosidade dos látices processados por centrifugação. Nessa etapa, foi utilizado amostras de látices coletados em água na proporção de 1:1 (v:v). Os látices de *C. procera* e *P. pudica* foram coletados em água destilada e o látex de *H. drasticus* em água potável. Um volume 30 mL da amostra de cada látex foi distribuído igualmente em três tubos de vidro. Em seguida, esses tubos foram centrifugados a 4.000 rpm (centrífuga centrífuga, com rotor de 120 mm), por 10 minutos, à 25 °C. Duas frações foram formadas na centrifugação, o sobrenadante e o pellet. Parte do sobrenadante de cada tubo foi removida de modo que apenas 75%, 50% e 25% do sobrenadante permanecessem em cada um dos três tubos. Em seguida, o volume de sobrenadante que permaneceu em cada tubo foi homogeneizado com o pellet correspondente. Essas amostras foram denominadas de Cp75, Cp50, Cp25, Pp75, Pp50, Pp25, Hd75, Hd50 e Hd25, as letras em referências às espécies de plantas e os números em referência ao percentual de sobrenadante presente. Essas amostras foram utilizadas para realizar ensaios de viscosidade - *shear viscosity test* (entre 0,01 e 100 s⁻¹) a 25 °C.

Na segunda metodologia, foi mensurado as propriedades reológicas de BNs produzidas a partir dos látices. Para a produção de peças de borrachas, foi tentado a produção com e sem a adição de ácido acético. A primeira tentativa foi realizada como descrita no item 3.4, do capítulo 1 deste trabalho. Já a segunda tentativa, contou apenas com a coagulação natural dos látices, com a finalidade de não haver alterações nas propriedades reológicas das BNs avaliadas. O material coagulado foi então colocado em cima de papel absorvente para absorver apenas o excesso de água e em seguida foram feitos os ensaios reológicos. Dois testes foram realizados com as peças de borracha: o teste de varredura de frequência (*frequency sweep*), de 25 a 0,1 Hz e 0,02 % strains, em modo de rampa (*ramp mode*), a 25 °C e o teste de varredura de temperatura (*temperature sweep*), com aquecimento de 25 °C a 90 °C, seguido de resfriamento de 90 °C a 5 °C, com frequência de 1 Hz, a 0,02 % strains. Ambos os testes foram realizados dentro das regiões viscoelásticas lineares de cada amostra. Os resultados desses testes geram um gráfico do módulo elástico ou de armazenamento (G') e do módulo viscoso ou de perda (G''). Ambos os módulos caracterizam o comportamento sólido (G') e líquido (G'') do material. O módulo elástico mensura a resposta elástica ou a energia armazenada por ciclo de deformação do material, enquanto o módulo viscoso mensura a resposta viscosa ou a energia dissipada por ciclo de deformação do material.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Tamanho e potencial zeta de partículas de borracha

Os dados do diâmetro médio efetivo e do potencial zeta obtidos após ensaios de DLS e ELS, respectivamente, são apresentados na tabela 2 e figura 13.

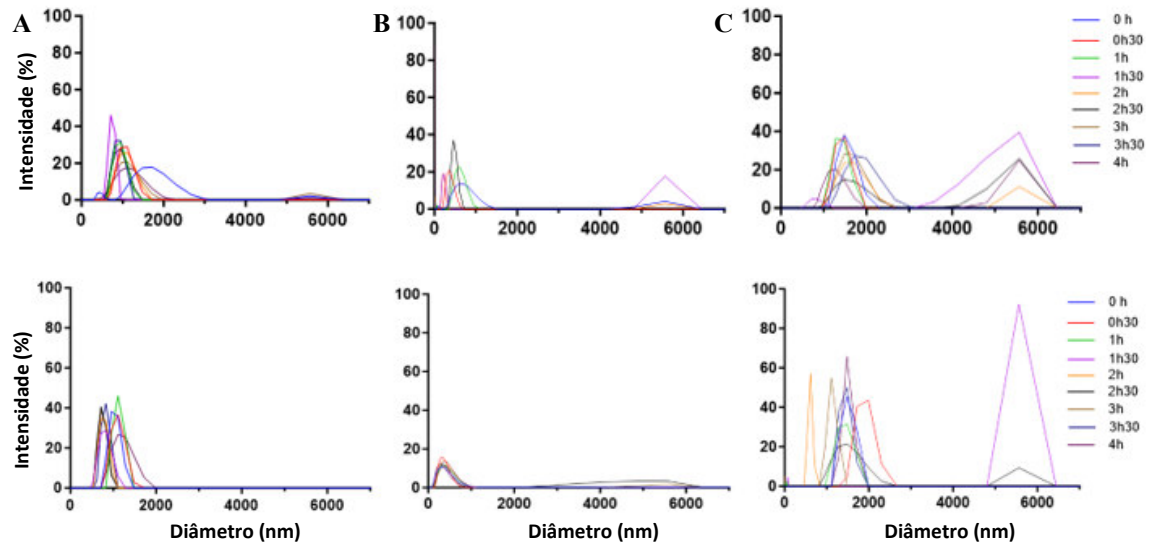
Tabela 2 - Diâmetro médio efetivo (Z-Average), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (ζ) de dispersões dos látices de *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* e *Himatanthus drasticus*.

Espécie	Tempo	Dispersão em água deionizada			Dispersão em solução aquosa de tween 20 0,5%		
		Z-Average (nm)	PDI	ζ (mV)	Z-Average (nm)	PDI	ζ (mV)
<i>Calotropis procera</i> ^{a-d}	0h	2010	0,403	1,22	2066	0,612	-9,86
	0h30	2396	0,744	1,90	1987	0,547	-1,91
	1h	2711	0,844	1,64	2291	0,389	-1,43
	1h30	2286	0,727	1,63	1273	0,588	-6,39
	2h	2517	0,767	2,05	1438	0,617	-7,56
	2h30	2351	0,598	1,44	1588	0,672	-7,65
	3h	2510	0,758	1,69	1635	0,719	-7,49
	3h30	2631	0,872	1,83	1635	0,636	-7,62
	4h	1948	0,617	1,75	1873	0,549	-7,93
<i>Plumeria pudica</i>	0h	739,1 ^{a-d}	0,475	-3,45	257	0,241	-6,11
	0h30	701,5 ^{a-d}	0,579	-3,09	285,1	0,177	-12,1
	1h	1138 ^{a-d}	0,656	-3,20	279,2	0,260	-12,1
	1h30	2590 ^{a-d}	1,000	-4,63	289,8	0,234	-12,8
	2h	2808 ^{a-d}	1,000	-4,94	320,7	0,265	-11,9
	2h30	3474 ^{a-d}	1,000	-2,25	354,5	0,416	-2,17
	3h	6986 ^{a-e}	1,000	-1,14	323,8	0,379	-11,5
	3h30	7992 ^{a-e}	1,000	-2,40	251,5	0,238	-14,0
	4h	8441 ^{a-e}	1,000	-2,67	313,6	0,241	-12,3
<i>Himatanthus drasticus</i> ^{a-d}	0h	5378	0,487	-17,2	5435	0,479	-14,7
	0h30	4953	0,352	-16,5	4263	0,271	-14,6
	1h	5013	0,497	-16,9	5331	0,474	-17,1
	1h30	4732	0,335	-16,1	7491	0,377	-18,8
	2h	5075	0,414	-16,8	4906	0,808	-15,8
	2h30	4210	0,383	-17,0	3905	0,478	-14,8
	3h	4295	0,426	-17,9	5078	0,458	-17,8
	3h30	4114	0,367	-17,4	4836	0,127	-19,2
	4h	4503	0,462	-17,6	4601	0,519	-14,8

As mensurações foram realizadas a cada 30 minutos ao longo de 4 horas. ^a: Presença de partículas grandes ou sedimentadas; ^b: Amostra fluorescente; ^c: Absorbância da amostra (amostras coloridas); ^d: Qualidade de dados muito pobre para análise de distribuição; amostra muito polidispersa para análise de distribuição, e pode não ser adequada para medições DLS; ^e: Tamanho medido superior ao limite do equipamento Zetasizer Nano. O pH das dispersões em água deionizada dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram 5,3, 5,7 e 5,2,

respectivamente. O pH das dispersões em solução aquosa de tween 20 0,5% dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram 6,6, 5,7 e 6,7, respectivamente.

Figura 13 – Distribuição do diâmetro de partículas de borracha e de agregados dessas partículas de dispersões dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C).



Dispersões em água (gráficos na primeira linha) e dispersões em solução aquosa de tween 20 0,05% (gráficos na segunda linha). As mensurações foram realizadas a cada 30 minutos ao longo de 4 horas.

A mensuração do potencial zeta deduz a carga superficial das PBs, e nos permite avaliar a estabilidade coloidal do látex. Essa carga negativa na superfície das PBs, atribuída a proteínas e fosfolipídios, confere estabilidade ao látex por contribuir nas forças de repulsão entre essas partículas, como já foi relatado anteriormente (Sakdapipanich *et al.*, 2015, p. 102).

As dispersões em água deionizada do látex de *C. procera* exibiram potencial zeta positivo, demonstrando a baixa estabilidade desse sistema. Esse comportamento indica a perda dos estabilizadores naturais das PBs, as proteínas e os fosfolipídios. As dispersões em água deionizada do látex de *P. pudica* também exibiram uma diminuição da carga negativa superficial. Apesar de exibirem potencial zeta negativo, os valores foram menores em relação aos valores apresentados pelas dispersões em tween 20 0,5%. Logo, também houve a perda dos estabilizadores naturais nas PBs do látex de *P. pudica* dispersas em água deionizada. Desse modo, é possível afirmar que a solução aquosa de tween 20 0,5% confere maior estabilidade às PBs dos látices de *C. procera* e *P. pudica*. Já as dispersões do látex de *H. drasticus* em água deionizada e em tween 20 não apresentaram diferenças.

Apesar dessas dispersões exibirem potencial zeta negativo, os baixos valores negativos apresentados na tabela 2 demonstram que esses látices possuem baixa estabilidade coloidal, em relação ao látex de *H. brasilienses*, que possuem potencial zeta entre - 34,9 a - 45,7

mV em um pH na faixa de 10 (Silva *et al.*, 2021, p. 3; Ibrahim; Othman; Yusof, 2021, p. 563). No entanto, vale ressaltar que as dispersões avaliadas nesse projeto exibiram pH na faixa de 5,2 a 5,7 em água deionizada e de 5,7 a 6,7 em solução aquosa de tween 20 0,5%.

Essa baixa estabilidade também é observada através dos dados de DLS, os quais indicaram a presença de possíveis agregados de partículas nas dispersões em água deionizadas dos três látices e nas dispersões em tween 20 0,5 % dos látices de *C. procera* e *H. drasticus*. Apenas a dispersão em tween 20 0,5 % do látex de *P. pudica* se manteve estável ao longo das 4 horas. Nessas dispersões o diâmetro das PBs variou entre 257 e 354,5 nm e não foi observado a presença de agregados nessas amostras, demonstrando, assim, o potencial da solução aquosa de tween 20 0,5% em conferir estabilidade coloidal aos látex de *P. pudica*.

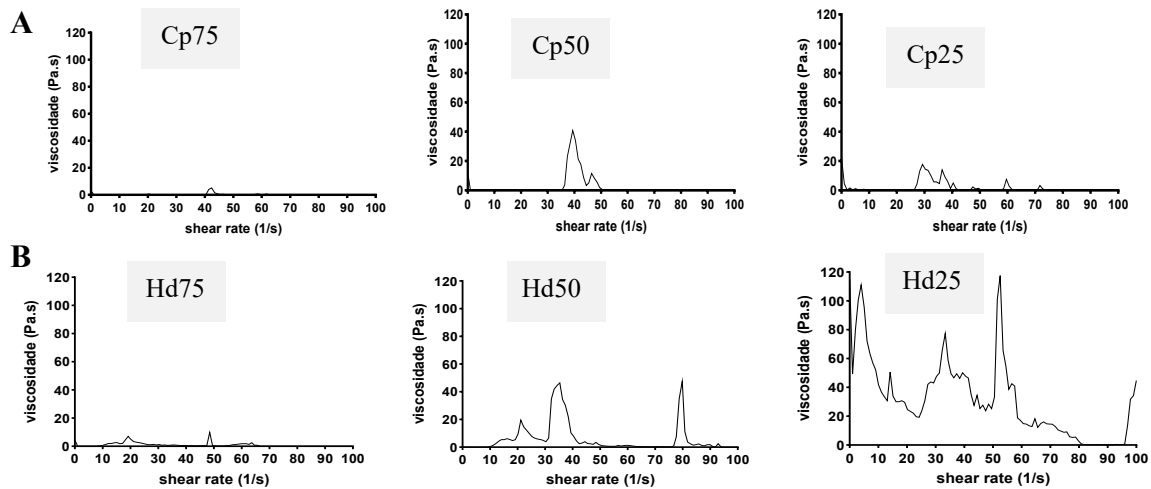
As dispersões em água deionizada do látex de *P. pudica* exibiram diferenças no diâmetro das PBs ao longo das 4 horas. Os valores de diâmetro aumentaram gradualmente ao longo desse período, indicando a formação de agregados de PBs que aumentavam de tamanho à medida que o tempo passava. Como já descrito, esse comportamento não foi observado na dispersão desse látex em tween 20 0,5 %, confirmando novamente o efeito desse surfactante não iônico no aumento da estabilidade coloidal desse látex. As dispersões dos látex de *C. procera* e *H. drasticus* não apresentaram diferenças nos dados de DLS ao longo do tempo de 4 horas.

Por meio dos dados do DLS, também foi observado uma ampla faixa de tamanho de PBs e/ou de seus respectivos agregados em todas as amostras, indicando sua natureza polidispersa (Figura 13).

4.2.2 Propriedades reológicas

Por meio dos testes de viscosidade, foi possível determinar as propriedades de fluxo de amostras dos látices de *C. procera* e *H. drasticus*. Os dados dos testes de viscosidade são mostrados na figura 14.

Figura 14 – Teste de viscosidade de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A) e *Himatanthus drasticus* (B) processadas por centrifugação.



Não foi possível mensurar a viscosidade das amostras Pp75, Pp50 e Pp25, devido ao látex de *P. pudica* possuir estruturas sólidas maior do que o limite permitido do equipamento. É possível que essas estruturas sejam os cristais presentes nesse látex, que possuem dimensões superiores as de PBs já relatadas na literatura. Devido as características do material coagulado do látex de *P. pudica*, também não foi possível a produção de uma peça única de BN. Esse material quando coagulado sem adição de ácido e seco tinha aspecto de farinha seca. Já na coagulação com adição de ácido acético, a BN do látex de *P. pudica*, tinha aspecto de areia molhada e não era possível a formação de uma peça única da borracha. Portanto, não foi realizado os testes oscilatórios e de varredura de temperatura com a amostra de *P. pudica*.

As amostras Cp75, Cp50, Cp25, Hd75, Hd50 e Hd25 exibiram comportamento de fluidos não-newtonianos. Essas amostras não possuem viscosidade bem definida, e apresentaram um perfil de fluxo instável. Ao considerar os picos apresentados na Figura 14 como regiões de maior viscosidade, é possível concluir que as amostras de *H. drasticus* exibem maior viscosidade, em relação as de *C. procera*, especialmente nas amostras mais concentradas.

Nas amostras mais concentradas, Cp50, Cp25, Hd50 e Hd25, houve aumento na viscosidade, mostrando que essas características estão associadas (Figura 14). Esse comportamento, provavelmente, é resultado da agregação das PBs e, conseqüentemente, da coagulação dos látices. À medida que o percentual de água nessas amostras diminui, as PBs ficam mais próximas umas das outras e aumentam as chances de elas colidirem, levando ao processo de coagulação (Sakdapipanich *et al.*, 2015, p. 105).

Por meio dessas observações, é possível discutir um papel biológico das PBs em *C. procera* e *H. drasticus*. No artigo de Bauer *et al.* (2014, p. 6), é discutido a hipótese de que as

propriedades mecânicas do látex é uma adaptação contra pequenos herbívoros e para a cicatrização de feridas na planta (Bauer *et al.*, 2014, p. 6).

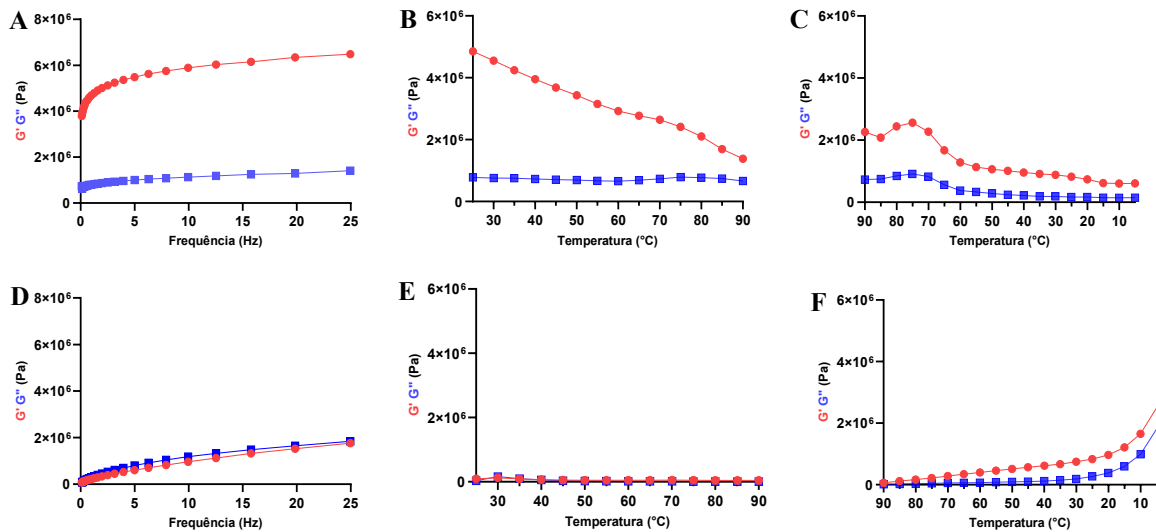
Em seu trabalho, o papel defensivo do látex é associado à sua viscosidade e ao tempo de evaporação de água desse látex. De modo que, o principal papel defensivo dos látices de menor viscosidade e com taxa de evaporação mais lenta seria a entrega de compostos anti-herbivoria, assegurando o maior tempo de exposição dos herbívoros a esses compostos. Já a funcionalidade dos látices exibirem maior viscosidade e taxa de evaporação mais rápida seria seu possível papel na cicatrização de feridas (Bauer *et al.*, 2014, p. 5).

A partir disso, é possível estabelecer essa mesma relação com os látices de *C. procera* e *H. drasticus*. As amostras de *C. procera*, além de exibirem a menor viscosidade, essa viscosidade parece não sofrer muita interferência com o aumento da concentração de PBs e outros solutos. Dessa forma, quando o látex de *C. procera* for liberado de seus tecidos devido a algum dano físico causado por pequenos herbívoros, esse látex permanecerá com baixa viscosidade, mesmo após ter perdido água por evaporação, possibilitando um maior tempo de exposição dos pequenos herbívoros aos seus metabólitos de defesa. De fato, o látex de *C. procera* é ricamente estudado por sua diversidade de metabólitos secundários (Ramos *et al.*, 2022, p. 92).

Em contrapartida, as amostras de *H. drasticus*, além de serem mais viscosas, sofrem maior interferência com o aumento da concentração de PBs e outros solutos. Portanto, esses parâmetros observados indicam ser uma adaptação de *H. drasticus* em utilizar o látex na cicatrização de suas feridas. De fato, o látex de *H. drasticus*, coletado no caule da planta, invoca uma necessidade de cicatrização breve, visto que, diferente de uma folha, que pode ser descartada, na planta, o mesmo não ocorre com o caule.

Nos testes oscilatórios mostrados na figura 15 (A e D), a BN de *C. procera* exibe um módulo elástico (G') superior ao módulo viscoso (G''), indicando maior rigidez. Além disso, esse dado sugere que na BN de *C. procera* há predominância do comportamento elástico. Seu módulo elástico (G') também é superior ao módulo elástico da BN de *H. drasticus* e, portanto, a BN de *C. procera* é mais rígida que a de *H. drasticus*. A BN de *H. drasticus* apresentou o módulo elástico (G') e viscoso (G'') quase na mesma magnitude, mas com o módulo viscoso (G'') se sobressaindo.

Figura 15 - Testes reológicos realizados com borracha natural de *Calotropis procera* (A, B e C) e de *Himatanthus drasticus* (D, E e F).



