

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

***Aloe barbadensis* Miller: ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E ESTUDOS DOS  
EFEITOS VASCULOGÊNICOS E ANGIOGÊNICOS DO EXTRATO DO  
PARÊNQUIMA DE RESERVA, DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA (FP) E DA  
ACEMANANA.**

**Luciano Henrique Campestrini**

**Florianópolis  
Março de 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

***Aloe barbadensis* Miller: ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E ESTUDOS DOS  
EFEITOS VASCULOGÊNICOS E ANGIOGÊNICOS DO EXTRATO DO  
PARÊNQUIMA DE RESERVA, DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA (FP) E DA  
ACEMANANA.**

**Luciano Henrique Campestrini**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo Maraschin**  
Co-orientadores: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Viana**  
**Prof. Dr. Paulo Fernando Dias**

**Florianópolis  
Março de 2007**

## Breve História da Medicina

500 d.C. Venha até aqui e coma esta raiz.

1000 d.C. Esta raiz é coisa de ateu, faça esta oração ao Deus que está no céu.

1792 d.C. O Deus não está no céu, quem reina é a razão. Venha até aqui e tome esta poção.

1917 d.C. Esta poção é para enganar o oprimido, sugiro que você tome este comprimido.

1960 d.C. Este comprimido é antigo e exótico. Chegou o momento de tomar antibiótico.

1998 d.C. Antibiótico te deixa fraco e infeliz. Eis um novo tratamento: coma esta raiz.

(Autor Desconhecido)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao mestre que generosamente compartilhou mais que o seu saber; partilhou exemplos! A você Prof. Marcelo Maraschin.

# AGRADECIMENTOS

À minha mãe Helena e meu irmão Sérgio, pelo apoio, carinho e amor.

Ao Professor Dr. Paulo Fernando Dias, pelo seu apoio, amizade e pela orientação na parte biológica, que tornaram o trabalho possível.

À Professora Ana Viana, pelo apoio durante a execução do projeto.

Agradeço ao Professor João de Deus Medeiros e alunos pelo auxílio com os cortes e à identificação das estruturas histológicas.

Ao Professor Antonio Gilberto Ferreira, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (Universidade Federal de São Carlos – UFSCar), pela imensa ajuda na obtenção dos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

A Empresa Macedo Koerich na pessoa do Sr. Wilson Bevilac, pela cessão dos ovos para os experimentos da parte biológica.

Agradeço à Professora Dr<sup>a</sup>. Ivonne Delgadillo e à mestranda BSc química Maria Beatriz da Rocha Veleirinho da Universidade de Aveiro – Portugal, pela contribuição na obtenção dos espectros de FT-IR.

Às grandes amigas Shirley e Priscilla, pelas idéias e pela amizade demonstrada ao longo desses anos, pelos momentos de diversão e por terem me apresentado ao grande universo da MPB – Viva a Rádio UDESC FM!!!

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), Marcelo, Olavo, Shana, Carol, Alan, Prof. Aparecido, Prof. Enio e Afonso pela convivência agradável e pelos queijos e vinhos que participamos juntos.

Especialmente aos colegas Wagner, Vanessa e Fernanda. Agradeço por terem sido mais que colegas no laboratório!

Ao técnico do LMBV Luis Pacheco, por seu espírito sempre prestativo, ao técnico Francisco Wagner do Laboratório de Solos e a amiga Maria Luisa Peixoto do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, pelo grande auxílio com as imagens dos vasos da vesícula vitelínica e por sua paciência ao longo destes anos de aprendizagem.

À Renata Ávila Ozório e ao Luciano pela imensa ajuda na liofilização dos materiais!

Às funcionárias Ligia e Joice, da secretaria da Pós em Biotecnologia, por terem sempre a disponibilidade de “salvar nossa pele”. Obrigado!!!!

Agradecimento ao colega Fábio Pit que tanto auxiliou durante a fase tão difícil das coletas de material.

Não poderia deixar de agradecer ao Henrique e a Marian e Aline, meus grandes estagiários, que me permitiram ensinar-lhes o tão pouco que conheço!

Aos amigos que passaram pelo laboratório e que fizeram parte desse grupo ao qual tive a honra de pertencer: Denílson, Josiane, Liana, Luciana, Taysa, Daniela e Liana. Obrigado por sua amizade!

A amiga Carla Máisa Camellini (Carla Cogumelos) pela “sessões” de troca de idéias e pelo empréstimo da resina para a realização da cromatografia de gel permeação.

Aos meus mais que amigos, meus irmãos Eleani, Gilmar, Robson, Jacks, Vanderlei, Paulo e Marta que estavam sempre ao meu lado e foram meu porto seguro!

Especialmente ao Sr. Dionísio e a Sra. Cacilda, pelo fornecimento do material de estudo sem o qual teria sido impraticável a realização do trabalho e por acreditarem sempre que a babosa ainda tem muito que oferecer!

Ao Professor Marcelo Maraschin, ao qual devo muito da minha formação como aluno e como ser humano. Por ter aberto generosamente as portas e ter permitido que eu adentrasse e conhecesse um pouco mais do vasto universo da ciência!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

# LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 –</b>	(A) <i>Aloe barbadensis</i> em estágio de floração. (B) Detalhe da inflorescência. (C) Micrografia da secção transversal da folha a fresco, corada com vermelho do Congo e verde malaquita, obtida sob luz polarizada e contraste por interferência diferencial de Normasky. Barra = 100 $\mu$ m.....	5
<b>FIGURA 2 –</b>	Fórmula molecular de componentes majoritários do extrato do parênquima clorofiliano de babosa.....	8
<b>FIGURA 3 –</b>	Biossíntese das antraquinonas através da via do ácido chiquímico.....	11
<b>FIGURA 4 –</b>	Detalhe da estrutura química da acemanana derivada de <i>Aloe barbadensis</i> , comercialmente denominada Carrysin™.....	14
<b>FIGURA 5 –</b>	Fluxograma de produção, coleta e processamento de plantas de <i>Aloe barbadensis</i> Miller.....	21
<b>FIGURA 6 –</b>	Concentração de aloína A em amostras de plantas distintas e em mesmas plantas, coletadas no período de maio de 2005 a março de 2006 e julho de 2005 a maio de 2006, respectivamente. <b>PC</b> = Plantas produzidas em campo; <b>PM</b> = Plantas micropropagadas, aclimatizadas e transferidas para o campo.....	31
<b>FIGURA 7 –</b>	Concentração de aloína A ( $\mu$ g/mL) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, em relação ao fator insolação total, no período de maio de 2005 a março de 2006.....	35
<b>FIGURA 8 –</b>	Concentração de aloína A ( $\mu$ g/mL) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, em relação ao fator temperatura média diária bimestral, no período de maio de 2005 a março de 2006.....	36
<b>FIGURA 9 –</b>	Concentração de aloína A ( $\mu$ g/mL) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, consoante à insolação total do período de maio de 2005 a março de 2006.....	37
<b>FIGURA 10 –</b>	Concentração de aloína A ( $\mu$ g/mL) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, consoante à temperatura média diária bimestral do período de maio de 2005 a março de 2006.....	38



<b>FIGURA 11</b> – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, segundo os valores de precipitação pluviométrica bimestral (mm), no período de julho de 2005 a maio de 2006.....	40
<b>FIGURA 12</b> – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, segundo os valores de umidade relativa diária mensal (%), no período de julho de 2005 a maio de 2006.....	41
<b>FIGURA 13</b> – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, de amostras de mesmas plantas, de acordo com a precipitação pluviométrica bimestral (mm), no período de julho de 2005 a maio de 2006.....	42
<b>FIGURA 14</b> – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, de amostras de mesmas plantas, de acordo com a umidade relativa diária mensal (%), no período de julho de 2005 a maio de 2006.....	43
<b>FIGURA 15</b> – Rendimento (g%) da fração polissacarídica em relação ao peso fresco do parênquima de reserva, em plantas distintas e em mesmas plantas, coletadas no período de maio de 2005 a março de 2006 e julho de 2005 a maio de 2006, respectivamente.....	45
<b>FIGURA 16</b> – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, consoante às condições de insolação total, observados no período de maio de 2005 a março de 2006.....	49
<b>FIGURA 17</b> – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, consoante às condições de temperatura média diária mensal, para o período de maio de 2005 a março de 2006.....	50
<b>FIGURA 18</b> – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, segundo o fator climático insolação total, no período de julho de 2005 a maio de 2006.....	51
<b>FIGURA 19</b> – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, segundo o fator climático temperatura média diária mensal, no período de julho de 2005 a março de 2006.....	52

<b>FIGURA 20</b> –	Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, de amostras de plantas distintas, de acordo com a condição de precipitação pluviométrica bimestral (mm), no período de maio de 2005 a março de 2006.....	54
<b>FIGURA 21</b> –	Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, de amostras de plantas distintas, de acordo com a condição de umidade relativa diária mensal (%), no período de maio de 2005 a março de 2006.....	55
<b>FIGURA 22</b> –	Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para as amostras de mesmas plantas, segundo a precipitação pluviométrica bimestral (mm), no período de julho de 2005 a maio de 2006.....	56
<b>FIGURA 23</b> –	Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, segundo a umidade relativa diária mensal (%), no período de julho de 2005 a maio de 2006.....	57
<b>FIGURA 24</b> –	Perfil cromatográfico dos padrões de açúcares: Ramnose ( $R_f = 0,59$ ), fucose ( $R_f = 0,52$ ), frutose ( $R_f = 0,43$ ), arabinose ( $R_f = 0,45$ ), galactose ( $R_f = 0,42$ ), ácido glucurônico ( $R_f = 0,40$ ), manose ( $R_f = 0,47$ ), glucose ( $R_f = 0,46$ ), da mistura de padrões (mix). Amostras (1-8) e da mistura de padrões (P).....	66
<b>FIGURA 25</b> –	Espectros de FT-IR (600 a 3400 $\text{onda.cm}^{-1}$ ) representativos da FP de plantas micropropagadas (PM). As bandas de maior intensidade são mostradas em destaque.....	68
<b>FIGURA 26</b> –	Espectros de FT-IR (600 a 3400 $\text{onda.cm}^{-1}$ ) representativos da FP de plantas produzidas no campo (PC), com destaque para as bandas de maior intensidade.....	69
<b>FIGURA 27</b> –	Espectros de FT-IR (600 a 3400 $\text{onda.cm}^{-1}$ ) representativos do padrão comercial de acemanana e da acemanana obtida via cromatografia de gel permeação da FPD.....	71
<b>FIGURA 28</b> –	Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2, das amostras da FP referentes às mesmas plantas (1 – PM, 2 – PC) e plantas distintas (3 – PM, 4 – PC). Os grupos circulosados em vermelho fora da grande elipse indicam amostras consideradas <i>outliers</i> e a seta dentro da elipse indica a amostra de acemanana (A).....	73

- FIGURA 29** – Contribuição fatorial de PC1 e PC2 das amostras da FP, referentes às mesmas plantas e plantas distintas, obtidas a partir dos dados espectrais de FT-IR (600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ )..... 75
- FIGURA 30** – Distribuição fatorial (PCA) dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) para os dados espectrais de FT-IR (600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ ) das amostras da FPD, referentes às mesmas plantas (1 – PM, 2 – PC) e plantas distintas (3 – PM, 4 – PC). A seta destaca a amostra de acemanana..... 76
- FIGURA 31** – Contribuição fatorial de PC1 das amostras da FPD, referentes às mesmas plantas e plantas distintas, para os dados espectrais de FT-IR (600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ )..... 77
- FIGURA 32** – Distribuição fatorial (PC1 e PC2) dos dados espectrais (FT-IR, 900-1300  $\text{onda.cm}^{-1}$ ) das amostras da FP, referentes às mesmas plantas (1 – PM, 2 – PC) e plantas distintas (3 – PM, 4 – PC). A seta dentro da elipse indica a amostra de acemanana e a externa uma amostra *outlier*. O grupo circulado em vermelho representa a amostra de padrão comercial..... 78
- FIGURA 33** – Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2 dos dados espectrais de FT-IR (600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ ) das amostras da FP (3 – PM e 4 – PC círculo menor em PC1 positivo) e FPD (1 – PM e 2 – PC círculo menor em PC1 negativo) de plantas distintas, juntamente com a acemanana (seta) e a amostra de padrão comercial (grupo circulado em vermelho)..... 79
- FIGURA 34** – Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2 dos dados espectrais de FT-IR (600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ ) das amostras da FP (3 – PM e 4 – PC círculo menor em PC1 positivo) e FPD (1 – PM e 2 – PC círculo menor em PC1 negativo) de plantas distintas, juntamente com a acemanana (seta) e a amostra de padrão comercial (grupo circulado em vermelho) ..... 80
- FIGURA 35** – Distribuição fatorial (PCA) de eixos PC1 vs PC2, das amostras referentes à FP (3 – PM e 4 – PC círculo menor) e FPD (1 – PM e 2 – PC) de plantas distintas, excluída a acemanana e a amostra de padrão comercial, do espectro de FT-IR (600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ )..... 81
- FIGURA 36** – Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN (9,4 Tesla) de amostras da FPD de plantas distintas (PM), representativos das quatro estações do ano, em ordem cronológica crescente..... 83

- FIGURA 37** – Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN (9,4 Tesla) de amostras da FPD de plantas distintas (PC), representativos das quatro estações do ano, em ordem cronológica crescente..... 84
- FIGURA 38** – Detalhe da estrutura química do constituinte básico da acemanana isolada da FP de *Aloe barbadensis*, com as indicações dos respectivos valores de deslocamentos químicos ( $^{13}\text{C}$ -RMN, 9,4 Tesla)..... 86
- FIGURA 39** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (9,4Tesla) de amostra da FPD evidenciando os sinais de deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{ppm}}$ ) referentes à estrutura polissacarídica encontrada em *A. barbadensis*..... 91
- FIGURA 40** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (9,4 Tesla) da amostra de acemanana isolada da FPD e de amostra de padrão comercial proveniente de *A. barbadensis*..... 93
- FIGURA 41** – Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2 calculada a partir dos dados espectrais de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras da FPD, referentes a amostras de plantas distintas. A seta em (2) indica o padrão comercial, enquanto a seta em (9) a amostra de PC coletada em março/2006..... 94
- FIGURA 42** – Contribuição fatorial (PC1) dos dados espectrais de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras da FPD (PC e PM)..... 95
- FIGURA 43** – (A) Percentagem de vasos observados na vesícula vitelínica nos tratamentos com 10, 30 e 90  $\mu\text{g}$  do extrato do parênquima de reserva e da heparina (HP, controle positivo), em comparação ao controle (água destilada). (B) Percentagem de comprimento cefálico (medida do eixo mesencéfalo-cervical). (C) Comprimento total. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  EPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey)..... 126
- FIGURA 44** – (A) Percentagem de vasos observados na vesícula vitelínica nos tratamentos com 10, 30 e 90  $\mu\text{g}$  da FP e da com heparina (HP, controle positivo), em comparação ao controle (água destilada). (B) Percentagem de comprimento cefálico (medida do eixo mesencéfalo-cervical). (C) Comprimento total. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  EPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey)..... 127

- FIGURA 45 –** (A) Percentagem de vasos observados na vesícula vitelínica nos tratamentos com 10, 30 e 90  $\mu\text{g}$  da acemanana e da heparina (HP, controle positivo), em comparação ao controle (água destilada). (B) Percentagem de comprimento cefálico (medida do eixo mesencéfalo-cervical). (C) Comprimento total. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  EPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey)..... 130
- FIGURA 46 –** Seqüência de microfotografias onde são observados os efeitos da administração do extrato do parênquima de reserva sobre a vascularização da vesícula vitelínica de embriões de *G. domesticus* no 6º dia de desenvolvimento. Em (A) tratamento controle, (B) tratamento com heparina 50 UI, (C) tratamento com 30  $\mu\text{g}$  do extrato e (D) tratamento com 90  $\mu\text{g}$  do extrato. A seta em (A) indica vestígios do disco de metilcelulose e água destilada e a seta em (C) indica um capilar sanguíneo em processo de remodelagem. Barra = 1 mm..... 133
- FIGURA 47 –** Seqüência de microfotografias onde são observados os efeitos da administração da FP sobre a vascularização da vesícula vitelínica de embriões de *G. domesticus* no 6º dia de desenvolvimento. Em (A) tratamento controle, (B) tratamento com heparina 50 UI, (C) tratamento com 30  $\mu\text{g}$  da FP e (D) tratamento com 90  $\mu\text{g}$  da FP. A seta em (A) indica vestígios do disco de metilcelulose e água destilada. Barra = 1 mm .... 134
- FIGURA 48 –** Seqüência de microfotografias onde são observdos os efeitos da administração da acemanana sobre a vascularização da vesícula vitelínica de embriões de *G. domesticus* no 6º dia de desenvolvimento. Em (A) tratamento controle, (B) tratamento com heparina 50 UI, (C) tratamento com 30  $\mu\text{g}$  da acemanana e (D) tratamento com 90  $\mu\text{g}$  da acemanana. As setas indicam vestígios do disco de metilcelulose. Barra = 1 mm ..... 135
- FIGURA 49 –** Percentagem de vasos nos limites do disco implantados na membrana corioalantóica nos tratamentos com as concentrações de 10  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$  e 90  $\mu\text{g}$  do extrato do parênquima de reserva (A), da fração polissacarídica (FP) (B) e com a acemanana (C), em relação ao controle (água destilada). 50 U.I. de heparina (HP), foi utilizada como controle positivo. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  EPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  em relação ao controle (água destilada) (ANOVA, seguida do teste de Tukey)..... 136

- FIGURA 50** – Modelo de mecanismo de ação da inibição da formação de novos vasos sanguíneos pela ação de polifenóis nas células da musculatura lisa vascular..... 139
- FIGURA 51** – Modelo esquemático da via de sinalização envolvendo a ativação de macrófagos por polissacarídeos de plantas. A partir da ativação dos receptores de membrana dos macrófagos, desencadeia-se a transdução deste sinal estimulatório para o interior da célula, levando à reações síntese dos fatores de transcrição ..... 140

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 –</b>	Concentração de aloína ( $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$ ) em plantas micropropagadas (PM) e em plantas produzidas no campo (PC) para coletas de mesmas plantas (MP) e plantas distintas (PD), ao longo do período maio/2005 a maio/2006.....	32
<b>TABELA 2 –</b>	Rendimento da FP (% p/p) de amostras de plantas micropropagadas (PM) e plantas produzidas no campo (PC), para coletas de mesmas plantas (MP) e plantas distintas (PD), ao longo do período maio/2005 a maio/2006.....	46
<b>TABELA 3 –</b>	Parâmetros físico-químicos de amostras de folhas e do extrato do parênquima de reserva de <i>Aloe barbadensis</i> Miller, cultivada em Paulo Lopes, SC, coletadas em setembro/2006.....	60
<b>TABELA 4 –</b>	Parâmetros bioquímicos referentes ao extrato do parênquima de reserva de <i>Aloe barbadensis</i> Miller, cultivadas em Paulo Lopes (SC), coletadas em setembro/2006.....	61
<b>TABELA 5 –</b>	Parâmetros bioquímicos da FP e FPD de <i>Aloe barbadensis</i> , referentes às plantas distintas de PM e PC, coletadas no período de maio de 2005 a março de 2006.....	62
<b>TABELA 6 –</b>	Parâmetros bioquímicos da FP e FPD de <i>Aloe barbadensis</i> , referentes a mesmas plantas de PM e PC, coletadas no período de julho de 2005 a maio de 2006.....	63
<b>TABELA 7 –</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) de $^{13}\text{C}$ -RMN da FPD de coletas de plantas distintas de PM e PC .....	87
<b>TABELA 8 –</b>	Patentes de produtos e processos industriais obtidos a partir de <i>Aloe barbadensis</i> , registrados na Europa no período de 1984 a 2001 .....	107
<b>TABELA 9 –</b>	Compostos presentes em <i>Aloe barbadensis</i> Miller e suas atividades biológicas .....	111
<b>TABELA 10 –</b>	Promotores e inibidores da angiogênese, produtos comercializados ou que se encontram em fase de testes clínicos .....	115

# LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aFGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos ácido
<b>ANG</b>	Angiopietina
<b>bFGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos básico
<b>CCD</b>	Cromatografia de Camada Delgada
<b>COX-2</b>	Ciclooxygenase-2
<b>dec</b>	Décimos
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos
<b>FP</b>	Fração polissacarídica
<b>FPD</b>	Fração polissacarídica dialisada
<b>FID</b>	<i>Free Induction Decay</i> – Decaimento de Indutância Livre
<b>FIV</b>	Vírus da imunodeficiência felina
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
<b>G-CSF</b>	Fator de estimulação de granulócitos-colônia
<b>HGF</b>	Fator de crescimento de hepatócitos
<b>h</b>	Horas
<b>HP</b>	Heparina
<b>IGF</b>	Fator de crescimento tipo insulina
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>INF- <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\chi</math></b>	Interferon $\alpha$ , $\beta$ , $\chi$
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>LOX</b>	Lipooxygenase
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrativa de macrófagos
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases da matriz
<b>MP</b>	Mesmas plantas
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>PAI-1</b>	Inibidor do ativador de plasminogênio-1
<b>PC</b>	Plantas produzidas em campo



<b>PCA</b>	Análise de componentes principais
<b>PD</b>	Plantas distintas
<b>PDGF-BB</b>	Fator de crescimento de plaquetas – BB
<b>PEDF</b>	Fator derivado do pigmento de epitélio
<b>PF 4</b>	Fator plaquetário 4
<b>PGF</b>	Fator de crescimento placentário
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PM</b>	Plantas micropropagadas, aclimatizadas e transferidas para o campo
<b>TIMPs</b>	Inibidor de metaloproteinase tecidual
<b>TGF <math>\alpha</math>, <math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformante $\alpha$ , $\beta$
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TSP-1</b>	Trombospondina – 1
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial
<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13

## RESUMO

*Aloe barbadensis* Miller, planta também conhecida como *Aloe vera* L., uma espécie originária do Continente Africano, possui diversas propriedades medicinais determinadas por metabólitos encontrados no extrato do parênquima clorofiliano e no parênquima de reserva. Este último, é rico em polissacarídeos, principalmente polimananas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . Neste trabalho, foram estudadas as influências de fatores climáticos (temperatura média diária mensal, insolação, precipitação pluviométrica bimestral e umidade relativa diária bimestral) sobre a biossíntese de aloína (antraquinona majoritária) e da fração polissacarídica do extrato do parênquima de reserva ao longo do período de maio/2005 a maio/2006. Para tal, foram utilizadas amostras de população de plantas obtidas via micropropagação, de plantas produzidas no campo e também de folhas coletadas de mesmas plantas e de plantas distintas. A precipitação pluviométrica bimestral foi o fator de maior influência na biossíntese de aloína A, enquanto a fração polissacarídica mostrou-se mais afetada pelos efeitos da insolação e da precipitação pluviométrica bimestral. As análises realizadas na determinação das características físico-químicas e bioquímicas do extrato do parênquima de reserva mostraram teores de glicídios e proteínas proeminentes. Adicionalmente, a FP demonstrou uma pequena variação de conteúdos protéico e glicídico inter-coletas. Entretanto, na FPD o grau de variância foi maior, o que demonstrou a importância da diálise das amostras. A composição monomérica da FPD, utilizando CCD, revelou a presença de manose, glucose e galactose. A utilização das espectroscopias de FT-IR e  $^{13}\text{C}$ -RMN permitiu determinar de forma inequívoca a estrutura molecular da acemanana presente nas amostras em estudo, do padrão comercial e da acemanana isolada da fração

polissacarídica. A análise quimiométrica (PCAs) viabilizou o estabelecimento de um padrão de distribuição fatorial das amostras de acordo com sua composição química e demonstrou que os efeitos de época de coleta e de diálise das amostras foram significativos para o perfil de agrupamentos observados. Os contaminantes presentes nas amostras e a intensidade de sinais nos espectros de FT-IR foram os principais responsáveis pela dispersão observada das amostras. A  $^{13}\text{C}$ -RMN mostrou que a purificação da acemanana não foi suficiente para garantir seu grau de pureza, no entanto, ficou acima do padrão usado comercialmente. Os ensaios de vascularização realizados na vesícula vitelínica e na membrana córioalantóica de *Gallus domesticus* produziram um efeito anti-vasculogênico e anti-angiogênico, sem comprometer a morfogênese embrionária, nos tratamentos com extrato do parênquima de reserva, da FP e de acemanana, nas concentrações de 10, 30 e 90 $\mu\text{g/ovo}$ .

## ABSTRACT

*Aloe barbadensis* Miller, also referred to as *Aloe vera* L., is a native plant to the African Continent, having a great diversity of medicinal properties owing to their secondary metabolites found in the extract of both chlorophyllian and storage parenchyma. The latter is rich in polysaccharides mainly  $\beta(1\rightarrow4)$  polymannans. In this work, the influences of environmental factors (mean temperature, insolation, rainfall, and relative humidity) on aloin and polysaccharide biosynthesis (the major anthraquinone) throughout one year has been studied, in collections of micropropagated plants and plants produced on field, by collecting leave samples from same plants and distinct plants. The rainfall was the main climatic factor influencing aloin content as the irradiation and rainfall had meaningful effect on the biosynthesis and accumulation of polysaccharide fraction. Physico-chemical analysis of storage parenchyma revealed prominent amounts of glycodes and proteins. The monomeric composition of DPF determined by TLC showed the presence of manose, glucose and galactose. Spectroscopic analysis (FT-IR and  $^{13}\text{C}$ -NMR) allowed to determine unequivocally the molecular structure of the polysaccharide fractions in study, the commercial acemannan standard and the isolated acemannan of the polysaccharide fraction. Spectral data showed that contaminants such as proteins, lipids and phenolics compounds are bound to the polysaccharide structure. The chemometric analysis allowed to group polysaccharide samples according their spectral (FT-IR) profile as well as to demonstrate the effect of sampling time and dialysis on the separation observed. The  $^{13}\text{C}$ -NMR disclosed that the protocol for purification of acemannan was not enough to guarantee high degree of pureness (~99%), but was superior as compared to the commercially available standard. The

biological assays revealed an anti-vasculogenic and anti-angiogenic effects in the yolk sac and the corioalantoic membrane of *Gallus domesticus* embryos, without intervening with their growth, as treated with storage parenchyma extract, polysaccharide fraction and acemannan (10, 30 and 90 $\mu$ g/egg).

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
Introdução.....	1
<b>CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA</b>	
1 Revisão Bibliográfica .....	4
1.1 Matéria-prima vegetal.....	4
1.1.1 Descrição botânica da espécie <i>Aloe barbadensis</i> Miller.....	4
1.1.2 Nomenclatura científica e família botânica.....	6
1.1.3 Sinonímia científica.....	6
1.1.4 Nomenclatura vernácula.....	6
1.1.5 Origem e distribuição geográfica.....	7
1.2 Composição química do gênero <i>Aloe</i> .....	7
1.2.1 Compostos do extrato do parênquima clorofiliano.....	7
1.2.2 Biossíntese de antraquinonas.....	9
1.2.3 Compostos do extrato do parênquima de reserva.....	12
1.2.4 Outros componentes.....	15
1.3 Análise da composição química por espectroscopia de infravermelho (FT-IR), <sup>13</sup> C-RMN e análise quimiométrica.....	16
1.4 Objetivos.....	19
1.4.1 Objetivo Geral.....	19
1.4.2 Objetivos Específicos.....	19
1.5 Material e Métodos.....	20

1.5.1	Produção de plantas no campo (PC) e de plantas micropropagadas, aclimatizadas e transferidas para o campo (PM).....	20
1.5.2	Caracterização química do extrato do parênquima de reserva, da FP e da FPD.....	21
1.5.2.1	Dosagem de proteínas no parênquima de reserva, da FP e da FPD....	21
1.5.2.2	Determinação dos carboidratos totais no parênquima de reserva, da FP e da FPD .....	22
1.5.2.3	Determinação do conteúdo de açúcares redutores no parênquima de reserva, da FP e da FPD .....	23
1.5.2.4	Quantificação de glucose (método da glucose oxidase) na FP .....	23
1.5.3	Caracterização físico-química do extrato do parênquima de reserva.....	24
1.5.4	Análise de aloína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	24
1.5.5	Análise quantitativa de polissacarídeos – Fração polissacarídica (FP) e fração polissacarídica dialisada (FPD).....	25
1.5.6	Hidrólise da FPD e cromatografia de camada delgada (CCD).....	26
1.5.7	Isolamento e análise de acemanana.....	27
1.5.8	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)...	28
1.5.9	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>13</sup> C.....	28
1.5.10	Quimiometria.....	29
1.6	Resultados e Discussão.....	30
1.6.1	Análise quantitativa da aloína por CLAE e relação da sua produção <i>in campo</i> com fatores climáticos.....	30
1.6.2	Análise quantitativa da FP e sua relação com fatores climáticos.....	44
1.6.3	Caracterização físico-química do extrato do parênquima de reserva da FP e FPD.....	59
1.6.4	Determinação da composição monomérica dos polissacarídeos da FPD.	65
1.6.5	Caracterização estrutural da FP, FPD e acemanana por espectroscopia vibracional de infravermelho (FT-IR), seguida de análise quimiométrica.....	67

1.6.6 Caracterização estrutural da FPD e de acemanana por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ ( $^{13}\text{C}$ -RMN), seguida de análise quimiométrica.....	82
1.7 Conclusões.....	97
<b>CAPÍTULO 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS</b>	
2 Revisão bibliográfica.....	99
2.1 Aspectos históricos e etnofarmacológicos .....	99
2.2 Atividades farmacológicas do gênero <i>Aloe</i> .....	101
2.2.1 Atividades farmacológicas dos compostos químicos do extrato do parênquima clorofiliano.....	101
2.2.2 Atividades farmacológicas dos compostos químicos do parênquima de reserva.....	104
2.3 Características dos processos de formação de vasos sanguíneos.....	112
2.4 Modelos de estudo de vascularização e morfogênese embrionária voltados à investigação das propriedades farmacológicas de <i>A. barbadensis</i> .....	117
2.5 Objetivos.....	120
2.5.1 Objetivo Geral.....	120
2.5.2 Objetivo Específico.....	120
2.6 Material e métodos.....	121
2.6.1 Modelo biológico – Embriões de <i>Gallus domesticus</i> – Linnaeus, 1758.....	121
2.6.2 Vasculogênese em vesícula vitelínica.....	121
2.6.3 Angiogênese em membrana córioalantóica.....	122
2.6.4 Medidas da morfogênese embrionária na vasculogênese.....	123
2.6.5 Análise estatística dos dados .....	124
2.7 Resultados e discussão.....	125
2.7.1 Tratamentos realizados na vesícula vitelínica.....	125
2.7.2 Tratamentos realizados na membrana córioalantóica.....	136
2.8 Conclusões.....	143



3 Referências.....	144
ANEXOS	165

## INTRODUÇÃO

Numerosas plantas têm sido tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 80% da população mundial em países em desenvolvimento dependem primariamente de plantas medicinais para o atendimento básico de saúde, além do que, o uso de plantas medicinais em países desenvolvidos é crescente, recentemente, verificou-se que 25% da população do Reino Unido utilizam plantas medicinais regularmente (CANTER et al., 2005). Simões et al. (1996) relatam que o uso das plantas medicinais não se restringe somente às zonas rurais ou regiões desprovidas de assistência médica e farmacêutica, mas que também são utilizadas intensamente no meio urbano como forma alternativa ou complementar aos medicamentos quimiossintéticos.