Teste de *Frequency sweep* (A e D) e de *temperature sweep* (B, C, E e F), com aquecimento de 25 °C a 90 °C (B e E) e subsequente resfriamento de 90 °C para 5 °C (C e F). G', círculos vermelhos; G'', quadrados azuis. BN de *C. procera* foi obtida sem a adição de ácido acético, contando apenas com o processo de coagulação natural. BN de *H. drasticus* foi obtida com adição de ácido acético, como descrito no item 3.4, do capítulo 1 deste trabalho. O gap aplicado na análise das BNs de *C. procera* e *H. drasticus* foi de 1.000 μm e 10.000 μm , respectivamente.

No entanto, vale ressaltar que a obtenção de ambas as BNs foram diferentes. A BNs de *C. procera* foi obtida a partir da coagulação natural, sem adição de nenhum produto, enquanto a de *H. drasticus* foi adiciona grande volume de ácido acético, o que pode ter influenciado nos baixos valores nos módulos, elástico e viscoso.

A rigidez em BNs é atribuído à presença de SRPs e às redes de interações formadas entre as cadeias de borracha e as extremidades de CNB, fosfolípidios e proteínas (Siriring *et al.*, 2020, p. 4). As SRPs, por possuírem maior superfície de contato e, portanto, maior quantidade de proteínas e fosfolípidios, aumentam os pontos de reticulação e dificultam a mobilidade das moléculas de borracha (Nun-Anan *et al.*, 2020, p. 55; Huang *et al.*, 2020, p. 158). Dessa forma, a borracha com SRPs torna-se mais dura e resistente (Siriring *et al.*, 2020, p. 6).

Além disso, tem sido demonstrado que quanto maior o percentual de SRPs em relação as LRPs, maior será os valores do módulo elástico (G') (Siriring *et al.*, 2020, p. 6). Assim, é proposto que há SRPs no látex de *C. procera* e, portanto, na composição de sua BN. Ao comparar os dados da reologia das amostras de *C. procera* com as de *H. drasticus*, é possível sugerir que há menor percentual de SRPs no látex de *H. drasticus* e, portanto, na composição de sua BN.

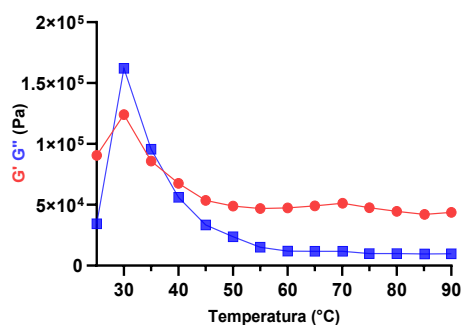
Nos testes de *Temperature sweep* mostrados na figura 15 (B, C, E e F), o módulo elástico (G') da BN de *C. procera* permaneceu dominante sobre o módulo viscoso (G''), na

etapa de aquecimento (Figura 15 B) e do subsequente resfriamento (Figura 15 C). No entanto, a BN de *C. procera* tornou-se menos elástica à medida que a temperatura aumentava. Isso pode ser explicado pela quebra de ligações fracas, como ligações de hidrogênio e ligações iônicas, nas redes de reticulação. As ligações de hidrogênio se quebram gradualmente a cerca de 80 a 100 °C (Nun-Anan, *et al.*, 2020, p. 55; Huang *et al.*, 2020, p. 158). Assim, o aumento da temperatura causa a quebra dessas ligações, ocasionando a decomposição das redes de reticulação e, portanto, a diminuição da rigidez da BN de *C. procera*.

O aumento da temperatura parece não ter efeito sobre o módulo viscoso (G'') da BN de *C. procera*, uma vez que este se alterou apenas na etapa de resfriamento até 5 °C (Figura 15 C). Além disso, na etapa de resfriamento, a redução do módulo elástico (G') continuou.

Na BN de *H. drasticus*, houve mudança do comportamento com o aumento da temperatura (Figura 15 E). O módulo elástico (G') passou a ser dominante sobre o módulo viscoso (G''), havendo a predominância do comportamento elástico. Esse comportamento elástico permaneceu durante subsequente resfriamento de 90 a 5 °C (Figura 15 F). Na etapa de aquecimento houve dois cruzamentos de G' e G'' , o primeiro a 28 °C e o segundo entre 37 e 37,5 °C. Esses cruzamentos nas curvas de G' e G'' são mostrados na figura 15 E, e com mais detalhes na figura 16. Na faixa de temperatura dentro dos dois cruzamentos de G' e G'' , entre 28 °C e 37,5 °C, a BN de *H. drasticus* apresenta comportamento viscoso (Figura 16).

Figura 16 – Cruzamento nas curvas de G' e G'' na etapa de aquecimento de 25 °C a 90 °C do teste de *temperature sweep* com a borracha natural *Himatanthus drasticus*.



G' , círculos vermelhos; G'' , quadrados azuis.

Em látices de *H. brasiliensis* comercializados não há predominância de um módulo específico sobre o outro. Haverá látices com dominância do módulo elástico (G') e outros com dominância do módulo viscoso (G'') (Singh, 2018, p. 131). Essa diferença é resultado da composição heterogênea dos látices em relação ao tamanho das PBs, que pode variar entre plantas de uma mesma espécie (Chan *et al.*, 2018, p. 256).

Os resultados apresentados neste capítulo mostram que: 1) os látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* exibem baixa estabilidade coloidal após coleta e tem natureza polidispersa; 2) propriedades mecânicas apresentadas pelos látices de *C. procera* e *H. drasticus* são adaptações contra pequenos herbívoros e para a cicatrização de feridas, respectivamente; e 3) no látex de *C. procera* a predominância é de SRPs.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE BORRACHA DOS LÁTICES DE *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* E *Himatanthus drasticus*

5.1 Procedimentos experimentais

5.1.1 Material vegetal

As amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* utilizadas nas análises deste capítulo foram obtidas conforme o item 3.2, do capítulo 1 deste trabalho.

5.1.2 Caracterização de polímeros por espectroscopia

Para identificação do poliisopreno das PBs e de sua respectiva isomeria, amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica*, *H. drasticus* foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (FT-IR - *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) e de Raman. Para essas análises, foram utilizadas as amostras da diluição em série do tubo 5 (diluição 1/32) dos látices coletados em água destilada, descritas no item 3.8, do capítulo 1 deste trabalho. Os dados foram analisados com auxílio do software Fityk 1.3.1 e OriginPro 2023.

5.1.2.1 Espectroscopia de Infravermelho

Foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu, modelo IR-tracer 100 (Shimadzu Corp., Osaka, Japão). Os espectros foram registados na faixa de 4000-500 cm^{-1} , com resolução de 1 cm^{-1} . Nessa etapa, as amostras da diluição 1/32 dos látices de *C. procera*, *P. pudica*, *H. drasticus* foram liofilizadas e então analisadas.

5.1.2.2 Espectroscopia Raman

Foi utilizado um microscópio Raman confocal, equipado com um microscópio invertido Nikon Eclipse Ti-U, operando com uma lente de 20x de magnificação. Para excitação dos materiais, foi empregado um laser de Hélio-Neônio ($\lambda=632,8$ nm). O Espectrômetro utilizado foi um Shamrock SR 303i acoplado a uma câmera IDus, equipado com uma grade de difração de 600 linhas/mm como elemento dispersivo. A resolução lateral foi de 200-300 nm. Nessa etapa, um volume de 20 μL das amostras da diluição 1/32 dos látices de *C. procera*, *P. pudica*, *H. drasticus* foi adicionado em placas de sílico e secas no exsiccador por 24 horas, e então foram analisadas.

5.1.3 Fluorescência de Raios X

A composição elementar dos látices foi mensurada através do espectrômetro de fluorescência de raios X dispersivo de comprimento de onda sequencial (Ragaku ZSX, modelo Mini II). O equipamento foi operado a 40 kV e 1,2 mA, com tubo de Pd (Paládio). Nessa análise, foi utilizado o látex íntegro de *C. procera* e *P. pudica*, enquanto o látex de *H. drasticus* estava diluído em água potável na proporção de 1:1 (v:v). Foi realizado análises semiquantitativas dos elementos de número atômico maior ou igual ao do elemento flúor (F, número atômico: 9), até o elemento urânio (U, número atômico: 92).

5.1.4 Microscopia de força atômica (AFM)

As características micromorfológicas das PBs dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram analisadas por AFM empregando-se um microscópio MFP3D-BIO da Asylum Research (Oxford Instruments, Santa Barbara, California, USA). A ponteira, associada ao cantiléver, foi do modelo Econo-LTESP com constante de mola nominal (ou constante de força) de 40 N/m e frequência de 300 kHz para produzir imagens no modo *tapping*. A ponteira é de Oxford Instruments Company. Nessa análise, foram utilizadas as amostras da diluição em série do tubo 5 (diluição 1/32) dos látices coletados em água, descritas no item 3.8, do capítulo 1 deste trabalho. Essas amostras foram previamente sonicadas por 5 minutos, com a finalidade de desfazer possíveis agregados de PBs presentes nas amostras. Em seguida, 5 μ L da amostra sonicada foi adicionada sobre uma placa de mica e deixada secar na temperatura da sala, por cerca de 20 minutos. Após esse intervalo, as amostras foram imediatamente analisadas no AFM. Uma lâmina de vidro foi utilizada como superfície rígida para calibrar a sensibilidade do fotodetector. As análises foram realizadas à temperatura ambiente da sala.

5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características micromorfológicas das PBs e a identificação e distribuição de elementos químicos dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram obtidas por MEV (Quanta-450 FEG, FEI). A análise dos elementos químicos foi realizada por meio da espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS). Os elementos selecionados para essa medida foram: oxigênio (O), magnésio (Mg), enxofre (S), cloro (Cl), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e sódio (Na). Nessa análise, foram utilizadas as amostras da diluição em série do

tubo 5 (diluição 1/32) dos látices coletados em água e em NaCl 0,15 M, descritas no item 3.8, do capítulo 1 deste trabalho. Um volume de 30 μ L de cada amostra foi adicionado em um fragmento pequeno de lamínula de vidro, secas à temperatura da sala e, então, fixado no *stubs*, e cobertas com uma fita de carbono. Foi analisado também a morfologia de BNs preparadas a partir da coagulação ácida desses látices. Nesse estudo, foram utilizadas peças de borrachas produzidas a partir da coagulação com ácido acético, como descrito no item 3.4, do capítulo 1 deste trabalho. Nessa etapa, não foi realizado a prensa manual dessas BNs, como referida no item 3.4, para evitar qualquer alteração na estrutura das borrachas.

5.1.6 Microscopia confocal

Emissões de fluorescência dos látices foram identificadas através do microscópio confocal LM-710 – Zeiss. Laser em 6 comprimentos de onda foi testado sobre as amostras, 405nm, 458nm, 488nm, 514nm, 543nm, 633nm. Cada amostra foi previamente examinada na objetiva de 10x do microscópio óptico invertido acoplado. Nessa análise foi utilizado o látex íntegro de *C. procera* e *P. pudica*, enquanto o látex de *H. drasticus* estava diluído em água potável na proporção de 1:1 (v:v). Um volume de 30 μ L de cada amostra foi adicionado em uma lâmina de vidro e imediatamente a análise foi realizada.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros FTIR obtidos das amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* são apresentados na figura 17. As três amostras exibiram bandas de absorção de espectros de poliisopreno, com bandas intensas de absorbância nas regiões entre 2850 e 3100 cm^{-1} e entre 1500 e 600 cm^{-1} (Lu; Hsu, 1987, p. 650; Santos; Suarez; Rubim, 2005, p. 36). As bandas de absorção relativa aos modos vibracionais de poliisopreno identificadas nesses espectros são apresentadas na tabela 3.

Figura 17 - Espectros do FTIR de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C).

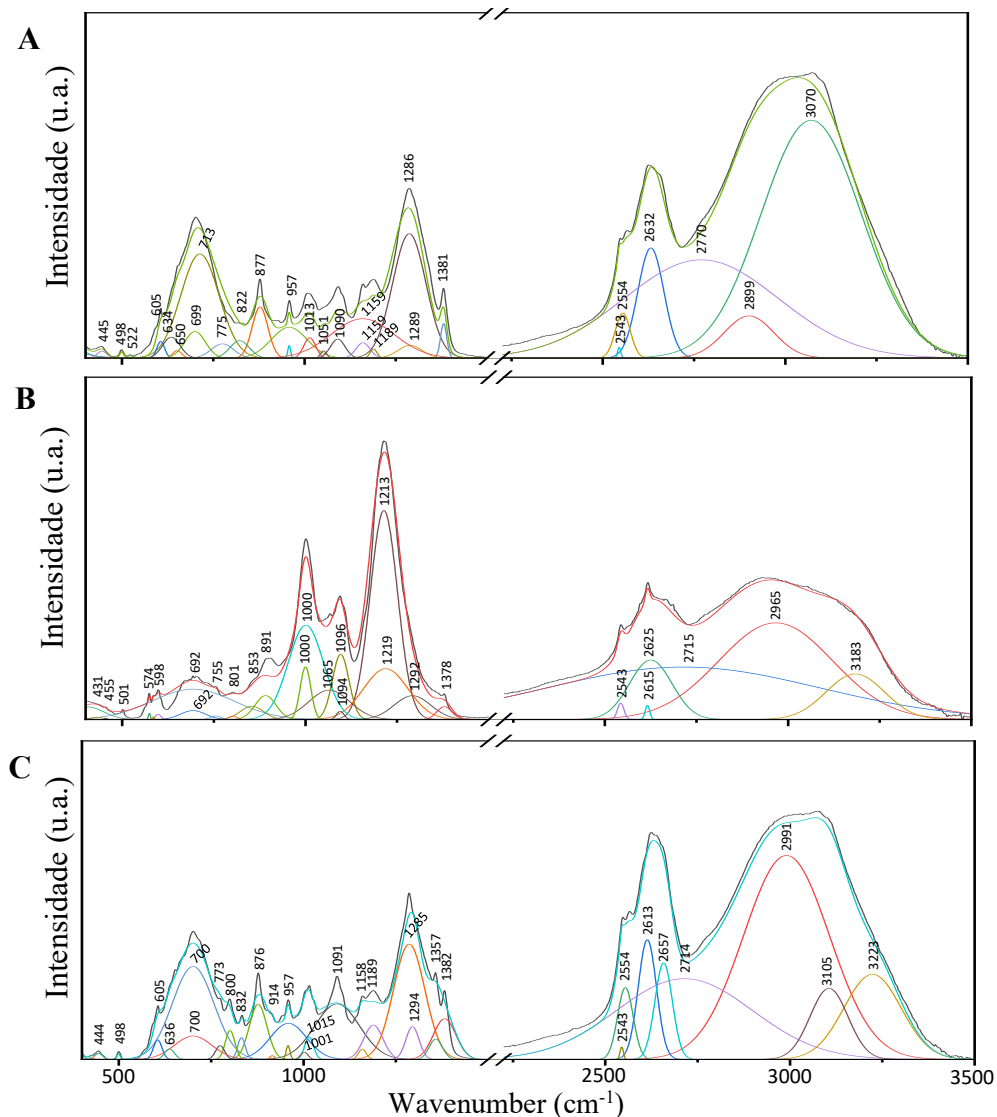


Tabela 3 - Bandas de absorção identificadas nos espectros FTIR de amostras dos látices de *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* e *Himatanthus drasticus* relativas aos modos vibracionais de *cis*-1,4-poliisopreno e *trans*-1,4-poliisopreno.

<i>Calotropis procera</i>	<i>Plumeira pudica</i>	<i>Himatanthus drasticus</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	Atribuição ¹
3070			3070	3053	=C-H estiramento
	2965		2962	2865	CH ₃ estiramento assimétrico
1381	1378	1382	1377	1382	CH ₃ estiramento assimétrico
		1357	1359	1358	CH ₃ estiramento simétrico
1289			1287		C-H bending
1286		1285	1286	1280	=C-H no plano
	1096		1100	1096	C-CH ₂ estiramento
1090		1091	1089	1089	C-CH ₂ estiramento
1051				1051	CH ₃ deformação
		800		800	=C-H deformação
	574		573		C=CH ₂ torção

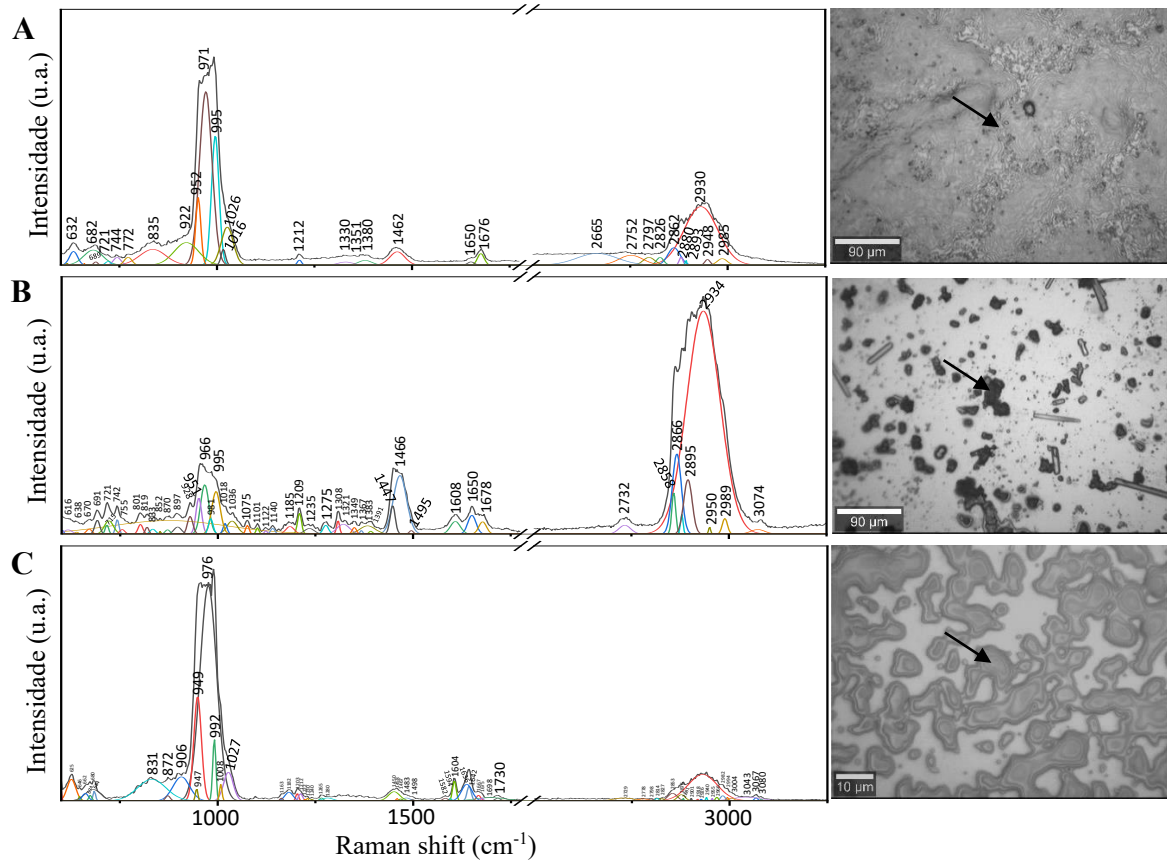
Bandas identificadas com auxílio do software Fityk 1.3.1. ¹: LU; HSU, 1987, p. 650; Santos; Suarez; Rubim, 2005, p. 36.

A banda de 3229 cm⁻¹ identificada na amostra do látex de *H. drasticus* pode ser atribuída a grupos OH, que está relacionada a ligações de hidrogênio com proteínas (Barth, 2007, p. 1079). Absorbâncias características de proteínas também foram identificadas. Bandas nas regiões 1170 cm⁻¹ a 1382 cm⁻¹ foram exibidas nas amostras dos três látices. Essas bandas são atribuídas a grupos CH₂ de proteínas. Além disso, a amostra do látex de *P. pudica* exibiu a banda 1094 cm⁻¹, que é atribuída a ligações C-H de histidina.

5.2.2 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman obtidos das amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* são apresentados na figura 18. Assim como no FTIR, os espectros Raman exibiram bandas de absorção comuns em espectros de poliisopreno (Cornell; Koenig, 1969, p. 547). Os espectros Raman exibiram bandas intensas de estiramento de metil (CH₃) e metileno (CH₂) entre 2800 e 3000 cm⁻¹. As amostras dos três látices também exibiram bandas intensas de C-CH₃ entre 920 e 1020 cm⁻¹, característico dos espectros de poliisopreno. As bandas de absorção relativa aos modos vibracionais de poliisopreno identificadas nos espectros Raman são apresentados na tabela 4.