A vantagem terapêutica específica do uso das plantas medicinais é o elevado grau de confiança que amplos segmentos da população têm nos fitomedicamentos, dentre os quais se encontra a babosa, cujo uso se estende também a diversas áreas da indústria.

Existe um crescente interesse comercial relacionado ao uso da babosa, tanto no setor cosmético como no farmacêutico. Como exemplo disto, diversos estudos têm demonstrado a utilização de babosa como fonte de compostos com atividades farmacológicas, tais como as antraquinonas, metabólitos secundários encontrados principalmente no extrato do parênquima clorofiliano foliar, tendo a aloína como constituinte majoritário, e também os polissacarídeos do extrato do parênquima, com destaque para a acemanana. A acemanana, comercialmente conhecida como Carrysin<sup>®</sup>, Hidrogel<sup>®</sup> (NI et al.,2004), foi aprovada pelo FDA (Food and Drug

Administration) para aplicação em ferimentos desde a década passada e, mais recentemente, para tratamento da osteíte alveolar (TALMADGE et al., 2004). Apesar dessas indicações, os mecanismos de ação desta macromolécula no organismo humano permanecem não completamente elucidados, carecendo, portanto, de maiores estudos.

Um dos aspectos que suscita maior interesse é o fato de que, por apresentar atividade imunomodulatória, este composto poderia atuar como um agente antitumoral. No contexto da investigação pré-clínica da acemanana, os estudos relacionados à vasculogênese e angiogênese são uma importante ferramenta no que concerne à elucidação dos efeitos desse polissacarídeo e de outros compostos isolados da babosa na geração ou inibição da formação de vasos.

Devido à gama de aplicações na área da saúde humana, os produtos derivados de babosa vêm apresentando forte expansão nos mercados nacional e internacional. Esse fato determina uma maior demanda por matérias-primas de qualidade e o aumento da oferta da biomassa de babosa pressupõe o incremento na produtividade e/ou expansão da área dos cultivos. Neste último caso, a implantação de cultivos com alto rendimento tem como premissa básica a utilização de mudas de qualidade genética e sanitária.

Recentemente, essa demanda motivou a parceria entre a empresa Naturama Sucos Integrais de Brasil® (Paulo Lopes, SC) e o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, voltada ao desenvolvimento de um projeto de seleção e multiplicação *in vitro* da espécie (ARAÚJO et al. 2002; CAMPESTRINI et al., 2006), com o objetivo de agregar valor aos produtos derivados. Outras empresas nacionais e estrangeiras têm se mostrado interessadas em investir na melhoria de suas linhas de produção, através da

aquisição de matéria-prima vegetal com características fitossanitárias e genéticas superiores, bem como empresas de tecnologia da região da Grande Florianópolis projetam a criação de produtos de interesse biomédico, utilizando métodos desenvolvidos em parte no trabalho aqui apresentado.

# CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

#### 1.1.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE *Aloe barbadensis* Miller

A espécie *Aloe barbadensis* Miller é uma planta arbustiva, dióica, suculenta, mucilagínosa, rizomatosa, entouceirada, de caule curto, perene, com 0,50 a 1,20m de altura. Suas flores são tubulosas, com 2 a 4cm de comprimento, de cor amarelada, pendentes, com pedicelos menores que as brácteas, dispostas em racemos terminais densos, de 30 a 40cm de comprimento, sobre uma haste simples ou ramificada. O fruto é uma cápsula triangular reunindo várias sementes escuras. As folhas são dispostas em roseta, reunindo até 20 unidades, sendo ensiformes, com 50 a 60cm de comprimento, 6 a 9cm de largura e 3cm de espessura na base; densas, lanceoladas, côncavas em sua face superior e convexa na face inferior; glauco-esverdeadas uniformes, sinuoso-serradas, carnosas, com pintas ou manchas brancas quando jovens, marginadas por espinhos triangulares, amarelos, curtos e espaçados. As folhas jovens são retas e agudas. O corte transversal das folhas revela, externamente, uma camada de células epidérmicas de consistência elástica e impermeável que reveste uma segunda camada, o mesófilo, o qual contém canais condutores de extrato do parênquima clorofiliano. Mais internamente, encontra-se o parênquima tissular (parênquima reserva), de aspecto vítreo, que se relaciona à condição xerófita da babosa, conservando a umidade do tecido por longo período de tempo. O extrato do parênquima clorofiliano é um líquido de consistência leitosa,

coloração amarela-ocre, sabor amargo e aroma rançoso, sendo produzido por células excretoras do mesófilo. O florescimento ocorre de agosto a setembro, sendo a fecundação cruzada, através de insetos e pássaros, principalmente (Figura 1) (SILVA JÚNIOR, 2003).



**Figura 1** - (A) *Aloe barbadensis* em estágio de floração. (B) Detalhe da inflorescência. (C) Micrografia da secção transversal da folha a fresco, corada com vermelho do Congo e verde malaquita, obtida sob luz polarizada e contraste por interferência diferencial de Normasky. Barra = 100 $\mu$ m

**Fonte:** Fotos do autor.

## 1.2 NOMENCLATURA CIENTÍFICA E FAMÍLIA BOTÂNICA

A espécie *Aloe barbadensis* Miller pertence à família Asphodelaceae (WICHTL, 2004). Esta nomenclatura é referenciada pela Organização Mundial de Saúde, assim como a *Aloe vera* (L.) Burm. f. (WHO, 1999).

## 1.3 SINONÍMIA CIENTÍFICA

*Aloe vera* (L.) Burm. f. (WICHTL, 2004) , *A. chinensis* Bak., *A. elongata* Murray, *A. indica* Royle, *A. officinalis* Forsk., *A. perfoliata* L., *A. rubescens* DC, *A. vera* L. var. *littoralis* Köning ex Bark., *A. vera* L. var. *chinensis* Berger, *A. vulgaris* Lam. (WHO, 1999), *A. perfoliata vera* L., *A. humilis* Blanco, *A. vera* L. var. *officinalis* Baker (SILVA JÚNIOR, 2003).

## 1.4 NOMENCLATURA VERNÁCULA

A planta popularmente denominada babosa é também conhecida como kanyasara, ghrita kumari na medicina Ayurvédica (Índia), lu hui ye (China), aloe, aloe de Barbados (Espanha), aloés de Curaçao (Inglaterra), aloés (França), aloés de Curaçao (Alemanha), babosa (WICHTL, 2004) babosa-medicinal, erva-babosa, erva-de-azebre, caraguatá e caraguatá-de-jardim (SILVA JÚNIOR, 2003).

## 1.5 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A espécie é nativa do sudeste ou leste da África e foi subseqüentemente introduzida no norte da África, península arábica, China, Gibraltar, países mediterrâneos, Índias Orientais (WHO, 1999) e Américas (WICHTL, 2004). É subespontânea nas ilhas Canárias e Madeira, no Mediterrâneo e nas margens do Mar Vermelho, crescendo em áreas semi-desérticas e em locais pedregosos e semi-áridos. Está amplamente adaptada no Brasil (SILVA JÚNIOR, 2003).

## 1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Aloe*.

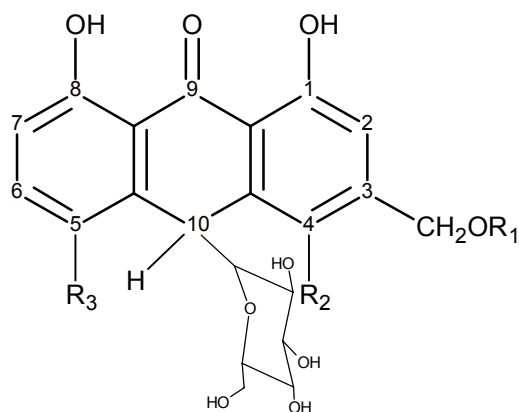
### 1.2.1 COMPOSTOS DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO

Os principais metabólitos secundários descritos para as espécies de babosa são os compostos fenólicos do tipo antronas, cromonas e fenil-pirronas (ESTEBAN-CARRASCO et al., 2001). A parte líquida (extrato do parênquima clorofiliano), extraída das folhas, possui cerca de 80 constituintes, muitos deles ainda não identificados. Dentre os derivados antracênicos, as antraquinonas são as mais estáveis; antronas e diantronas são relativamente estáveis em soluções aquosas acidificadas, mas na presença de álcalis são rapidamente oxidadas a antraquinonas (FALKENBERG, 2004).

A aloína é uma antrona C-glicosilada, que é uma mistura de dois diasterisômeros: aloína A (configuração C<sub>10</sub>, C<sub>1</sub>: S,S) e aloína B (configuração C<sub>10</sub>, C<sub>1</sub>: R,S) (Figura 2). Os demais componentes que ocorrem neste extrato são a aloesina e aloeresina, entretanto, muitos outros compostos são citados, tais como aloe-emodina, homonataloína, nataloe-emodina, aloinosídeo A e B, aloenina A e B,



4-hidroxi aloína e 5-hidroxi aloína (ZONTA et al., 1995; KOCH, 1996; ALVES et al., 2004).



	CONFIGURAÇÃO				
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>1</sub>
<b>Aloína A</b>	H	H	H	S	S
<b>Aloína B</b>	H	H	H	R	S
<b>4-hidroxi aloína</b>	H	OH	H		
<b>5-hidroxi aloína</b>	H	H	OH	R	S
<b>Aloinosídeo A</b>	$\alpha$ -L-Ramnosil	H	H	S	S
<b>Aloinosídeo B</b>	$\alpha$ -L-Ramnosil	H	H	R	S

**Figura 2** – Fórmula molecular de componentes majoritários do extrato do parênquima clorofiliano de babosa (ZONTA et al., 1995)

Okamura et al. (1996), isolaram do extrato do parênquima clorofiliano de *Aloe barbadensis* novas cromonas: 8-C-glucosil-7-O-metil-(S)-aloesol, isoaloerisina D e aloeresina. No ano seguinte, Saleem et al. (1997), isolaram das raízes da planta uma nova antrona denominada aloe barbendol, ao mesmo tempo em que outros três compostos derivados do extrato do parênquima clorofiliano foram encontrados: emodina, aloe crisona e barbaloína A. Seguidamente, em 1998, Okamura et al.,

apresentaram a estrutura química de cinco outras cromonas isoladas do extrato do parênquima de reserva das folhas: 8-C-glucosil-noreugenina, 4'-O-glucosil-isoaloeresina DI, 4'-O-glucosil-isoaloeresina DII, 8-C-glucosil-(2'-O-cinamoil)-7-O-metilaloediol A, 8-C-glucosil-(2'-O-cinamoil)-7-O-metilaloediol B.

Durì et al. (2004) relataram a descoberta de dois novos compostos isolados de uma espécie de babosa do Kenia: 10-O- $\beta$ -D-glucopiranosil aloenina e 8-C- $\beta$ -D-glucopiranosil-7-O-metil-(R)-aloesol. Também foram identificados nessa espécie aloenina, aloenina 2'-*p*-cumaroil éster e aloenina aglicona.

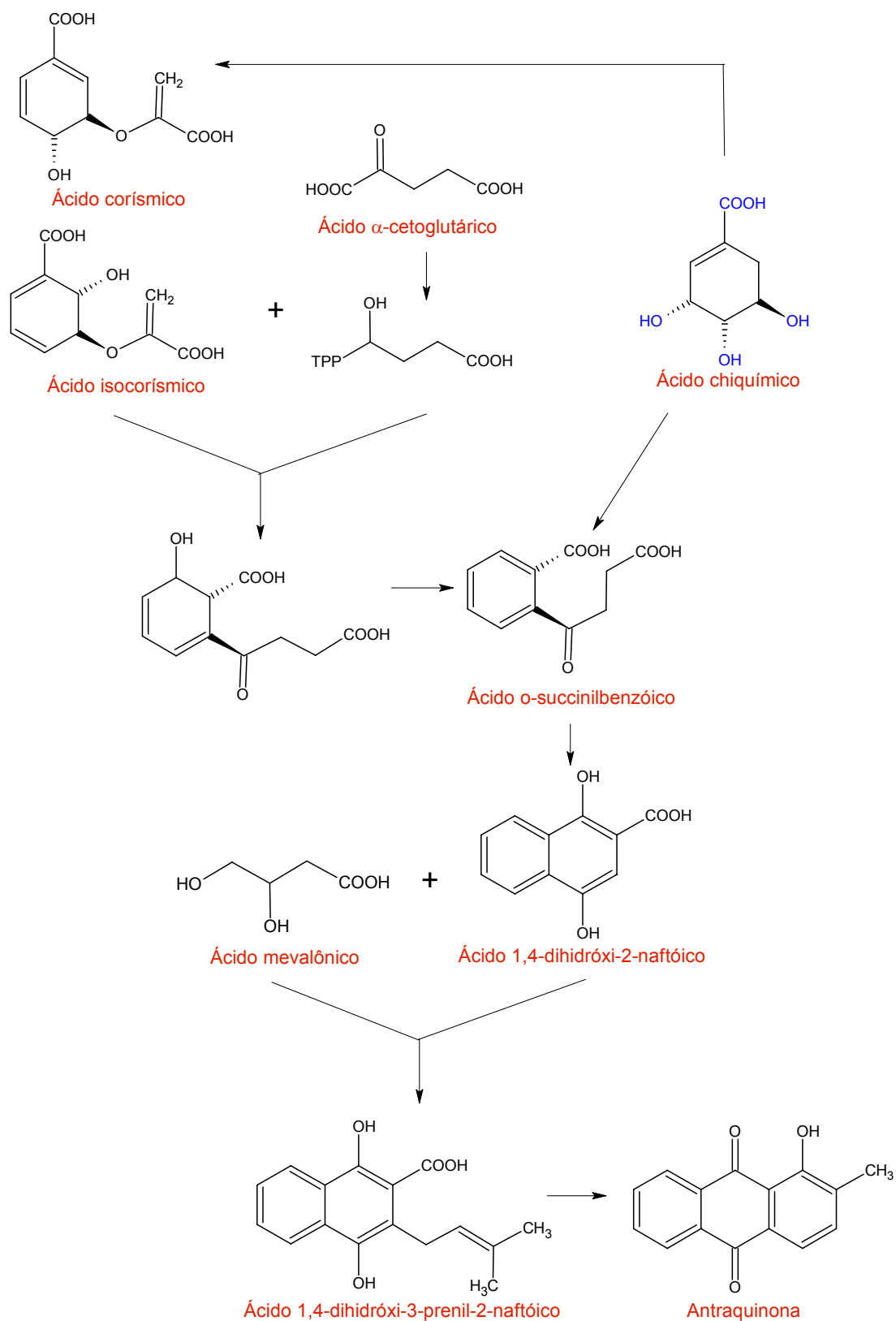
### 1.2.2 BIOSÍNTESE DE ANTRAQUINONAS

Para o grupo de substâncias denominadas genericamente antraquinonas encontram-se na literatura também outras denominações, tais como antranóides, derivados antracênicos ou derivados hidroxiantracênicos. Os derivados antraquinônicos contidos nas drogas vegetais secas apresentam um grau de oxidação superior, comparativamente aos compostos originalmente encontrados na planta fresca. As antraquinonas propriamente ditas são mais estáveis, em relação às antronas livres que as dão origem por auto-oxidação ou por ação enzimática (FALKENBERG, 2004).

As antraquinonas, com dois grupamentos cetônicos nas posições C9 e C10, ocorrem naturalmente em plantas (YEN et al., 2000). Têm como precursores o ácido chiquímico e o acetato, ou apenas o acetato (acilpolimalonato), sendo que no primeiro caso, o ácido chiquímico reage com o ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, proveniente da desaminação do ácido glutâmico ou do ciclo do ácido cítrico, produzindo o ácido  $\alpha$ -succinilbenzóico. O ácido 1,4-dihidróxi-2-naftóico (produto da redução do ácido  $\alpha$ -

succinilbenzóico) combina-se com o ácido mevalônico (proveniente do acetato), originando uma antraquinona (Figura 3) (WIJNSMA, 1986; SANTOS, 2004).

Muito do que se conhece acerca das vias metabólicas das antraquinonas advém de estudos realizados em fungos (ELSWORTH et al., 2000, TANG et al., 2004), sendo que em vegetais superiores, estudos prévios revelaram que a biossíntese acontece através da via do chiquimato-mevalonato (WIJNSMA, 1986), como observado em espécies da família das rubiáceas.



**Figura 3** – Biossíntese das antraquinonas através da via do ácido chiquímico. (WIJNSMA, 1986; SANTOS, 2004).

### 1.2.3 COMPOSTOS DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA DE RESERVA

Uma diversidade de substâncias está presente no parênquima de reserva de espécies do gênero *Aloe*, sendo os polissacarídeos os compostos majoritários, havendo teores proeminentes de glucose e ácido málico (DIEHL, TEICHMULLER, 1998).

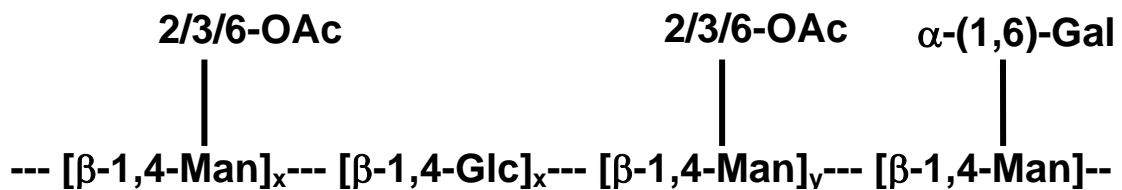
Uma característica de interesse do parênquima de reserva da *Aloe barbadensis* refere-se ao seu alto conteúdo de água, i.e., cerca de 98,5% a 99,5% do peso fresco. Mais de 60% do remanescente sólido é constituído por polissacarídeos (FEMENIA et al., 1999), enquanto os monossacarídeos manose e glucose perfazem aproximadamente 70% dos açúcares totais (NI et al., 2004b). Segundo Femenia et al. (1999), a análise da composição de açúcares encontrados no resíduo insolúvel em álcool preparado a partir do parênquima de reserva das folhas revelou a existência de oito monossacarídeos: arabinose, galactose, glucose, manose, ramnose, xilose, fucose e ácido urônico, com destaque para os valores de concentração de manose e glucose (~73% em peso seco), sendo a razão de ocorrência de glucose/manose de 1:1,7. Gowda et al. (1980) foram os primeiros a citar que a razão entre manose e glucose era cerca de 19:1, porém, o trabalho de Chow et al. (2005), corrigiu este índice para 15:1 e definiu também que as ramificações ocorriam por substituição nas hidroxilas do C-2, C-3 e C-6.

O primeiro trabalho sobre a determinação de estruturas de polissacarídeo do gênero *Aloe* foi publicado em 1948, por Roboz e Haagen-Smith, que descreveram a composição do que denominaram látex seco de *Aloe vera*. Utilizando hidrólise total da fração polissacarídica, os autores identificaram quantidades

equimoleculares de manose e glucose e 2,73% em peso seco de ácidos urônicos (SANTA RITA, 1984).

Waller et al. (1978) isolaram de *Aloe barbadensis* um composto cuja estrutura básica era formada por resíduos de D-manose e D-glucose. No ano seguinte, Gouda et al. (1979) isolaram quatro polissacarídeos que foram identificados como glucomananas acetiladas, com diferentes proporções entre os resíduos de glucose e manose e grupamentos acetílicos. Posteriormente, Gaurhari e Das (1980, 1980b) determinaram a estrutura de dois polissacarídeos em *Aloe barbadensis*, sendo um deles identificado como uma  $\beta$ -D-galactana ramificada. O segundo polissacarídeo foi caracterizado como uma  $\beta$ -D-glucomanana, acetilada na posição C<sub>6</sub> dos resíduos de manose.

As glucomananas são os principais polissacarídeos de *Aloe*, com destaque para a acemanana, o constituinte mais estudado. A acemanana é um polímero misto de mananas acetiladas, com cadeias de tamanhos variáveis, formadas por resíduos de manose e glucose unidos por ligações do tipo  $\beta$ -(1→4) e com peso molecular de aproximadamente 1000 KDa (TURNER et al., 2004; LEE, et al., 2001 - Figura 4). Em média, cada manose possui um grupamento acetil em uma das três posições do anel (DIEHL, TEICHMULLER, 1998), característica esta que corrobora para a denominação acemanana (ZHANG, TIZARD, 1996; NI et al., 2004).



**Figura 4** – Detalhe da estrutura química da acemanana derivada de *Aloe barbadensis*, comercialmente denominada Carrysin™ (TURNER et al. 2004).

Vários polissacarídeos têm sido isolados do extrato do parênquima de reserva de folhas de *Aloe barbadensis*, incluindo mananas, galactanas, arabinanas, arabinoramnogalactanas, substâncias pécticas e ácido glicurônico. As polimananas foram identificadas como o tipo de polissacarídeo majoritário do extrato do parênquima reserva cuja concentração pode ser muito variável. (REYNOLDS, DWECK, 1999). A razão para esta variação é atribuída às mudanças sazonais e/ou ao efeito da localização geográfica dos cultivos (NI et al., 2004). Mais recentemente, Esua et al. (2006) isolaram do extrato do parênquima de reserva de folhas de *Aloe barbadensis* três novas maloil-glucanas denominadas de veracilglucanas A, B e C.

Reynolds e Dweck (1999) e Rodrigues et al. (2005) relataram a existência de seis tipos de polissacarídeos no extrato do parênquima reserva de *Aloe barbadensis*: (1) glucomananas com diferentes pesos moleculares; (2) glucomananas acetiladas; (3) galactogalacturanas; (4) glucogalactomananas; (5) galactoglucoarabinomananas e (6) mananas acetiladas, com diferentes composições e pesos moleculares.

#### 1.2.4 OUTROS COMPONENTES

Além dos componentes anteriormente mencionados, compostos de baixo peso molecular, tais como dietilhexilftalato, vitaminas A, C, D, do complexo B, saponinas, ácido salicílico e esteróides (lupeol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol) e enzimas também estão presentes na planta (MOON et al., 1999; ARAÚJO et al., 2002; CHOI e CHUNG, 2003).

Comum em plantas, o  $\beta$ -sitosterol é encontrado nas folhas de babosa, juntamente com pequena quantidade de colesterol, campesterol e lupeol. Também foi observado um número não identificado de substâncias voláteis, detectados por cromatografia de camada delgada (REYNOLDS, 2004).

No extrato do parênquima de reserva são encontrados cerca de 200 compostos, incluindo muitas vitaminas, minerais, ácidos orgânicos, todos funcionando de maneira sinérgica de forma a exibir os efeitos biológicos. Também são relatados esteróis e ácidos carbônicos aromáticos (ESUA et. al., 2006).



### 1.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FT-IR), <sup>13</sup>C-RMN E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA.

A chamada radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à região do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. O segmento da janela espectral de utilidade para a análise de compostos orgânicos situa-se entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que as regiões do infravermelho próximo (14290 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) e do infravermelho distante (700 – 200  $\text{cm}^{-1}$ ) também têm atraído a atenção (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

A espectroscopia de infravermelho é considerada um método de análise rápido e não destrutivo da amostra, que necessita o mínimo de preparação do material amostral e que encontra as mais diversas aplicações, desde fármacos até a indústria do petróleo, passando pela aplicação na área de alimentos e no auxílio a diagnósticos em medicina. Mais recentemente, trabalhos publicados revelam o uso da espectroscopia de infravermelho na distinção entre plantas transgênicas e até mesmo entre plantas clonadas e não clonadas (PETIBOIS et al., 2001; PURCELL et al., 2006; SMALL, 2006; VLACHOS et al., 2006; XIE et al., 2006).

Tendo surgido na década de 30, a técnica de espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ganhou maior interesse somente durante a Segunda Guerra Mundial, onde teve papel decisivo em dois grandes projetos, a síntese da penicilina e o desenvolvimento da borracha sintética (KATON, 1996). O FT-IR tem se mostrado um método globalmente aceito devida à sua alta reprodutibilidade físico-química, permitindo a análise estrutural de biomoléculas em função de suas características peculiares e únicas, que são exibidas no espectro de

FT-IR e que constituem a impressão digital do composto em análise (DÉLÉRIS, PETIBOIS, 2003).

Atualmente, a espectroscopia vibracional tem encontrado importantes aplicações na indústria alimentícia, principalmente no que se refere à análise e identificação de propriedades físicas e interações entre carboidratos, no estudo de óleos e gorduras comestíveis e no controle de qualidade de produtos industrializados, como sucos e refrigerantes (FERREIRA et al., 2002; ČERNÁ et al., 2003; VLACHOS et al., 2006).

Com a crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química, como o FT-IR, a ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , impulsionada pelo avanço da tecnologia computacional, tem havido um aumento da necessidade de utilização de técnicas de tratamento de dados mais complexas do ponto de vista matemático. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos e vem, rapidamente, ganhando popularidade, dando origem a uma nova disciplina denominada quimiometria, uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada. Os métodos multivariados consideram a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade maior de informações, muitas vezes impossível de ser obtida, quando analisadas variável a variável (FERREIRA et al., 1999; SENA et al., 2000; FERREIRA et al., 2002; CHOI et al., 2004).

Recentemente têm-se enfatizado os sistemas de análise multivariados, com destaque para a análise de componentes principais (PCA), que consiste em uma manipulação de uma matriz de dados com o objetivo de representar as variações presentes em diversas variáveis, através do menor número de “fatores”. Trata-se de

um método utilizado para projetar dados  $n$ -dimensionais em um espaço de menor dimensão. Isso é feito através do cálculo de componentes principais e de combinações lineares das variáveis originais. PCA é um método exploratório, porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. É também capaz de separar informações importantes das redundantes e aleatórias (FERREIRA et al., 1999; FERREIRA et al., 2002).

A combinação de PCA e  $^1\text{H}$ -RMN ou  $^{13}\text{C}$ -RMN, permite, por exemplo, realizar estudos de metabolômica vegetal e análises de misturas complexas, como em alimentos, onde existe a possibilidade de discriminar a variedade dos frutos que dão origem a sucos e estabelecer seus parâmetros de qualidade, por exemplo (BELTON et al., 1998; LE GALL et al., 2001; CHOI et al., 2004).

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os teores de aloína e de polissacarídeos em folhas de plantas produzidas no campo (PC), micropropagadas (PM) e caracterizar a fração polissacarídica (FP) utilizando-se métodos químicos e bioquímicos.

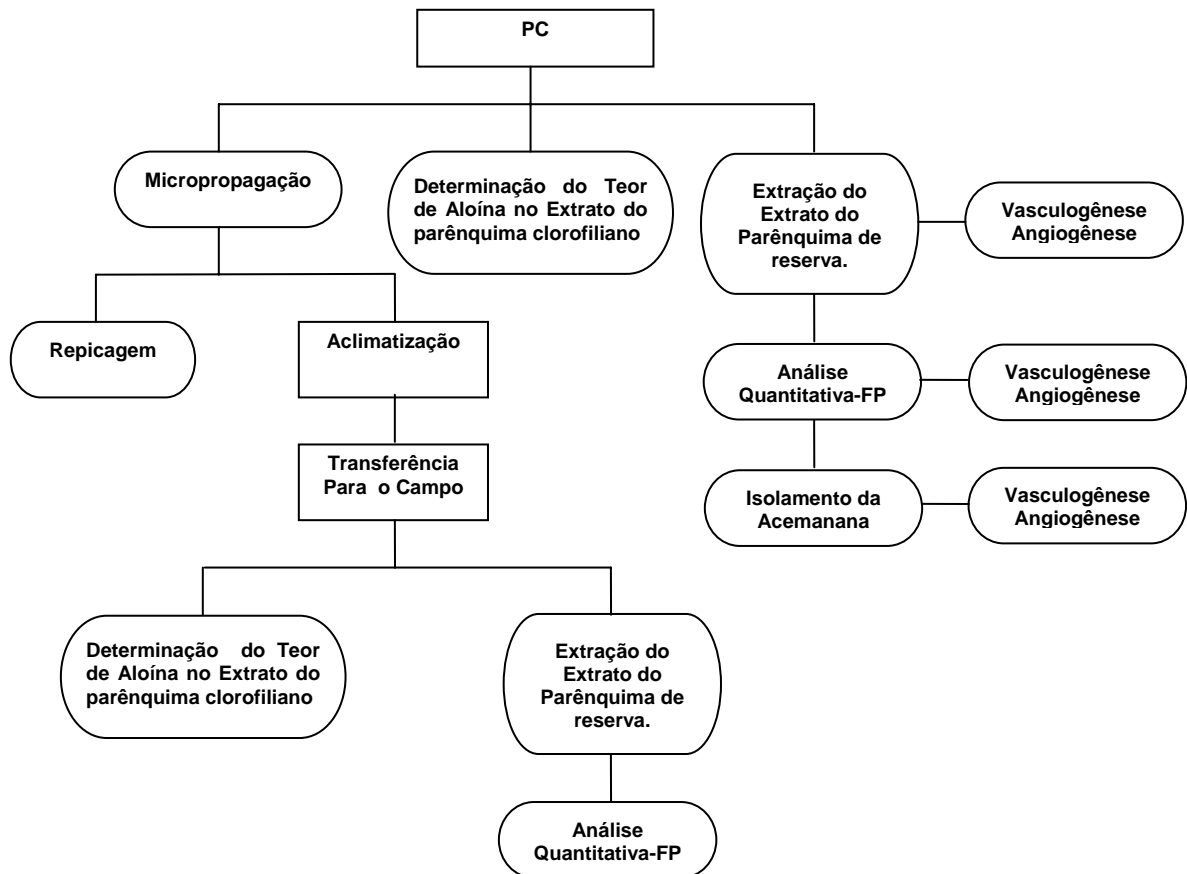
### 1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar os teores de aloína e de polissacarídeos totais em PC e em PM, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e análise gravimétrica, respectivamente, em amostras coletadas bimestralmente, ao longo de um período experimental de 12 meses;
- Correlacionar a produção de aloína e da FP com fatores climáticos;
- Determinar a estrutura química de amostras da FP, da fração polissacarídica dialisada (FPD) e de acemanana de PC e PM, coletadas nas 4 estações do ano, por espectroscopia de infravermelho e por ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -RMN);
- Analisar os dados espectrais de infravermelho das amostras da FP e da FPD através de técnicas quimiométricas, i.e., análise de componentes principais (PCA);

## **1.5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.5.1 PRODUÇÃO DE PLANTAS NO CAMPO (PC) E DE PLANTAS MICROPROPAGADAS, ACLIMATIZADAS E TRANSFERIDAS PARA O CAMPO (PM)**

As plantas de *Aloe barbadensis* Miller, oriundas do Paraná, foram adquiridas pela empresa Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltda<sup>®</sup> no ano de 2000, tendo estas, idade de cerca de dois anos, e foram plantadas no Município de Paulo Lopes, sendo que algumas destas plantas foram selecionadas por suas características fenotípicas para a micropropagação, executada em 2002 no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC conforme a metodologia descrita por Araújo et al. (2002). Todos os passos descritos neste e nos itens seguintes, são mostrados no fluxograma a seguir (Figura 5).



**Figura 5** – Fluxograma de produção, coleta e processamento de plantas de *Aloe barbadensis* Miller

## 1.5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA DE RESERVA, DA FP E DA FPD

### 1.5.2.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS NO EXTRATO DO PARÊNQUIMA DE RESERVA, DA FP E DA FPD

A determinação de proteínas totais foi feita pelo método de Bradford (1976) para amostras de extrato do parênquima de reserva, FP e FPD. A quantidade total de proteínas nas amostras foi calculada a partir de uma curva-padrão (0,5; 1,0; 5,0;

10,0; 15,0 e 20,0  $\mu\text{g/mL}$ ), utilizando albumina de soro bovino (100  $\mu\text{g/mL}$  em NaCl 0,15M – Sigma/St Louis – MO, USA). A média dos valores de três leituras da absorbância (595  $\text{nm}$ , Shimadzu UV-1203) para cada concentração de albumina de soro bovino foi utilizada para a elaboração da curva padrão ( $r^2 = 0,9949$  e  $y = 6,027x$ ).

A quantificação das proteínas das amostras do parênquima de reserva utilizou o extrato aquoso bruto daquela biomassa, enquanto para as amostras da FP e da FPD foram feitas soluções-estoque de 1mg/mL. Os valores apresentados representam a média de três leituras da absorbância.

#### **1.5.2.2 DETERMINAÇÃO DOS CARBOIDRATOS TOTAIS NO EXTRATO DO PARÊNQUIMA DE RESERVA, DA FP E DA FPD**

A análise de carboidratos totais seguiu a metodologia de Dubois et al. (1956), utilizando microplacas de 96 cavidades e leitor de ELISA modelo EL800 (Biotek Instruments INC) para determinação dos valores de absorbância (492 $\text{nm}$ ). A concentração de carboidratos totais utilizou uma curva-padrão de glucose (Sigma/St Louis – MO, USA), considerando um intervalo de concentrações de 0,02; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20 e 0,25mg/mL ( $r^2=0,9948$  e  $y = 2,371x$ ). Os valores apresentados foram calculados utilizando-se a média de três leituras seqüenciais da absorbância. Para as amostras do extrato do parênquima de reserva houve a necessidade de realizar-se uma diluição de 15 vezes, enquanto para as amostras de FP e FPD uma solução estoque de 0,5mg/mL foi elaborada.

### **1.5.2.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE AÇÚCARES REDUTORES NO EXTRATO DO PARÊNQUIMA DE RESERVA, DA FP E DA FPD**

O método do ácido 3,5-dinitrossalicílico, descrito por Miller (1959), foi utilizado para esta determinação da variável em estudo. Os teores de açúcares totais foram calculados com o auxílio de uma curva-padrão ( $r^2=0,9974$  e  $y = 0,5646x$ ) de glucose (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,4mg/mL), através da leitura da absorvância (540 nm) das amostras em espectrofotômetro Shimadzu UV-1203. Alíquotas do extrato aquoso bruto do parênquima de reserva foram utilizadas nos ensaios quantitativos, enquanto uma solução-estoque das amostras de FP e FPD foi elaborada previamente à análise. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de três leituras de absorvância/amostra.

### **1.5.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE GLUCOSE (MÉTODO DA GLUCOSE OXIDASE) NA FP**

As análises do teor de glucose pelo método enzimático foram efetuadas somente em amostras da fração FP com a utilização de um kit comercial (Labtest®. Lote 6001/2006 – Lagoa Santa, MG). O protocolo de análise baseou-se nas orientações do fabricante do kit e, para efeitos de cálculo do teor de glucose, uma curva-padrão daquele monossacarídeo (Sigma/St Louis – MO, USA) foi elaborada (0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,07 e 0,1 mg/mL –  $r^2=0,9985$  e  $y = 2,9388x$ ). As leituras da absorvância (505 nm) das amostras foram realizadas em triplicatas, em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1203).



### **1.5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA DE RESERVA**

A caracterização físico-química das amostras do extrato do parênquima de reserva considerou os seguintes parâmetros: comprimento médio das folhas (cm), massa fresca média das folhas (g), pH, umidade (%), cinzas totais (mg) e teor de sólidos solúveis (°Brix).

Para determinação dos valores de pH, foram adotadas as recomendações da AOAC (1995), enquanto os teores de umidade e cinzas seguiram os protocolos descritos na Farmacopéia Brasileira IV (1988). O conteúdo de sólidos solúveis totais foi realizado por refratometria, com o auxílio de refratômetro manual de Abbé (Carl-Zeiss-Jena), sendo os resultados expressos em °Brix (PREGNOLATO e PREGNOLATO, 1985).

### **1.5.4 ANÁLISE DE ALOÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

Aproximadamente 2mL do extrato do parênquima clorofiliano foliar de plantas crescidas no campo foram coletadas bimestralmente e armazenadas em frascos de vidro âmbar (5mL), com a atmosfera interna de N<sub>2</sub>, a -20°C. Subsequentemente, as amostras foram liofilizadas e mantidas sob refrigeração (-20°C).

A análise quantitativa de aloína seguiu o protocolo estabelecido pela empresa alemã Spectral Service, com adaptações, conforme, descrito a seguir: Uma massa de 1mg, foi ressuspensa em 10mL de MeOH p.a., seguido de agitação e

filtração (0,22 $\mu$ m). Alíquotas (10 $\mu$ L) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Shimadzu LC-10A, equipado com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Shim-Pack CLC-ODS, 25cm x 4,6mm  $\varnothing$ ) e pré-coluna C<sub>18</sub> Shim-pack CLC-ODS com diâmetro de partícula de 5  $\mu$ m e diâmetro interno de 4,6 mm. Como fase móvel, utilizou-se uma solução de MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1, com um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção espectrofotométrica (Shimadzu SPD-10A, UV-visível) dos compostos de interesse foi realizada em comprimento de onda de 356 nm. A identificação da aloína foi efetuada com base no tempo de retenção de uma amostra padrão (Fluka – 200 $\mu$ g/mL), analisada sob as mesmas condições cromatográficas. Para efeitos de quantificação da aloína, construiu-se uma curva-padrão de aloína (Fluka,  $r^2 = 0,9992$  e  $y = 214,56x$ ), foi elaborada, considerando-se a altura do pico correspondente para efeito de cálculo com as concentrações de 10, 20, 50, 100, 120 e 200  $\mu$ g/mL.

#### **1.5.5 ANALISE QUANTITATIVA DE POLISSACARÍDEOS – FRAÇÃO POLISSACARÍDICA (FP) E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DIALISADA (FPD)**

As amostras de folhas coletadas de PC e PM foram lavadas imediatamente após a chegada ao laboratório, seguido da remoção de suas extremidades basal (~ 1cm) e apical (~ 10cm) e determinação do comprimento (cm) do material amostral remanescente. A epiderme desta biomassa foi cuidadosamente retirada, produzindo o extrato do parênquima de reserva, o qual foi subsequentemente pesado.

Para a obtenção do resíduo insolúvel em álcool a partir das amostras do extrato do parênquima de reserva, utilizou-se o método descrito por Femenia et al.

(2003), com adaptações. O extrato do parênquima de reserva foi triturado em aparelho multimixer (Walita<sup>®</sup> - modelo Billy RI 1340) e extensivamente filtrado sob vácuo, em filtro de poliéster, para remoção do material fibroso. O volume final coletado foi determinado em proveta, seguido da adição de 6 volumes de etanol 92°GL, sendo a mistura final mantida a 4°C/24h, para a floculação da fração polissacarídica de alto peso molecular, doravante denominada fração polissacarídica insolúvel em álcool (FP).

A FP obtida foi depositada em pesa-filtros, previamente limpos e tarados, e seca em estufa a 55°C (FEMENIA et al., 2003), até peso constante. O peso seco da FP foi utilizado para fins de cálculo de rendimento de extração, considerando a relação dos valores percentuais de FP e da massa do extrato do parênquima reserva.

Foram pesados 200mg da FP de cada amostra e dissolvidos em 20mL de água destilada, seguido da diálise da solução contra água destilada-deionizada (membrana de acetato de celulose, *cut-off* 10.000-12.000 MW, Sigma), por um período de 36 horas. O material dialisado foi coletado e liofilizado, denominando-se fração polissacarídica dialisada (FPD).

#### **1.5.6 HIDRÓLISE DA FPD E CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)**

Alíquotas (20mg peso seco/amostra) foram transferidas para microtubos de centrífuga e adicionadas de 1mL de ácido trifluoroacético (TFA) 1N, seguido de aquecimento em banho-maria (100°C, 3h). Após esse período, os tubos foram coletados, resfriados e centrifugados (5000 rpm/15 min). O sobrenadante (600µL) foi coletado, transferido para microtubo e mantido sob fluxo de ar até a evaporação da

solução ácida. Ao final do processo, as amostras foram ressuspensas em 100 $\mu$ L de água destilada-deionizada e armazenadas a -20°C.

A determinação da composição monossacarídica nas amostras hidrolisadas da FPD utilizou a cromatografia de camada delgada (CCD). Previamente à CCD, as amostras em estudo diluídas em água destilada-deionizada (10x), seguido da coleta de uma alíquota de 2 $\mu$ L/amostra, a qual foi aplicada em placa de alumínio recoberta com sílica gel UV254 (10 x 7cm, Sorbent Technologies). A eluição utilizou como fase móvel uma solução de *n*-butanol: ácido acético: éter etílico: água (9:6:3:1) e como revelador anisaldeído sulfúrico, seguido do aquecimento da placa cromatográfica em estufa a 120°C/10 minutos (IKAN, 1991).

Os Rf das amostras e as intensidades de cores foram comparadas com aqueles observados para padrões de açúcares (2 mg/mL, Sigma, St. Louis – MO), a saber: ramnose (Rf = 0,59), fucose (Rf = 0,52), frutose (Rf = 0,43), arabinose (Rf = 0,45), galactose (Rf = 0,42), ácido glucurônico (Rf = 0,40), manose (Rf = 0,47) e glucose (Rf = 0,46).

### **1.5.7 ISOLAMENTO E ANÁLISE DA ACEMANANA.**

O isolamento da acemanana, componente majoritário da fração polissacarídica, seguiu a metodologia descrita por Camelini (2005), com adaptações.

Uma amostra de 200mg da FPD foi dissolvida em 40mL de água destilada, seguido da aplicação de frações (2mL) deste material em coluna cromatográfica (35cm de comprimento x 1,5cm de  $\varnothing$  interno), contendo 35mL de resina Toyopear HW-65F (Tosoh, Japan) como fase estacionária. As amostras foram eluídas com uma solução de NaCl 0,2M, desprezando-se 12 mL de volume morto (Blue Dextran –

Sigma, St Louis – MO/USA) e coletando os primeiros 10 mL para obtenção da fração polissacarídica de maior peso molecular.

Os eluatos obtidos foram reunidos, dialisados em membrana de acetato de celulose (*cut-off* de 12.000 KDa, Sigma, St Louis – MO/USA) contra água destilada-deionizada e posteriormente liofilizados. O perfil espectrométrico dos polissacarídeos foi determinado por FT-IR e  $^{13}\text{C}$ -RMN, conforme descrito a seguir.

#### **1.5.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)**

As análises espectroscópicas de infravermelho foram executadas no Departamento de Química da Universidade de Aveiro – Portugal. Amostras de FP, FPD e de acemanana isolada foram analisadas em equipamento Bruker IFS 55, operando em janela espectral de 500 a 4000  $\text{ondas.cm}^{-1}$ , com 128 varreduras/amostra e resolução de 4  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Foram adquiridos sequencialmente cinco espectros por amostra, os quais foram processados e analisados com auxílio do programa Opus<sup>®</sup> (Bruker, Rheinsteten, Germany).

#### **1.5.9 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE $^{13}\text{C}$**

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) das amostras em estudo foram realizadas no Laboratório de RMN (Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos – São Paulo).

Foram obtidas as medidas de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras de FPD de PC, para os períodos amostrais de julho e novembro/2005 e janeiro e março/2006. Adicionalmente, foram obtidos os espectros referentes à acemanana isolada (item 4.7). Para tal, as amostras foram obtidas em sonda multinuclear de detecção direta de 10mm, onde 60mg de amostra (peso seco), foram dissolvidas em 2,0mL de  $\text{DMSO-}\delta_6$  com o auxílio de um sonicador. O tempo de máquina utilizado em cada experimento foi de aproximadamente 24 horas usando aproximadamente 2,0 mL de  $\text{DMSO-d}_6$ .

Os espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN foram coletados em equipamento VARIAN Unit-Plus, operando em 9,4 Tesla (400 MHz de frequência de ressonância de  $^{13}\text{C}$ ), com janela espectral de 248,54 ppm, tempo de aquisição de 0,65s, número de pontos de 32 K, resolução digital de 1,52 Hz/ponto. Ácido trimetil silil propiônico (TMS) foi utilizado como padrão interno e, para a obtenção dos espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN, os FIDs (*Free Induction Decay* – Decaimento de Indutância Livre) coletados foram submetidos ao processamento com função de janela exponencial multiplicativa com alargamento de linha de 0,30 Hz e delay de  $6\mu\text{s}$ . Os FIDs foram processados com o auxílio do programa Topspin 1.3 - Bruker®.

#### 1.5.10 QUIMIOMETRIA

Os espectros de FT-IR das amostras da FP e das FPD após processamento foram submetidos à análise estatística multivariada (quimiometria), assim como uma amostra representativa de cada estação do ano, analisadas por  $^{13}\text{C}$ -RMN, via determinação dos componentes principais (PCA), utilizando-se os dados pertencentes à janela espectral compreendida entre 600 a  $3400\text{ ondas.cm}^{-1}$ .

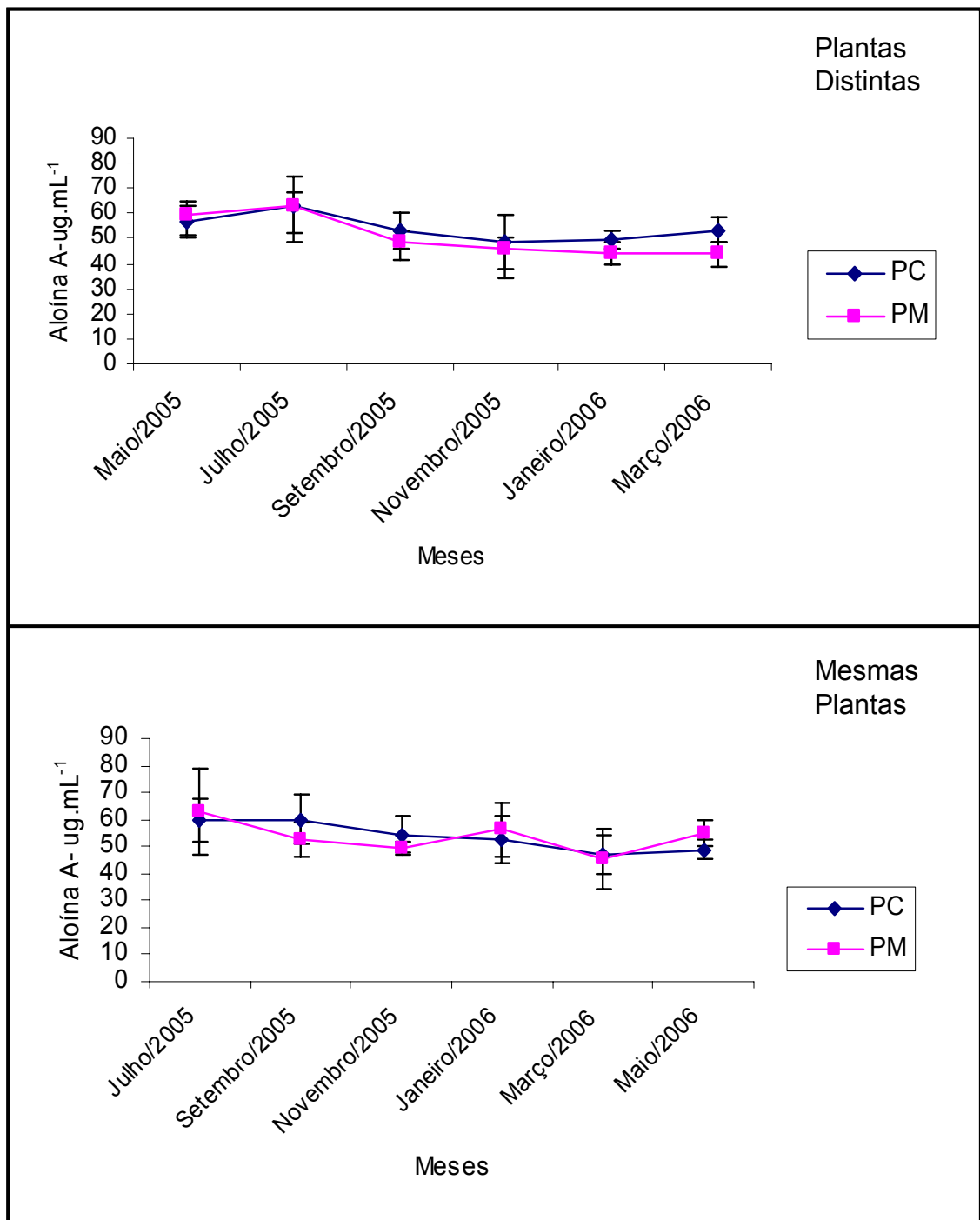
Posteriormente, utilizou-se somente a região específica de polissacarídeos (900-1200  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ), onde foram calculadas as distribuições e contribuições fatoriais, a fim de determinar as bandas de relevância para a dispersão das amostras.

## **1.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **1.6.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ALOÍNA POR CLAE E RELAÇÃO DA SUA PRODUÇÃO *IN CAMPO* COM FATORES CLIMÁTICOS.**

A figura 6 mostra as variações na concentração de aloína no período estudado.

Em coleta de plantas distintas, a maior concentração de aloína A foi detectada no período referente ao mês de julho/2005, independente da população em análise, i.e., PC ( $63,35\mu\text{g/mL}$ ) e PM ( $63,42\mu\text{g/mL}$ ). Nos meses de setembro e novembro/2005, os teores da antraquinona na população PC apresentaram uma redução ( $53,09\mu\text{g/mL}$  e  $48,59\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), elevando-se em janeiro ( $49,34\mu\text{g/mL}$ ) e março/2006 ( $53,55\mu\text{g/mL}$ ). Em PM este padrão não foi observado, tendo sido constatadas reduções constantes a partir do mês de maior produção (julho/2005), atingindo o menor valor observado no experimento em março/2006 ( $43,86\mu\text{g/mL}$ ). Os menores teores de aloína A para as populações em estudo (PC,  $48,59\mu\text{g/mL}$  - novembro/2005 e PM,  $43,86\mu\text{g/mL}$  - março/2006) foram 1,29 e 1,42 respectivamente superiores em relação à maior concentração observada ao longo de todo período experimental (julho/2005).



**Figura 6** – Concentração de aloína A em amostras de plantas distintas e em mesmas plantas, coletadas no período de maio de 2005 a março de 2006 e julho de 2005 a maio de 2006, respectivamente. **PC** = Plantas produzidas em campo; **PM** = Plantas micropropagadas, acimtizadas e transferidas para o campo.



As análises de aloína A em amostras de mesmas plantas revelaram a ocorrência dos maiores valores nos meses de julho/2005 para PM (62,69 $\mu$ g/mL) e setembro/2005 para PC (60,01 $\mu$ g/mL). As menores concentrações para plantas PC e PM foram encontradas em março/2006, sendo 1,28 e 1,37 vez menores, comparativamente aos maiores valores observados para as respectivas populações. Nas plantas PM, reduções no conteúdo deste metabólito foram detectadas nos meses de setembro e novembro/2005, com subsequente aumento no mês de janeiro/2006(56,49 $\mu$ g/mL).

Ao longo do período estudado, observou-se que as amostras de mesmas plantas (MP) apresentaram menores diferenças de concentração (Tabela 1). Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram encontradas entre as coletas de julho/2005 e março/2006 para plantas PM e entre as coletas de julho, setembro/2005 e março/2006.

**Tabela 1** – Concentração de aloína ( $\mu$ g/mL  $\pm$  DP) em plantas micropropagadas (PM) e em plantas produzidas no campo (PC) para coletas de mesmas plantas (MP) e plantas distintas (PD), ao longo do período maio/2005 a maio/2006.

MESES	MP		PD	
	PM*	PC*	PM*	PC*
Maio/05			59,73 $\pm$ 9,29 <sup>a</sup>	57,14 $\pm$ 6,00
Julho/05	62,69 $\pm$ 15,78 <sup>a</sup>	59,59 $\pm$ 8,12 <sup>a</sup>	63,42 $\pm$ 15,03	63,35 $\pm$ 11,18 <sup>a</sup>
Setembro/05	52,66 $\pm$ 6,40	60,01 $\pm$ 9,30 <sup>b</sup>	48,41 $\pm$ 7,36	53,09 $\pm$ 6,70 <sup>b</sup>
Novembro/05	49,50 $\pm$ 2,50	54,40 $\pm$ 6,88 <sup>e</sup>	46,50 $\pm$ 10,94 <sup>b</sup>	48,59 $\pm$ 10,50
Janeiro/06	56,49 $\pm$ 9,98	52,47 $\pm$ 8,85 <sup>e</sup>	44,11 $\pm$ 4,70 <sup>c</sup>	49,34 $\pm$ 3,80 <sup>c</sup>
Março/06	45,61 $\pm$ 10,97 <sup>b</sup>	46,68 $\pm$ 7,09 <sup>c</sup>	43,86 $\pm$ 5,47 <sup>d</sup>	53,55 $\pm$ 5,07
Maio/06	54,93 $\pm$ 5,03	48,72 $\pm$ 3,52 <sup>e</sup>		

\* Os resultados referem-se às médias  $\pm$  DP (n=7), realizadas em triplicata. Letras distintas nas colunas denotam diferenças significativas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Diferenças quantitativas foram encontradas em coletas de plantas distintas, nas PC nos períodos de coleta de julho/2005, setembro/2005 e janeiro/2006. Entretanto, a maior variação foi observada nas amostras de PM.

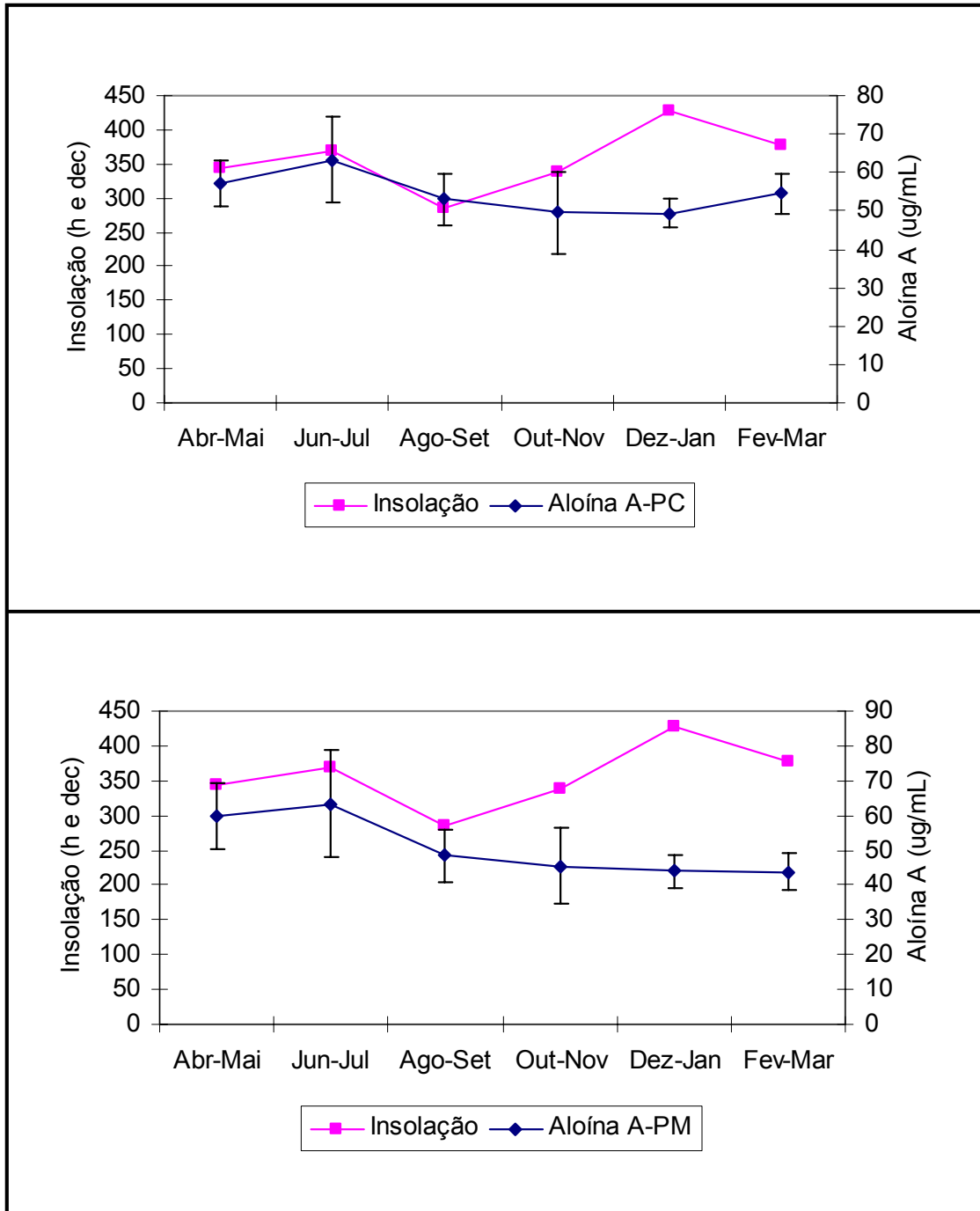
As espécies vegetais apresentam épocas específicas, onde determinados metabólitos encontram-se em maior concentração nos tecidos. Esta variação pode ocorrer tanto ao longo do dia como entre as estações do ano (FALKENBERG et al., 2004).

A variação sazonal resulta de um conjunto de fatores que alteram o metabolismo vegetal, como a temperatura ao longo do ano, que provoca mudanças nas rotas biossintéticas no vegetal, implicando em diferentes tipos e quantidades de certas substâncias (SILVA, 2004). Neste contexto, buscou-se estabelecer o perfil de variação do conteúdo de aloína A em amostras de extrato do parênquima clorofiliano das populações em estudo, consoante às flutuações dos fatores climáticos insolação total, precipitação pluviométrica bimestral, temperatura média diária bimestral e umidade relativa diária bimestral, ao longo do período experimental.

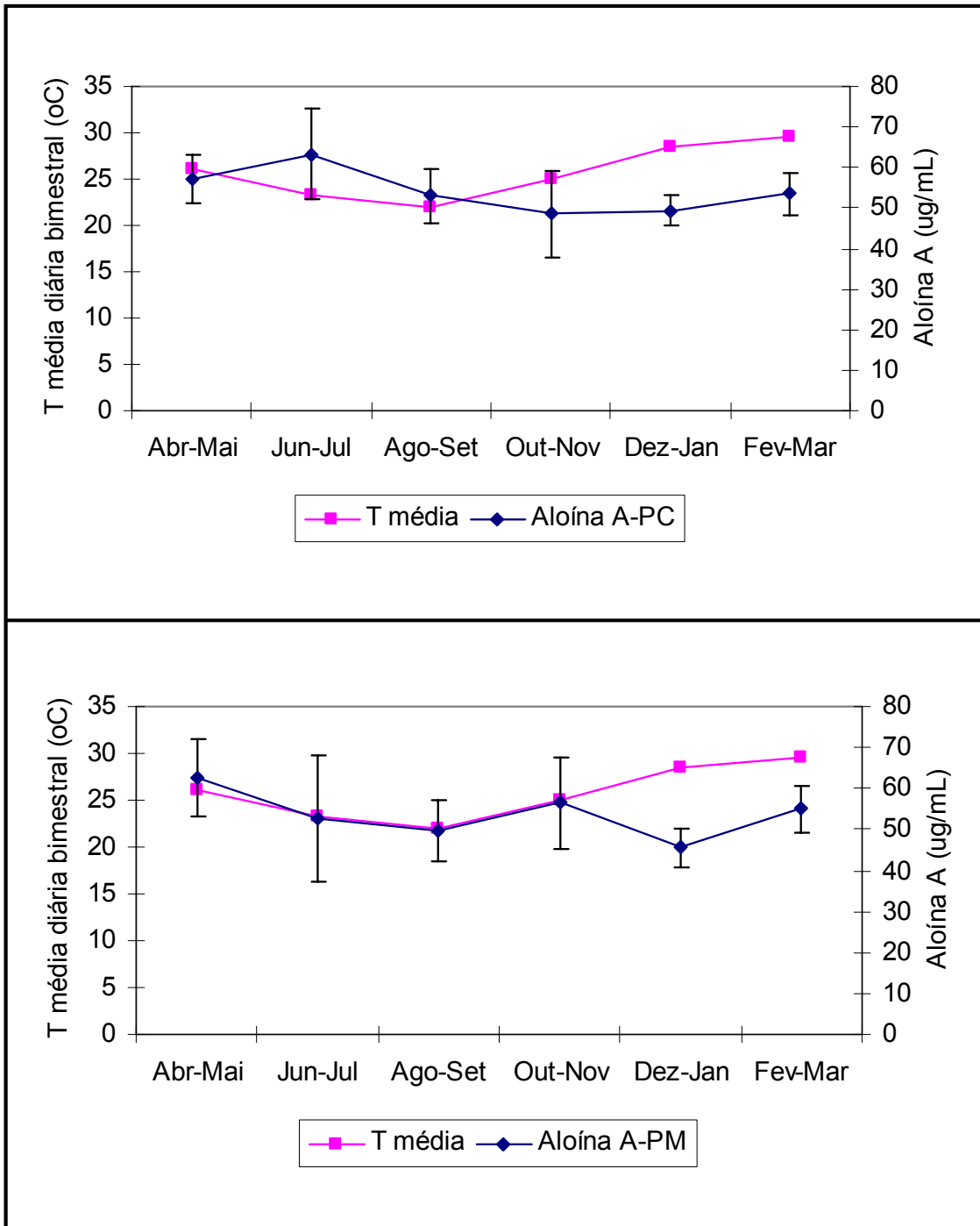
A concentração da antraquinona em amostras de plantas distintas (Figura 7) evidenciou um perfil similar ao observado para o fator climático insolação para PM e PC, durante o período amostral maio-setembro/2005. Para o período subsequente (novembro/2005-março/2006), a concentração de aloína A manteve-se estável, não apresentando, portanto, nenhuma relação com as variações observadas para a insolação. Comportamento semelhante foi detectado para as amostras de mesmas plantas, conforme demonstrado na figura 9, sugerindo que a diferenciação amostral utilizada neste estudo (plantas distintas x mesmas plantas) não se mostrou influenciada pelo fator climático em estudo.