Figura 18 - Espectros de Raman de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C).



Imagens do lado direito foram obtidas por meio do microscópio invertido Nikon Eclipse Ti-U. As setas pretas indicam o local de onde foi obtido os espectros Raman.

Tabela 4 - Bandas de absorção identificadas nos espectros Raman de amostras dos látices de *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* e *Himatanthus drasticus* relativas aos modos vibracionais de *cis*-1,4-poliisopreno e *trans*-1,4-poliisopreno.

<i>Calotropis procera</i>	<i>Plumeira pudica</i>	<i>Himatanthus drasticus</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	Atribuição ¹
		2955	2957	2969	CH ₃ estiramento assimétrico
2930		2926	2929	-	CH ₂ estiramento assimétrico
2880		2876	2878	2879	CH ₃ estiramento assimétrico
		2853	2853	2850	CH ₃ estiramento assimétrico
	1447		1445		CH ₃ deformação.
1380	1383			1380	CH ₃ deformação
	1367		1369		CH ₃ deformação
1351			1359	1354	CH ₂ balanço/oscilação
	1321		1321	1323	=C-H deformação
	1308		1308		=C-H deformação
	1235	1240	1238		CH ₂ deformação
		1280	1286	1281	=C-H deformação
		1222		1223	=C-H deformação
		1203	1201	1203	=C-H deformação
	1036		1038	1032	CH ₃ balanço/oscilação
995	995		996		CH ₃ deformação

819		816	=C-H deformação
755		753	=C-H deformação
	494	493	C-C deformação
	352	355	=CC ₂ cisão
429		428	=CC ₂ balanço/oscilação
346		343	=CC ₂ cisão

Bandas identificadas com auxílio do software Fityk 1.3.1. ¹: Cornell; Koenig, 1969, p. 547.

Ambos os espectros, FTIR e Raman, exibiram intensa sobreposição de bandas, de modo que não foi possível a identificação exata da isomeria do poliisopreno dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*. No entanto, o trabalho de Silva *et al.* (2003, p. 107), com o látex de uma espécie do gênero *Himatanthus*, *H. sucuuba*, identificou o poliisopreno isolado desse látex como sendo *cis*-poliisopreno (Silva *et al.*, 2003, p. 107). Portanto, é possível que as cadeias de poliisopreno de *H. drasticus* também tenham isomeria *cis*.

5.2.3 Fluorescência de Raios X

A composição elementar de amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, identificada por meio do espectrômetro de fluorescência de raios X, é apresentada na tabela 5. No geral, foram detectados oito elementos químicos: cloro (Cl), enxofre (S), magnésio (Mg), potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), estrôncio (Sr) e silício (Si).

Tabela 5 - Composição química de amostras dos látices de *Calotropis procera*, *Plumeria pudica* e *Himatanthus drasticus*, em porcentagem em massa, determinada por fluorescência de raios X.

Elemento	<i>Calotropis procera</i>	<i>Plumeira pudica</i>	<i>Himatanthus drasticus</i>
Cl	47,115	0,244	27,639
S	28,392	0,048	1,348
Mg	13,464	-	12,905
K	6,770	0,134	18,377
P	4,258	-	0,592
Ca	-	99,138	37,661
Sr	-	0,435	-
Si	-	-	1,477

Cl: cloro; S: enxofre; Mg: magnésio; K: potássio; P: fósforo; Ca: cálcio; Sr: estrôncio; Si: silício.

Os elementos mais abundantes nas amostras de látex de cada espécie foram Cl, S e Mg no látex de *C. procera*, Ca no de *P. pudica* e Ca, Cl, K e Mg na amostra de *H. drasticus*. Apenas três elementos, Cl, S e K, são comuns nos três látices avaliados, mas em um percentual muito inferior em *P. pudica*. O elevado percentual de Ca no látex de *P. pudica* é explicado pela

presença de muitas estruturas de cristais que possuem Ca na sua composição, tais como o malonato de cálcio, e que não foram identificados nos látices de *C. procera* e *H. drasticus*.

Além disso, o Ca, K, P, Mg e S são constituintes minerais comuns dos látices de *Hevea brasiliensis*. Esse conteúdo de minerais também é denominado de teor de cinzas e é influenciado significativamente pela sazonalidade (Bottier, 2019, p. 221). Além disso, esses minerais exercem influência no processo de floculação das PBs, de modo que baixos teores de K e P estão correlacionados com a baixa estabilidade coloidal dos látices (D'auzac; Jacob; Chrestin, 2018, p. 82; Bottier, 2019, p. 222). A presença de P também é indicativo de fosfolipídios, o qual é constituinte das membranas das PBs (Sakdapipanich *et al.*, 2015, p. 102).

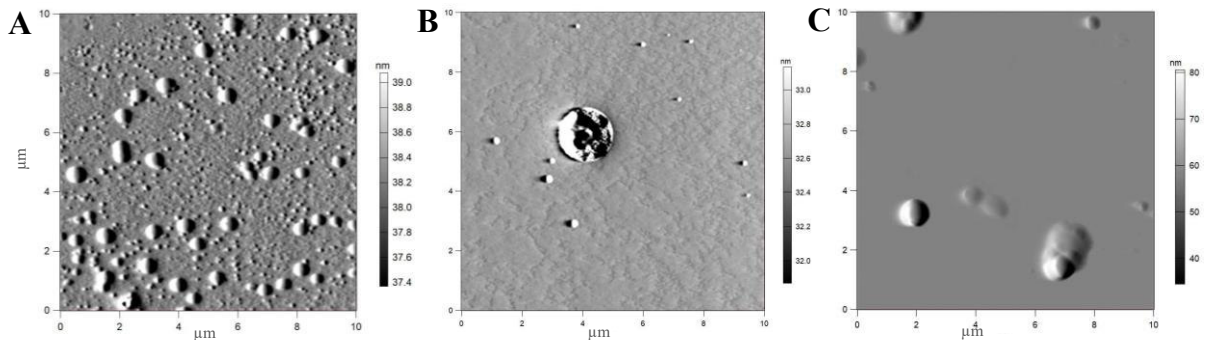
Em relação ao maior percentual de S no látex de *C. procera*, esse fato pode estar relacionado a presença de proteases cisteínicas (Freitas *et al.*, 2007, p. 783; Freitas *et al.*, 2016, p. 2016). Essa classe de protease não foi identificada no látex de *H. drasticus*, portanto, a presença de S nesses látices pode ser atribuída a presença de outras proteínas, uma vez que esse elemento faz parte da composição de aminoácidos, como a metionina e a cisteína (Freitas *et al.*, 2015, p. 50). Vale ressaltar que essa é uma análise comparativa dos látices de *C. procera* e *H. drasticus*, e que os elementos identificados nesses látices, além do S, estão também relacionados à diversas outras funções do metabolismo vegetal.

A diferença na proporção dos elementos, bem como a presença ou ausência de elementos em cada látex avaliado, pode estar relacionada ao acúmulo diferencial de elementos específicos por cada espécie de planta e a composição do solo. Isso pode exemplificar a presença de Sr apenas no látex de *P. pudica* e de Si no látex de *H. drasticus*, uma vez que ambos os elementos são comuns no solo, especialmente o Si (Snoeck *et al.*, 2020, p. 3; Khan *et al.*, 2023, p. 302). Vale ressaltar que, os látices de ambas as espécies foram coletados de plantas de localidades diferentes, logo, uma possível variação na composição do solo dessas duas localidades pode justificar essa diferença na composição dos látices.

5.2.4 Microscopia de força atômica (AFM)

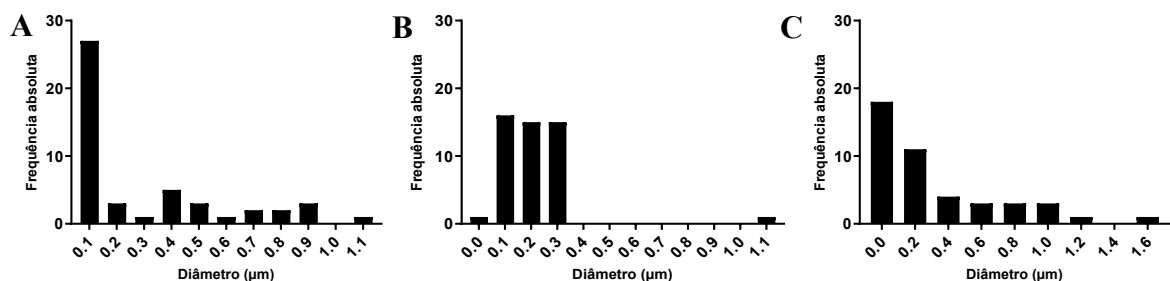
A partir das imagens de AFM de amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, foi possível observar que as PBs desses respectivos látices tinha formato esférico e superfície, predominantemente, uniforme, como pode ser percebido na figura 19. Todas as imagens de AFM foram obtidas de amostras de látices previamente processadas no sonicador, que contribuiu na dispersão das PBs no meio aquoso. No entanto, ainda foi observado a presença de agregados dessas partículas com formatos irregulares.

Figura 19 – Imagens de AFM no modo tapping de partículas de borracha de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C).



As PBs dos três látices demonstraram serem muito polidispersas em tamanho. A figura 20 mostra a distribuição de tamanho dessas partículas. O diâmetro das PBs do látex de *C. procera* variaram entre 0,08-1,1 μm , mas a predominância foram de PBs com 0,1 μm de diâmetro. Já as PBs do látex de *P. pudica*, possuíam diâmetro entre 0,02-1,1 μm , e predominância de PBs com diâmetro entre 0,1-0,3 μm . No látex de *H. drasticus* foi observado PBs com diâmetro variando entre 0,06-1,6 μm e a predominância de PBs com diâmetro entre 0,06-0,2 μm .

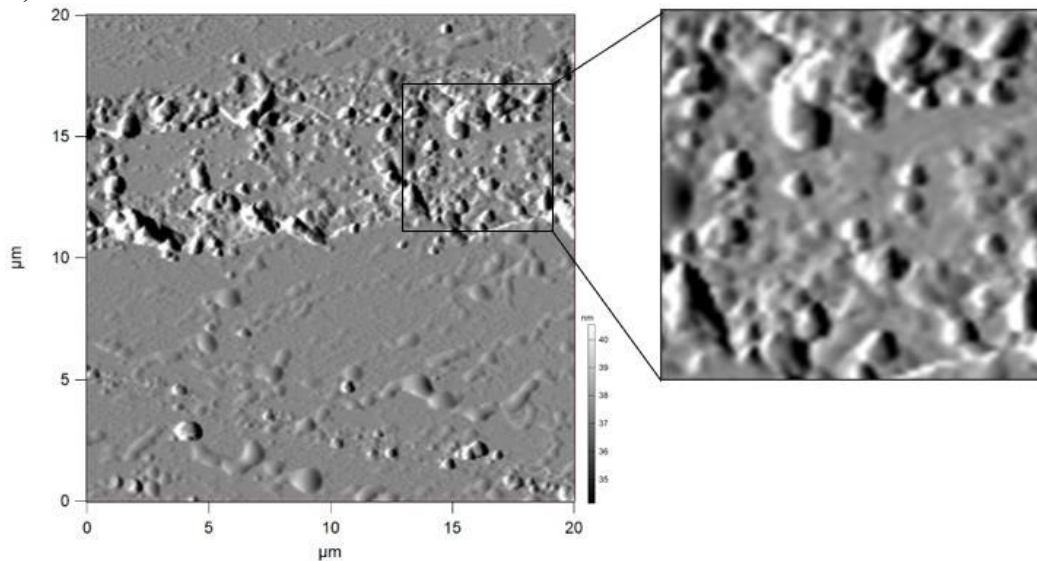
Figura 20 – Frequência absoluta do diâmetro das partículas de borracha dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C).



50 PBs de cada látex foram contadas para plotar cada um dos gráficos.

Antes de definir o uso do sonicador nas amostras dos látices, outra metodologia foi inicialmente empregada com a finalidade de trabalhar com PBs dispersas em solução. Foi testado o uso de soluções de NaCl com Tween 20 (NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01% e NaCl 0,15 M com Tween 20 0,3%) para diluição dos látices. Foi realizado o mesmo procedimento de diluição seriada descrito no item 3.8, do capítulo 1 deste trabalho. No entanto, ao examinar na AFM uma amostra em branco, contendo apenas a solução de NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01%, sem látex, foi observado a presença de inúmeras micelas na solução, com estrutura muito semelhante as de PBs (Figura 21).

Figura 21 – Imagens de AFM no modo tapping da solução de NaCl 0,15 M com Tween 20 0,01% não sonicadas.

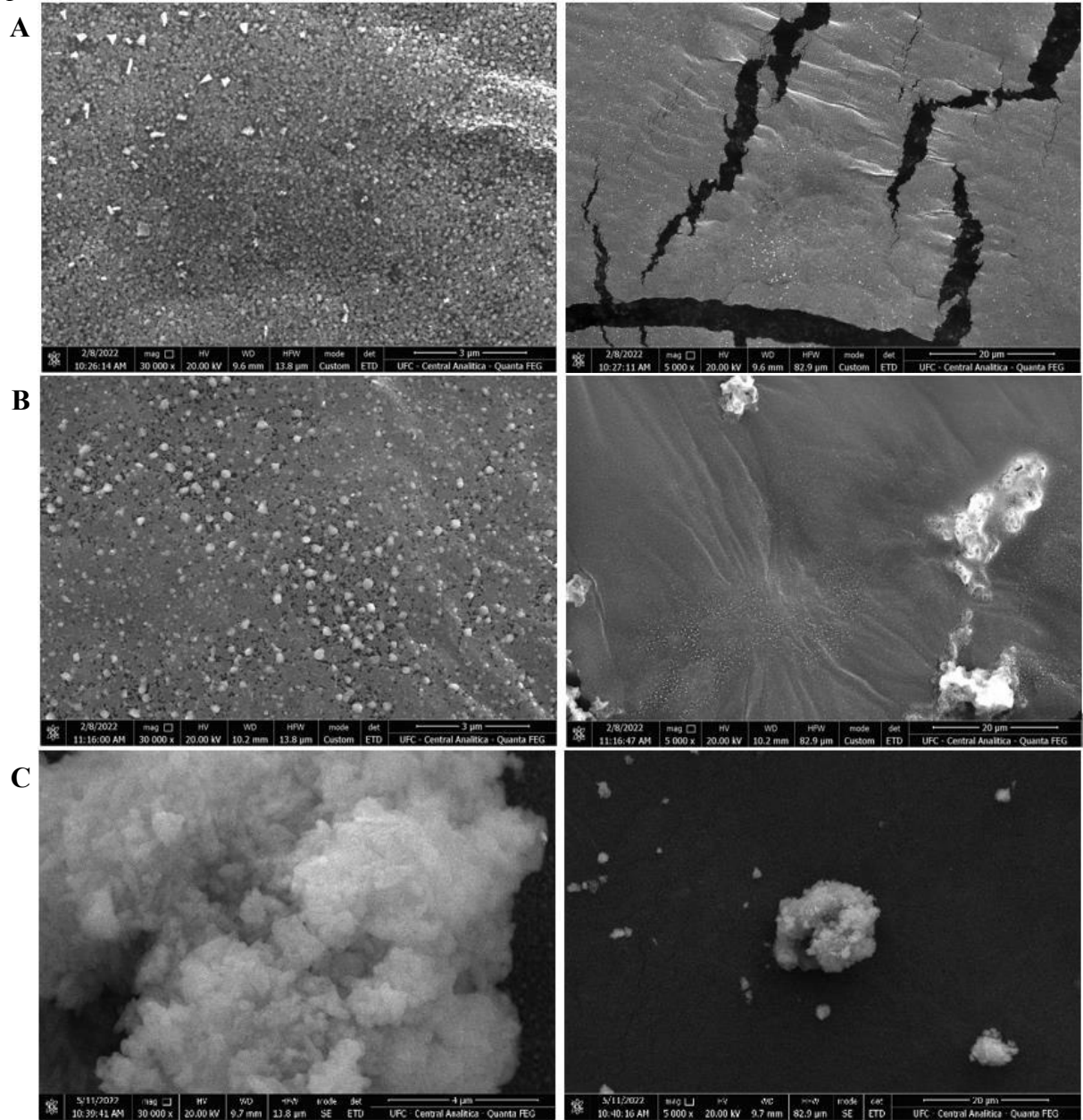


Os surfactantes em solventes polares possuem essa capacidade de auto associação (Knoch *et al.* 2021, p. 3156). Logo, apesar do Tween 20 nas concentrações de 0,01% e 0,3% manterem as PBs dispersas, como demonstrado na Figura 12, do capítulo 1, o seu uso em procedimentos destinados a visualização dessas partículas revelou ser inadequado, devido a sua capacidade de formar micelas em solução aquosa e impossibilitar a diferenciação das PBs nesse meio.

5.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

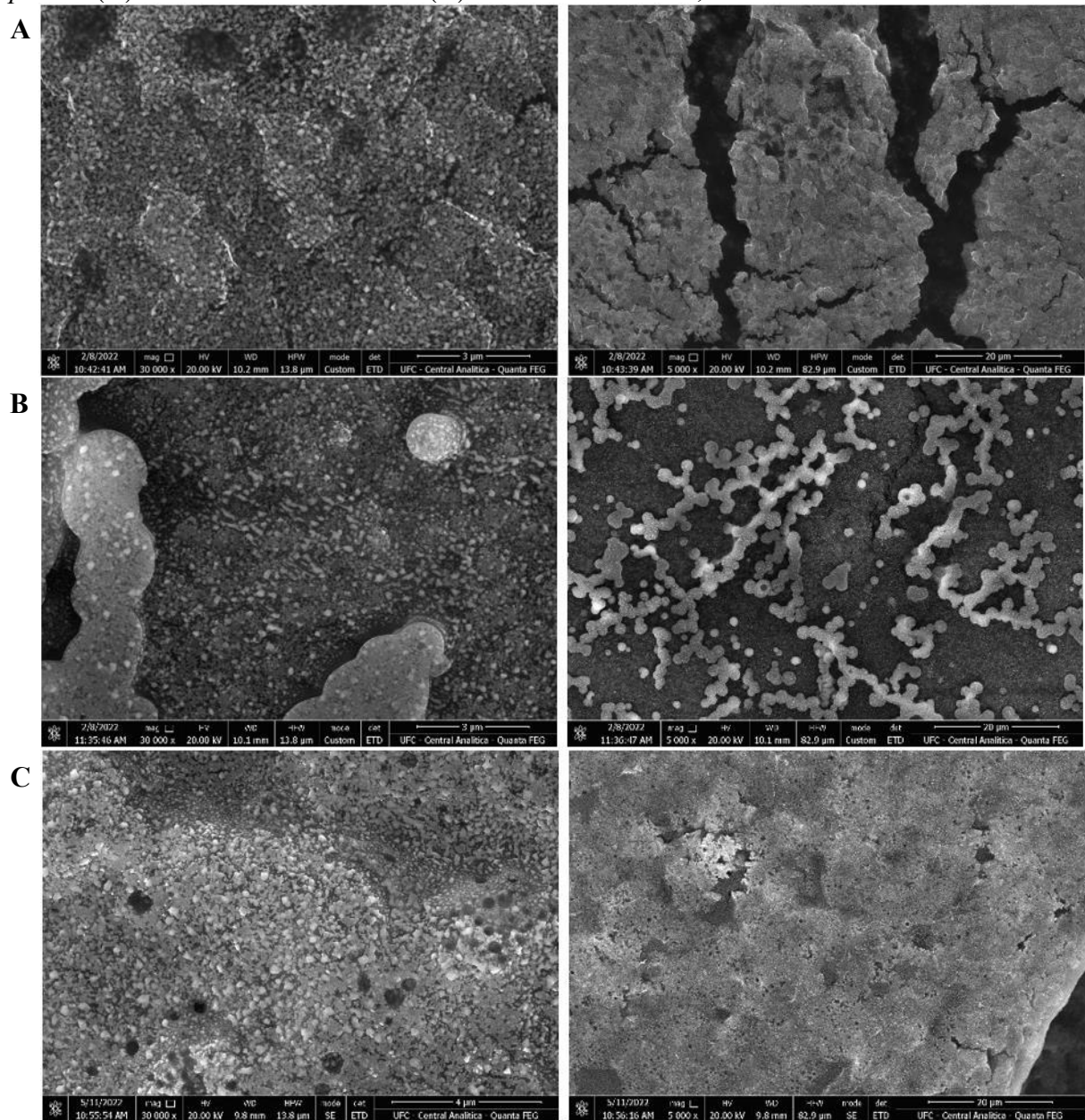
As PBs visualizadas por MEV estavam próximas umas das outras. As amostras dos látexes das três espécies formaram um filme uniforme sobre a superfície da lamínula, exceto a do látex de *H. drasticus* diluído em água destilada (Figuras 22 e 23). Nessa amostra de *H. drasticus* foi observado a formação de agregados de PBs de formatos irregulares e concentrados (Figura 22 C). Aqui, as PBs das amostras dos látexes não se mantiveram dispersas, como foi verificado através da AFM. Essa diferença pode ser atribuída ao uso do sonicador nas amostras visualizadas na AFM, o qual não foi aplicado às amostras analisadas por MEV.