Paez et al (2000) estudando plantas de babosa expostas a níveis de irradiação concluíram que a aloína encontrava-se presente no extrato do parênquima clorofiliano de todas as folhas, não sendo sua concentração influenciada pela quantidade de irradiação a que foram expostas. No presente trabalho, constatou-se que as variações da taxa de irradiação ao longo do período experimental não afetaram significativamente a concentração de aloína A, sendo que em todos os tratamentos detectou-se a presença deste composto. De forma semelhante ao observado para a insolação, a variação sazonal do conteúdo de aloína A não foi influenciada pela temperatura, tanto em amostras de plantas distintas como de mesmas plantas (Figura 8 e 10).

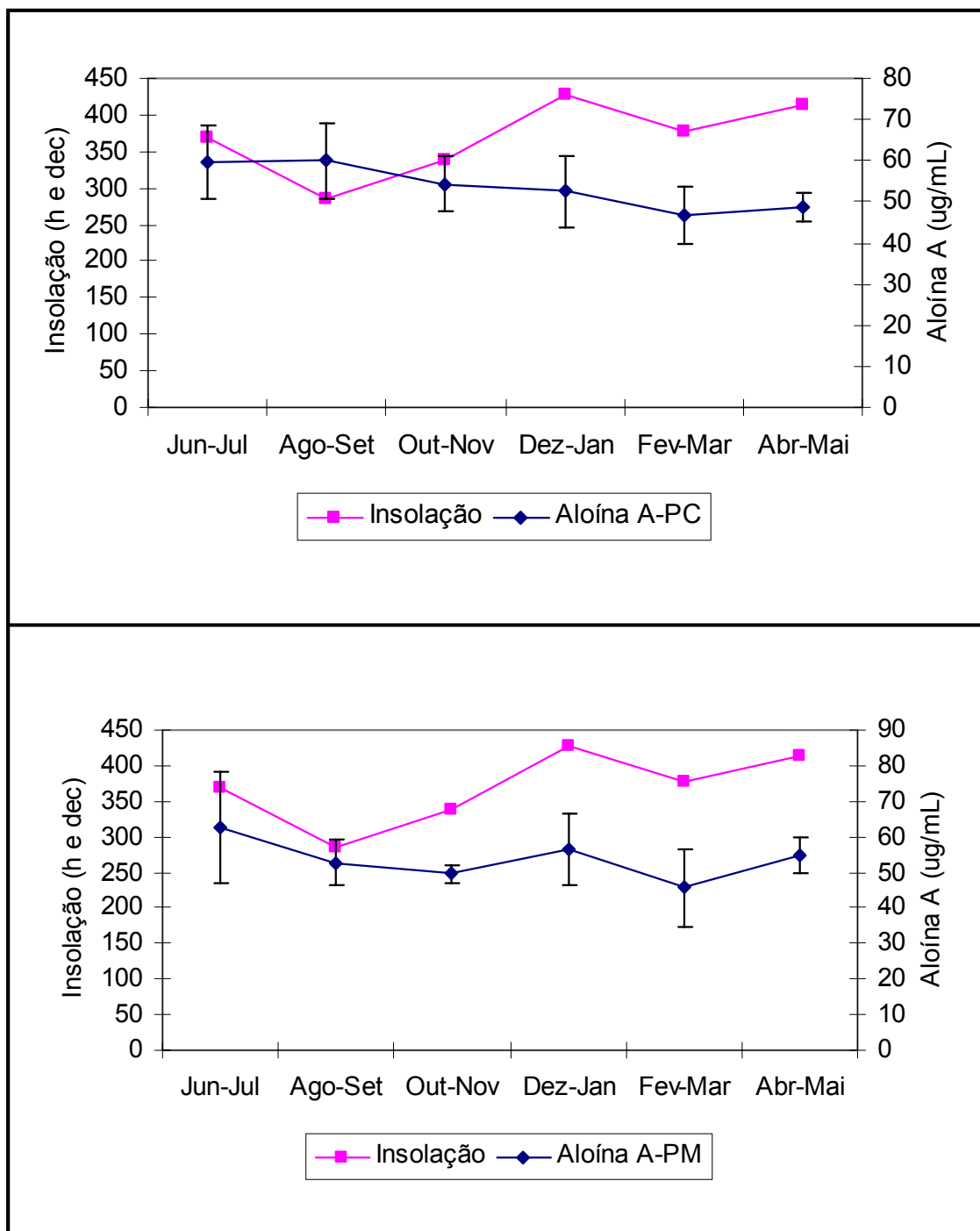
Beppu et al. (2004), estudando a concentração de metabólitos em *Aloe arborecens* em relação a variações de temperatura, no período de um ano, observaram que os teores de aloína A foram superiores no verão em relação ao inverno, diferindo do observado neste estudo. Em diversas espécies vegetais, como *Rosmarinus officinalis*, por exemplo, estudos acerca da produção de óleos voláteis em localidades distintas e com diferentes regimes térmicos mostraram a clara influência deste fator na produção destes metabólitos, onde em regiões com maiores temperaturas médias a produção foi favorecida (CELIK TAS, et al, 2007).



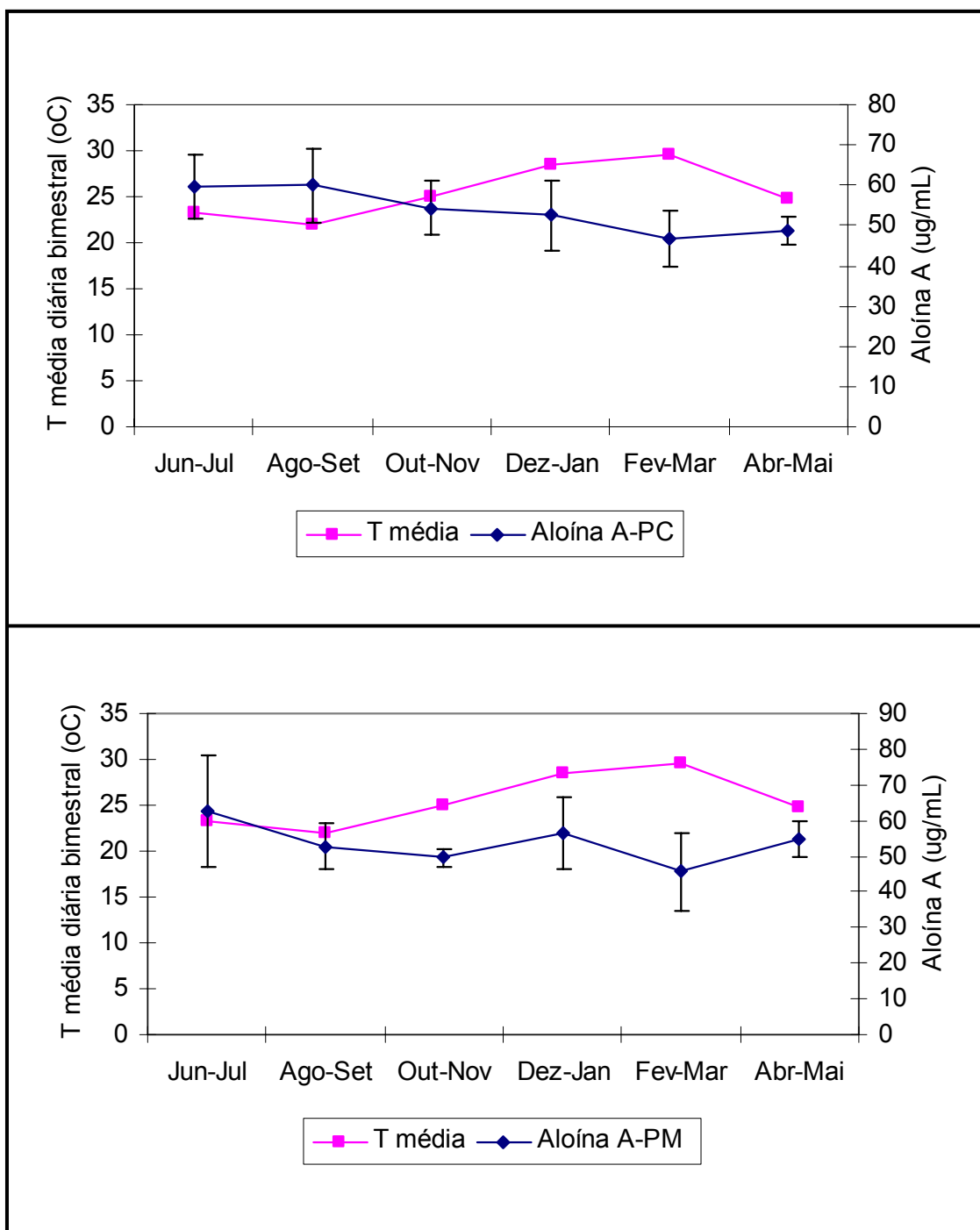
**Figura 7** – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, em relação ao fator insolação total, no período de maio de 2005 a março de 2006.



**Figura 8** – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, em relação ao fator temperatura média diária bimestral, no período de maio de 2005 a março de 2006.



**Figura 9** – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, consoante à insolação total do período de maio de 2005 a março de 2006.



**Figura 10** – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, consoante à temperatura média diária bimestral do período de maio de 2005 a março de 2006.

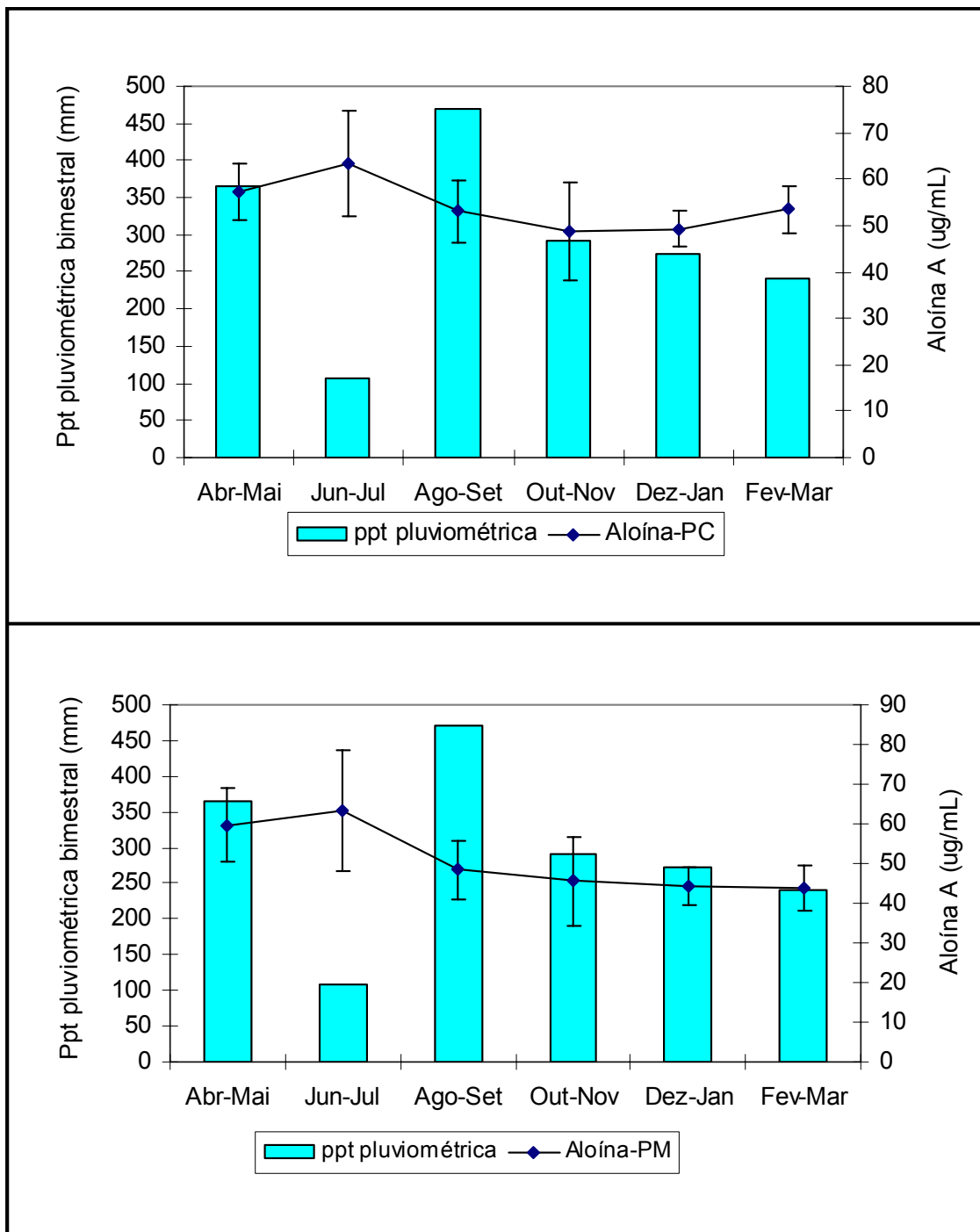
O fator sazonal que teve maior influência sobre a produção de Aloína A foi a precipitação pluviométrica (Figura 11). Os dados referentes ao fator precipitação evidenciaram que os meses de junho-julho foram os mais secos dentre os períodos estudados e que nesse período encontrou-se a maior concentração de aloína A. No período subsequente, o nível de chuvas aumentou de 107mm para 470mm, o que resultou na diminuição da concentração desse metabólito. A umidade relativa apresentou um aumento de 1% e não foi um fator significativo na biossíntese do metabólito nos grupos estudados (Figuras 12 e 14).

O segundo período mais seco estudado para coletas de plantas distintas foi o mês de fevereiro, o qual apresentou também a menor umidade relativa, sendo que a associação destes fatores determinou nas plantas PC um aumento da concentração de aloína A. De forma semelhante, em amostras de mesmas plantas (Figura 13) o mês de maio foi marcado por uma precipitação pluviométrica de apenas 117mm de chuva (Figura 13), uma condição que induziu elevação nas concentrações daquele metabólito.

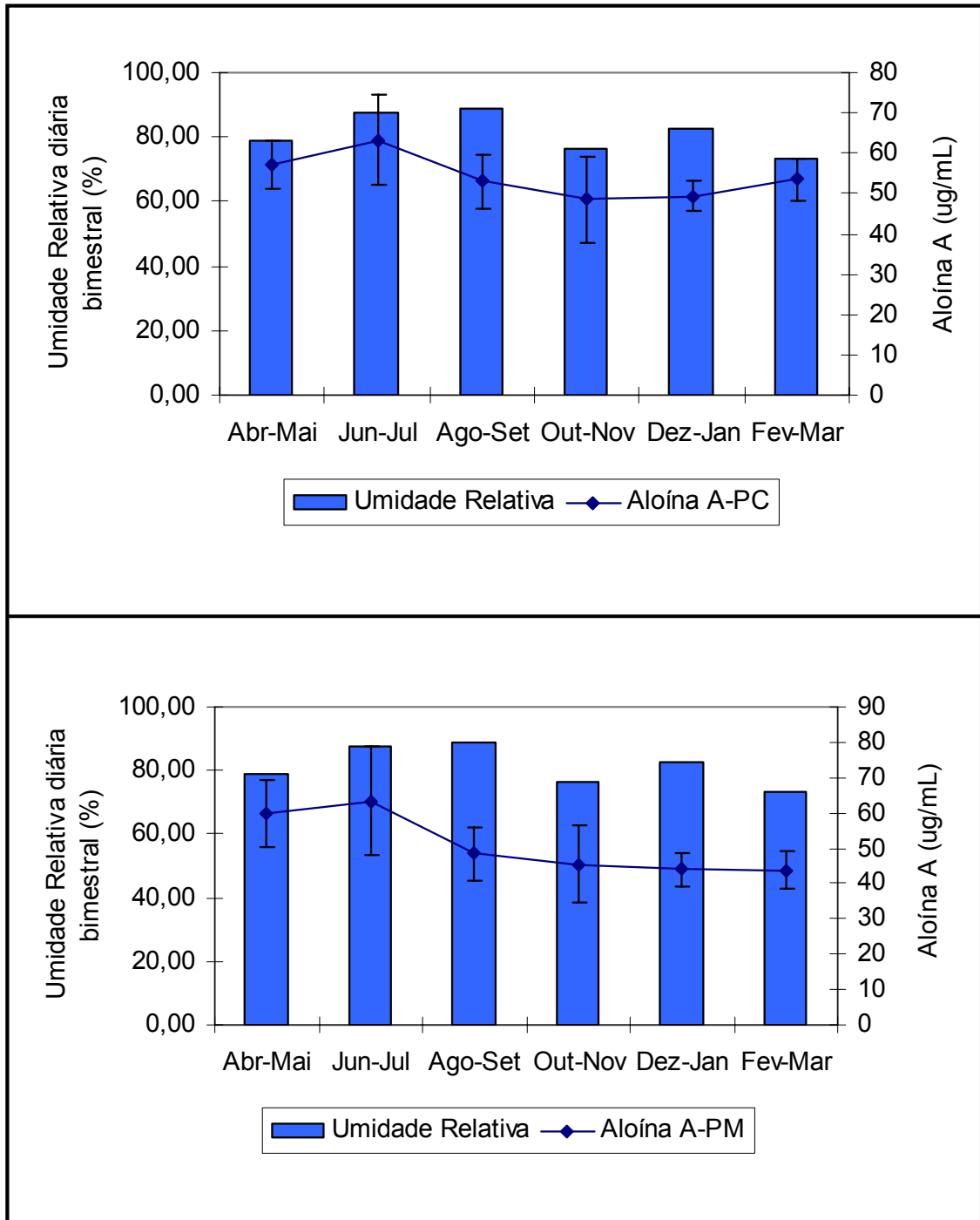
Os resultados obtidos reforçam a idéia de que a produção de aloína A por *A. barbadensis* está diretamente relacionadas à pluviosidade bimestral, uma vez que se trata de uma planta de característica predominantemente xerófito.

O fator pluviosidade é marcante para o aumento ou diminuição da produção de metabólitos em algumas espécies, entretanto, estudos realizados por Southwell e Bourke (2001) com *Hypericum perforatum* mostraram que a pluviosidade não foi um fator primordial na produção de hipericina.

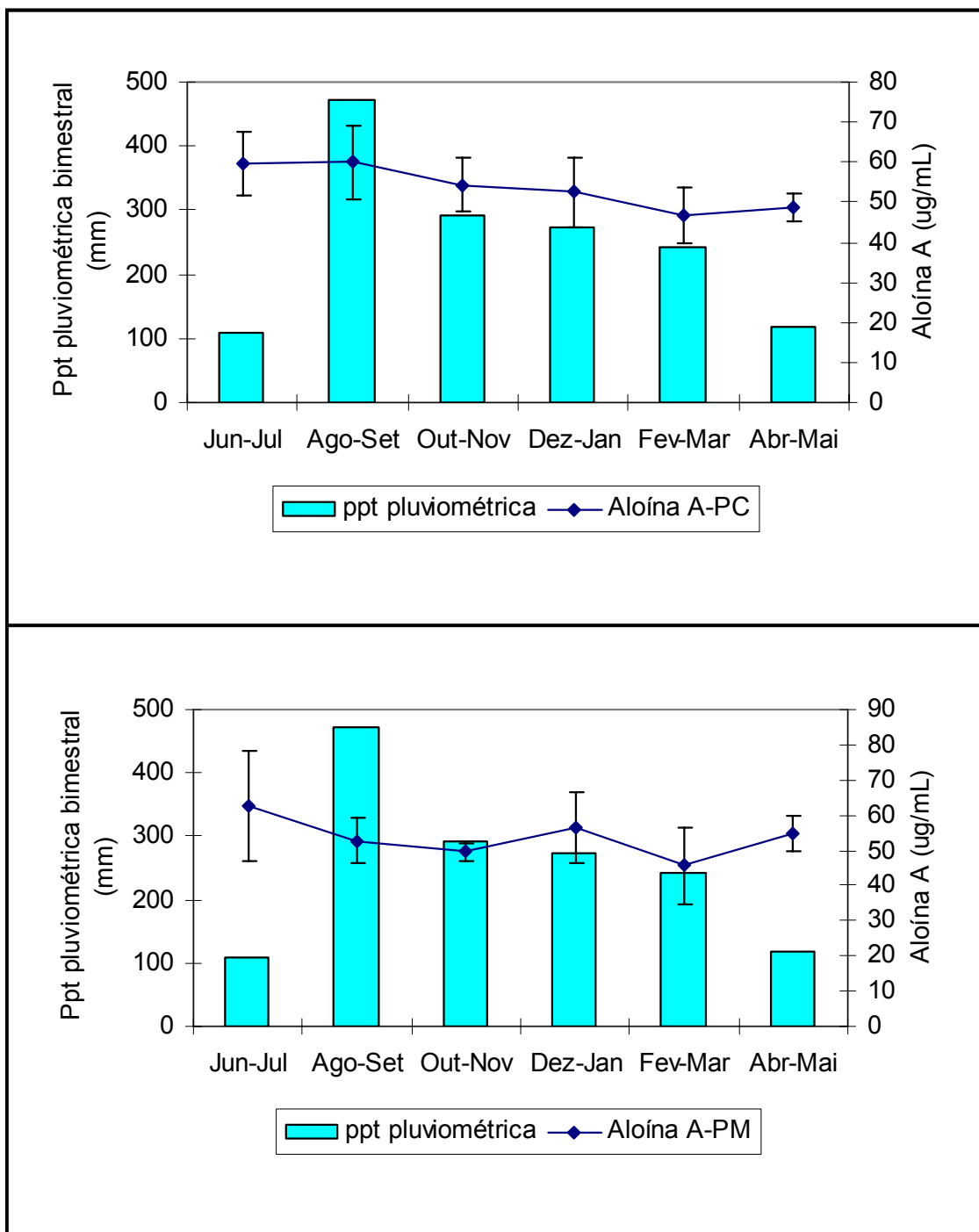




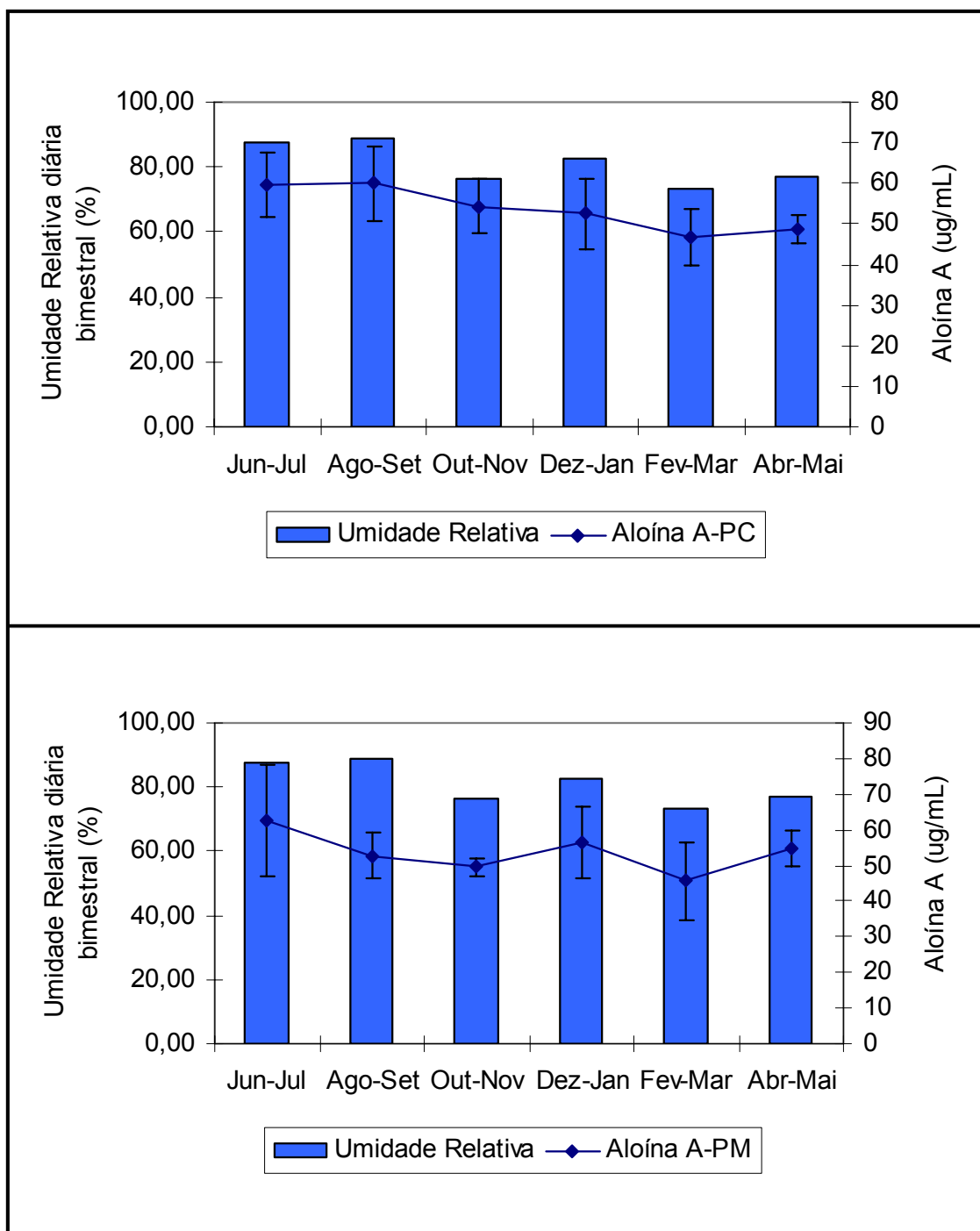
**Figura 11** – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, segundo os valores de precipitação pluviométrica bimestral (mm) no período de julho de 2005 a maio de 2006.



**Figura 12** – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, segundo os valores de umidade relativa diária mensal (%) no período de julho de 2005 a maio de 2006.



**Figura 13** – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, de amostras de mesmas plantas, de acordo com a precipitação pluviométrica bimestral (mm) no período de julho de 2005 a maio de 2006.



**Figura 14** – Concentração de aloína A ( $\mu\text{g/mL}$ ) em PM e PC, de amostras de mesmas plantas, de acordo com a umidade relativa diária mensal (%) no período de julho de 2005 a maio de 2006.

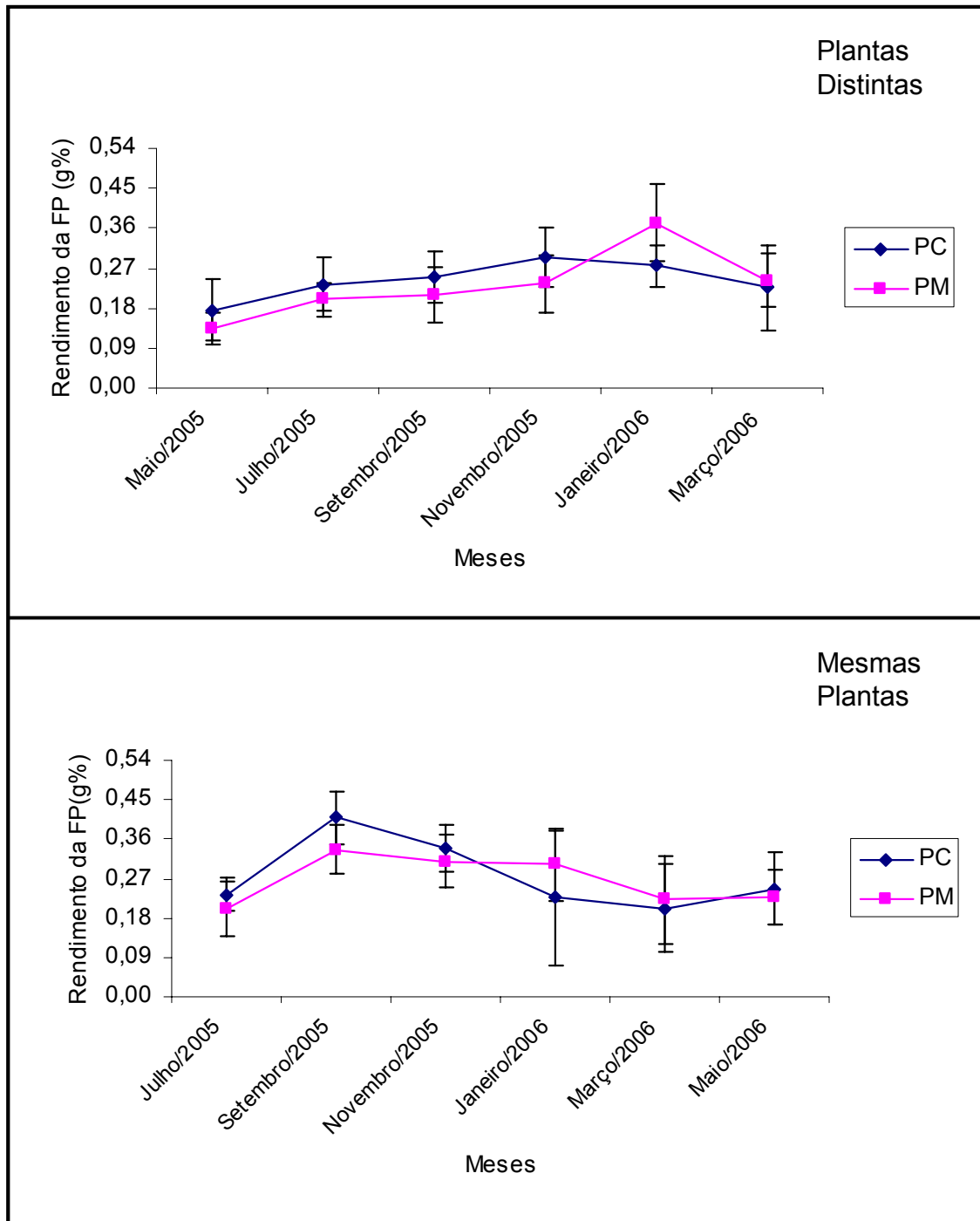
Em outras espécies, o estresse hídrico influenciou positivamente o acúmulo de precursores do(s) metabólito(s) de interesse, como observado para *Isatis tinctoria* L. e *Polygonum tinctorium* Ait. Nestas espécies, o composto isatan B, precursor do índigo, teve sua síntese e acúmulo aumentados sob condições de déficit hídrico (CAMPEOL, 2006). Em plantas típicas de florestas, o período de chuvas regula a produção de metabólitos, tal como em *Virola surinamensis*. Nesta espécie, as concentrações de monoterpenos foram maiores do que a concentração de sesquiterpenos na estação chuvosa (LOPES et al., 1997).