Figura 22 – Imagens de MEV de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C) diluídos em água destilada.



Os látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram submetidos a processos de diluição em série, por um fator de diluição de 2. As diluições 1/32 em água destilada das amostras de cada látex foram utilizados para visualização na MEV. As imagens possuem ampliações de 30.000x (esquerda) e 5.000x (direita).

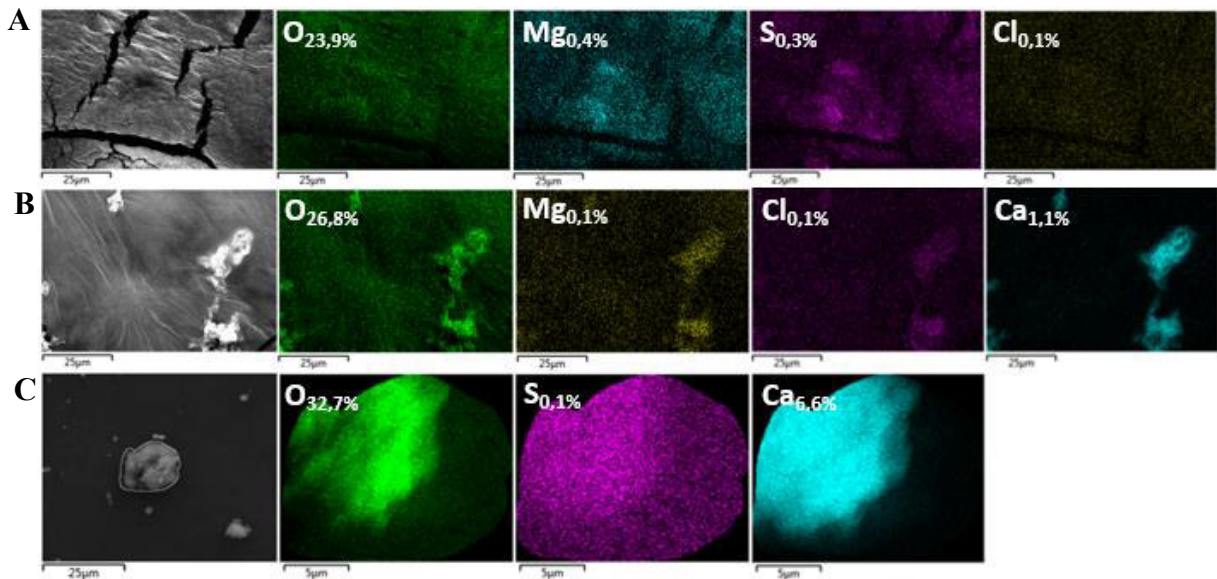
Figura 23 – Imagens de MEV de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C) diluídos em NaCl 0,15 M.



Os látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram submetidos a processos de diluição em série, por um fator de diluição de 2. As diluições 1/32 em NaCl 0,15 M das amostras de cada látex foram utilizados para visualização na MEV. As imagens possuem ampliações de 30.000x (esquerda) e 5.000x (direita).

A microanálise química por EDS mostrou a presença de O, Mg, S, Cl e Ca. Na figura 24 são mostrados os mapas de cores dos elementos químicos identificados nas amostras de cada látex e o percentual desses elementos. A distribuição desses elementos não foi igual para todas as amostras avaliados, com exceção do O. O elemento O esteve presente nas três amostras e em grandes quantidades, com valores de até 32,7%. O Ca presente apenas em *P. pudica* e *H. drasticus* estava presente pequena quantidade, com valores entre 1-10%, e os demais elementos foram identificados apenas traços, exibindo valores menores que 1%.

Figura 24 – Micrografias de MEV. Imagens de MEV e microanálise por EDS dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C) diluídos em água destilada.



Os látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram submetidos a processos de diluição em série, por um fator de diluição de 2. As diluições 1/32 em água destilada das amostras de cada látex foram utilizados para visualização na MEV. Os percentuais apresentados em cada mapa de cor correspondem a presença dos elementos oxigênio (O), magnésio (Mg), enxofre (S), cloro (Cl) e cálcio (Ca).

As imagens da figura 24 mostram que os elementos presentes nessas amostras possuem um padrão de distribuição semelhante, mas com maior ou menor concentração em algumas regiões. Os elementos, O, Mg, S, Cl e Ca, são constituintes da fração soro do látex. Nessa análise, seria esperado a quantificação de P e K, uma vez que ambos os elementos foram identificados na fluorescência de raios X e são constituintes minerais comuns dos látices (Bottier, 2019, p. 222). No entanto, eles podiam estar em concentrações muito baixas nas amostras avaliadas na MEV e, portanto, não foram detectados.

Os mapas elementares do S pode ser um indicativo de proteínas adsorvidas na superfície das PBs. Além disso, os dados desses mapas estão de acordo com os valores apresentados na análise de fluorescência de raios X. Uma vez que, o percentual de S nas amostras do látex de *P. pudica* exibiu um valor muito inferior as demais amostras, de *C. procera* e *H. drasticus*. Desse modo, a concentração de S na amostra do látex de *P. pudica* avaliada na MEV podia estar, também, em baixas concentrações e, portanto, não foi detectado.

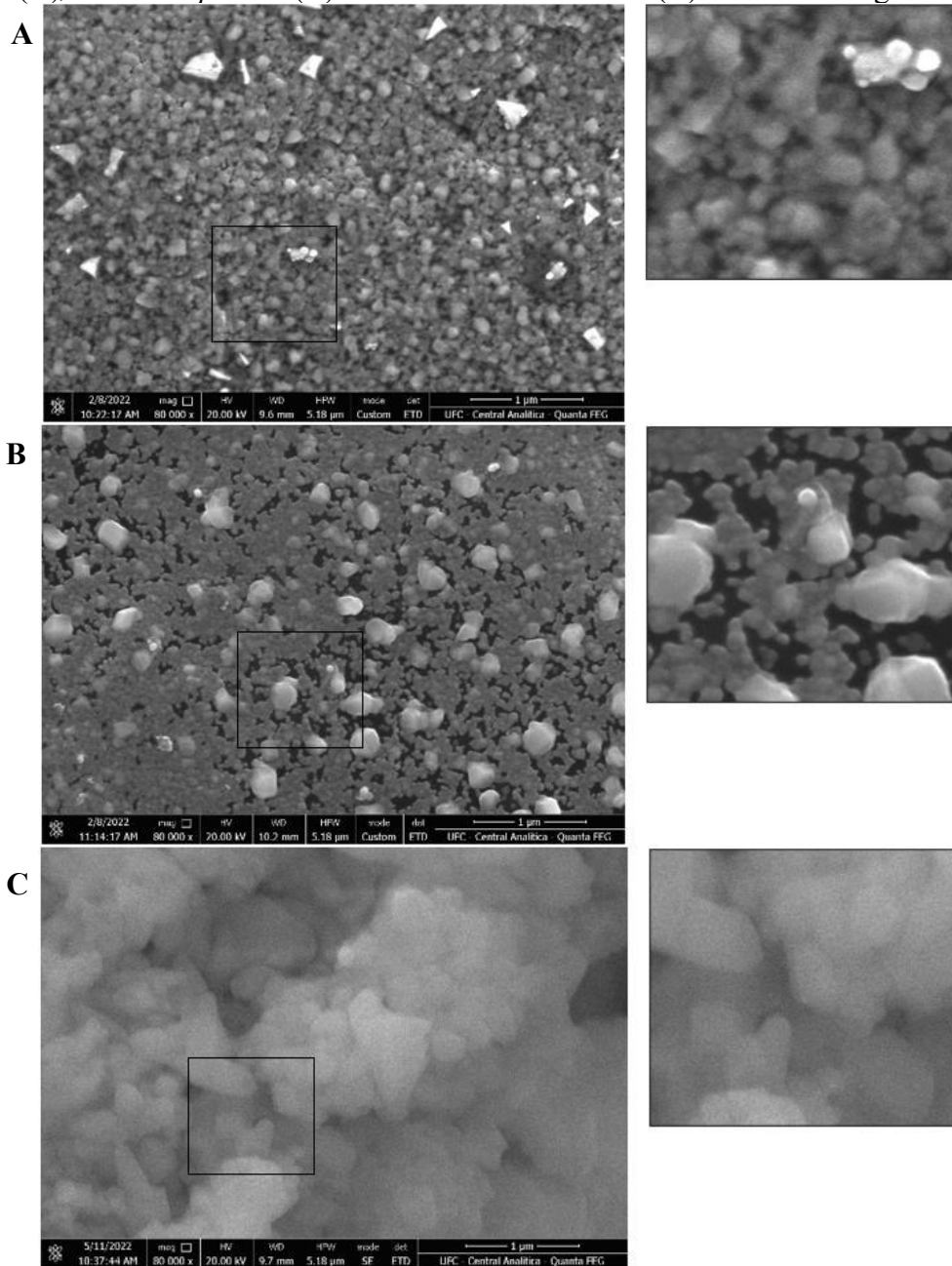
A variação na identificação dos elementos dessa análise com a fluorescência de raios X deve estar relacionada com o acúmulo diferencial dos elementos por *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, e com a composição do solo, como já destacado no item 8.3, deste capítulo.

O perfil de distribuição de Ca e o percentual desse elemento nas amostras de *P. pudica* e *H. drasticus*, demonstra que esse elemento está fortemente associado a matriz da BN. Íons de Ca formam pontes iônicas entre as proteínas e fosfolípídeos que constitui a membrana das PBs e as cadeias de poliisopreno, agindo com um agente reticulador (Rippel *et al.*, 2005, p. 573).

Além disso, através da MEV foi possível observar PBs de formato esférico e outras com estrutura deformada (Figuras 25 e 26). Essa mudança de formato ocorre devido ao processo natural de coagulação que acontece durante a formação do filme de BN. Na publicação de Sakdapipanich *et al.* (2015, p. 105) é descrito as quatro etapas da formação do filme de BN. A primeira etapa consiste na evaporação da água, de modo que as PBs ficam mais próximas umas das outras e o seu movimento browniano fica mais lento, o qual foi observado na microscopia óptica descrita no capítulo 1. Assim, as partículas começam a se aglomerar.

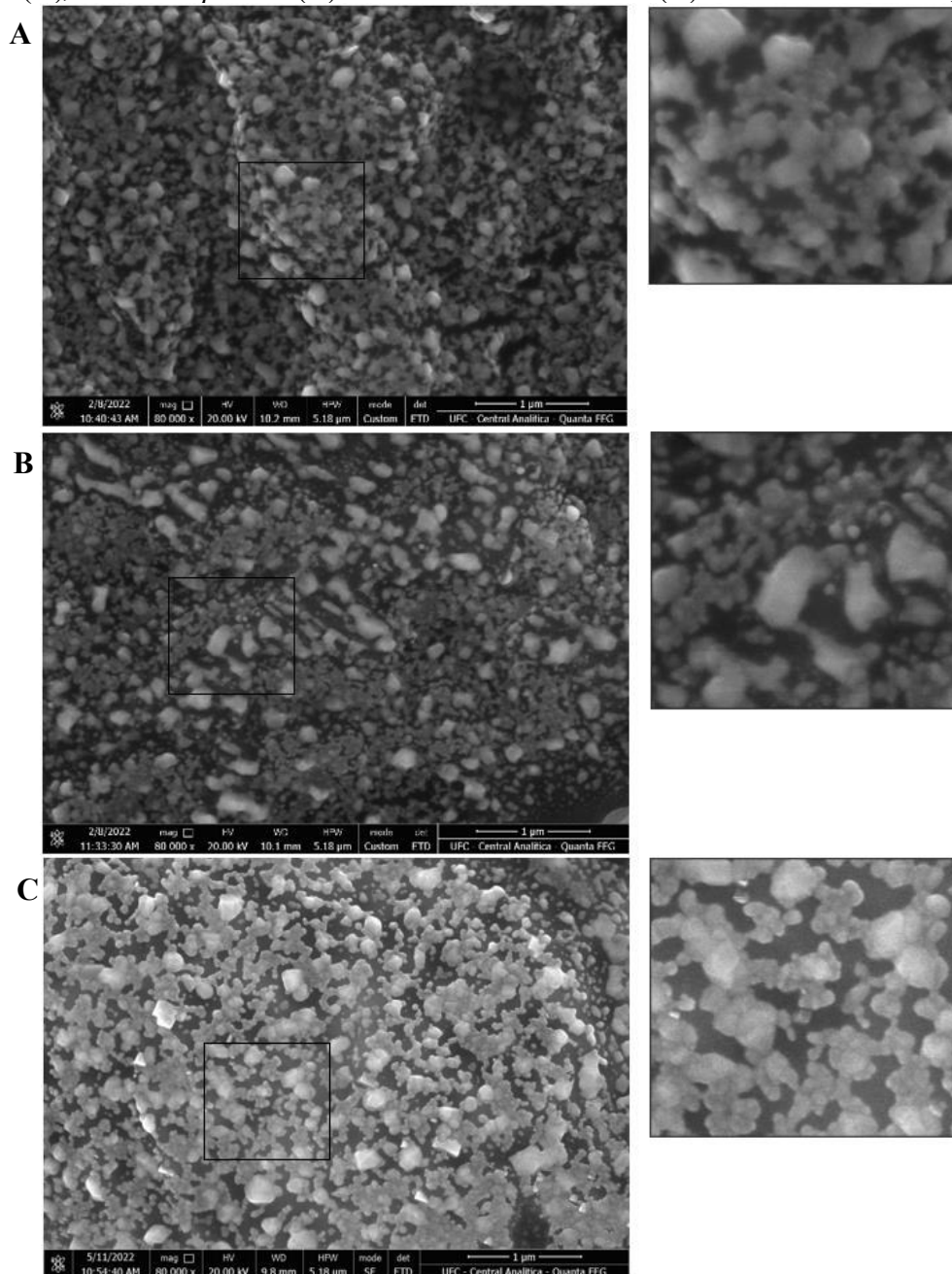
O segundo estágio é o de deformação das PBs. Nessa fase, as PBs colidem entre si, suas membranas que estão em contato fundem-se gradualmente, deformando a estrutura dessas partículas. No terceiro estágio, o de coalescência, as membranas das PBs se rompem e as cadeias de poliisopreno do núcleo dessas partículas entram em contato umas com as outras, formando interações intermoleculares. Nesse momento, as PBs se deformam mais facilmente. PBs de formato esférico e coalescidas são apresentadas nas figuras 25 e 26. Já o último estágio, denominado de interdifusão, as PBs se rompem completamente e as moléculas de poliisopreno se difundem através das membranas rompidas, formando pontos de reticulação e um filme de BN (Sakdapipanich *et al.*, 2015, p. 105).

Figura 25 – Imagens de MEV de partículas de borracha de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C) diluídos em água destilada.



Os látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram submetidos a processos de diluição em série, por um fator de diluição de 2. As diluições 1/32 em água destilada das amostras de cada látex foram utilizadas para visualização na MEV. As imagens à esquerda possuem ampliações de 80.000x. Um zoom dessas imagens foi realizado e incluído ao lado esquerdo de cada imagem.

Figura 26 – Imagens de MEV de partículas de borracha de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C) diluídos em NaCl 0,15 M.



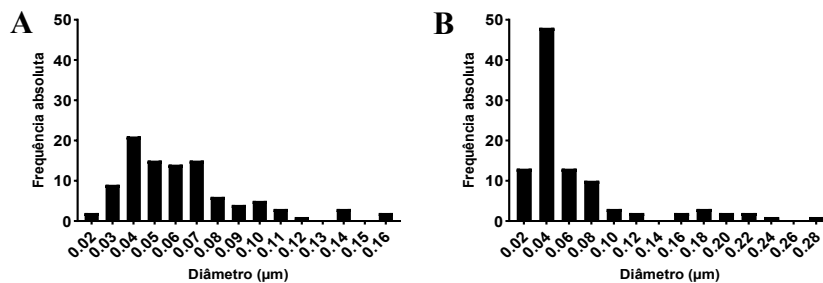
Os látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* foram submetidos a processos de diluição em série, por um fator de diluição de 2. As diluições 1/32 em NaCl 0,15 M das amostras de cada látex foram utilizadas para visualização na MEV. As imagens à esquerda possuem ampliações de 80.000x. Um zoom dessas imagens foi realizado e incluído ao lado esquerdo de cada imagem.

Por meio da MEV, foi constatado uma ampla faixa de tamanho das PBs, confirmando a natureza polidispersa dessas partículas nos três látices. Nas figuras 27 e 28 é mostrado a frequência do diâmetro das PBs observadas por MEV. Ao comparar essas dimensões com o diâmetro das partículas visualizada por AFM, o látex de *C. procera* apresentou PBs de menor dimensão, com diâmetro de no mínimo 0,02 μm . Isso foi observado

no látex diluído em água e em NaCl 0,15 M. No látex de *P. pudica*, foi observado PBs de diâmetro de até 2,2 μm , mas com predominância de PBs menores. As PBs do látex de *P. pudica* com diâmetro superior a 0,28 μm foram visualizadas apenas na diluição feita com NaCl 0,15 M (Figura 28 B). Já o látex de *H. drasticus*, exibiu apenas PBs com diâmetro inferior a 0,1 μm .

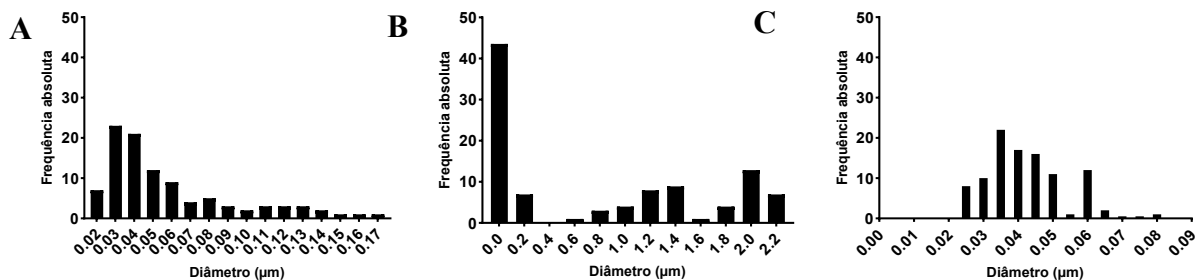
De acordo com os dados obtidos por AFM e MEV, em relação ao diâmetro das PBs, é possível a classificação dessas PBs em SRPs (PBs com diâmetro igual ou inferior a 0,4 μm) e LRPs (PBs com diâmetro igual ou superior a 0,5 μm). Portanto, os látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* possuem SRPs e LRPs.

Figura 27 - Frequência absoluta do diâmetro de partículas de borracha de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A) e *Plumeria pudica* (B) diluídos em água destilada.



100 PBs de cada amostra de látex foram contadas para plotar cada um dos gráficos.

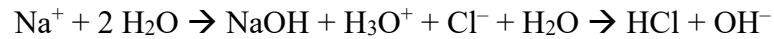
Figura 28 - Frequência absoluta do diâmetro de partículas de borracha de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C) diluídos em NaCl 0,15 M.



100 PBs de cada amostra de látex foram contadas para plotar cada um dos gráficos.

Não foi possível medir o diâmetro das PBs do látex de *H. drasticus* diluído em água, uma vez que as PBs estavam coalescidas e o contorno de sua superfície não estava conservado, de modo que impossibilitou a visualização e mensuração do diâmetro das partículas individuais. Esse comportamento demonstra a baixa estabilidade coloidal do látex de *H. drasticus*.

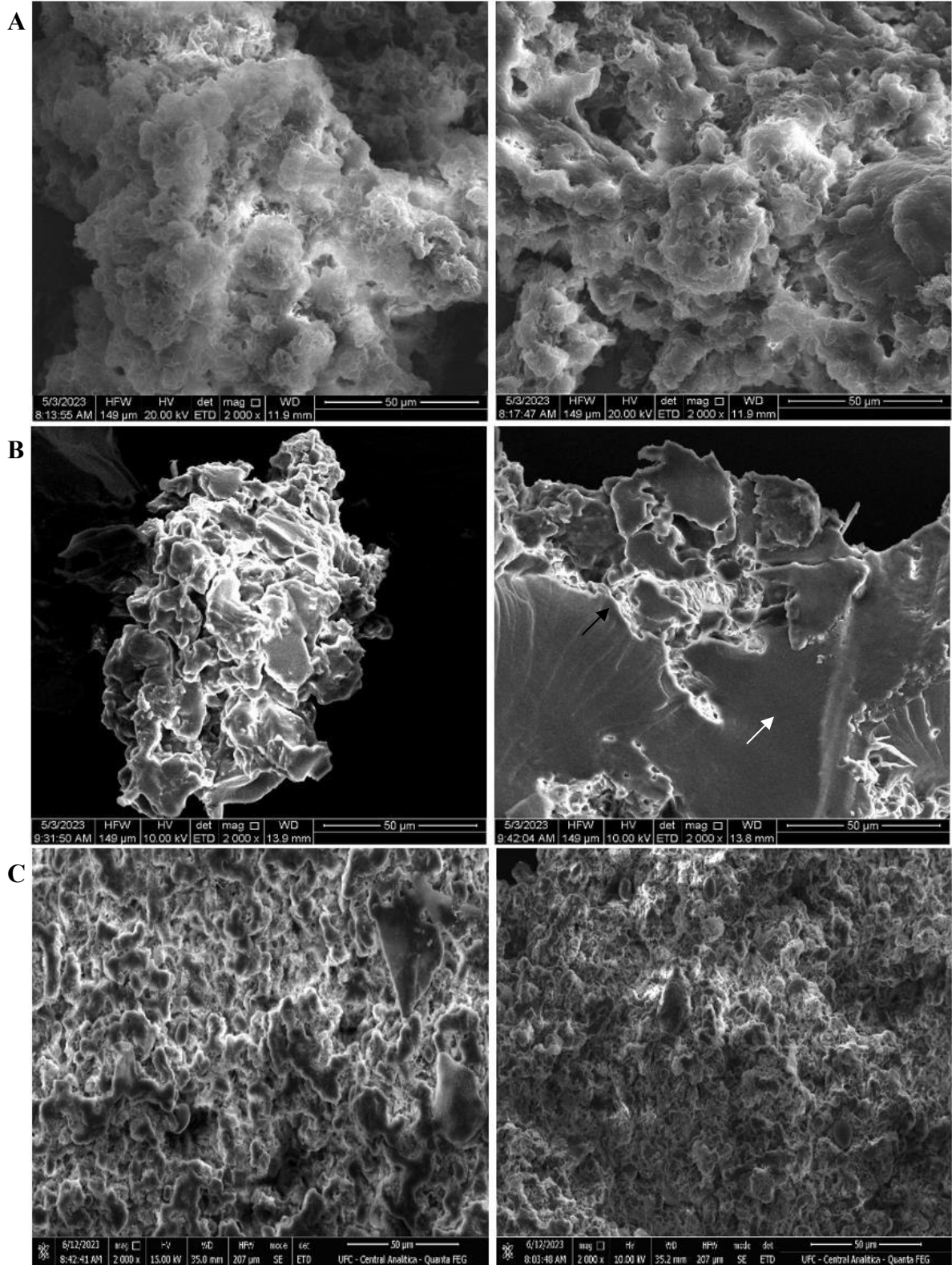
Já as PBs do látex de *H. drasticus* diluído em NaCl 0,15 M não estavam totalmente coalescidas, como pode ser observado na Figuras 26 C. Em solução, o NaCl se dissocia totalmente em Na^+ e Cl^- . Esses íons podem reagir com a água, formando a seguinte reação:



A introdução de ânions de OH^- na solução pode ter conferido maior estabilidade ao látex de *H. drasticus*, de modo que não foi observado PBs coalescidas em solução de NaCl na mesma intensidade que ocorreu no látex diluído em água. Vale ressaltar que o HCl produzido nessa reação induz ao processo de coagulação, no entanto, a concentração utilizada aqui demonstrou ser insuficiente para exercer esse efeito.

O HCl P.A. foi utilizado nesse projeto para induzir a coagulação dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, no entanto, um grande volume foi necessário para a obtenção de suas respectivas BNs. Imagens de MEV desses BNs são mostrados na figura 29, na qual é observado o terceiro e o quarto estágio da formação de BN, descrito por Sakdapipanich *et al.* (2015). As BNs de *C. procera* e *H. drasticus* exibem uma superfície rugosa e irregular, enquanto na *P. pudica* é observado regiões com superfície mais plana e outras regiões com superfície mais rugosa e irregular.

Figura 29 – Imagens de MEV de borrachas naturais obtidas a partir da coagulação ácida dos látexes de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B) e *Himatanthus drasticus* (C).



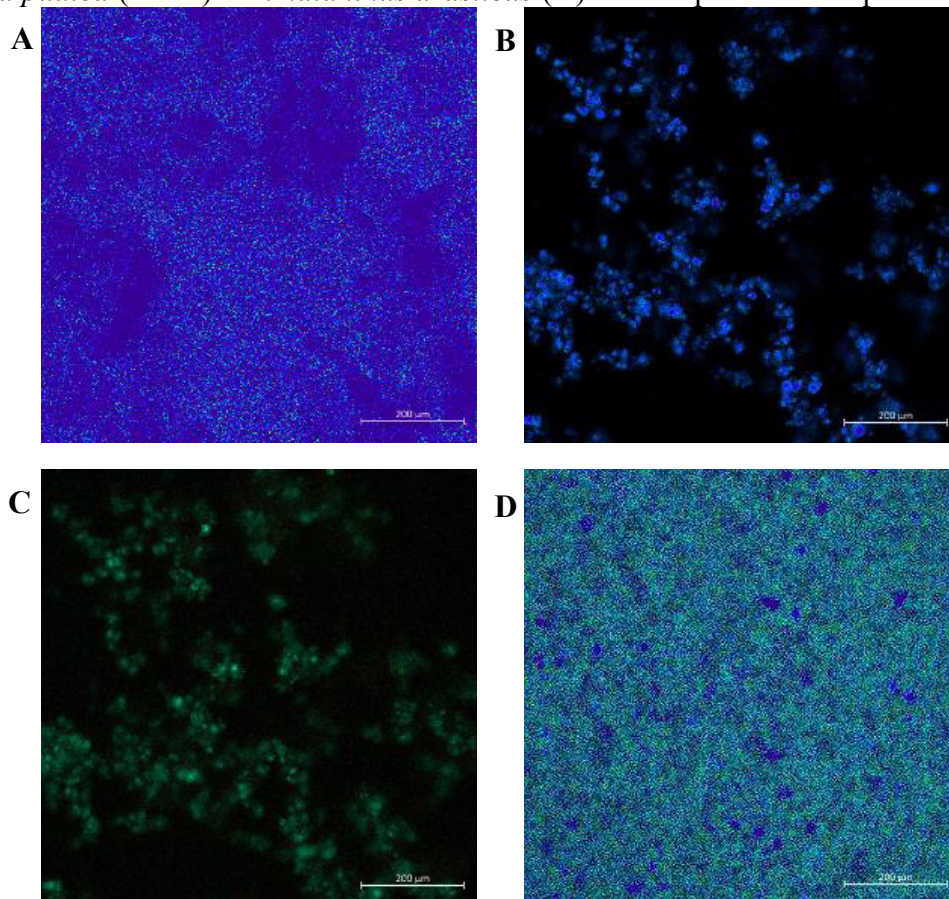
Imagens produzidas de regiões diferentes da BN. A seta preta indica uma região de superfície mais rugosa e a seta branca indica uma superfície mais plana na BN de *P. pudica*. As imagens têm ampliações de 2.000x.

Essa diferença na superfície das BNs pode ser atribuída a distribuição de LRPs e SRPs. Regiões com predominância de LRPs irão exibir protuberâncias nos filmes de BN, e as regiões com predominância de SRP irão formar um filme com superfície mais plana (SRIRING *et al.*, 2020, p. 4).

5.2.6 Microscopia confocal

Amostras de látices íntegros de *C. procera* e *P. pudica* e do látex de *H. drasticus* diluído em água potável exibiram autofluorescência quando foram excitados com laser de comprimento de onda de 405 nm. O látex de *P. pudica* também exibiu autofluorescência a 488 nm. Na figura 30 é mostrado imagens dessas amostras capturadas pela microscopia confocal.

Figura 30 –Imagens de autofluorescência de amostras dos látices de *Calotropis procera* (A), *Plumeria pudica* (B e C) e *Himatanthus drasticus* (D) obtidas por microscopia confocal.



A, B e D: emissão de fluorescência na excitação de luz azul (405 nm). C: emissão de fluorescência na excitação de luz verde (488 nm). Barra de escala = 200 µm.

Na amostra de *P. pudica*, as regiões de emissão de autofluorescência podem ser vistas mais concentradas na superfície das PBs e de seus agregados. Além disso, é observado

uma distribuição homogênea de compostos autofluorescentes na superfície dessas partículas. Nas amostras de *C. procera* e *H. drasticus*, não é possível fazer essa mesma afirmação, uma vez que não foi possível distinguir as PBs ou seus agregados, e a emissão foi visualizada por toda a imagem capturada.

A presença de compostos autofluorescentes em tecidos vegetais é comum, e quando estão presentes em produtos de células secretoras são associados, principalmente, aos metabólitos secundários (Roshchina, 2003, p. 407; Donaldson, 2020, p. 1).

Alguns fenóis, terpenóides e alcalóides exibem autofluorescência na região azul esverdeado (400-600 nm), quando são excitadas pela luz ultravioleta (UV) (Plazaola, 2005, p. 139). Esses compostos são metabólitos secundários comumente encontrados nos látices vegetais (Konno, 2011, p. 1514). Portanto, a fluorescência observada nos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*, pode estar relacionada a presença desses metabólitos.

Os resultados apresentados neste terceiro capítulo mostram que: 1) amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* contém uma série de elementos, tais como Cl, S, Mg, K, P, Ca, Sr e Si. Esses elementos fazem parte de constituintes da membrana que envolve as moléculas de poliisopreno ou da fase aquosa dos látices; 2) através da espectroscopia de infravermelho e de Raman foi confirmado a presença de poliisopreno nos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus*; 3) as PBs dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* exibem formato esférico. Por meio da AFM e MEV, foi observado que as PBs *C. procera* possuem diâmetro entre 0,02-1,1 μm , as PBs do látex de *P. pudica* tem diâmetro entre 0,02-2,2 μm e as do látex de *H. drasticus* tem diâmetro entre 0,02-1,6 μm . Nos três látices havia SRPs e LRPs, mas as SRPs eram predominantes; e 4) amostras dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* exibiram autofluorescência. Essa autofluorescência pode estar relacionada a presença de metabólitos secundários.

5.3 Conclusão

Esta pesquisa forneceu os primeiros dados experimentais sobre algumas características dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* que estão diretamente relacionadas às suas PBs. Alguns parâmetros dessas PBs também foram investigados pela primeira vez, e foi mostrado suas diferenças na estabilidade coloidal, carga superficial, propriedades reológicas, tamanho e na morfologia das BNs.

Muitos trabalhos científicos sobre a BN estão relacionados com a caracterização de clones de *H. brasiliensis* e nos mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese da BNs, com a finalidade de realizar melhorias genéticas nas culturas de seringueiras. Todavia, a identificação de novas espécies de plantas capazes de produzir BNs com características que a permita ser introduzida no setor industrial pode ser uma alternativa promissora.

Logo, os dados apresentando nessa tese fornecem novas possibilidades de pesquisa sobre novas fontes de BN que possam ser introduzidas no setor industrial. No entanto, é necessário um aperfeiçoamento nos estudos sobre as propriedades mecânicas das PBs dos látices de *C. procera*, *P. pudica* e *H. drasticus* e suas BNs.

CAPÍTULO 4

CRISTAIS DE CÁLCIO NOS LÁTICES DE *Plumeria pudica* e *Plumeria rubra*

6.1 Procedimentos experimentais

6.1.1 Material vegetal e coleta do látex

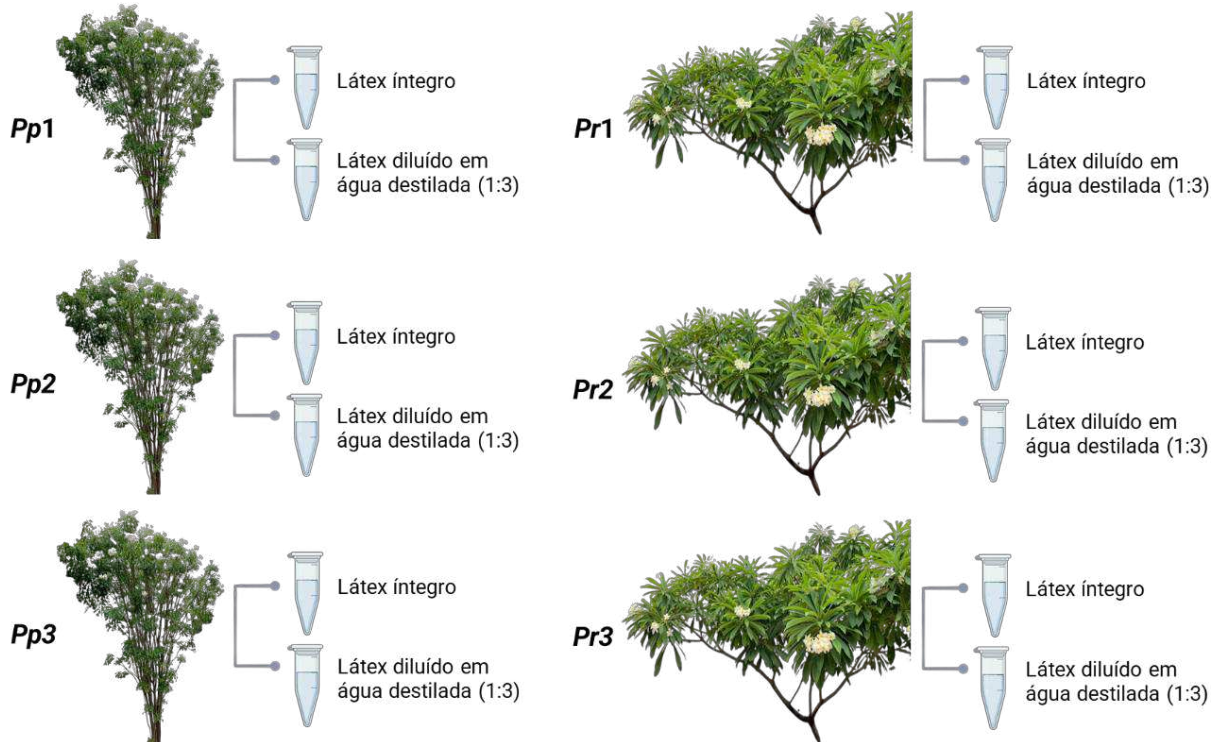
Duas espécies do gênero *Plumeria*, *P. pudica* e *P. rubra*, foram utilizadas nesta etapa. Ao longo do trabalho desta tese, foram identificadas estruturas de cristais no látex de *P. pudica*. Nenhuma estrutura semelhante a cristais foi identificada nos látices de *C. procera* e *H. drasticus*, por conta disso, esses látices não foram trabalhados neste capítulo. A espécie *P. rubra* foi incluída neste projeto com a finalidade de realizar uma análise comparativa entre os cristais produzidos por plantas de mesmo gênero. Ambas as espécies foram devidamente identificadas por uma botânica e exsicatas foram produzidas e depositadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil. O número de identificação das exsicatas de *P. pudica* e *P. rubra* foram 64839 e 66361, respectivamente. As amostras dos látices de *P. pudica* e *P. rubra* utilizadas nas análises deste capítulo foram obtidas conforme o item 3.2, do capítulo 1 deste trabalho. Para a coleta dos látices, foram utilizados tubos tipo eppendorf de 2 mL contendo um volume de água destilada, de modo que a proporção final fosse 1:3 (v:v) de látex e água. Em algumas análises foi utilizado o látex íntegro, sem adição de água. Todo o material foi mantido em temperatura ambiente durante a coleta e as análises.

6.1.2 Microscopia óptica

Para visualização e caracterização dos cristais foi utilizado o microscópio óptico invertido Opton, com objetiva de 10 x. Nesta etapa, foram realizadas coletas em triplicatas, no qual os látices de três arbustos de *P. pudica* (denominados de *Pp1*, *Pp2* e *Pp3*) e três árvores de *P. rubra* (denominados de *Pr1*, *Pr2* e *Pr3*) foram coletados. De cada uma dessas plantas selecionadas foram coletadas duas amostras de látex: uma de látex íntegro e uma de látex diluído em água destilada na proporção final de 1:3 (v:v), como ilustrado na figura 31. Totalizando assim, seis amostras de látex de *P. pudica* e seis amostras de *P. rubra*. Essas amostras foram analisadas com auxílio do microscópio óptico em diferentes intervalos de tempo após a coleta. Esses intervalos foram de 0 horas (dia da coleta), 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a coleta. Ao longo desse período, as amostras foram armazenadas em tubos tipo eppendorf de 2 mL, os mesmo em que foram coletadas. Para visualização dos cristais, um volume de 30 μ L de cada amostra, previamente homogeneizada, foi adicionado sobre a lâmina

e uma lamínula foi posta sobre a amostra. Com auxílio dos softwares BEL Capture 3.2 e ImageJ, imagens foram capturadas e a dimensão dos cristais foram mensuradas.

Figura 31 – Exemplificação da coleta em triplicata dos látices de *Plumeria pudica* e *Plumeria rubra*.



Fonte: elaborada pelo autor. Ao lado esquerdo está ilustrado três arbustos de *P. pudica* (denominados de Pp1, Pp2 e Pp3), e ao lado direito as três árvores de *P. rubra* (denominados de Pr1, Pr2 e Pr3).

6.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para melhor caracterização micromorfológica, os cristais dos látices de *P. pudica* e *P. rubra* foram visualizados por MEV (Quanta-450 FEG, FEI). Para essa etapa, foram realizadas novas coletas de látex. As amostras utilizadas foram de látices diluídos em água destilada na proporção de 1:3 (v:v), e apenas uma amostra de cada espécie foi utilizada nessa análise. Um volume de 30 μ L de cada amostra foi adicionado em um fragmento pequeno de lamínula de vidro e, então, fixado no *stubs*, secas à temperatura ambiente da sala, cobertas com uma fita de carbono e analisadas.