#### **1.6.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA FP E SUA RELAÇÃO COM FATORES CLIMÁTICOS**

Na figura 15 é demonstrada a variação do rendimento (g%) da fração polissacarídica em relação ao peso fresco do parênquima de reserva de *Aloe barbadensis*. Padrões distintos foram observados para as amostras de plantas distintas e de mesmas plantas, ao longo do período experimental.

Conforme observado na figura 15, as amostras de plantas distintas (PC e PM) apresentaram um perfil semelhante, quando comparadas entre si, a exceção do mês de janeiro/2006 que marcou o maior pico de produção de polissacarídeos nas PM, o que não foi observado em PC.

Para as coletas de mesmas plantas, os perfis não foram concordantes entre si ao longo do período estudado.



**Figura 15** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica em relação ao peso fresco do parênquima de reserva, em plantas distintas e em mesmas plantas, coletadas no período de maio de 2005 a março de 2006 e julho de 2005 a maio de 2006, respectivamente.

Em coletas feitas em mesmas plantas, as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ; Tabela 2) observadas nas plantas micropropagadas (PM) foram entre as coletas do mês de julho/2005 e setembro/2005. As demais coletas não apresentaram diferenças. Já as plantas produzidas em campo (PC) apresentaram diferenças significativas entre si ao longo dos períodos amostrais.

Em amostras de plantas distintas as diferenças significativas em plantas micropropagadas (PM) foram observadas para as coletas dos meses de maio/2005 e novembro/2005. As plantas produzidas em campo (PC) diferiram significativamente nos períodos de maio/2005, setembro/2005, novembro/2005, janeiro/2006 e março/2006 (tabela 2).

**Tabela 2** – Rendimento da FP (% p/p) de amostras de plantas micropropagadas (MP) e plantas produzidas no campo (PC), para coletas de mesmas plantas (MP) e plantas distintas (PD) ao longo do período maio/2005 a maio/2006.

MESES	MP		PD	
	PM*	PC*	PM*	PC*
Maio/05			0,13±0,03 <sup>a</sup>	0,17±0,07 <sup>a</sup>
Julho/05	0,20±0,03 <sup>a</sup>	0,23±0,06 <sup>a</sup>	0,20±0,03	0,23±0,06
Setembro/05	0,33±0,06 <sup>b</sup>	0,40±0,05 <sup>b</sup>	0,21±0,06	0,25±0,05
Novembro/05	0,31±0,05	0,33±0,05	0,23±0,06 <sup>b</sup>	0,29±0,06 <sup>b</sup>
Janeiro/06	0,30±0,15	0,22±0,08 <sup>c</sup>	0,37±0,08	0,27±0,05 <sup>c</sup>
Março/06	0,22±0,08	0,20±0,09 <sup>d</sup>	0,24±0,06	0,20±0,09 <sup>d</sup>
Maio/06	0,22±0,10	0,24±0,06		

\* Os resultados referem-se às médias  $\pm$  DP (n=8), realizadas em triplicata. Letras distintas nas colunas denotam diferenças significativas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Observou-se que as diferenças significativas foram maiores em PC para os dois tipos de coletas, evidenciando que as plantas micropropagadas (PM)

mantiveram constante a produção de polissacarídeo durante todo o período experimental. Contrariamente, a maior variância encontrada nas plantas produzidas em campo (PC) pode ser atribuída a uma resposta fisiológica mais rápida, ante ao estímulo da retirada da folha. Este fato, aliado aos fatores ambientais, somado à idade das plantas e sua variabilidade genética são os mais prováveis elementos que contribuíram para a variância.

De forma similar ao realizado para a análise de aloína A, foi estabelecido o perfil de variação do conteúdo da FP das populações em estudo, consoante às flutuações dos fatores climáticos insolação total, precipitação pluviométrica bimestral, temperatura média diária bimestral e umidade relativa diária bimestral ao longo do período experimental. Os resultados são mostrados nas figuras 16, 17, 18 e 19.

Destaca-se que o maior valor de rendimento da FP (0,37%) de PM em coletas de plantas distintas ocorreu no período de (dezembro/2005-janeiro/2006), coincidindo com o período de maior insolação (Figura 16 - 426,4 h e dec). Já as plantas PC apresentaram maior percentual da FP (0,29%) no período outubro-novembro/2005, no final da primavera, momento de elevação da taxa de insolação.

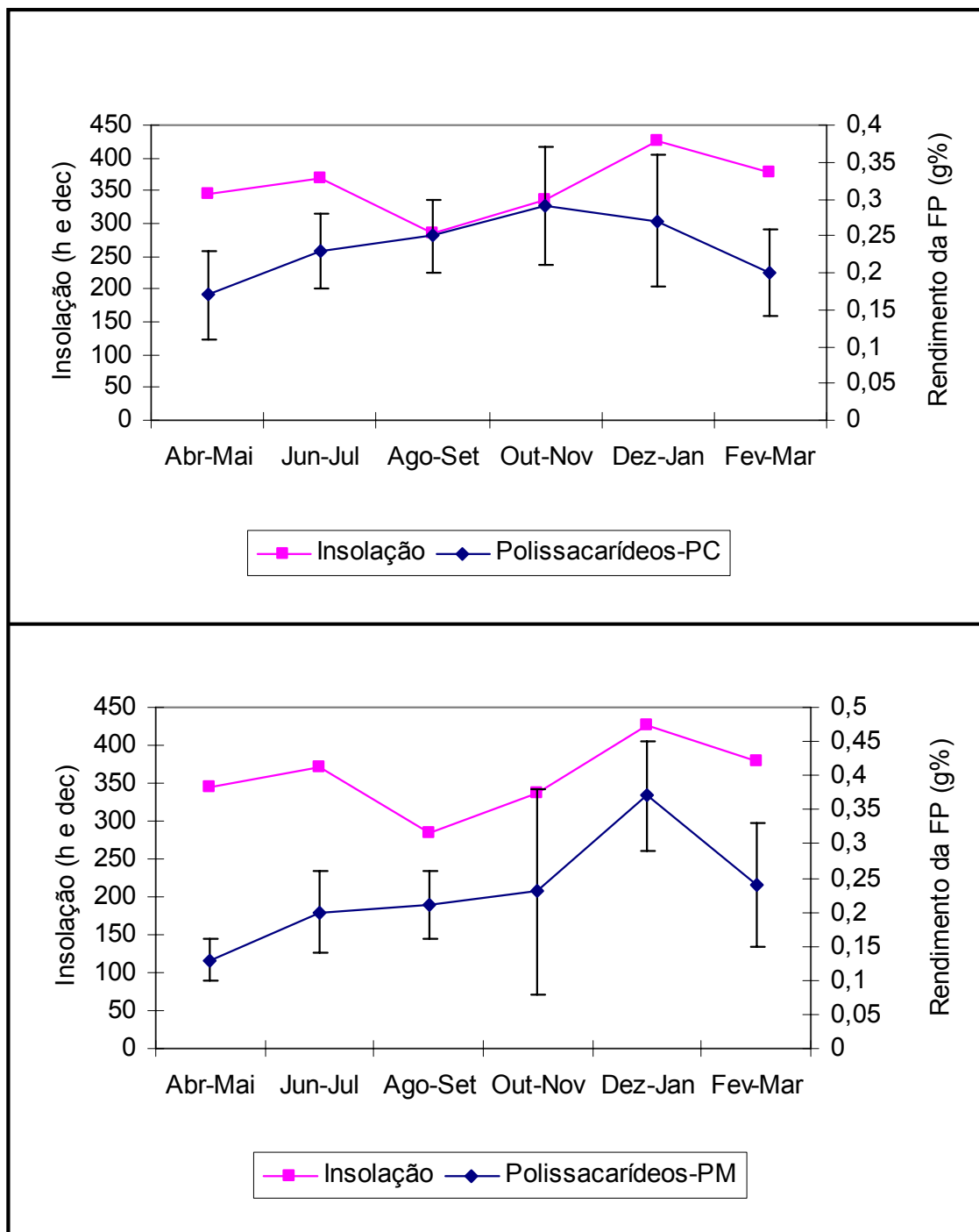
A precipitação pluviométrica (Figura 22) para o período de maior produção da FP em PM (0,37%) foi de 273,8mm (dezembro/2005-janeiro/2006), não coincidindo com a época de maior intensidade de chuvas (470,7mm de chuva – agosto/2005-setembro-2005). Analisando o comportamento da população de PC, verificou-se que o rendimento da FP no período de maior precipitação pluviométrica foi de 0,25% e que a maior produção aconteceu no período outubro-novembro/2005. Novamente, não se verificou a relação entre precipitação pluviométrica e o rendimento da FP.



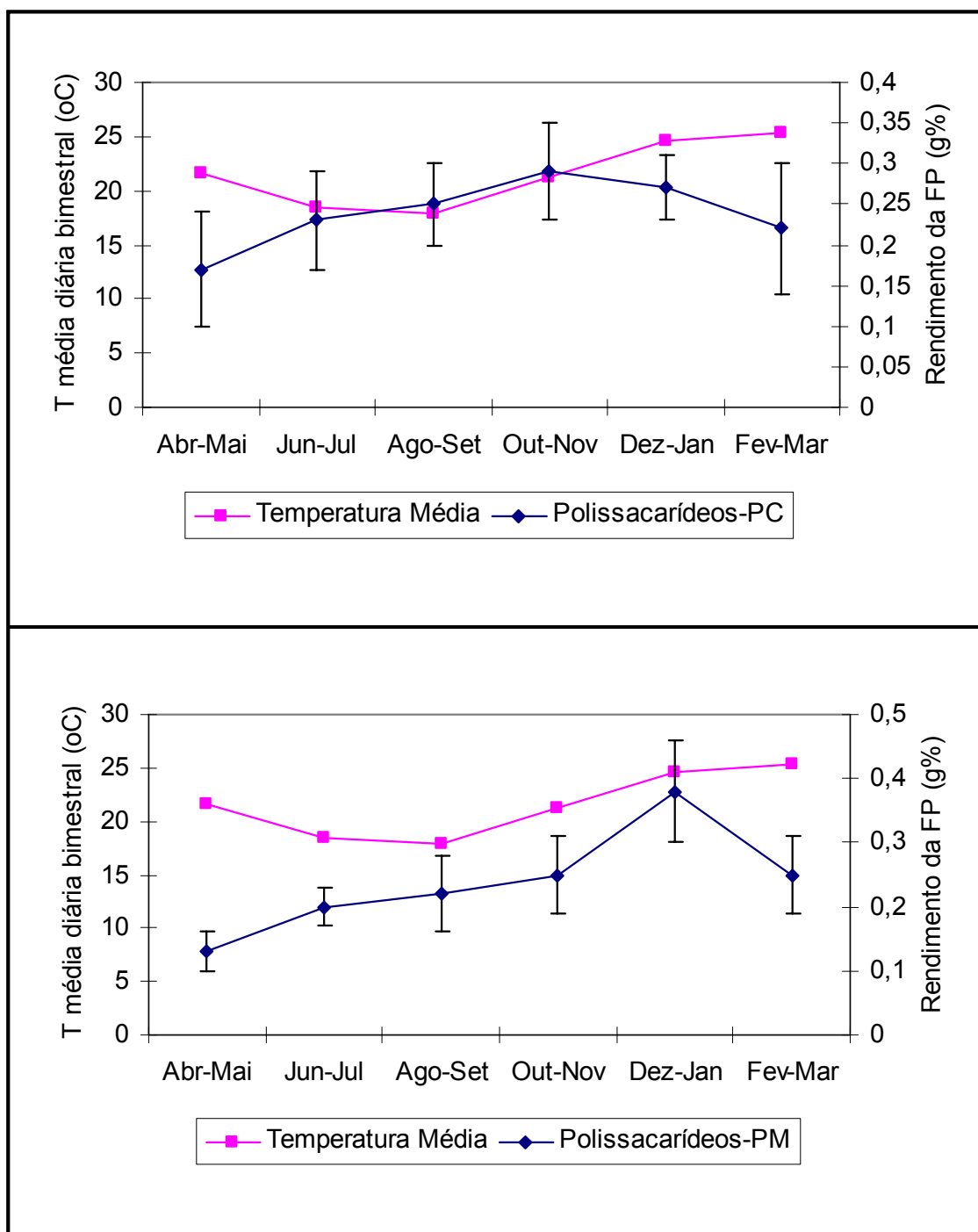
A maior temperatura média para os períodos de coleta foi registrada no período fevereiro-março/2006 (25,3°C) para PM, referente à coleta de mesmas plantas, ao mesmo tempo em que a maior concentração de polissacarídeos foi observada no período de dezembro/2005-janeiro/2006. Nas coletas de plantas PC, o pico de rendimento deu-se no período outubro-novembro/2006, período no qual a temperatura encontrava-se em ascensão após o final do inverno.

Nas coletas em mesmas plantas não foi observado um padrão de comportamento diante do fator insolação para as PM e PC. O pico de maior rendimento da FP de PM foi observado no período de dezembro/2005-janeiro/2006, período no qual se registrou a maior taxa de insolação total. Para as amostras de PC, o período outubro-novembro/2005 foi o período de maior produção de polissacarídeos, não apresentando relação com a insolação total.

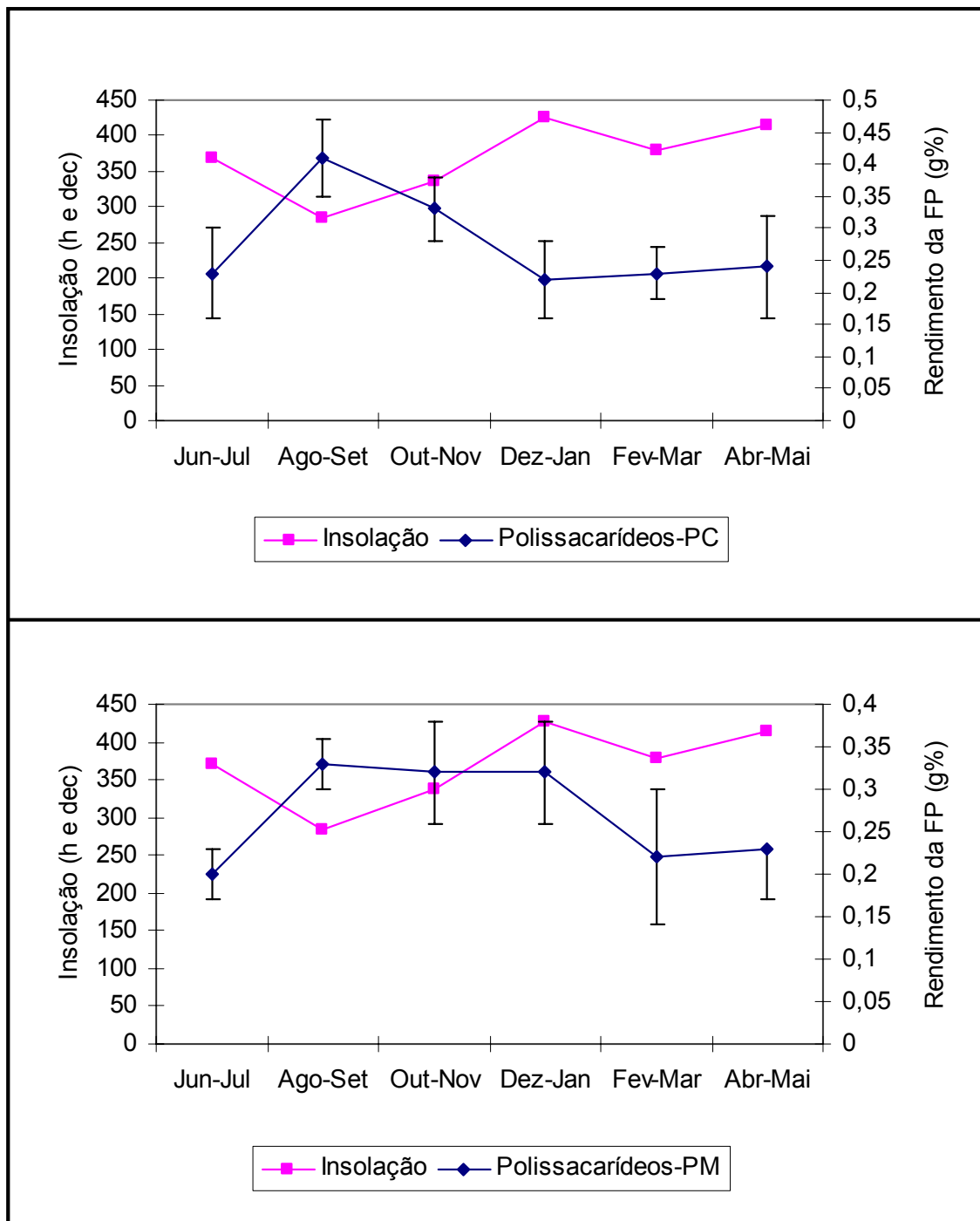
No período de menor precipitação pluviométrica (junho-julho/2005; 107,2mm de chuva) foi detectado o menor rendimento da FP para as amostras de PM de coleta de mesmas plantas (Figura 20). No período seguinte (agosto-setembro/2005), registrou-se o pico de maior rendimento da FP, consoante à precipitação pluviométrica mais elevada do período experimental. Similarmente, em relação às amostras da FP das plantas PC, o período de menor precipitação registrou a menor concentração daquela macromolécula (junho-julho/2005), enquanto o período de maior precipitação apresentou os maiores valores de rendimento (agosto-setembro/2005).



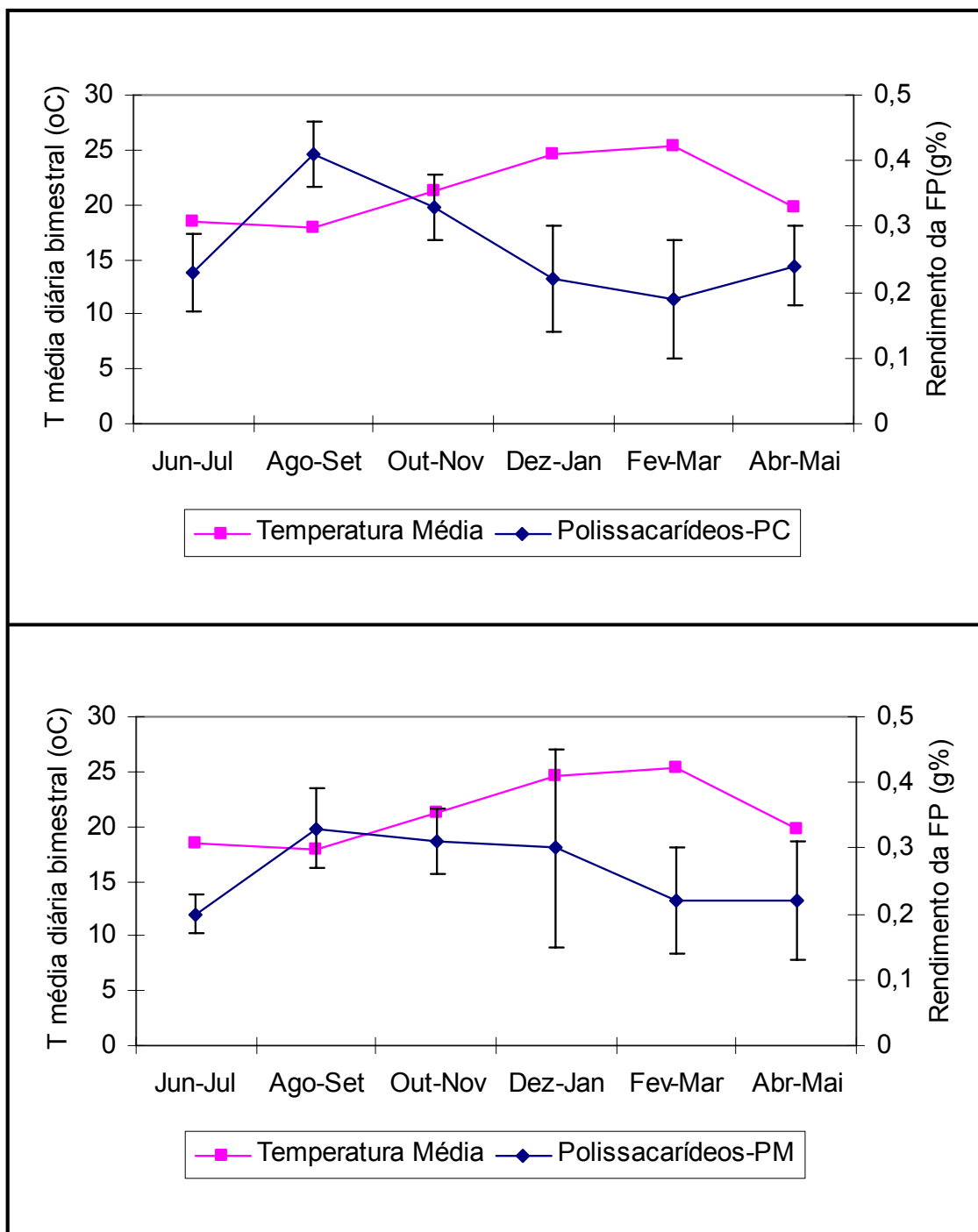
**Figura 16** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, consoante às condições de insolação total observados no período de maio de 2005 a março de 2006.



**Figura 17** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de plantas distintas, consoante às condições de temperatura média diária mensal observadas no período de maio de 2005 a março de 2006.



**Figura 18** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, segundo o fator climático insolação total, no período de julho de 2005 a maio de 2006.



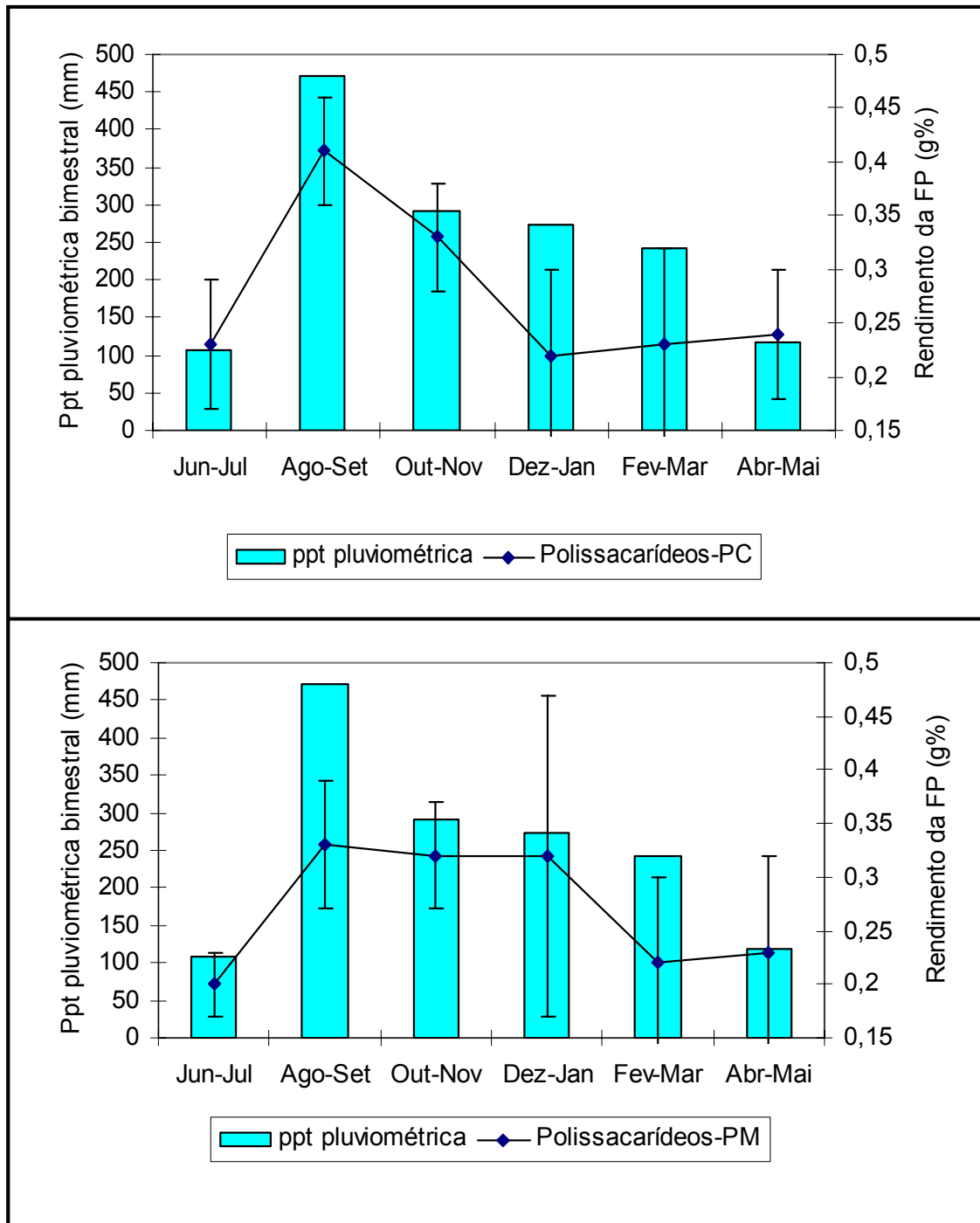
**Figura 19** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para amostras de mesmas plantas, segundo o fator climático temperatura média diária mensal, no período de julho de 2005 a março de 2006.

O efeito da umidade relativa em PC e PM (Figuras 21 e 23) para as amostras de plantas distintas e de mesmas plantas não mostrou uma relação direta com a produção da FP.

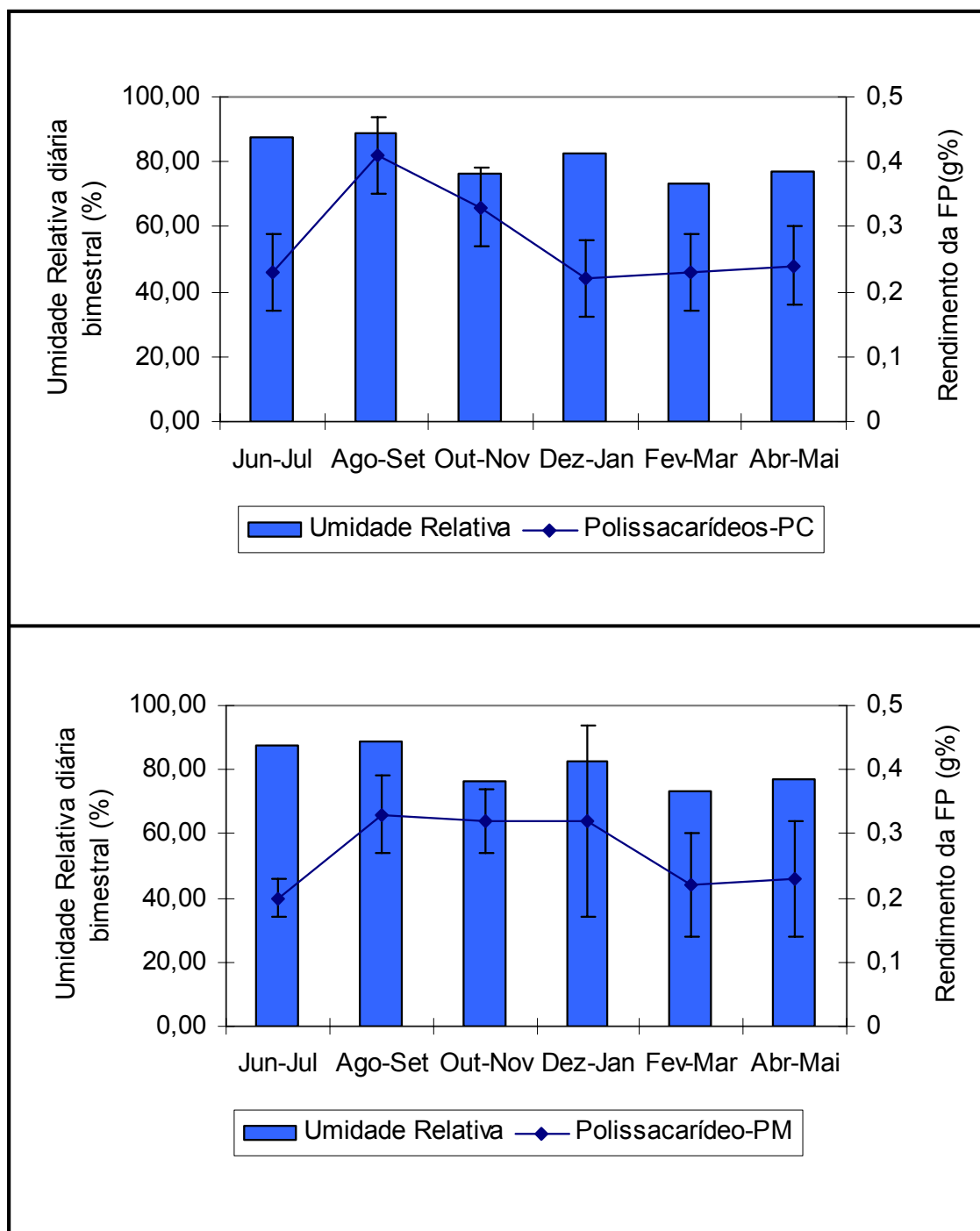
No que concerne ao efeito da temperatura média sobre as amostras de mesmas plantas (PM), uma relação inversa foi detectada para este fator e o rendimento da FP (Figura 19). Assim, para o período com maior temperatura (25,3°C em fevereiro-março/2006) foi registrado o menor rendimento da FP (0,22g%). Para as amostras de PC, o período de menor temperatura média (17,9°C; agosto-setembro/2005), apresentou o maior rendimento da FP (0,41g%). Entretanto, em amostras de plantas distintas (Figura 17), a variação da temperatura média em PC e PM não apresentou um efeito aparente sobre a concentração da FP.