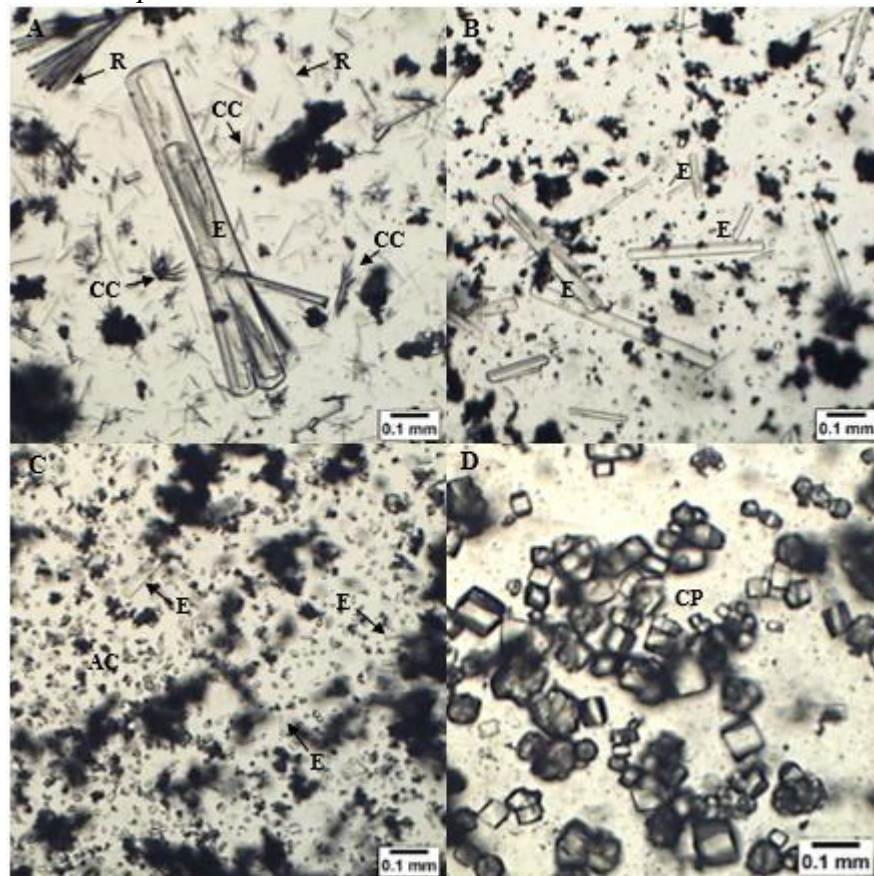
6.1.4 Difração de Raio-X

Para identificação da composição química dos cristais, foram realizadas análises em um difratômetro de monocristal, o difratômetro de geometria κ Bruker D8 Venture. Nessa etapa, novas amostras dos látices de *P. pudica* e *P. rubra* diluídos em água destilada na proporção de 1:3 (v:v) foram utilizadas. Apenas uma amostra de cada espécie foi utilizada nessa análise. Um cristal de cada amostra de látex foi selecionado e montado em uma fibra de Kapton com um MiTeGen MicroMount utilizando óleo de imersão. Os dados de difração de raios X de cristal único (varreduras ϕ e varreduras ω com deslocamentos κ e θ) foram coletados no difratômetro equipado com um detector Photon II CPAD e uma fonte de microfoco Incoatec I μ S 3.0 Cu K α ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$). O software APEX 4 foi utilizado para a determinação da célula unitária e coleta dos dados (Bruker AXS Inc, 2021). A redução de dados e o refinamento global da célula foram realizados utilizando o pacote de software Bruker SAINT⁺ (Bruker AXS Inc, 2019), e uma correção numérica de absorção foi realizada com SADABS (Krause *et al.*, 2015, p. 7). A estrutura dos cristais foi resolvida pelo método de faseamento intrínseco, através do programa de interface Olex2 (Dolomanov *et al.*, 2009, p. 339) para o SHELX, no qual foi possível localizar a maioria dos átomos não-hidrogênio. Os demais átomos não-hidrogênio foram localizados a partir de diferenças de mapas de Fourier calculados por meio de sucessivos ciclos de refinamento com ShelXL (Sheldrick 2015, p. 3) e refinados utilizando parâmetros de deslocamento anisotrópico. Os átomos de hidrogênio foram colocados de acordo com critérios geométricos e tratados utilizando o modelo riding. O software MERCURY 4.2.0 foi utilizado para a construção das imagens.

6.2 Resultados e discussão

Os cristais observados nas amostras de látices de *P. pudica* e de *P. rubra* apresentam-se em uma variedade de formas e tamanhos. Em ambos os látices, foi observado cristais nas formas de ráfides, estilóides, areias cristalinas e cristais prismáticos (Figura 32).

Figura 32 – Morfologia de cristais identificados nos látices de *Plumeria pudica* e *Plumeria rubra*.



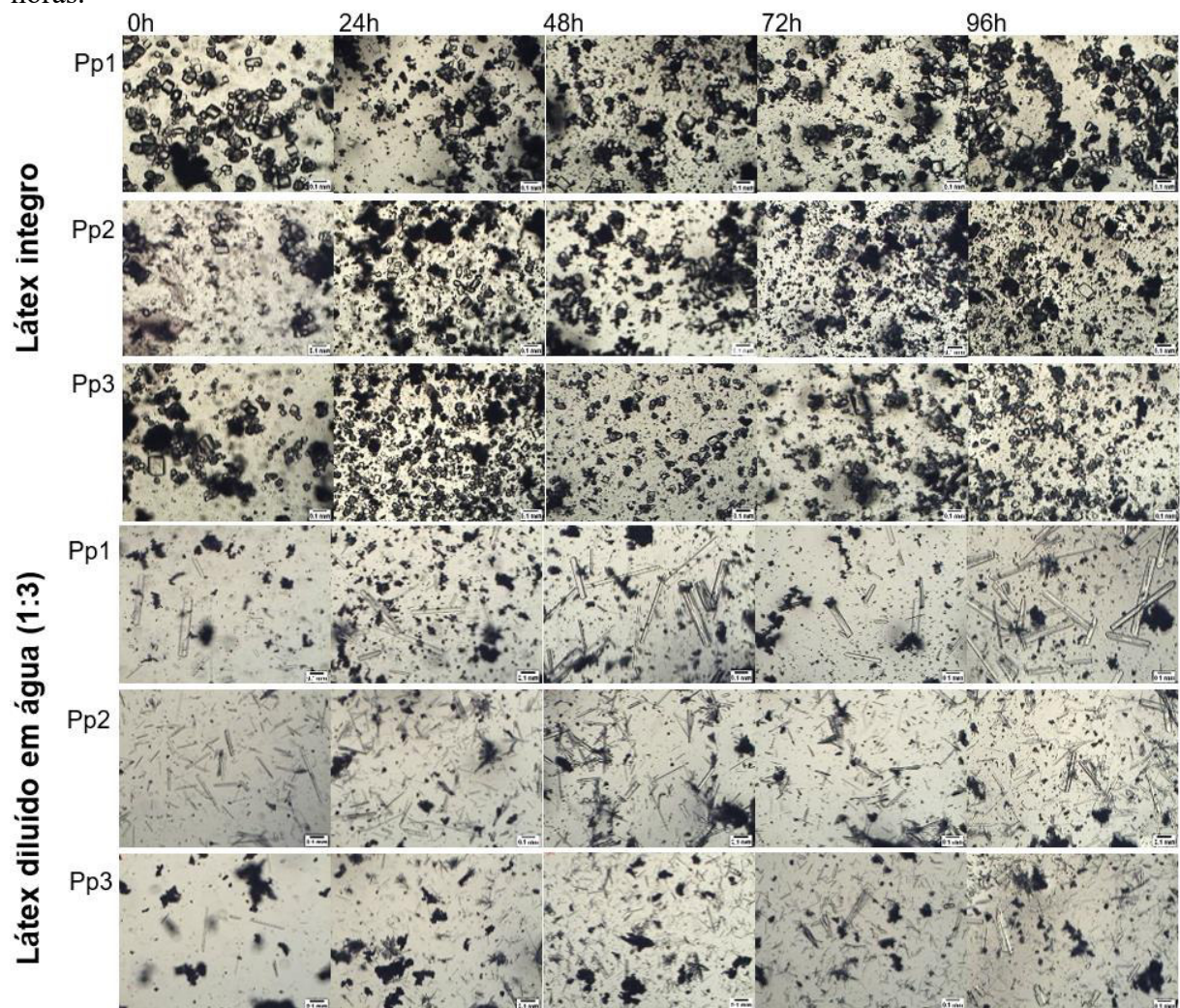
Imagens de microscopia óptica, com objetiva de 10x. A: látex de *Pp3* diluído em água destilada (1:3); B: látex de *Pp1* diluído em água destilada (1:3); C: látex de *Pr3* diluído em água destilada (1:3); e D: látex de *Pp1* íntegro. Abreviaturas: R, feixes de cristais de ráfides; E, cristal estilóide; AC, areia cristalina; CP, cristal prismático; CC, complexo de cristais agregados.

As dimensões desses cristais variaram bastante. Havia cristais do tipo ráfide de 200 μm x 10 μm , mas a predominância era de ráfides menores, com cerca de 50 μm de comprimento, como da figura 32 A. Os estilóides exibiam maiores dimensões, chegando até 910 μm x 120 μm (Figura 32 A). Os cristais do tipo areia cristalina e cristais prismáticos exibiram dimensões na faixa de 18,7 μm x 20,6 μm e 310 μm x 250 μm , respectivamente.

Nas análises realizadas por microscopia óptica ao longo de 96h, não foi observado nenhum tipo de mudança na estrutura dos cristais. Os cristais não se degradaram e se fizeram

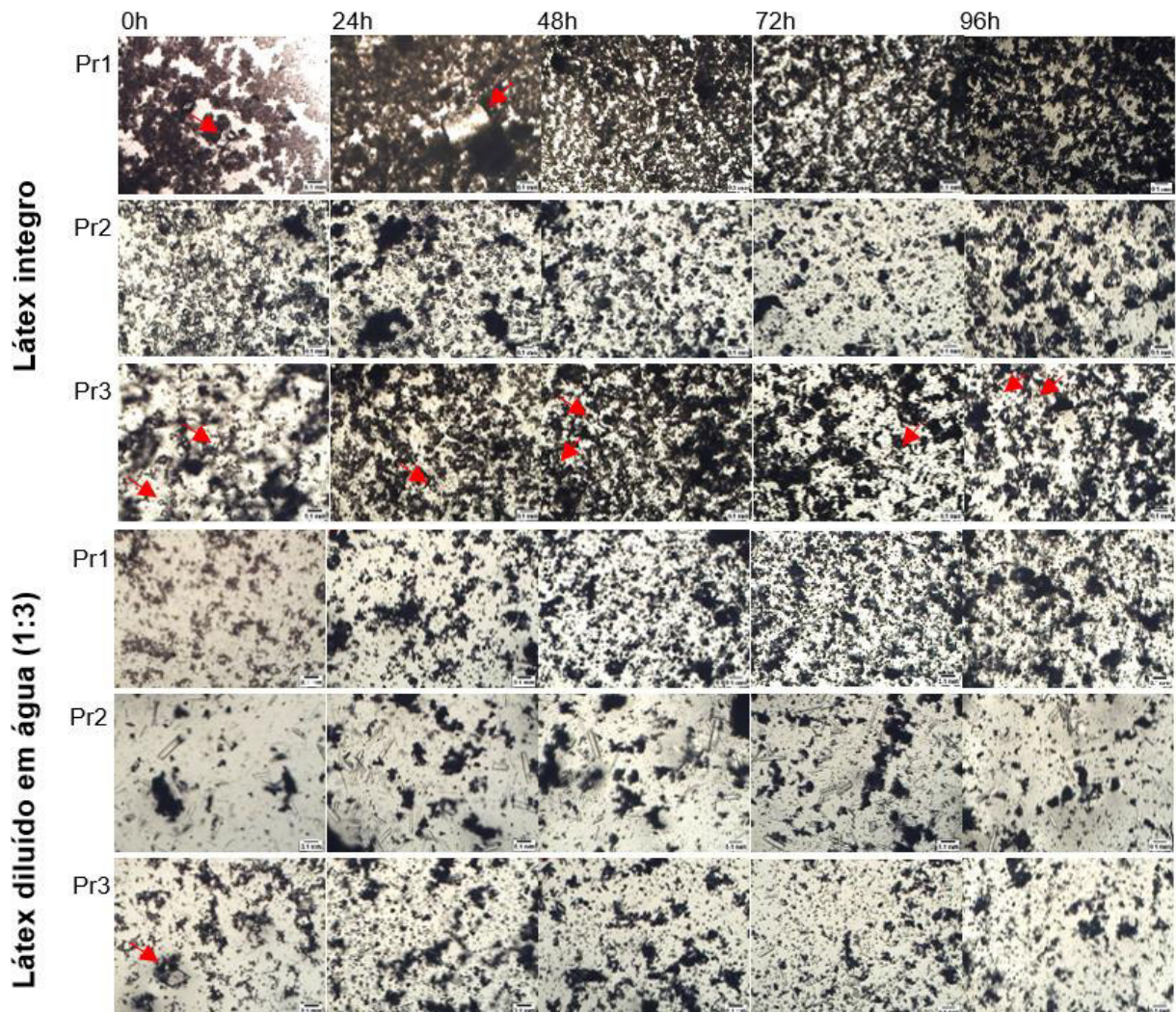
presentes nas amostras durante todo esse período (Figura 33 e 34). No entanto, diferente do esperado, a morfologia dos cristais nas amostras dos látices íntegros eram diferentes dos cristais observados nas amostras dos látices diluídos em água, como pode ser observado nas figuras 33 e 34.

Figura 33 – Imagens de microscopia óptica dos cristais de *Plumeria pudica* ao longo de 96 horas.



Amostras do látex de *P. pudica* íntegro e diluído em água destilada na proporção de 1:3 (v:v). As imagens foram capturadas com auxílio do software BEL Capture 3.2, utilizando a objetiva de 10x.

Figura 34 – Imagens de microscopia óptica dos cristais de *Plumeria rubra* ao longo de 96 horas.



Amostras do látex de *P. rubra* íntegro e diluído em água destilada na proporção de 1:3 (v:v). As imagens foram capturadas com auxílio do software BEL Capture 3.2, utilizando a objetiva de 10x. Devida a grande quantidade de material amorfo, setas vermelhas foram incluídas em algumas imagens para indicar cristais de difícil identificação.

Nas amostras dos látices íntegros, de ambas as espécies, houve a predominância de cristais do tipo areia cristalina e prismáticos. Já nas amostras de látices diluídos em água destilada a predominância era de cristais do tipo ráfide, estilóide e complexos de cristais agregados. Esse padrão foi observado nas amostras dos látices de *P. pudica* (*Pp1*, *Pp2*, *Pp3*) e em uma amostra de látex de *P. rubra* (*Pr2*) (Figura 33 e 34). Nas demais amostras dos látices de *P. rubra* (*Pr1* e *Pr3*), não foi observado essa diferença na morfologia dos cristais presentes nos látices íntegros e nos diluídos em água destilada. Todas as amostras de látex das plantas *Pr1* e *Pr3*, tanto as de látex íntegro como as de látex diluído em água, exibiram predominância de cristais do tipo areia cristalina e prismáticos.

Essas diferenças observadas na morfologia dos cristais em látices íntegros e em látices diluídos pode ser um indicativo de que a formação desses cristais ocorre no próprio látex

e que sua morfologia é influenciada pela concentração de compostos no meio e/ou condições de hidratação. Na diluição dos látices, há uma diminuição na concentração de elementos utilizados na formação desses cristais, que de algum modo propicia a mudança na morfologia dos cristais. Logo, um ambiente com maior concentração de cálcio e outros substratos utilizados na construção dos cristais em *P. pudica* e *P. rubra*, a morfologia dos cristais formados são predominantemente do tipo areia cristalina e prismáticos. Enquanto, que em condições de menor concentração desses compostos, há predominância na formação de cristais com morfologia do tipo ráfide, estilóide e de complexos de cristais agregados.

No entanto, outros fatores devem atuar sobre a morfologia desses cristais, uma vez que todas as amostras de látex de *Pr1* e *Pr3*, de látex íntegro e de látex diluído, a predominância foi de cristais do tipo areia cristalina e prismáticos.

Nas análises realizadas por MEV, na qual foram utilizadas apenas amostras de látices diluídas em água destilada (proporção de 1:3), foram identificados cristais de drusas na amostra do látex de *P. pudica* (Figura 35 A). Cristais com essa morfologia não foram observados na microscopia óptica. Além disso, na figura 35 A é possível visualizar cristais aderidos a uma estrutura amorfa, que corresponde a borracha natural desse látex, uma vez que ele possui em sua composição PBs.

Figura 35 – Imagens de MEV de cristais identificados nos látices de *Plumeria pudica* (A) e *Plumeria rubra* (B).



Abreviaturas: AM, estrutura amorfa (borracha natural); D, cristal de drusa; E, cristal estilóide; AC, areia cristalina; CP, cristal prismático. As imagens têm ampliações de 2.000 x (esquerda) e 900 x (direita).

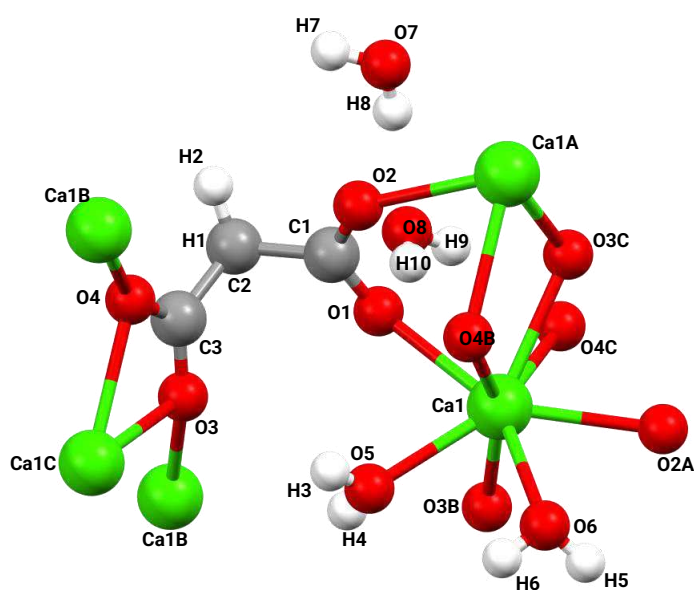
Essa aderência dos cristais à borracha observada no látex de *P. pudica* pode ser um fator que impossibilita a formação de um filme de BN a partir desse látex, como discutido nos capítulos anteriores dessa tese. A aderência dos cristais à BN desse látex leva a diminuição da superfície de contato de PBs disponível para aderir com outras PBs durante o processo natural de coagulação. Desse modo, reduz as chances de as PBs colidirem entre si e terem suas membranas fundidas gradualmente. Isso justificaria o aspecto de areia molhada que a BN produzida a partir do látex de *P. pudica* apresenta.

A composição dos cristais foi determinada por difração de raio-X. Os cristais do tipo ráfides, estilóides, areias cristalinas e prismáticos presentes no látex de *P. pudica* são compostos por malonato de cálcio hidratado, com a seguinte fórmula molecular: $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4)(\text{H}_2\text{O})_4$. Cristais com essa composição química já tem sua estrutura reportada e depositada no banco de dados estrutural de Cambridge (CSD – *Cambridge Structural*

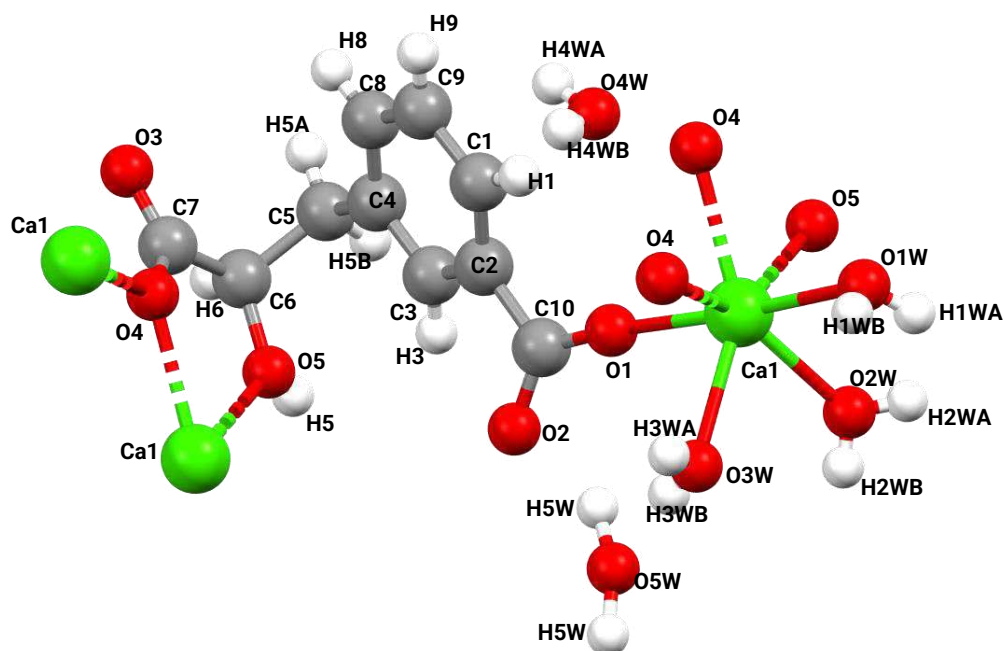
Database) (número de depósito CCDC: 1185166, identificador: JETVAF, link: https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/search?entry_list=JETVAF) (Figura 36 A). No entanto, esse é o primeiro relato de cristais de malonato de cálcio em plantas e, especificamente em látex vegetal.

Figura 36 – Estrutura molecular que compõe os cristais dos látices de *Plumeria pudica* e *Plumeria rubra*.

A



B



Fonte: arquivo pessoal. (A) Estrutura cristalina de malonato de cálcio (número de depósito CCDC: 1185166 e identificador: JETVAF) (Hodgson; Asplund, 1990, p. 3615). (B) Estrutura cristalina que compõem os cristais do tipo areias cristalinas e prismáticos do látex de *P. rubra* (número CCDC: 2269012). Figura foi produzida através do programa Mercury 4.2.0.

No látex de *P. rubra*, os cristais do tipo ráfides e estilóides também são compostos por malonato de cálcio, no entanto, os cristais do tipo areias cristalinas e prismáticos exibiram outra composição molecular, com um anel de carbono, o qual ainda não havia sido reportada no CSD. Este também é o primeiro relato de cristais de cálcio que possuem um anel de carbono em sua composição. Logo, os dados dessa nova estrutura identificada foram refinados e depositados no respectivo banco de dados. O número de acesso para os dados cristalográficos é CCDC: 2269012. Esses dados podem ser obtidos gratuitamente no Cambridge Crystallographic Data Center (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/Structures>). A tabela 6 apresenta os dados dessa nova estrutura após o refinamento. Dados complementares são apresentados no apêndice A.

Tabela 6 – Dados sobre a estrutura dos cristais do tipo areia cristalina e prismático do látex de *Plumeria rubra* e do refinamento dessa estrutura.

Número CCDC	2269012
Fórmula empírica	C ₂₀ H ₃₄ Ca ₂ O ₁₉
Massa molar (g.mol ⁻¹)	658,63
Temperatura (K)	100,00
Sistema	Ortorrômbicas
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>a</i> (Å)	9,6027(2)
<i>b</i> (Å)	16,6731(4)
<i>c</i> (Å)	8,7673(2)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Volume (Å ³)	1403,70(5)
Z	2
ρ_{calc} (g/cm ³)	1,558
M (mm ⁻¹)	4,302
F(000)	692
Tamanho do cristal (mm ³)	0,2 × 0,15 × 0,026
Radiação	CuK α ($\lambda = 1,54178$ Å)
Cor do cristal	Luz clara incolor
Forma do cristal	placa
2 Θ range (°)	10,09 – 144,35 (0,81 Å)
Intervalos	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 11; -16 ≤ <i>k</i> ≤ 20; -10 ≤ <i>l</i> ≤ 10
Dados coletados	10306
Dados/restrições/parâmetros	2647/2/243
Goodness-of-fit on F ²	1,051
Índices R ₁ finais [<i>I</i> ≥ 2 σ (<i>I</i>)]	R ₁ = 0,0299
Parâmetro Flack	0,122(13)

CCDC: Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge; Z: número de moléculas em uma célula unitária; ρ : densidade; F(000): soma dos fatores de espalhamento em *teta* = zero; R₁: concordância entre os modelos calculados e observados; e *I*: intensidades.

Apesar de ser comum a presença de cristais de Ca em plantas, o mecanismo de formação desses cristais, bem como a sua função, ainda não é bem compreendido. Algumas hipóteses quanto a função desses cristais sugere, principalmente, o seu papel na regulação da concentração de Ca. Assim, a formação desses cristais ocorre em resposta ao excesso de Ca apoplástico, com a finalidade de reduzir sua concentração. Além disso, o tamanho dos cristais é proporcional a concentração de Ca, de modo que o aumento dessa concentração leva ao aumento do tamanho desses cristais (Pennisi; McConnell, 2001, p. 1189; Volk *et al.*, 2002, p. 34; He *et al.*, 2014, p. 167). Na literatura, essas funções são atribuídas, especialmente, aos cristais de CaOx, os quais são os mais estudados e os mais citados, mas não foram encontrados cristais com essa composição nos látices de *P. pudica* e *P. rubra*.

A produção de cristais de malonato de cálcio por *P. pudica* e *P. rubra*, pode ser uma adaptação de plantas desse gênero. O malonato é um inibidor competitivo da succinato-desidrogenase, de modo que sua presença na mitocôndria bloqueia o ciclo do ácido cítrico, inibindo a respiração celular. Logo, é possível que a formação de cristais de malonato de cálcio possa ser um meio de tornar o malonato indisponível, além de regular a concentração de Ca citoplasmático.

Vale ressaltar, que cristais de Ca também são uma estratégia da planta de desintoxicação de metais (Khan *et al.*, 2024, p. 12). Esses cristais podem incorporar em sua composição metais, tais como alumínio (Al), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e estrôncio (Sr), evitando possíveis efeitos tóxicos desses elementos na planta (Nakata, 2012b, p. 259). Essa estratégia é denominada de epitaxia e foi demonstrado pela primeira vez em plantas no trabalho de Brizuela *et al.*, (2007, p. 149). Assim, uma hipótese possível é de que os cristais de malonato de Ca possam também funcionar como um meio de desintoxicação de metais na planta, uma vez que Sr foi identificado no látex de *P. pudica*, através do espectrômetro de fluorescência de raios X, discutido do capítulo 3.

Cristais de malonato de cálcio e cristais de cálcio com um anel de carbono nunca foram antes documentado em plantas ou em látices vegetais. A presença desses cristais em *P. pudica* e *P. rubra* demonstra a versatilidade metabólica das plantas e dos laticíferos, que são células com elevado nível de diferenciação. Notavelmente, a diferença na composição da porção orgânica desses cristais indica adaptações no modo de armazenamento e, possivelmente, de reaproveitamento desse carbono no metabolismo vegetal.

A porção orgânica de cristais de CaOx são utilizadas como fonte de CO₂ em casos de fotossíntese de alarme em algumas espécies de plantas, tais como a *Amaranthus hybridus*, *Dianthus chinensis*, *Pelargonium peltatum* e *Portulacaria afra* (Tooulakou *et al.*, 2016, p.

2582; Jaykar; Ayhad, 2023, p. 130). O termo fotossíntese de alarme foi estabelecido por Tooulakou *et al.*, (2016, p. 2582), que ocorre quando a planta está sob condições limitadas de CO₂. Durante o dia, a planta em condições de escassez hídrica fecha os estômatos para evitar a perda de água, desse modo a planta fica limitada de assimilar CO₂ atmosférico. Para suprir a deficiência desse CO₂ e permitir a continuidade do processo fotossintético, a planta busca por outras fontes de CO₂ (Tooulakou *et al.*, 2016, p. 2582).

Alguns trabalhos já têm demonstrado que durante o dia, quando ocorre a fotossíntese de alarme, há uma redução gradual do volume de cristais de CaOx (Tooulakou *et al.*, 2016, p. 2578; Kolyva *et al.*, 2023, p. 6; Jaykar; Ayhad, 2023, p. 138). Esse processo ocorre devido a decomposição desses cristais, que é acompanhada da liberação de Ca²⁺, CO₂, O₂ e H₂O. Esse CO₂ é assimilado pelo mecanismo de fotossíntese de alarme. Desse modo, a formação desses cristais nas plantas, especialmente durante o período noturno, também funciona como um mecanismo de armazenamento de carbono, que durante o dia, disponibiliza esse carbono para assimilação fotossintética (Tooulakou *et al.*, 2016, p. 2582; Karabourniotis *et al.*, 2020, p. 848).

Por conseguinte, é possível também que a porção orgânica dos cristais presentes nos látices de *P. pudica* e *P. rubra* possam atuar como fontes de CO₂ em condições em que há a privação do CO₂ atmosférico. No entanto, essa porção orgânica também pode atuar como fonte de carbono ou intermediários em vias diversas do metabolismo vegetal.

Os resultados apresentados neste capítulo mostram que: 1) pela primeira vez, foram identificados em látices vegetais cristais de malonato de cálcio e cristais de cálcio com um anel de carbono em sua estrutura; 2) o látex de *P. pudica* produz cristais de malonato de cálcio do tipo ráfide, estilóide, areia cristalina e cristal prismático. Cristais com essa composição também são produzidos no látex de *P. rubra*, mas exibem apenas a morfologia do tipo ráfide e estilóide; 3) o látex de *P. rubra* produz cristais de cálcio com um anel de carbono. Esses cristais exibem morfologia do tipo areia cristalina e prismático; 4) o látex de *P. pudica* também produz cristais de drusas; 5) a morfologia dos cristais produzidos nos látices de *P. pudica* e *P. rubra* pode ser dependente da concentração de substratos presentes no meio; 6) a produção de cristais de malonato de cálcio por *P. pudica* e *P. rubra* pode ser uma adaptação dessas espécies para tornar o malonato insolúvel e, portanto, indisponível ao metabolismo vegetal; 7) a produção de cristais de malonato de cálcio por *P. pudica* podem funcionar como um mecanismo na desintoxicação de metais; e 8) a porção orgânica dos cristais presentes nos látices de *P. pudica* e *P. rubra* podem atuar como fontes de CO₂ em casos de fotossíntese de alarme e como fonte de carbono para outras vias do metabolismo vegetal.

6.3 Conclusão

A identificação de cristais de malonato de cálcio no látex de *P. pudica* e *P. rubra* e cristais de cálcio com anel de carbono no látex de *P. rubra* demonstra a versatilidade dos processos de biomineralização em plantas e abre espaço para novos questionamentos. Essas formas cristalinas observadas nos látices estariam presentes em outros tecidos e órgãos da planta? Quais fatores determinam a composição e a morfologia dos cristais produzidos no látex da planta? Espécies de plantas estão determinadas a sintetizar cristais de composição e morfologia fixa, sem sofrer qualquer variação? Espécies de plantas que sintetizam cristais de uma determinada composição, podem alterar essa composição em resposta a condições do ambiente e/ou a composição do solo em que estão sendo cultivadas?

Compreender os mecanismos e as razões pelas quais algumas espécies de plantas possuem cristais de uma composição específica e porque os cristais exibem determinada morfologia em uma espécie e outros tipos de morfologia em outras espécies, requer uma análise detalhada da atividade metabólica das plantas, considerando o ambiente em que são cultivadas. Dada essa complexidade, investigações no campo da fisiologia vegetal são necessários para esclarecer as questões que envolvem a processo de biomineralização que dá origem a esses cristais.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, L. F. S.; KLINKHAMER, P. G. L.; CHOI, Y. H. Plant Latex, from Ecological Interests to Bioactive Chemical Resources. **Planta medica**, v. 85, n. 1, p. 856-868, 2019.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p. 311-331, 2009.
- AMARO, M. S. *et al.* Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 450-457, 2006.
- ASTM-D1076. **Standard Specification for Rubber—Concentrated, Ammonia Preserved, Creamed, and Centrifuged Natural Latex**. 2015.
- AUGUSTUS, G. D. P. S.; JAYABALAN, M.; SEILER, G. J. *Cryptostegia grandiflora*—a potential multi-use crop. **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 1, p. 59-62, 2000.
- BAE, S. W. *et al.* Lipid Composition of Latex and Rubber Particles in *Hevea brasiliensis* and *Taraxacum kok-saghyz*. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 1-13, 2020.
- BAUER, G. *et al.* Investigating the rheological properties of native plant latex. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 90, p. 1-6, 2014.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.
- BELCHER, B. *et al.* Rattan, rubber, or oil palm: cultural and financial considerations for farmers in Kalimantan. **Economic Botany**, v. 58, n. 1, p. 77-87, 2004.
- BERTHELOT, K. *et al.* *Hevea brasiliensis* REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): an overview on rubber particle proteins. **Biochimie**, v. 106, p. 1-9, 2014.
- BIHANI, T. *Plumeria rubra* L.—A review on its ethnopharmacological, morphological, phytochemical, pharmacological and toxicological studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, n. 113291, p. 1-23, 2021.
- BORCHERT, R. Calcium-induced patterns of calcium-oxalate crystals in isolated leaflets of *Gleditsia triacanthos* L. and *Albizia julibrissin* Durazz. **Planta**, v. 165, p. 301–310, 1985.
- BOTTIER, C. Biochemical composition of *Hevea brasiliensis* latex: A focus on the protein, lipid, carbohydrate and mineral contents. **In Advances in botanical research**, v. 93, p. 201-237, 2020.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIZUELA, M. *et al.* Insolubilization of potassium chloride crystals in *Tradescantia pallida*. **Protoplasma**, v. 231, p. 145-149, 2007.

CANAVEZE, Y. *et al.* Cytological differentiation and cell wall involvement in the growth mechanisms of articulated laticifers in *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.(Apocynaceae). **Protoplasma**, v. 256, n. 1, p. 131-146, 2019.

CHAMAKURI, S. R.; SUTTEE, A.; MONDAL, P. An eye-catching and comprehensive review on *Plumeria pudica* Jacq.(Bridal Bouquet). **Plant Archives**, v. 20, n. 2, p. 2076-2079, 2020.

CHAN, A. J. *et al.* Lipid content in small and large natural rubber particles. **Rubber Chemistry and Technology**, v. 88, n. 2, p. 248–257, 2015.

CHERIAN, S.; RYU, S. B.; CORNISH, K. Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects. **Plant biotechnology journal**, v. 17, p. 11, p. 2041-2061, 2019.

CHOUYTAN, J. *et al.* Synthesis of polyisoprene via miniemulsion polymerisation: Effect on thermal behaviour, colloidal properties and stereochemistry. **Journal of Rubber Research**, v. 21, n. 4, p. 236-255, 2018.

CORNELL, S. W.; KOENIG, J. L. Raman spectra of polyisoprene rubbers. **Macromolecules**, v. 2, n. 5, 546-549, 1969.

CORNISH, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. **Phytochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1123-1134, 2001.

CORNISH, K. Alternative natural rubber crops: why should we care?. **Technology & Innovation**, v. 18, n. 4, p. 244-255, 2007.

CORNISH, K. Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthetic rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 2, p. 182-189, 2001.

CRANG, R.; LYONS-SOBASKI, S.; WISE, R. **Plant anatomy: a concept-based approach to the structure of seed plants**. Springer, 2018.

CUÉLLAR-CRUZ, M. *et al.* Biocrystals in plants: A short review on biomineralization processes and the role of phototropins into the uptake of calcium. **Crystals**, v. 10, n. 7, p. 1-23, 2020.

D'AUZAC, J.; JACOB, J. L.; CHRESTIN, H. **Physiology of Rubber Tree Latex: The Laticiferous Cell and Latex-A Model of Cytoplasm**. Montpellier, France: CRC press, 2018.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica De Varredura: Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

- DEMARCO, D.; KINOSHITA, L. S.; CASTRO, M. M. Laticíferos articulados anastomosados: novos registros para Apocynaceae. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, n. 1, p. 133-144, 2006.
- DOLOMANOV, O. V. *et al.* OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, n. 2, p. 339–341, 2009.
- DONALDSON, L. Autofluorescence in plants. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 1-20, 2020.
- DUPONT, J. MOREAU, F.; LANCE, C.; JACOB, J. L. Phospholipid composition of the membrane of lutoids from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry**, v. 15, n. 8, p. 1215-1217, 1976.
- ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae sl. **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.
- ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. An updated classification for Apocynaceae. **Phytotaxa**, v. 159, n. 3, p. 175-194, 2014.
- EVERT, R. F. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development**. 3. ed. John Wiley & Sons, 2006.
- FERNANDES, H. B. *et al.* Laticifer proteins from *Plumeria pudica* inhibit the inflammatory and nociceptive responses by decreasing the action of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 269-277, 2015.
- FOSTER, A. S. Plant idioblasts: remarkable examples of cell specialization. **Protoplasma**, v. 46, n. 1, p. 184-193, 1956.
- FRANCESCHI, V.R.; HARRY T. H. "Calcium oxalate crystals in plants." **The Botanical Review**, v. 46, p. 361-427, 1980.
- FRANCESCHI, V.R.; NAKATA, P.A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, p. 41-71, 2005.
- FREITAS, C. D. T. *et al.* Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 781-789, 2007.
- FREITAS, C. D. *et al.* Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. **Food Research International**, v. 87, p. 50-59, 2016.
- FREITAS, C. D. *et al.* New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 45-52, 2015.
- GOMES, J. I.; ALBUQUERQUE, J. M. Características botânicas do gênero *Hevea*. **Embrapa Amazônia Oriental**, 2000.
- GOMEZ, J. B.; HAMZAH, S. Frey-Wyssling complex in *Hevea* latex-uniqueness of the organelle. **Journal of Natural Rubber Research**, v. 4, n. 2, p. 75-85, 1989.

HABIB, M. A. H. *et al.* Proteomics analysis of latex from *Hevea brasiliensis* (clone RRIM 600). **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, n. 2, p. 232-242, 2017.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in plant science**, v. 13, n. 12, p. 631-639, 2008.

HE, H. *et al.* Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. **Trends in plant science**, v. 19, n. 3, p. 166-174, 2014.

HODGSON, D. J.; ASPLUND, R. O. Calcium binding to carboxylate residues: synthesis and structure of a new form of calcium malonate. **Inorganic Chemistry**, v. 29, n. 18, p. 3612-3615, 1990.

HUANG, C. *et al.* The effects of proteins and phospholipids on the network structure of natural rubber: a rheological study in bulk and in solution. **Journal of Polymer Research**, v. 27, p. 1-11, 2020.

IBRAHIM, S.; OTHMAN, N.; YUSOF, N. H. Preparation, characterization and properties of liquid natural rubber with low non-rubber content via photodegradation. **Polymer Bulletin**, v. 78, p. 559-575, 2021.

ISLAM, M. S.; LUCKY, R. A. A study on different plants of Apocynaceae family and their medicinal uses. **J Pharm Res**, v. 4, n. 1, p. 40-44, 2019.

JAVKAR, R.; AVHAD, A. Effect of drought and salinity stress on Calcium oxalate crystals of *Portulacaria afra* (L.) Jacq. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 127-140, 2023.

JAYASREE, G. *et al.* Contribution of latex cations to the water relations and latex yield in *Hevea brasiliensis*. **Natural Rubber Research**, v. 23, p. 93-97, 2010.

KAJIURA, H. *et al.* Elucidation of rubber biosynthesis and accumulation in the rubber producing shrub, guayule (*Parthenium argentatum* Gray). **Planta**, v. 247, p. 513–526. 2018.

KARABOURNIOTIS, G. *et al.* New insights into the functions of carbon–calcium inclusions in plants. **New Phytologist**, v. 228, n. 3, p. 845-854, 2020.

KEKWICK, R.G. Latex and laticifers. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley, 2001.

KOLYVA, F. *et al.* Acclimation of the Grapevine *Vitis vinifera* L. cv. Assyrtiko to Water Deficit: Coordination of Structural and Functional Leaf Traits and the Dynamic of Calcium Oxalate Crystals. **Plants**, v. 12, n. 23, p. 3992, 2023.

KHAN, I. *et al.* Silicon: an essential element for plant nutrition and phytohormones signaling mechanism under stressful conditions. **Plant Growth Regulation**, v. 100, n. 2, p. 301-319, 2023.

KHAN, M. I. *et al.* Rhubarb: A novel model plant to study the conundrum of calcium oxalate synthesis. **Food Chemistry**, v. 434, p. 1-15, 2024.

KNOCH, H. *et al.* Complex micellization behavior of the polysorbates Tween 20 and Tween 80. **Molecular Pharmaceutics**, v. 18, n. 8, p. 3147-3157, 2021.

KO, J.-H.; CHOW, K.-S.; HAN, K.-H. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). **Plant. Mol. Biol.**, v. 53, p. 479–492, 2003

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

KRAUSE, L. *et al.* Comparison of silver and molybdenum microfocus X-ray sources for single-crystal structure determination. **Journal of Applied Crystallography**, v. 48, n. 1, p. 1–8, 2015.

KUMAR, V. L.; VERMA, S.; DAS, P. Anti-inflammatory and antioxidant effect of methanol extract of latex of *Calotropis procera* in rat model of colorectal cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 296, p. 1-6, 2022.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LIU, H. *et al.* Foliar spray of growth regulators significantly increases trans-1, 4-polyisoprene production from *Eucommia ulmoides* Oliver short-rotation coppice. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 383-390, 2018.

LOSADA, J. M.; DÍAZ, M.; HOLBROOK, N. M. Idioblasts as pathways for distributing water absorbed by leaf surfaces to the mesophyll in *Capparis odoratissima*. **bioRxiv**, v. 12, p. 1-40, 2019.

LU, F. J.; HSU, S. L. A vibrational spectroscopic analysis of the structure of natural rubber. **Rubber chemistry and technology**, v. 60, n. 4, p. 647-658, 1987.

MAPA, INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA NO 6, DE 26 DE ABRIL DE 2021: Norma Técnica Específica para a Produção Integrada de Borracha Natural. Imprensa Nacional, 2021.

MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 2, p. 20-25, 2004.

MEN, X. *et al.* Biosynthesis of natural Rubber: Current state and perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 1, p. 50, 2019.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood, in relation to taxonomy, with notes on economic uses**. 2. ed. Clarendon Press, 1950.

MOOIBROEK, H.; CORNISH, K. Alternative sources of natural rubber. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 355-365, 2000.

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Science**, v. 164, n. 6, p. 901-909, 2003.

NAKATA, P. A. Influence of calcium oxalate crystal accumulation on the calcium content of seeds from *Medicago truncatula*. **Plant science**, v. 185, p. 246-249, 2012a.