Os fatores ambientais controlam a concentração e a produção de metabólitos secundários como a biossíntese de terpenos, que é diretamente afetada pela temperatura, irradiância, sazonalidade e disponibilidade de água. A redução da fotossíntese, devido ao stress hídrico, reduz consideravelmente a biossíntese de terpenos (DELFINE et al., 2005), sendo considerada o fator de maior restrição ao crescimento das plantas via redução da assimilação de carbono (CORREIA et al., 2006).

O fator hídrico interferiu de forma preponderante no acúmulo de polissacarídeos nas folhas de babosa, principalmente em amostras de mesmas plantas. A baixa pluviosidade registrada no período junho-julho/2005 coincidiu com o momento de menor rendimento da FP, possivelmente em consequência da própria característica xerofítica da planta.

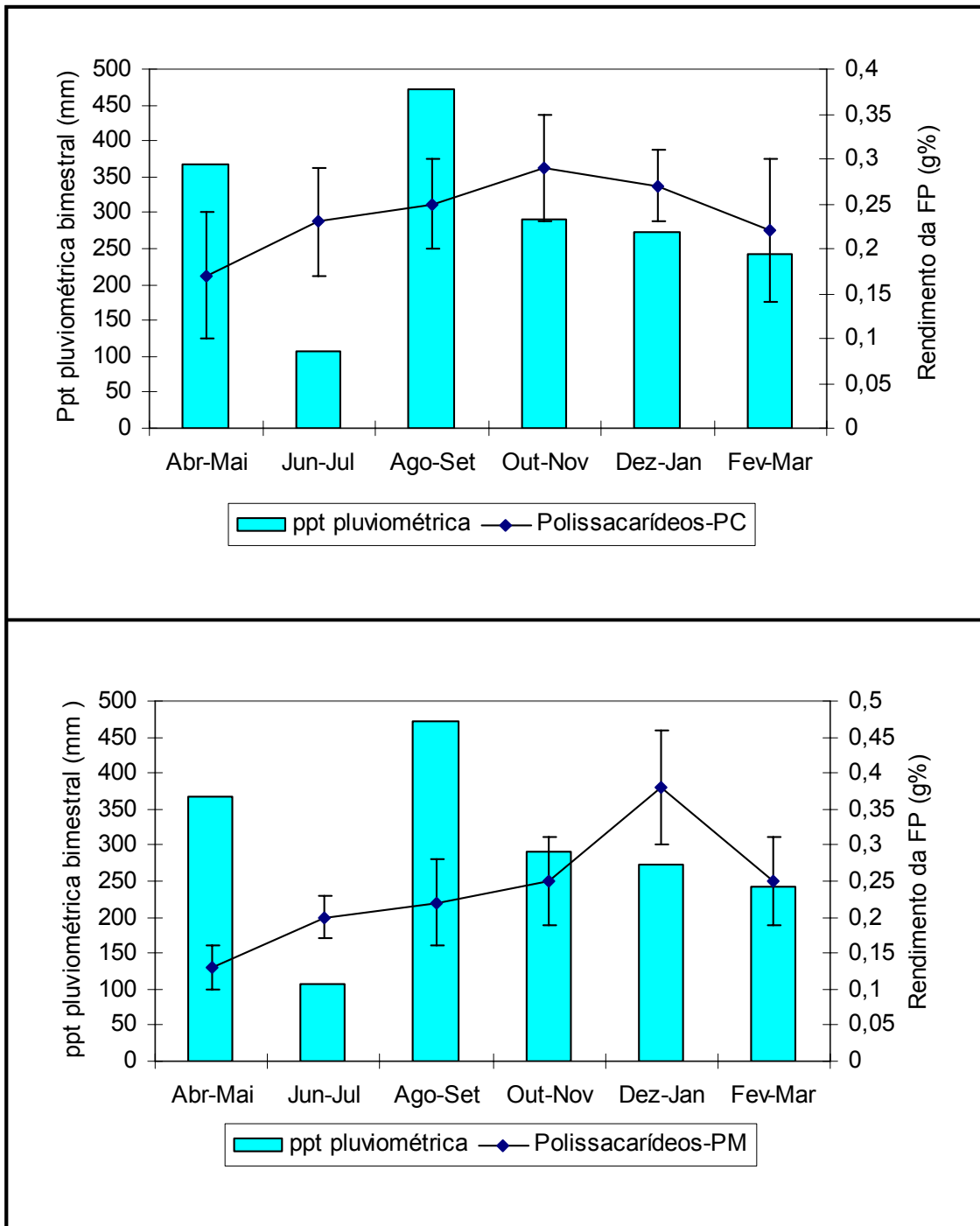


**Figura 20** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, de amostras de plantas distintas, de acordo com a condição de precipitação pluviométrica bimestral (mm), no período de maio de 2005 a março de 2006.

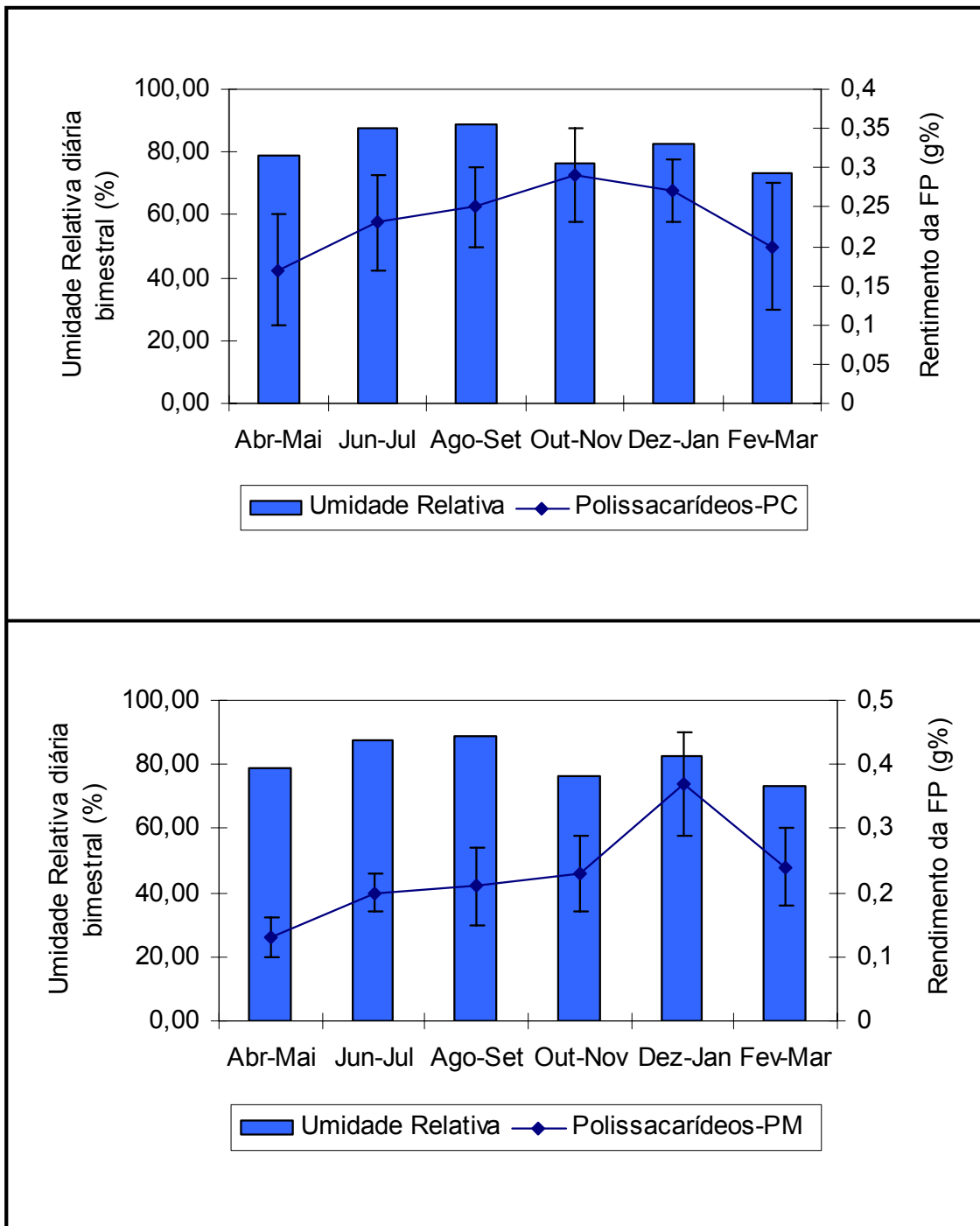


**Figura 21** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, de amostras de plantas distintas, de acordo com a condição de umidade relativa diária mensal (%), no período de maio de 2005 a março de 2006.





**Figura 22** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para as amostras de mesmas plantas, segundo a precipitação pluviométrica bimestral (mm), no período de julho de 2005 a maio de 2006.



**Figura 23** – Rendimento (g%) da fração polissacarídica (FP) em PM e PC, para as amostras de mesmas plantas, segundo a umidade relativa diária mensal (%), no período de julho de 2005 a maio de 2006.

A elevada irradiação luminosa é frequentemente associada a elevadas taxas assimilatórias e apresenta influência sobre a fotossíntese (MONNEVEUX et al., 2003). Em indivíduos de babosa expostos a níveis diferentes de irradiação foi constatado que em plantas parcialmente sombreadas ( $420-670 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) a alocação de carbono para as raízes e a quantidade de massa seca de tecido foliar sofreram restrições. Somente a concentração de carboidratos solúveis não foi afetada negativamente, sendo que seu conteúdo foi maior no extrato do parênquima de reserva em relação ao extrato do parênquima clorofiliano. Estes resultados sugerem uma indução ao aumento da concentração de glucose no parênquima de reserva foliar sob condições de maior irradiância. Já em *Heliantus annuus* L. observou-se que plantas submetidas a estresse hídrico e sob elevada irradiância, tiveram suas concentrações de carboidratos totais não estruturais igualmente aumentadas (CORREIA et al., 2006).

Nos resultados encontrados em plantas distintas, o fator irradiância teve forte influência sobre a produção dos polissacarídeos, principalmente em PM. Uma vez que a irradiância é geralmente associada à temperatura, assume-se que estes fatores colaboraram em alguma extensão para os valores de rendimento observados, a exemplo do que é descrito que para algumas culturas, como em aspargos, onde a concentração de açúcares solúveis é maior em meses mais frios e maior na estação quente (SHOU et al., 2007). No que concerne especificamente à babosa, poucos são os dados disponíveis na literatura acerca do efeito de fatores climáticos sobre o comportamento metabólico desta espécie, i.e., biossíntese, acúmulo e mobilização dos polissacarídeos de reserva. Alguns estudos referem-se a cultivos experimentais em ambientes controlados e não em cultivos estabelecidos em campo (BEPPU et al., 2004), ou utilizam um pequeno número de indivíduos

cultivados em jardins botânicos (GUTTERMAN et al., 2000), condições estas que mais dificilmente poderão refletir o comportamento de populações de plantas cultivadas em escala comercial. Em função disto, as comparações de resultados de estudos neste contexto deverão ser feitas com a devida cautela.

### **1.6.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA DE RESERVA, DA FP E DA FPD**

Os parâmetros físico-químicos avaliados para o extrato do parênquima de reserva estão mostrados na tabela 3.

Observou-se a existência de diferenças não proeminentes entre os tipos de amostras em estudo, exceção feita ao teor de sólidos solúveis, os quais no caso específico de *A. barbadensis* são representados principalmente pela glucose e em menores concentrações frutose e galactose (PAEZ, et al., 2000).

Alguns dos resultados i.e. pH e percentagem de polpa, encontrados neste experimento assemelham-se ao descrito na literatura (Waller et al., 2004), que avaliaram as características de extratos de parênquima de reserva em amostras oriundas de três propriedades no Texas (EUA), ao longo de um período de cultivo de 112 semanas. Os autores descreveram que a percentagem de polpa encontrada foi de 0,11g%, pH de 4,56, apresentando, portanto, valores bastante próximos aos encontrados no presente estudo. De forma similar, Femenia et al. (1999 e 2003) descreveram valores de conteúdo de água (umidade %) em plantas de babosa de 4 anos de idade, cultivadas nas Ilhas Baleares (Espanha), variando de 98,5% a 99,55%.

**TABELA 3** – Parâmetros físico-químicos de amostras de folhas e do extrato do parênquima de reserva de *Aloe barbadensis* Miller, cultivada em Paulo Lopes, SC, coletadas em setembro/2006.

Parâmetros	Amostras do Extrato do Parênquima de Reserva Foliar	
	PM	PC
Comprimento (cm)*	41,00 ± 4,99	46,00 ± 1,77
Massa (g)*	208,86 ± 33,01	239,80 ± 32,34
% polpa*	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,04
pH*	4,66 ± 0,15	4,75 ± 0,09
Umidade (%)**	99,03 ± 0,11	99,09 ± 0,14
Cinzas (mg)**	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,01
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)*	1,10±0,08	2,31±0,41

\*As amostras referem-se às médias ± DP (n=8)

\*\* As análises compreenderam a reunião de 8 amostras e foram realizadas em triplicata

Em um estudo realizado por estes pesquisadores com plantas cultivadas nas Ilhas Baleares (Espanha), conteúdos de cinzas, proteínas e açúcares solúveis, no extrato do parênquima de reserva, foram 23,61%, 8,92% e 26,81%, respectivamente, demonstrando a influência de fatores agronômicos e de ambiente sobre os parâmetros estudados.

Na tabela 4 são mostrados os valores de concentração de carboidratos totais (mg.mL<sup>-1</sup>), açúcares redutores (mg.mL<sup>-1</sup>) e proteínas totais (mg.mL<sup>-1</sup>) em amostras do extrato do parênquima de reserva de plantas de babosa.

**TABELA 4** – Parâmetros bioquímicos referentes ao extrato do parênquima de reserva de *Aloe barbadensis* Miller, cultivadas em Paulo Lopes (SC), coletadas em setembro/2006.

Parâmetros	Amostras do Extrato do Parênquima de Reserva Foliar	
	PM	PC
Carboidratos Totais (mg.mL <sup>-1</sup> )*	4,00±0,23	4,74±0,27
Açúcares Redutores (mg.mL <sup>-1</sup> )*	3,09±0,40	3,44±0,95
Proteínas Totais (mg.mL <sup>-1</sup> )*	0,09±0,01	0,10±0,02

\* As amostras compreenderam a reunião de oito indivíduos, as análises foram realizadas em triplicata e os valores expressam a média ± DP.

Verifica-se que o extrato possui um alto conteúdo glicídico, devido, principalmente, à presença de mono e polissacarídeos. Em menor escala, encontrou-se a fração protéica, que representa em termos percentuais cerca de 9% do peso seco do extrato, um dado semelhante ao descrito por Femenia et al. (1999) para uma população de plantas de babosa cultivada na Espanha.

A partir do extrato do parênquima de reserva obtiveram-se as FP e FPD, a partir de amostras de mesmas plantas (MP) de plantas distintas (PD). Similarmente, ao estudo realizado para o extrato do parênquima de reserva, alguns parâmetros bioquímicos foram analisados, sendo os resultados descritos nas tabelas 5 e 6.

**TABELA 5** – Parâmetros bioquímicos da FP e FPD de *Aloe barbadensis*, referentes às plantas distintas de PM e PC, coletadas no período de maio de 2005 a março de 2006.

Coletas	FP				FPD	
	Carboidratos totais (mg/mL)	Açúcares redutores (mg/mL)	Glucose (ug/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Carboidratos totais (mg/mL)	Proteínas totais (mg/mL)
PC mai/05*	0,152±0,053 <sup>a</sup>	0,048±0,003 <sup>a</sup>	31,57±1,34 <sup>a</sup>	0,021±0,001 <sup>c</sup>	0,152±0,011 <sup>a</sup>	0,019±0,002 <sup>c</sup>
PC jul/05*	0,172±0,037 <sup>a</sup>	0,068±0,015 <sup>a</sup>	31,54±1,16 <sup>a</sup>	0,024±0,005 <sup>b</sup>	0,120±0,016 <sup>a</sup>	0,020±0,001 <sup>b</sup>
PC set/05*	0,157±0,031 <sup>a</sup>	0,059±0,005 <sup>a</sup>	16,35±5,35 <sup>be</sup>	0,011±0,003 <sup>a</sup>	0,154±0,005 <sup>a</sup>	0,007±0,001 <sup>a</sup>
PC nov/05*	0,164±0,026 <sup>a</sup>	0,062±0,003 <sup>a</sup>	17,52±1,16 <sup>ce</sup>	0,016±0,004 <sup>a</sup>	0,166±0,030 <sup>a</sup>	0,016±0,001 <sup>d</sup>
PC jan/06*	0,166±0,044 <sup>a</sup>	0,060±0,009 <sup>a</sup>	14,40±2,69 <sup>df</sup>	0,016±0,002 <sup>a</sup>	0,108±0,022 <sup>a</sup>	0,014±0,001 <sup>e</sup>
PC mar/06*	0,159±0,040 <sup>a</sup>	0,052±0,007 <sup>a</sup>	12,85±1,16 <sup>ef</sup>	0,015±0,004 <sup>a</sup>	0,156±0,016 <sup>a</sup>	0,014±0,003 <sup>f</sup>
PM mai/05*	0,141±0,016 <sup>a</sup>	0,074±0,015 <sup>a</sup>	43,61±0,67 <sup>bg</sup>	0,013±0,001 <sup>a</sup>	0,140±0,007 <sup>a</sup>	0,012±0,003 <sup>c</sup>
PM jul/05*	0,175±0,053 <sup>a</sup>	0,062±0,014 <sup>a</sup>	32,04±0,69 <sup>ch</sup>	0,018±0,005 <sup>a</sup>	0,171±0,029 <sup>a</sup>	0,017±0,001 <sup>b</sup>
PM set/05*	0,147±0,012 <sup>a</sup>	0,067±0,006 <sup>a</sup>	47,50±1,78 <sup>dg</sup>	0,012±0,002 <sup>a</sup>	0,148±0,004 <sup>c</sup>	0,007±0,002 <sup>a</sup>
PM nov/05*	0,165±0,051 <sup>a</sup>	0,060±0,011 <sup>a</sup>	27,25±1,78 <sup>eh</sup>	0,021±0,001 <sup>a</sup>	0,157±0,043 <sup>d</sup>	0,011±0,001 <sup>d</sup>
PM jan/06*	0,179±0,045 <sup>a</sup>	0,056±0,004 <sup>a</sup>	15,57±1,78 <sup>a</sup>	0,012±0,001 <sup>a</sup>	0,082±0,005 <sup>e</sup>	0,010±0,001 <sup>e</sup>
PM mar/06*	0,116±0,016 <sup>a</sup>	0,065±0,009 <sup>a</sup>	40,88±3,09 <sup>fg</sup>	0,020±0,002 <sup>a</sup>	0,115±0,009 <sup>b</sup>	0,012±0,001 <sup>f</sup>

\* As amostras referem-se a triplicatas, expressando as médias ± DP. O teste de separação de médias foi efetuado utilizando o teste de Tukey com  $p < 0,05$ . Letras diferentes nas mesmas colunas e por coleta, indicam diferenças significativas.

**TABELA 6** – Parâmetros bioquímicos da FP e FPD de *Aloe barbadensis*, referentes a mesmas plantas de PM e PC, coletadas no período de julho de 2005 a maio de 2006

Coletas	FP				FPD	
	Carboidratos totais (mg/mL)	Açúcares redutores (mg/mL)	Glucose (ug/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Carboidratos totais (mg/mL)	Proteínas totais (mg/mL)
PC jul/05*	0,172±0,037 <sup>a</sup>	Nd	31,93±0,67 <sup>a</sup>	0,023±0,005 <sup>a</sup>	0,152±0,011 <sup>d</sup>	0,020±0,001 <sup>a</sup>
PC set/05*	0,126±0,022 <sup>a</sup>	Nd	26,48±4,10 <sup>a</sup>	0,021±0,009 <sup>a</sup>	0,120±0,016 <sup>b</sup>	0,018±0,001 <sup>b</sup>
PC nov/05*	0,193±0,030 <sup>a</sup>	Nd	38,16±4,42 <sup>a</sup>	0,012±0,002 <sup>a</sup>	0,194±0,005 <sup>a</sup>	0,010±0,002 <sup>c</sup>
PC jan/06*	0,178±0,030 <sup>a</sup>	Nd	39,33±1,78 <sup>a</sup>	0,016±0,003 <sup>a</sup>	0,166±0,030 <sup>d</sup>	0,012±0,001 <sup>d</sup>
PC mar/06*	0,200±0,016 <sup>a</sup>	Nd	19,86±3,50 <sup>a</sup>	0,015±0,000 <sup>a</sup>	0,108±0,022 <sup>c</sup>	0,014±0,001 <sup>e</sup>
PC mai/06*	0,159±0,026 <sup>a</sup>	Nd	26,48±1,35 <sup>a</sup>	0,018±0,002 <sup>a</sup>	0,141±0,016 <sup>d</sup>	0,010±0,001 <sup>c</sup>
PM jul/05*	0,175±0,053 <sup>a</sup>	Nd	31,93±0,67 <sup>b</sup>	0,018±0,005 <sup>a</sup>	0,137±0,007 <sup>a</sup>	0,017±0,001 <sup>c</sup>
PM set/05*	0,153±0,015 <sup>a</sup>	Nd	26,47±4,10 <sup>c</sup>	0,013±0,008 <sup>a</sup>	0,149±0,154 <sup>a</sup>	0,015±0,001 <sup>d</sup>
PM nov/05*	0,183±0,044 <sup>a</sup>	Nd	38,16±4,42 <sup>b</sup>	0,020±0,006 <sup>a</sup>	0,145±0,004 <sup>a</sup>	0,014±0,001 <sup>e</sup>
PM jan/06*	0,157±0,028 <sup>a</sup>	Nd	39,33±1,78 <sup>b</sup>	0,022±0,005 <sup>a</sup>	0,155±0,045 <sup>a</sup>	0,010±0,001 <sup>a</sup>
PM mar/06*	0,173±0,021 <sup>a</sup>	Nd	19,85±3,50 <sup>a</sup>	0,026±0,008 <sup>a</sup>	0,169±0,002 <sup>a</sup>	0,010±0,001 <sup>a</sup>
PM mai/06*	0,150±0,009 <sup>a</sup>	Nd	26,47±1,34 <sup>d</sup>	0,019±0,009 <sup>a</sup>	0,148±0,010 <sup>a</sup>	0,016±0,001 <sup>b</sup>

\* As amostras referem-se a triplicatas, expressando as médias ± DP. O teste de separação de médias foi efetuado utilizando o teste de Tukey com  $p < 0,05$ . Letras diferentes nas mesmas colunas e por coleta, indicam diferenças significativas.



Em ambas as coletas foi observada uma flutuação nas concentrações dos carboidratos totais e proteínas, porém não foram detectadas diferenças significativas para estes parâmetros ao longo do período experimental. Ao mesmo tempo, não foi detectada variação de interesse ( $p < 0,05$ ) na concentração dos metabólitos em questão, quando da diálise das amostras. As moléculas de alto peso ( $> cut-off$ ) como as proteínas e polissacarídeos não são eliminadas pelos poros da membrana utilizada. No entanto, as concentrações de carboidratos totais obtidas após a diálise, em geral, são menores que as de amostras não dialisadas, possivelmente pela eliminação de açúcares solúveis de baixo peso molecular ( $< cut-off$ ).

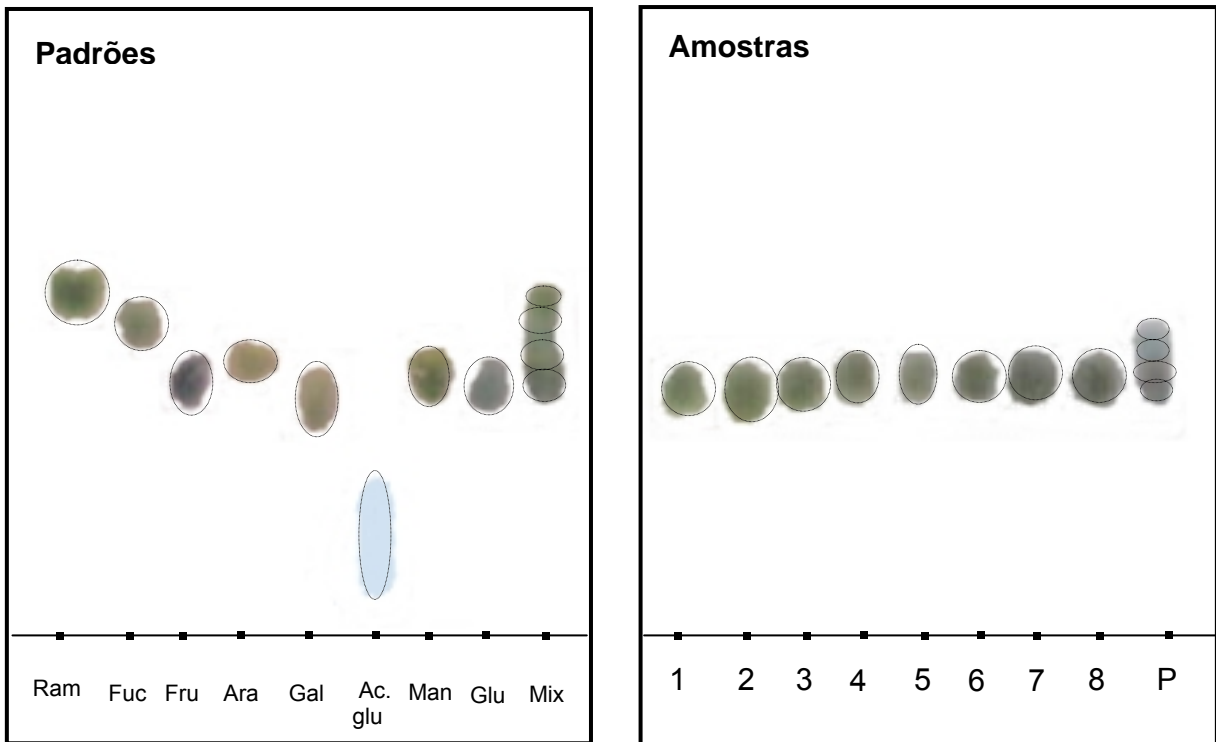
Fica evidente o efeito da técnica de diálise quando se compara a FP e FPD entre as coletas. A FPD apresenta uma grande variância dos dados, o que não acontece com a FP. A glucose foi o constituinte que apresentou a maior variância de dados entre as coletas, evidenciando a grande variação existente deste açúcar nas amostras, apesar de apresentarem-se em baixa concentração.

#### 1.6.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA DOS POLISSACARÍDEOS DA FPD.

Os cromatogramas da FPD hidrolisada são mostrados na figura 24. Considerando que todas as amostras cromatografadas apresentaram um perfil composicional monossacarídico semelhante, os resultados apresentados na figura 16 foram considerados representativos da variabilidade química de interesse, para o material em estudo. A partir dos valores de R<sub>f</sub> e dos padrões de cor dos açúcares, caracterizou-se a composição monomérica da FPD, sendo esta composta principalmente por manose e, em menor proporção, por glucose e galactose. Outros monossacarídeos eventualmente presentes em menores concentrações, i.e., arabinose, ramnose, xilose e ácidos urônicos (WALLER et al., 1978; FEMENIA et al., 1999; FEMENIA et al., 2003;) não foram detectados pela metodologia empregada.

Estudos realizados por Femenia et al. (2003), via cromatografia gasosa, demonstraram que a FPD de *A. barbadensis* é composta principalmente por manose e glucose, com menores concentrações de ramnose, fucose, arabinose, xilose e ácidos urônicos.

A predominância de monômeros de manose no hidrolisado da FPD corrobora com os resultados de Reynolds (2004), contudo, a razão manose/glucose mostrou-se variável entre indivíduos de *A. barbadensis*, bem como entre espécies daquele gênero.



**Figura 24** – Perfil cromatográfico dos padrões de açúcares: Ramnose ( $R_f = 0,59$ ), fucose ( $R_f = 0,52$ ), frutose ( $R_f = 0,43$ ), arabinose ( $R_f = 0,45$ ), galactose ( $R_f = 0,42$ ), ácido glucurônico ( $R_f = 0,40$ ), manose ( $R_f = 0,47$ ), glucose ( $R_f = 0,46$ ), da mistura de padrões (mix). Amostras (1-8) e da mistura de padrões (P).

Os dados da CCD apresentados revelaram a composição monossacarídica das amostras em estudo de forma qualitativa, sendo uma ferramenta útil à determinação primária da autenticidade da matéria-prima provinda desta espécie vegetal, uma vez que contaminantes de natureza glicídica poderiam ser detectados por esta técnica. Estudos de caráter quantitativo, via densitometria ótica, encontram-se em andamento.