NAKATA, P. A. Plant calcium oxalate crystal formation, function, and its impact on human health. **Frontiers in biology**, v. 7, p. 254-266, 2012b.

NUN-ANAN, P. *et al.* Influence of nonrubber components on properties of unvulcanized natural rubber. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 31, n. 1, p. 44-59, 2020

NG, J. W.; OTHMAN, N.; YUSOF, N. H. Various coagulation techniques and their impacts towards the properties of natural rubber latex from *Hevea brasiliensis*—A comprehensive review related to tyre application. **Industrial Crops and Products**, v. 181, p. 1-14, 2022.

OLIVEIRA, N. V. *et al.* Proteins from *Plumeria pudica* latex exhibit protective effect in acetic acid induced colitis in mice by inhibition of pro-inflammatory mechanisms and oxidative stress. **Life sciences**, v. 231, p. 1-8, 2019.

PAIVA, E. A. S. Are calcium oxalate crystals a dynamic calcium store in plants?. **New Phytologist**, v. 223, n. 4, p. 1707-1711, 2019.

PAIVA, E. A. S. Do calcium oxalate crystals protect against herbivory?. **The Science of Nature**, v. 108, n. 24, p. 1-7, 2021.

PENNACCHIO, H. L. **CONAB: Borracha Natural**. Disponível em: BorrachaZNaturalZ-ZAnaliseZMensalZ-ZMarcoZ2019 (1).pdf. Acesso em: 3 nov. 2023.

PENNISI, S. V.; MCCONNELL, D. B. Inducible calcium sinks and preferential calcium allocation in leaf primordia of *Dracaena sanderiana* Hort. Sander ex MT Mast.(Dracaenaceae). **Hortscience**, v. 36, n. 7, p. 1187-1191, 2001.

PEREIRA, A. M. V. *et al.* Etnoconhecimento associado ao uso de plantas medicinais e do látex de Janaúba (*Himatanthus Drasticus* (Mart.) Plumel) e seus reflexos na comercialização nas suas formulações farmacológicas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. 1-7, 2022.

PLAZAOLA, J. I. G. *et al.* Autofluorescence: biological functions and technical applications. **Plant Science**, v. 236, p. 136-145, 2015.

POMPELLI, M. F. *et al.* Mesophyll thickness and sclerophylly among *Calotropis procera* morphotypes reveal water-saved adaptation to environments. **Journal of Arid Land**, v. 11, p. 795-810, 2019.

PRIYADARSHAN, P. M. Breeding *Hevea brasiliensis* for environmental constraints. **Advances in Agronomy**, v. 79, p. 352-400, 2003.

RAMOS, M. V. *et al.* Laticifers, latex, and their role in plant defense. **Trends in plant science**, v. 24, n. 6, p. 553-567, 2019.

- RAMOS, M. V. *et al.* Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant science**, v. 173, n. 3, p. 349-357, 2007.
- RAMOS, M. V. *et al.* Plant latex and latex-borne defense *In: Advances in Botanical Research*. Academic Press, v. 93, p. 1-25, 2020.
- RAMOS, M. V. *et al.* Structural Analysis Revealed the Interaction of Cardenolides from *Calotropis procera* with Na⁺/K⁺ ATPases from Herbivores. **Protein and Peptide Letters**, v. 29, n. 1, p. 89-101, 2022.
- RIPPEL, M. M. *et al.* Direct imaging and elemental mapping of microgels in natural rubber particles. *Colloid and Polymer Science*, v. 283, p. 570-574, 2005.
- ROSE, K.; STEINBÜCHEL, A. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2803-2812, 2005.
- ROSHCHINA, V. V. Autofluorescence of plant secreting cells as a biosensor and bioindicator reaction. **Journal of Fluorescence**, v. 13, p. 403-420, 2003.
- ROTH, W. B. *et al.* New sources of gutta-percha in *Garrya flavescens* and *G. wrightii*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 1, p. 183-184, 1985.
- SALES, A. C. S. *et al.* Estudo de atividades biológicas e aplicações de componentes da planta *Plumeria pudica* Jacq.: uma prospecção científica e tecnológica com ênfase na atividade antimicrobiana. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. 1-11, 2022.
- SANTOS, K. A. M.; SUAREZ, P. A. Z.; RUBIM, J. C. Photo-degradation of synthetic and natural polyisoprenes at specific UV radiations. **Polymer degradation and stability**, v. 90, n. 1, p. 34-43, 2005.
- SANTOS, A. C. F. D. Secretory structures from the leaf blade of bitter amapá (*Parahancornia fasciculata*, Apocynaceae): histochemistry and assay of flavonoids. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 4, p. 407 – 414, 2013.
- SAKDAPIPANICH, J. *et al.* Influence of mixed layer of proteins and phospholipids on the unique film formation behavior of Hevea natural rubber latex. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 466, p. 100-106, 2015.
- SILVA, J. R. D. A. *et al.* Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 105-110, 2003.
- SILVA, M. J. *et al.* Evaluation of the physicochemical properties of natural rubber from *Hevea brasiliensis* clones. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 1-8, 2021.
- SINGH, A. P. *et al.* The micromorphology and protein characterization of rubber particles in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis* and *Hevea brasiliensis*. **Journal of experimental botany**, v. 54, n. 384, p. 985-992, 2003.

SINGH, M. The Colloidal Properties of Commercial Natural Rubber Latex Concentrates. **Journal of Rubber Research**, v. 21, n. 2, p. 119-134, 2018.

SOUSA, J. S. *et al.* Double power-law viscoelastic relaxation of living cells encodes motility trends. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

SHELDRIK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 3–8, 2015.

SHI, M. J. *et al.* Ethrel-stimulated prolongation of latex flow in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): an Hev b 7-like protein acts as a universal antagonist of rubber particle aggregating factors from laticifers and C-serum. **The Journal of Biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 209-216, 2016.

SNOECK, C. *et al.* Towards a biologically available strontium isotope baseline for Ireland. **Science of The Total Environment**, v. 712, p. 1-10, 2020.

SRIRING, M. *et al.* Viscoelastic and mechanical properties of large-and small-particle natural rubber before and after vulcanization. **Polymer Testing**, v. 70, p. 127-134, 2018.

SRIRING, M. *et al.* Enhancing viscoelastic and mechanical performances of natural rubber through variation of large and small rubber particle combinations. **Polymer Testing**, v. 81, p. 1-9, 2020.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Artmed Editora, 2017.

TANAKA, Y.; TARACHIWIN, L. Recent advances in structural characterization of natural rubber. **Rubber chemistry and technology**, v. 82, n. 3, p. 283-314, 2009.

TEIXEIRA, S. P. *et al.* Structural diversity and distribution of laticifers. *In: Advances in Botanical Research*. Academic Press, 2020.

TISSIER, A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags?. **The Plant Journal**, v. 70, n. 1, p. 51-68, 2012.

TISSIER, A. Plant secretory structures: more than just reaction bags. **Current opinion in biotechnology**, v. 49, p. 73-79, 2018.

TOOULAKOU, G., *et al.* Alarm photosynthesis: calcium oxalate crystals as an internal CO₂ source in plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 4, p. 2577-2585, 2016.

VAN BEILEN, J. B.; POIRIER, Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 522-529, 2007.

VOGLER, W.; LINDSAY, A. The impact of the rust fungus *Maravalia cryptostegiae* on three rubber vine (*Cryptostegia grandiflora*) populations in tropical Queensland. *In: 13th Australian weeds conference*, 2002.

VOLK, G. M. *et al.* The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. **Plant biology**, v. 4, n. 01, p. 34-45. 2002.

WADEESIRISAK, K. *et al.* Rubber particle proteins REF1 and SRPP1 interact differently with native lipids extracted from *Hevea brasiliensis* latex. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1859, n. 2, p. 201-210, 2017.

WADHWANI, B. D. *et al.* A review on phytochemical constituents and pharmacological potential of *Calotropis procera*. **RSC advances**, v. 11, n. 57, p. 35854-35878, 2021.

WANG, D. *et al.* Subcellular proteome profiles of different latex fractions revealed washed solutions from rubber particles contain crucial enzymes for natural rubber biosynthesis. **Journal of proteomics**, v. 182, p. 53-64, 2018.

WANG, S. *et al.* Micromorphological characterization and label-free quantitation of small rubber particle protein in natural rubber latex. **Analytical biochemistry**, v. 499, p. 34-42, 2016.

WANG, X. C. *et al.* A method for protein extraction from different subcellular fractions of laticifer latex in *Hevea brasiliensis* compatible with 2-DE and MS. **Proteome Science**, v. 8, n. 1, p. 35, 2010.

WANG, X., A method for protein extraction from different subcellular fractions of laticifer latex in *Hevea brasiliensis* compatible with 2-DE and MS. **Proteome Science**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2010.

WEI, Y. C. *et al.* Non-rubber components tuning mechanical properties of natural rubber from vulcanization kinetics. **Polymer**, 183, p. 1-7, 2019.

WEI, Y. C. *et al.* Influence of non-rubber components on film formation behavior of natural rubber latex. **Colloid and Polymer Science**, v. 298, p. 1263-1271, 2020.

WITITSUWANNAKUL, R. *et al.* Hevea latex lectin binding protein in C-serum as an anti-latex coagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation. **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p. 656-662, 2008.

WOOD, D. F.; CORNISH, K. Microstructure of purified rubber particles. **International journal of plant sciences**, v. 161, n. 3, p. 435-445, 2000.

YAMASHITA, S. *et al.* Purification and characterization of small and large rubber particles from *Hevea brasiliensis*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 82, n. 6, p. 1011-1020, 2018.

YAMASHITA, S.; TAKAHASHI, S. Molecular Mechanisms of Natural Rubber Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 89, p. 1-31, 2020.

YAMASHITA, S. *et al.* Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*. **eLife**, v. 5, p. 1-28, 2016.

YAMASHITA, S.; TAKAHASHI, S. Molecular mechanisms of natural rubber biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 89, p. 821-851, 2020.

YEANG, H. Y. *et al.* Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, v. 27, n. 1, p. 32-45, 2002.

APÊNDICE A – DADOS CRISTALOGRÁFICOS DE 2269012 (NÚMERO CCDC)

Tabela 7 - Coordenadas atômicas e U_{eq} (Å²) de 2269012 (Número CCDC).

Átomo	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U_{eq}
Ca1	0.31009(5)	0.54384(3)	-0.00618(6)	0.00972(15)
O4	0.55391(19)	0.58186(10)	0.9936(2)	0.0116(4)
O5	0.3493(2)	0.68120(12)	0.9334(2)	0.0133(4)
O2	0.2114(2)	0.57962(12)	0.4732(2)	0.0176(4)
O5W	0.000000	0.500000	0.3288(4)	0.0188(6)
O3W	0.1418(2)	0.44769(13)	0.0807(3)	0.0143(4)
O3	0.7037(2)	0.68100(11)	1.0429(2)	0.0173(4)
O2W	0.0942(2)	0.59878(13)	-0.0806(3)	0.0178(5)
O1	0.3192(3)	0.57883(13)	0.2481(2)	0.0193(4)
O1W	0.3175(3)	0.50443(13)	-0.2654(2)	0.0220(5)
H1WA	0.246975	0.525413	-0.314131	0.033
H1WB	0.304100	0.452776	-0.272221	0.033
O4W	0.5393(3)	0.82475(15)	0.3490(3)	0.0262(5)
H4WA	0.589446	0.848483	0.418226	0.039
H4WB	0.550726	0.773817	0.366602	0.039
C7	0.5882(3)	0.65504(15)	0.9998(3)	0.0117(5)
C2	0.4436(3)	0.62796(16)	0.4620(3)	0.0140(6)
C3	0.4299(3)	0.67513(17)	0.5941(3)	0.0139(6)
C5	0.5293(3)	0.76112(17)	0.8042(3)	0.0135(6)
C4	0.5469(3)	0.70686(17)	0.6674(3)	0.0137(6)
C6	0.4821(3)	0.71839(16)	0.9513(3)	0.0116(6)
C1	0.5765(3)	0.61270(17)	0.4036(3)	0.0162(6)
C9	0.6932(3)	0.64212(16)	0.4780(3)	0.0171(6)
C8	0.6789(3)	0.68904(17)	0.6090(3)	0.0160(6)
C10	0.3153(3)	0.59326(16)	0.3876(3)	0.0153(6)
H3	0.338(4)	0.685(2)	0.632(4)	0.012(8)
H5A	0.612(4)	0.790(2)	0.824(4)	0.006(7)
H9	0.784(4)	0.630(2)	0.439(4)	0.011(8)
H5B	0.450(4)	0.803(2)	0.784(4)	0.012(8)
H6	0.477(3)	0.7569(19)	1.036(4)	0.004(7)
H5	0.290(5)	0.714(3)	0.936(5)	0.034(12)
H8	0.760(4)	0.707(2)	0.659(4)	0.010(8)
H1	0.582(4)	0.585(3)	0.309(5)	0.023(10)
H2WA	0.078(4)	0.621(3)	-0.165(6)	0.026(11)
H2WB	0.021(6)	0.585(3)	-0.047(6)	0.042(14)
H3WA	0.187(5)	0.406(3)	0.084(5)	0.035(12)
H3WB	0.107(5)	0.457(3)	0.152(6)	0.034(13)
H5W	0.080(5)	0.537(4)	0.348(7)	0.10(2)

U_{eq} é definido como 1/3 do traço do tensor U_{ij} .

Tabela 8 – Comprimentos e ângulos de ligação de 2269012 (Número CCDC).

Átomo-Átomo	Comprimento (Å)
Ca1-O4 ^{#1}	2.4256(19)
Ca1-O5 ^{#1}	2.381(2)
Ca1-O3W	2.401(2)

Ca1–O2W	2.359(2)
Ca1–O1	2.306(2)
Ca1–O1W	2.367(2)
Ca1–H1WA	2.7841
O3W–H3WB	0.73(5)
O3–C7	1.249(3)
O2W–H2WA	0.84(5)
O2W–H2WB	0.80(6)
O1–C10	1.247(4)
O1W–H1WA	0.8735
O1W–H1WB	0.8729
O4W–H4WA	0.8699
O4W–H4WB	0.8700
C7–C6	1.528(4)
C2–C3	1.406(4)
C2–C1	1.398(4)
C2–C10	1.510(4)
C3–C4	1.399(4)
C3–H3	0.96(4)
C5–C4	1.512(4)
C5–C6	1.542(4)
C5–H5A	0.94(4)
C5–H5B	1.05(4)
C4–C8	1.399(4)
C6–H6	0.98(3)
C1–C9	1.386(4)
C1–H1	0.95(4)
C9–C8	1.397(4)
C9–H9	0.96(4)
C8–H8	0.94(4)

Átomo-Átomo-Átomo	Ángulo (°)
O4 ^{#1} –Ca1–H1WA	103.8
O4 ^{#1} –Ca1–H1WB	99.3
O4 ^{#1} –Ca1–H3WA	130.1(11)
O5 ^{#1} –Ca1–O4 ^{#1}	66.17(7)
O5 ^{#1} –Ca1–O3W	145.03(8)
O5 ^{#1} –Ca1–H1WA	85.7
O5 ^{#1} –Ca1–H1WB	110.0
O5 ^{#1} –Ca1–H3WA	162.3(11)
O3W–Ca1–O4 ^{#1}	145.56(7)
O3W–Ca1–H1WA	95.0
O3W–Ca1–H1WB	83.5
O3W–Ca1–H3WA	17.3(11)
O2W–Ca1–O4 ^{#1}	138.31(8)
O2W–Ca1–O5 ^{#1}	72.76(8)
O2W–Ca1–O3W	75.83(8)
O2W–Ca1–O1W	82.44(9)
O2W–Ca1–H1WA	65.4
O2W–Ca1–H1WB	87.8
O2W–Ca1–H3WA	91.5(11)

O1-Ca1-O4 ^{#1}	84.13(8)
O1-Ca1-O5 ^{#1}	88.03(7)
O1-Ca1-O3W	83.57(8)
O1-Ca1-O2W	101.69(9)
O1-Ca1-O1W	175.84(9)
O1-Ca1-H1WA	166.8
O1-Ca1-H1WB	161.6
O1-Ca1-H3WA	87.2(10)
O1W-Ca1-O4 ^{#1}	92.47(8)
O1W-Ca1-O5 ^{#1}	92.79(7)
O1W-Ca1-O3W	98.01(8)
O1W-Ca1-H1WA	17.2
O1W-Ca1-H1WB	17.2
O1W-Ca1-H3WA	93.2(10)
H1WA-Ca1-H1WB	28.7
H1WA-Ca1-H3WA	95.3
H1WB-Ca1-H3WA	76.7
Ca1 ^{#2} -O4-Ca1 ^{#3}	106.78(7)
C7-O4-Ca1 ^{#2}	120.22(16)
C7-O4-Ca1 ^{#3}	132.92(16)
Ca1 ^{#2} -O5-H5	123(3)
C6-O5-Ca1 ^{#2}	122.32(16)
C6-O5-H5	110(3)
Ca1-O3W-H3WA	103(3)
Ca1-O3W-H3WB	116(4)
H3WA-O3W-H3WB	113(5)
Ca1-O2W-H2WA	125(3)
Ca1-O2W-H2WB	124(4)
H2WA-O2W-H2WB	107(5)
C10-O1-Ca1	174.7(2)
Ca1-O1W-H1WA	109.6
Ca1-O1W-H1WB	109.6
H1WA-O1W-H1WB	104.3
H4WA-O4W-H4WB	104.5
O4-C7-C6	118.8(2)
O3-C7-O4	125.3(2)
O3-C7-C6	115.9(2)
C3-C2-C10	119.6(3)
C1-C2-C3	119.3(3)
C1-C2-C10	121.1(2)
C2-C3-H3	118(2)
C4-C3-C2	121.0(3)
C4-C3-H3	121(2)
C4-C5-C6	114.8(2)
C4-C5-H5A	111(2)
C4-C5-H5B	110.3(19)
C6-C5-H5A	109(2)
C6-C5-H5B	103.6(19)
H5A-C5-H5B	108(3)
C3-C4-C5	120.1(3)

C8–C4–C3	118.6(3)
C8–C4–C5	121.3(3)
O5–C6–C7	109.1(2)
O5–C6–C5	111.8(2)
O5–C6–H6	109(2)
C7–C6–C5	110.8(2)
C7–C6–H6	106.0(19)
C5–C6–H6	110.1(19)
C2–C1–H1	117(3)
C9–C1–C2	120.1(3)
C9–C1–H1	123(3)
C1–C9–C8	120.4(3)
C1–C9–H9	119(2)
C8–C9–H9	121(2)
C4–C8–H8	121(2)
C9–C8–C4	120.6(3)
C9–C8–H8	119(2)
O2–C10–C2	117.0(2)
O1–C10–O2	124.7(3)
O1–C10–C2	118.3(3)

Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: #1: +X, +Y, -1+Z; #2: +X, +Y, 1+Z; #3: 1-X, 1-Y, 1+Z.

Tabela 9 – Ângulos de torção de 2269012 (Número CCDC).

Átomo-Átomo-Átomo- Átomo	Ângulo de torção (°)
Ca1 ^{#1} -O4-C7-O3	158.6(2)
Ca1 ^{#2} -O4-C7-O3	-17.6(5)
Ca1 ^{#1} -O4-C7-C6	-21.4(3)
Ca1 ^{#2} -O4-C7-C6	162.39(18)
Ca1 ^{#1} -O5-C6-C7	4.6(3)
Ca1 ^{#1} -O5-C6-C5	127.6(2)
O4-C7-C6-O5	10.9(4)
O4-C7-C6-C5	-112.6(3)
O3-C7-C6-O5	-169.1(2)
O3-C7-C6-C5	67.4(3)
C2-C3-C4-C5	176.7(3)
C2-C3-C4-C8	-1.6(4)
C2-C1-C9-C8	-1.8(4)
C3-C2-C1-C9	1.7(4)
C3-C2-C10-O2	-27.8(4)
C3-C2-C10-O1	153.4(3)
C3-C4-C8-C9	1.6(4)
C5-C4-C8-C9	-176.7(3)
C4-C5-C6-O5	-61.4(3)
C4-C5-C6-C7	60.5(3)
C6-C5-C4-C3	72.4(3)
C6-C5-C4-C8	-109.3(3)
C1-C2-C3-C4	0.0(4)
C1-C2-C10-O2	150.9(3)
C1-C2-C10-O1	-27.9(4)

C1-C9-C8-C4	0.2(4)
C10-C2-C3-C4	178.8(3)
C10-C2-C1-C9	-177.0(3)

Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: #1: +X, +Y, 1+Z; #2: 1-X, 1-Y, 1+Z.