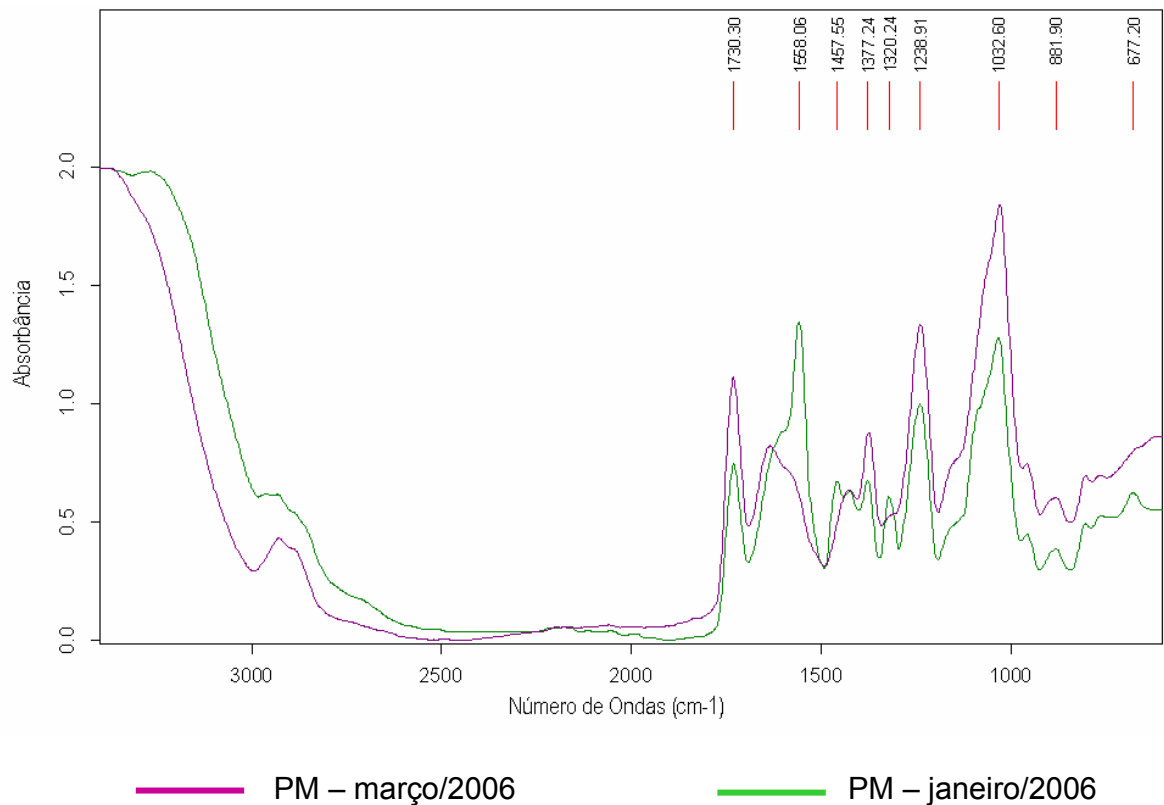
### **1.6.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA FP, DA FPD E DA ACEMANANA POR ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRAVERMELHO (FT-IR) SEGUIDA DE ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA.**

As amostras da FP e da FPD foram analisadas com o objetivo de caracterizar os grupamentos funcionais presentes na estrutura daqueles biopolímeros. A região estudada compreendeu as bandas localizadas na janela espectral compreendida entre 600 e 3400  $\text{ondas.cm}^{-1}$ .

A figura 25 mostra o perfil do espectro de infravermelho de amostras da FP de plantas micropropagadas (PM) e a figura 26 refere-se à FP de plantas produzidas no campo (PC).

O estiramento assimétrico da ligação C–H nos grupos  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2-$  em compostos alifáticos estão representados nas bandas em 2930-2888  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Estes grupamentos podem estar associados a ésteres ou ácidos graxos (LAMBERT et al., 1998; PETIBOIS et al., 2001; YANG et al., 2005).

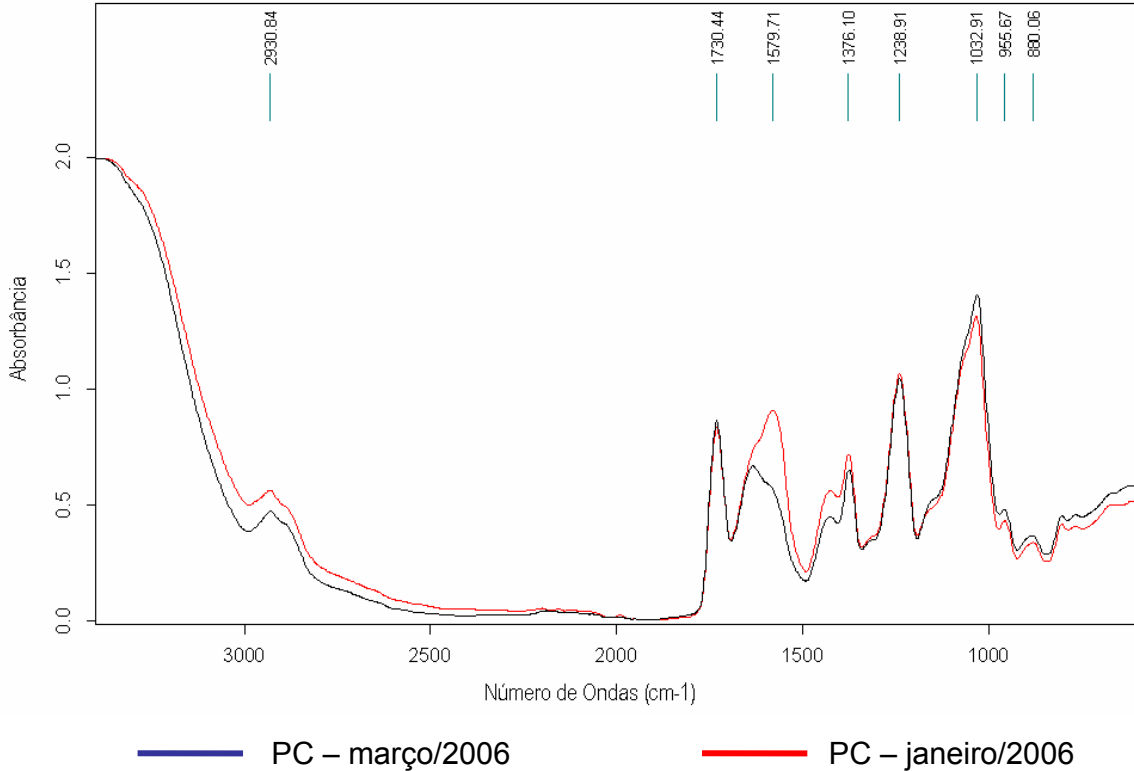
Bandas características do estiramento de ligação C=O foram detectadas na região de 1730  $\text{ondas.cm}^{-1}$  e representam grupos aldeídos ou grupamento acetil (LAMBERT et al., 1998; PRASHANTH et al., 2006).



**Figura 25** – Espectros de FT-IR (600 a 3400 ondas.cm<sup>-1</sup>) representativos da FP de plantas micropropagadas (PM). As bandas de maior intensidade são mostradas em destaque.

Bandas de interesse, associadas à deformação axial do grupamento funcional C=O e à deformação do grupamento NH<sub>2</sub> de amidas primárias e secundárias (em 1645, 1636, 1568 e 1524 ondas.cm<sup>-1</sup>, WILLIAMS; FLEMING, 1995; DÉLERIS, PETIBOIS, 2003) foram encontradas nas amostras. A presença destes grupamentos sugeriu a existência de compostos protéicos associados à FP, uma vez que as bandas acima mencionadas ocorrem na região espectral definida para estes compostos, i.e., 1720-1600 ondas.cm<sup>-1</sup> (estiramento da ligação C=O de amidas primárias) e 1600-1480 ondas.cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação N-H de amidas secundárias) (PETIBOIS et al., 2001; DÉLERIS, PETIBOIS, 2003). Posteriormente,

esta informação foi confirmada através do doseamento de proteínas nas amostras, conforme descrito no item 6.1.3.



**Figura 26** – Espectros de FT-IR (600 a 3400 ondas.cm<sup>-1</sup>) representativos da FP de plantas produzidas no campo (PC), com destaque para as bandas de maior intensidade.

Dois sinais verificados na região de 1457 e 1431 ondas.cm<sup>-1</sup> foram atribuídos à deformação axial de grupos CH<sub>3</sub> e a deformação no plano de grupamentos OH em ácidos carboxílicos, respectivamente (LAMBERT et al., 1998). As bandas observadas em 1376 e 1377 ondas.cm<sup>-1</sup>, por sua vez, resultam do estiramento da ligação C–H em compostos alifáticos ou de grupamentos acetil, bem como de OH fenólicos (BOERIU et al., 2004; PRASHANTH et al., 2006).

Um sinal em 1320 ondas.cm<sup>-1</sup> foi observado em amostras provenientes de coletas realizadas em mesmas plantas e especificamente em algumas coletas em

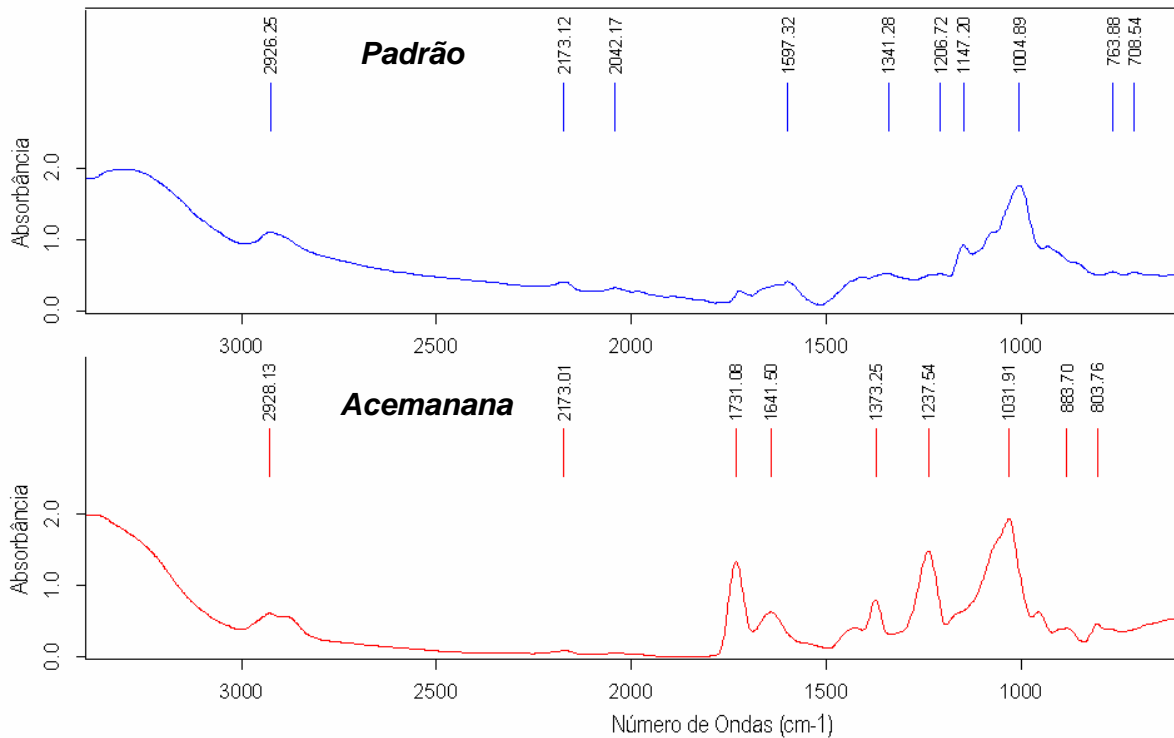
plantas micropropagadas, atribuindo-se ao estiramento do grupo C–O em anel siringil (BOERIU et al., 2004; XU et al., 2006).

De forma bastante freqüente, observou-se um sinal na região de  $1238\text{ cm}^{-1}$ ; referente à região de carboidratos. Porém, a banda característica do polissacarídeo localiza-se em  $1032\text{ cm}^{-1}$  e representa o anel de carbono em composto cíclico (WILLIANS, FLEMING, 1995; LAMBERT et al., 1998). Segundo Kemsley et al. (1995), os carboidratos geralmente exibem um sinal intenso na região de  $900\text{-}1300\text{ onda.cm}^{-1}$ , região considerada de impressão digital de polissacarídeos. A banda específica em  $1032\text{ onda.cm}^{-1}$  foi atribuída por Prashanth et al. (2006) ao estiramento da ligação C–O quando ligado a grupos C–O–C o que caracteriza para os autores grupos acetilados. Conjuntamente à região pertencente aos carboidratos, as bandas de  $955$  e  $958\text{ onda.cm}^{-1}$  apareceram como sinal pertencente ao grupamento =CH fora do plano.

Ainda, os sinais relativos às bandas de  $880\text{-}881\text{ onda.cm}^{-1}$  foram definidos como pertencentes às ligações HC=CH<sub>2</sub> em grupamentos vinílicos (LAMBERT et al., 1998) ou à estruturas piranosídicas de β-D-manose e β-D-glucose, segundo Santa Rita (1984).

Por fim, as bandas registradas em  $769$  e  $677\text{ onda.cm}^{-1}$  estariam ligadas aos sinais característicos de estiramento da ligação CH em anéis aromáticos, mostrando a presença de possíveis contaminantes de natureza fenólica (WILLIANS, FLEMING, 1995).

Quando são comparados os espectros de um padrão comercial com o material obtido da cromatografia de gel permeação (acemanana - Figura 27), nota-se que muitos dos sinais não são correspondentes.



**Figura 27** – Espectros de FT-IR (600 a 3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ ) representativos do padrão comercial de acemanana e da acemanana obtida via cromatografia de gel permeação da FPD.

Em relação ao padrão comercial, a acemanana apresenta bandas intensas nas regiões de 1600 a 1730  $\text{onda.cm}^{-1}$ , características de grupamentos C=O de aldeídos e  $\text{NH}_2$  de amidas primárias (proteínas), respectivamente, e 1200  $\text{onda.cm}^{-1}$  que se refere ao estiramento da região C–O–C de carboidratos. Uma vez que essas bandas continuam presentes após o procedimento cromatográfico, pode-se sugerir que o polissacarídeo não foi suficientemente purificado, ou mesmo que essas substâncias contaminantes estejam fortemente ligadas à estrutura polissacarídica. De interesse, a banda que caracteriza aquele polissacarídeo aparece em diferentes números de onda nos espectros, uma vez que o padrão comercial apresenta o pico em 1004  $\text{onda.cm}^{-1}$ , enquanto a acemanana em 1031  $\text{onda.cm}^{-1}$ . Em função disto, pode-se inferir que o polissacarídeo isolado não esteja totalmente purificado ou

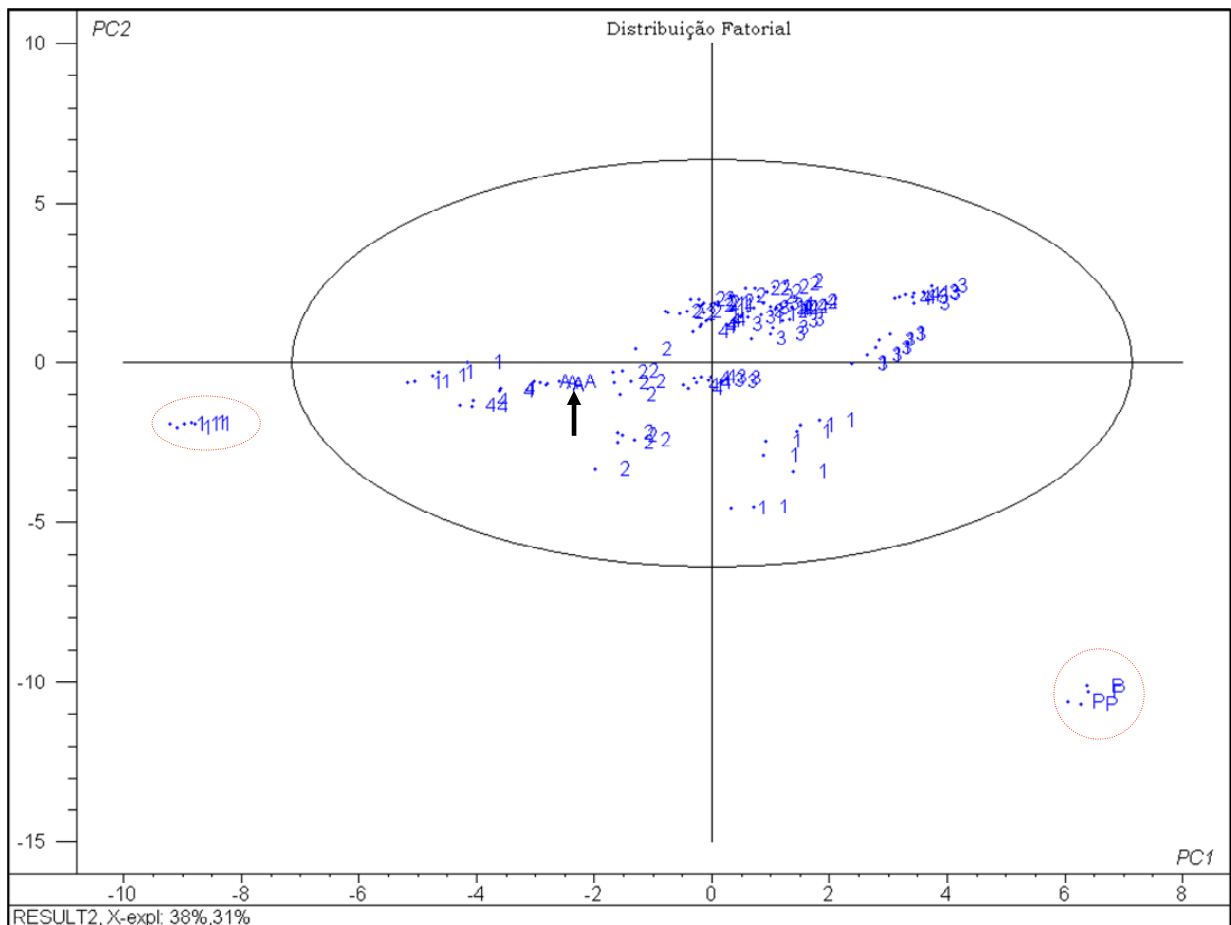


ainda que o padrão comercial utilizado não seja um padrão adequado. Como estratégia para elucidar esta questão, análises subseqüentes do perfil estrutural destes polissacarídeos foram realizadas utilizando-se a  $^{13}\text{C}$ -RMN e os resultados serão discutidos *a posteriori*. As regiões subseqüentes, entre 880 a 710  $\text{onda.cm}^{-1}$ , foram detectadas em ambas as amostras e indicam, possivelmente, a presença de compostos fenólicos associados àquelas macromoléculas.

Os resultados encontrados utilizando a técnica de FT-IR são de grande importância, no que diz respeito à caracterização da fração polissacarídica bruta e das subseqüentes frações purificadas do extrato do parênquima de reserva de *A. barbadensis*. No entanto, a espectroscopia de infravermelho isoladamente não permite a elucidação completa acerca da estrutura dos polissacarídeos de interesse, recomendando o uso de técnicas complementares como a  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Ainda neste contexto, a utilização de uma abordagem quimiométrica dos dados espectrais de FT-IR, através da análise de componentes principais (PCA), foi tomada como ferramenta para estipular o grau de dispersão das amostras entre plantas de diferentes coletas e entre diferentes épocas.

A figura 28 mostra o gráfico de distribuição fatorial (*scores*) das amostras pertencentes à FP extraída de mesmas plantas e de plantas distintas. Analisando a distribuição das amostras em relação aos eixos PC1 e PC2, verificou-se que aqueles componentes explicam 67% da variância presente nas amostras. A dispersão observada pode ser explicada através da análise dos gráficos de contribuição fatorial (*loadings*), os quais indicam os grupamentos funcionais que majoritariamente concorrem para a distribuição amostral observada nos eixos PC1 e PC2.

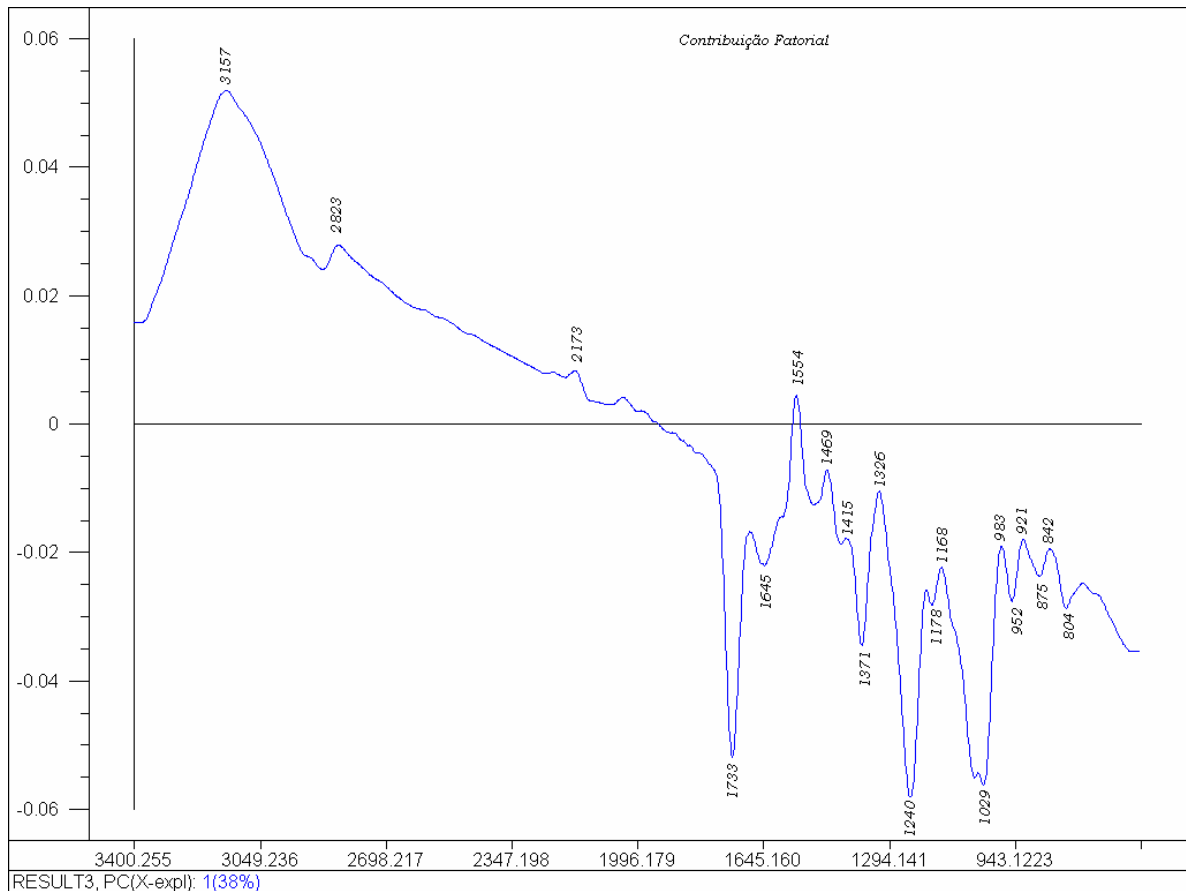


**Figura 28** – Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2, das amostras da FP referentes às mesmas plantas (1 – PM, 2 – PC) e plantas distintas (3 – PM, 4 – PC). Os grupos circulosados em vermelho fora da grande elipse indicam amostras consideradas *outliers* e a seta dentro da elipse indica a amostra de acemanana (A).

Uma tendência das amostras providas de PC agruparem-se ao longo do eixo PC1 negativo foi detectada, enquanto as amostras de PM mostraram a tendência de agrupamento em PC2 positivo. As amostras pertencentes ao padrão comercial de acemanana igualmente não aparecem inseridas no agrupamento majoritário, demonstrando diferenças quanto à sua composição química principalmente aos artefatos contaminantes de natureza protéica, lipídica e fenólica. A acemanana foi dispersa no quadrante PC1 negativo-PC2 negativo.

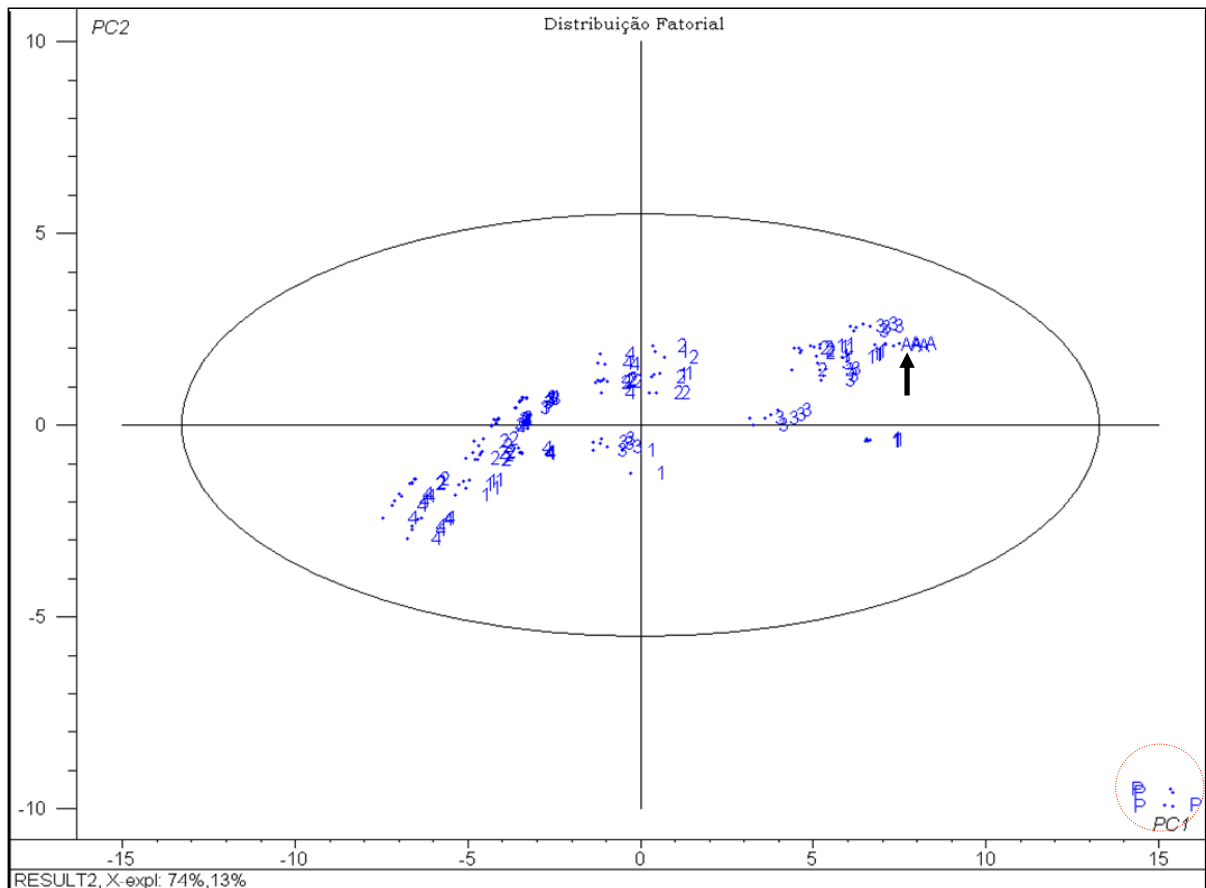
A análise da contribuição fatorial (Figura 29) dos dados espectrais de FT-IR revelou a presença de sinais de mais alta intensidade na região de 1730-840  $\text{onda.cm}^{-1}$  e predominantemente no quadrante negativo. As bandas que mais intensamente contribuíram para o perfil observado na separação foram detectadas em 3157  $\text{onda.cm}^{-1}$ , relativa a grupamentos  $-\text{NH}_2$  de aminoácidos, em 1371  $\text{onda.cm}^{-1}$ , relativos à deformação da ligação C–O–H pertencentes a grupos fenólicos, em 1240  $\text{onda.cm}^{-1}$ , relativo ao estiramento da ligação C–O–C de éteres e a banda em 1029  $\text{onda.cm}^{-1}$ , que se refere à ligação  $\text{CH}_2\text{--OH}$  de álcoois, característico de polissacarídeos.

Adicionalmente, amostras coletadas em maio/2006 foram separadas das demais, possivelmente devido à presença de banda em 1425  $\text{onda.cm}^{-1}$ , referente à deformação angular de -OH no plano (a qual pode estar associada a ácidos fenólicos), bem como à banda em 1320-1325  $\text{onda.cm}^{-1}$  que sugere resultar de ligação C–O. Em menor extensão, a banda em 1733  $\text{onda.cm}^{-1}$ , característica de carbonila de lipídios ou ésteres, foi um contribuinte à separação observada.



**Figura 29** – Contribuição fatorial de PC1 e PC2 das amostras da FP, referentes às mesmas plantas e plantas distintas, obtidas a partir dos dados espectrais de FT-IR (600-3400  $\text{cm}^{-1}$ ).

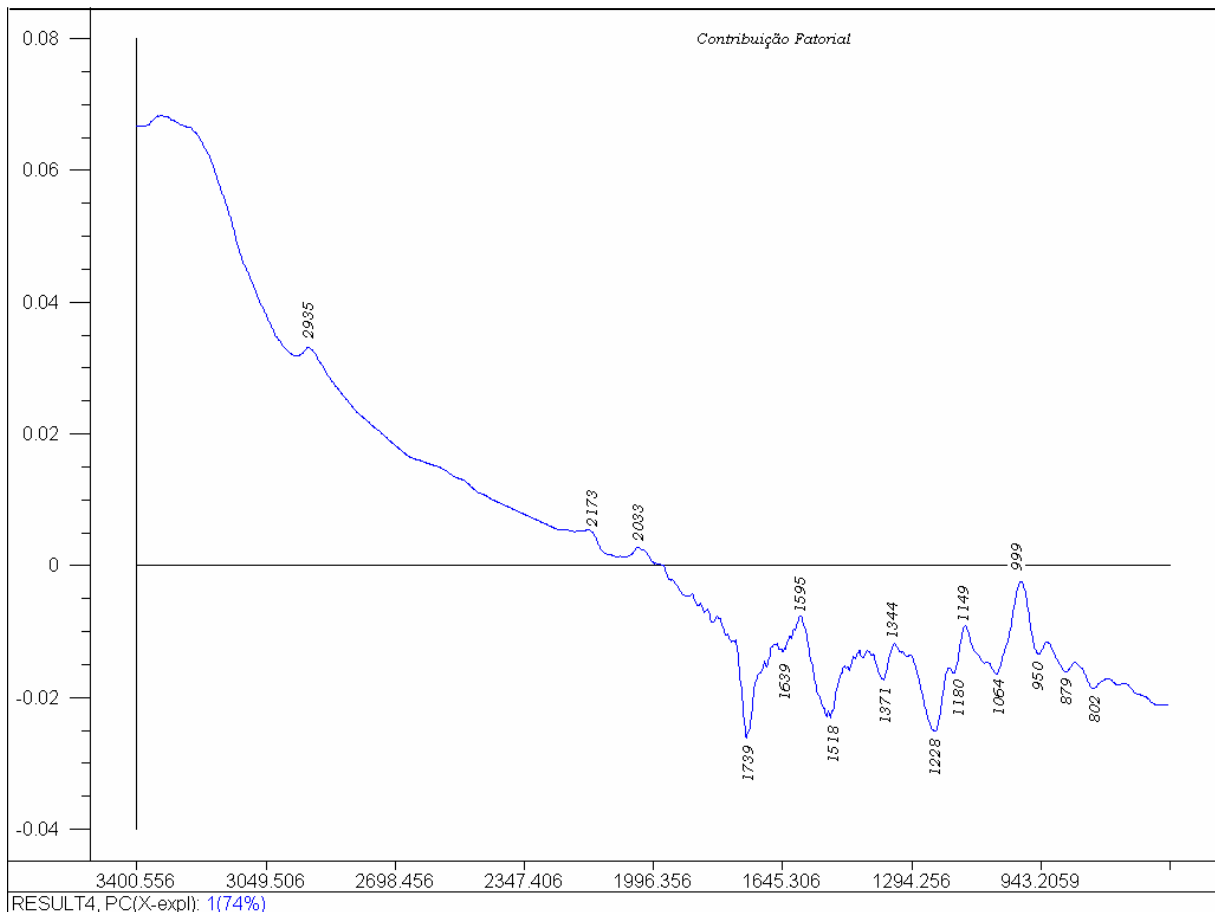
Para a FPD, a variância dada em relação aos eixos PC1 e PC2 foi de 74% e 13%, respectivamente, sendo detectada uma grande dispersão amostral ao longo dos eixos PC1 e PC2 (Figura 30). Um grupo menor com ocorrência em PC1 positivo-PC2 negativo compreendeu a amostra relativa ao padrão comercial, evidenciando novamente que este material difere estruturalmente daquele dialisado. De forma similar ao observado para a amostra da FP, a acemanana permaneceu no grupo majoritário, i.e., PC1 positivo-PC2 positivo.



**Figura 30** – Distribuição fatorial (PCA) dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) para os dados espectrais de FT-IR ( $600\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ ) das amostras da FPD, referentes às mesmas plantas (1 – PM, 2 – PC) e plantas distintas (3 – PM, 4 – PC). A seta destaca a amostra de acemanana.

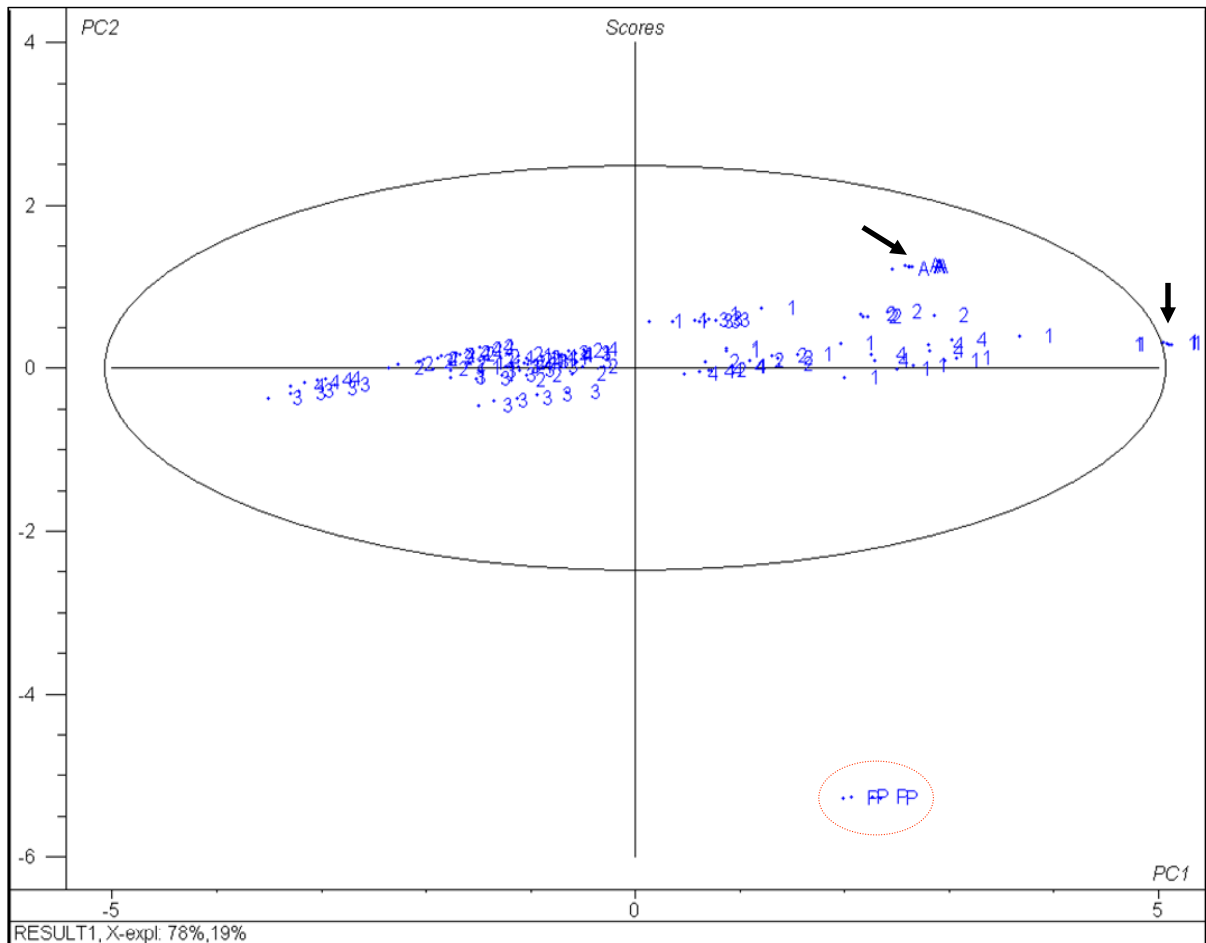
A análise do gráfico de contribuição fatorial (Figura 31) revela que as bandas que apresentaram maior contribuição na separação foram detectadas em  $2935\text{ onda.cm}^{-1}$ , pertencentes a grupos  $\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2-$ , possivelmente indicando a presença de lipídeos, enquanto as bandas situadas em  $1739\text{ onda.cm}^{-1}$ ,  $1518\text{ onda.cm}^{-1}$  e  $1228\text{ onda.cm}^{-1}$  são relativas ao estiramento da ligação  $\text{C}=\text{O}$  em ésteres, ao estiramento em ligações em anéis aromáticos e a deformação axial em ligações  $\text{C}-\text{C}-\text{N}$  em aminas.

Diante dos resultados encontrados, pode-se sugerir que a separação destes grupos esteja sendo efetuada principalmente por artefatos como resíduos de proteínas, lipídios e compostos de natureza fenólica. A intensidade das bandas é fator a ser considerado na separação.



**Figura 31** – Contribuição fatorial de PC1 das amostras da FPD, referentes às mesmas plantas e plantas distintas, para os dados espectrais de FT-IR ( $600\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ ).

Quando se restringe a análise dos componentes principais aos dados da janela espectral de caracterização de polissacarídeos ( $900\text{ a }1300\text{ onda.cm}^{-1}$  - Figura 32), 97% da variância amostral da FP é explicada pelos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2).



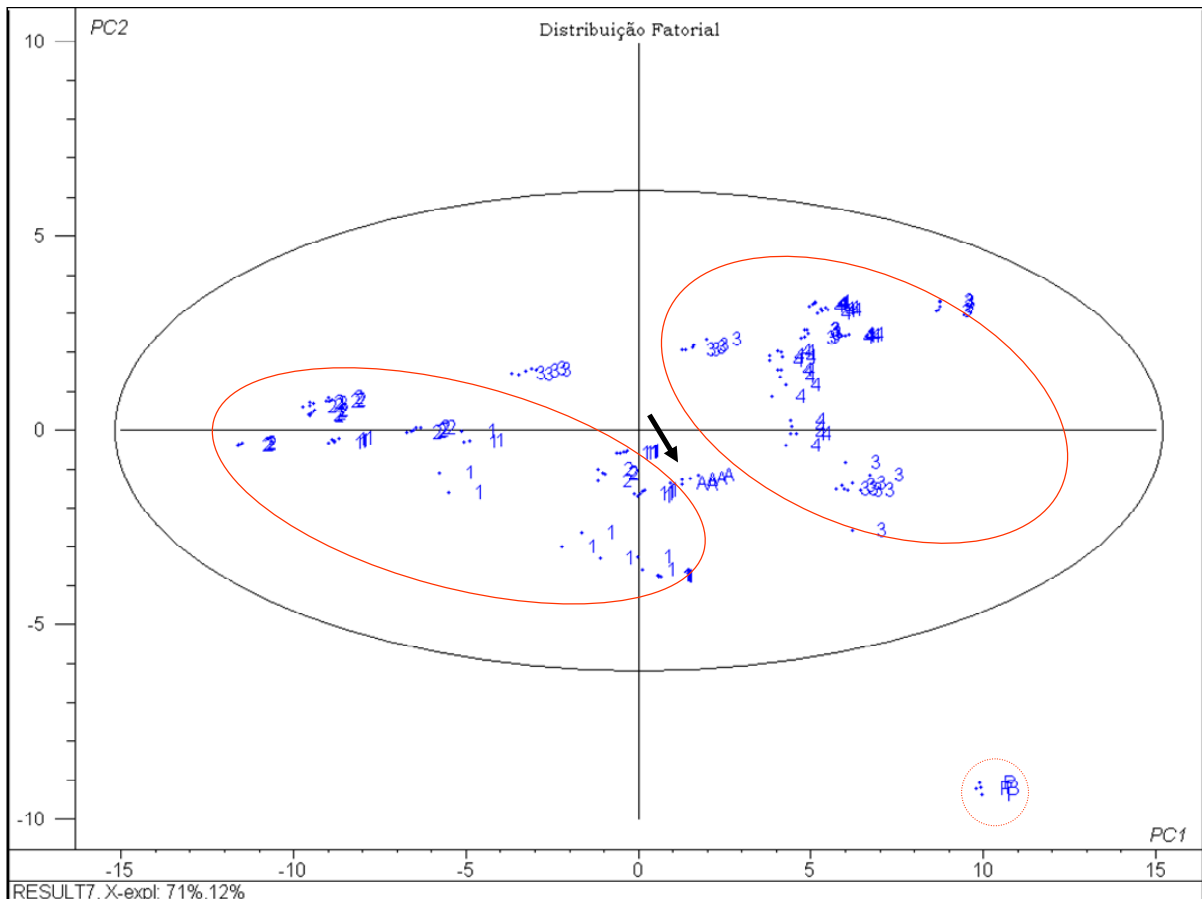
**Figura 32** – Distribuição fatorial (PC1 e PC2) dos dados espectrais (FT-IR, 900-1300  $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras da FP, referentes às mesmas plantas (1 – PM, 2 – PC) e plantas distintas (3 – PM, 4 – PC). A seta dentro da elipse indica a amostra de acemanana e a externa, uma amostra *outlier*. O grupo circulado em vermelho representa a amostra de padrão comercial.

As amostras apresentaram uma dispersão proeminente em relação ao eixo PC1. A amostra C294 que na análise da FP na região de 600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ , apresentou-se como *outlier*, ao se restringir a região de análise, foi enquadrada dentro do agrupamento principal.

As análises anteriores abordaram o efeito dos tipos de coleta da biomassa foliar para efeitos de obtenção das frações polissacarídicas. Posteriormente, decidiu-

se analisar o efeito da diálise no perfil estrutural de FT-IR das amostras de polissacarídeos em estudo.

As figuras 33 e 34 apresentam o efeito de diálise quando se comparam as FP e FPD de coleta de plantas distintas, ao longo do período estudado.

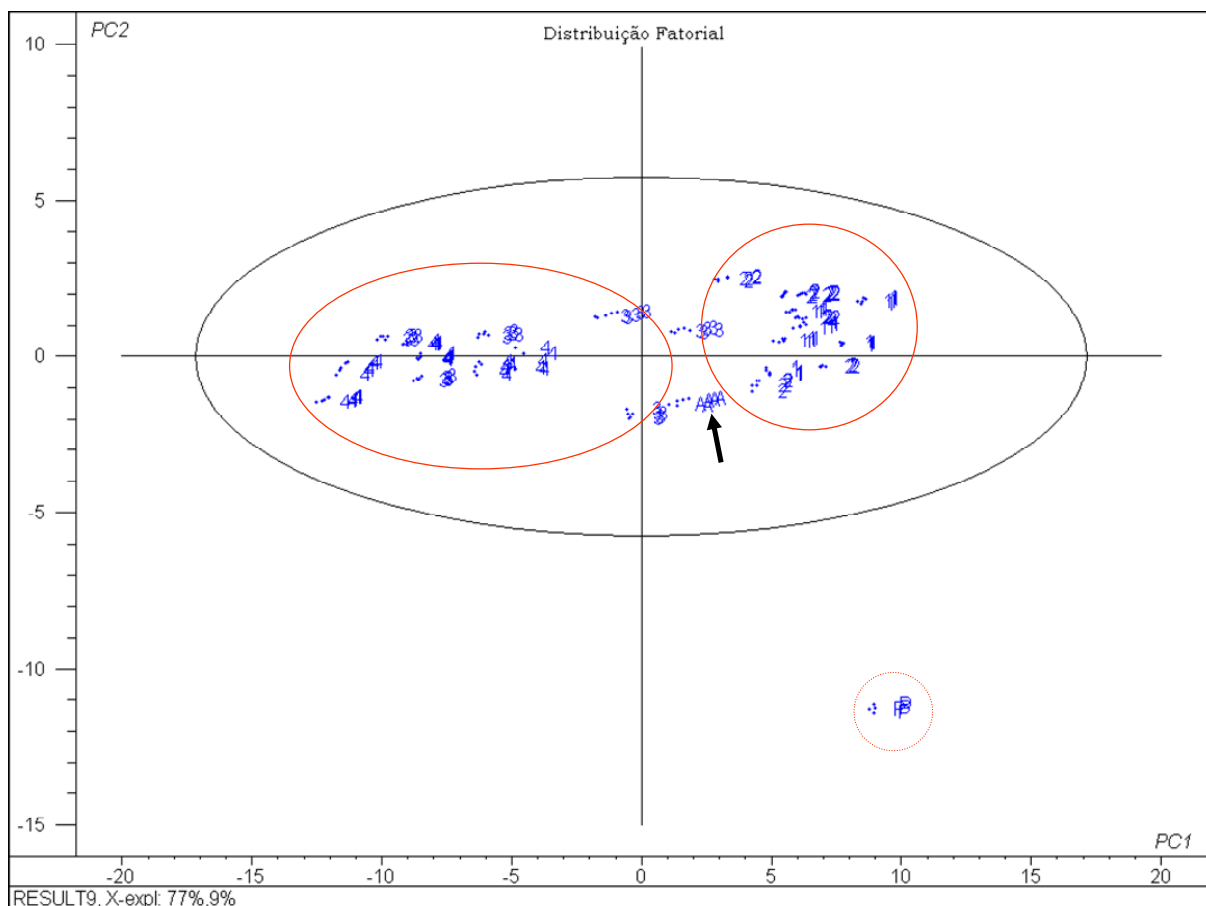


**Figura 33** – Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2 dos dados espectrais de FT-IR (600-3400 onda.cm<sup>-1</sup>) das amostras da FP (3 – PM e 4 – PC círculo menor em PC1 positivo) e FPD (1 – PM e 2 – PC círculo menor em PC1 negativo) de plantas distintas, juntamente com a acemanana (seta) e a amostra de padrão comercial (grupo circulado em vermelho)

Apresentando uma variância de 71% em PC1 e 12% em PC2, a distribuição fatorial de mesmas plantas mostrou uma tendência de separação das FP e da FPD em relação ao eixo PC1, onde as FP localizaram-se em PC1 positivo e as amostras da FPD em PC1 negativo. A amostra do padrão comercial manteve sua tendência de

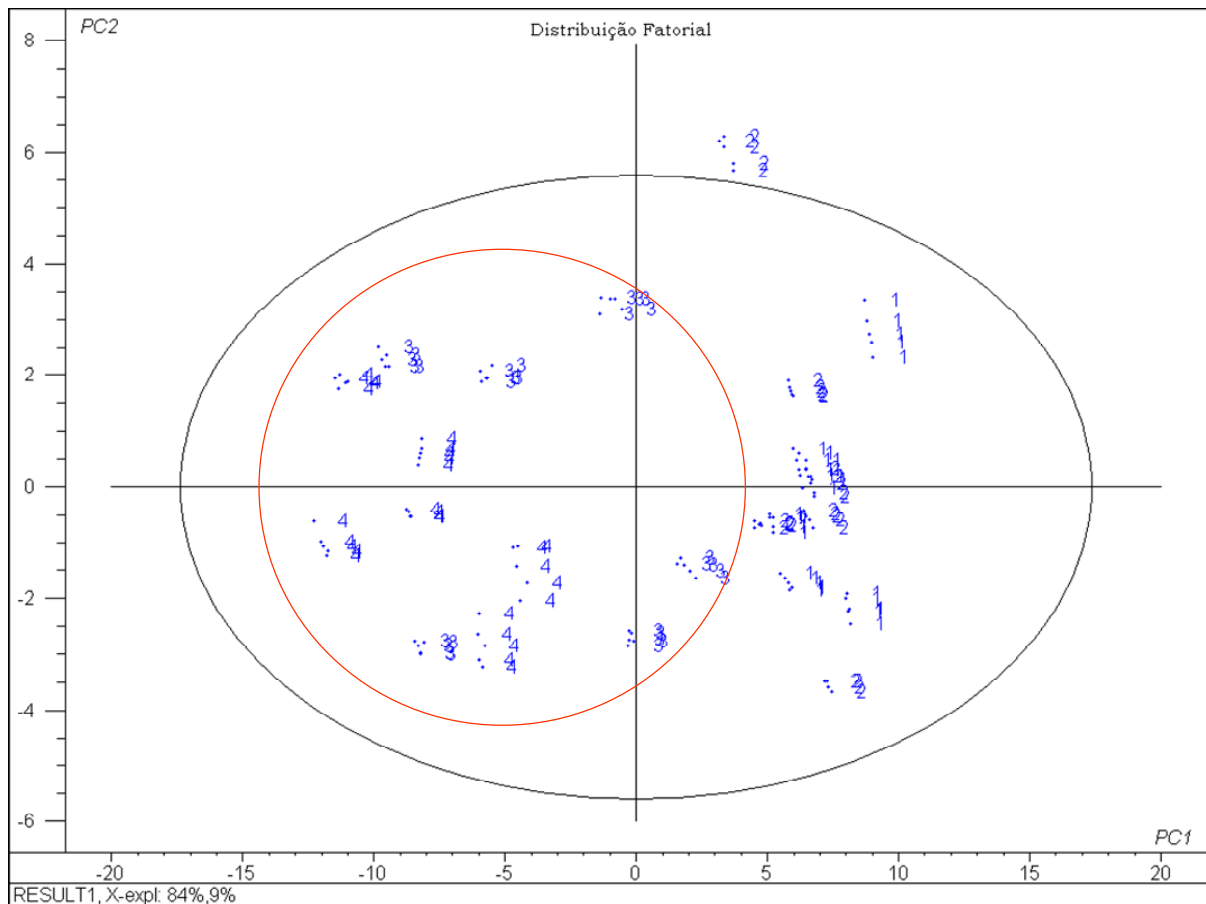


isolamento do grupo principal, enquanto a acemanana apresentou-se agrupada juntamente com as amostras dialisadas. Da mesma forma, quando se analisa o gráfico de plantas distintas (Figura 34), este mostrou também uma separação em função do eixo PC1. Entretanto, diferentemente dos resultados encontrados para as amostras de mesmas plantas, o agrupamento da FP deu-se no eixo PC1 negativo e a FPD no eixo PC1 positivo, predominantemente.



**Figura 34** – Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2 dos dados espectrais de FT-IR (600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ ) das amostras da FP (3 – PM e 4 – PC círculo menor em PC1 positivo) e FPD (1 – PM e 2 – PC círculo menor em PC1 negativo) de plantas distintas, juntamente com a acemanana (seta) e a amostra de padrão comercial (grupo circulado em vermelho)

Com o propósito de avaliar a interferência da acemanana e do padrão comercial na distribuição das amostras, foi executada uma análise utilizando as amostras de plantas distintas, igualmente ao que se observa na figura 34 excluindo-se a acemanana e o padrão comercial. O resultado desta análise pode ser visualizado na figura 35.



**Figura 35** – Distribuição fatorial (PCA) de eixos PC1 vs. PC2, das amostras referentes à FP (3 – PM e 4 – PC círculo menor) e FPD (1 – PM e 2 – PC) de plantas distintas excluída a acemanana e a amostra de padrão comercial, do espectro de FT-IR da região compreendida entre 600-3400  $\text{onda.cm}^{-1}$ .

A quimiometria apresentou uma variância de 84% em relação ao eixo PC1 e 9% em relação ao eixo PC2. Predominantemente, as amostras da FP dispersaram-se no eixo PC1 negativo, enquanto as amostras da FPD dispersaram-se em PC1

positivo. Observou-se a que a inserção da acemanana e do padrão comercial no conjunto amostral determinou um novo padrão de distribuição, principalmente no que diz respeito à FP, que apresentou uma tendência maior de deslocamento em relação ao eixo PC1 positivo. Após diálise, as amostras mostraram um perfil de distribuição bastante diferenciado, revelando que o tratamento influenciou de maneira significativa no perfil da distribuição fatorial.

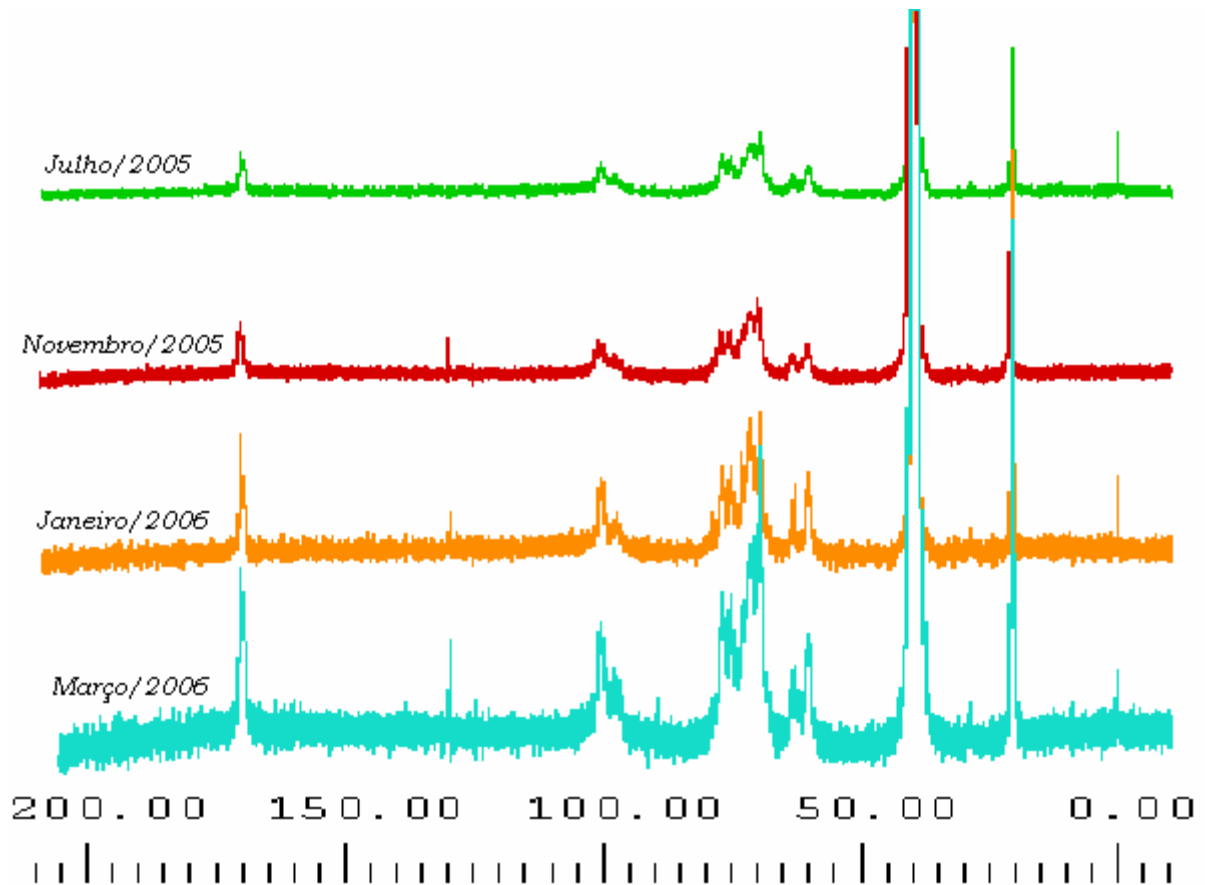
#### **1.6.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA FPD E DA ACEMANANA POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR de $^{13}\text{C}$ ( $^{13}\text{C}$ -RMN) SEGUIDA DE ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA.**

Os estudos de  $^{13}\text{C}$  em polissacarídeos permitem obter informações estruturais úteis. Assim, e considerando que os desvios químicos ( $\delta$  ppm) são sensíveis à forma do açúcar, os carbonos anoméricos têm maiores valores de  $\delta$  entre 90 e 98 ppm nas piranoses, comparativamente às furanoses, os carbonos ligados a grupos  $-\text{OH}$  apresentam ressonâncias típicas em  $\delta = 65\text{-}67$  ppm, enquanto os carbonos ligados a grupos  $-\text{OH}$  axiais têm valores de  $\delta$  inferiores aqueles ligados a grupos  $-\text{OH}$  equatoriais e, finalmente, os átomos de carbono envolvidos em ligações glicosídicas sofrem desvios consideráveis para alta frequência, cujos valores refletem a conformação molecular total (GIL, GERALDES, 2002).

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  da FPD referem-se à coleta de plantas distintas para amostras de PC e PM. Foram escolhidas amostras representativas de cada estação do ano a fim de comparar o efeito de época sobre as plantas estudadas. Assim, amostras coletadas nos meses de julho/2005 e novembro/2005

foram consideradas representativas do inverno e primavera, respectivamente, enquanto as amostras de janeiro/2006 e março/2007 representam as estações do verão e outono.

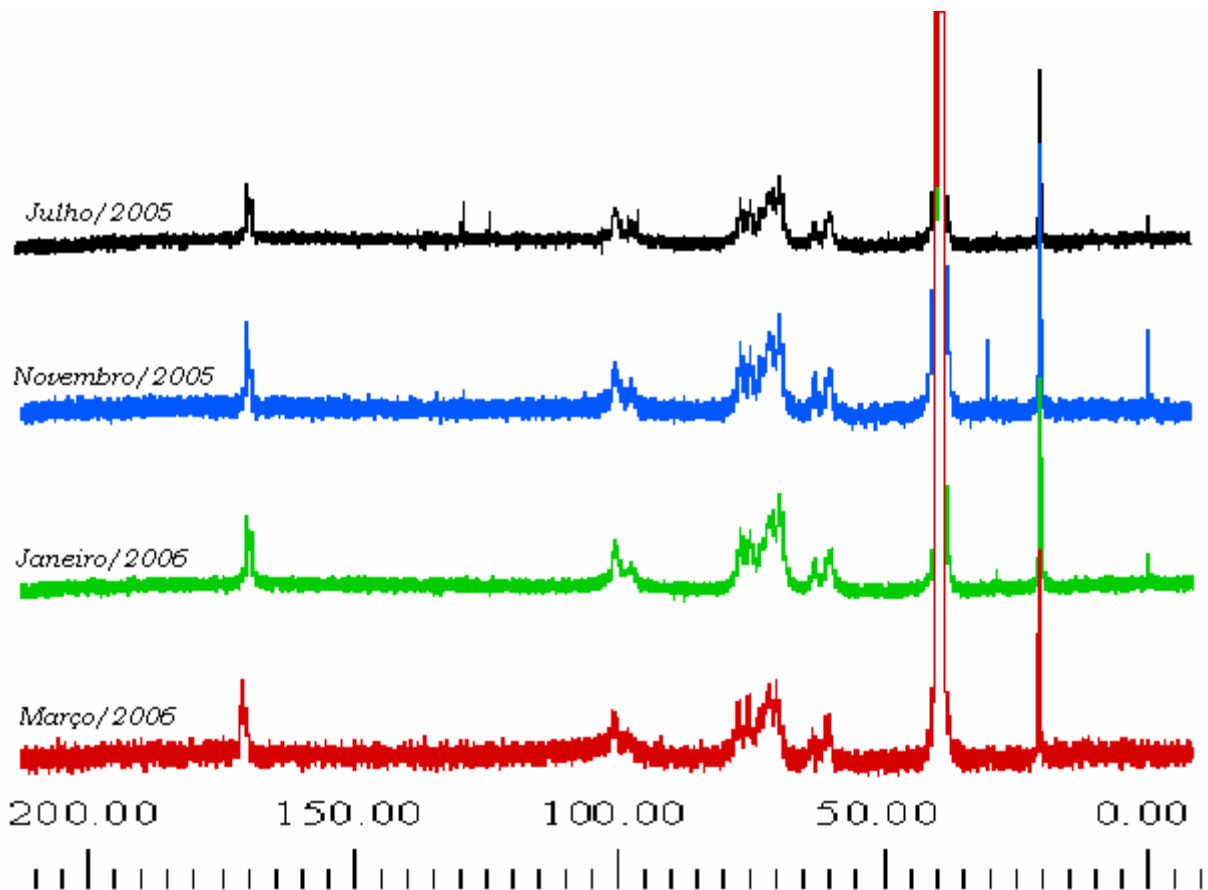
Foram coletados dois espectros adicionais, referentes à acemanana isolada pela coluna de gel filtração e de uma amostra de padrão comercial. Os espectros referentes às amostras de PM e PC são mostrados nas figuras 36 e 37, respectivamente.



**Figura 36** – Espectros de <sup>13</sup>C-RMN (9,4 Tesla) de amostras da FPD de plantas distintas (PM), representativas das quatro estações do ano, em ordem cronológica crescente.

Os espectros mostram que ao longo das estações os perfis de sinais referentes à estrutura dos polissacarídeos, i.e.,  $\delta = 20,5$  ppm, 60,3-100,6 ppm e 170,2 ppm, referentes ao grupamento  $\text{CH}_3$ , aos carbonos da estrutura polissacarídica e ao grupamento  $\text{C}=\text{O}$ , respectivamente.

Outros sinais que aparecem em 129,8 ppm nas coletas dos meses de novembro/2005, janeiro/2006 e março/2006 (PM – Figura 36), possivelmente pertencem a grupos aromáticos de compostos fenólicos contaminantes das amostras, ligados à estrutura do polissacarídeo (LAMBERT et al., 1998; SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

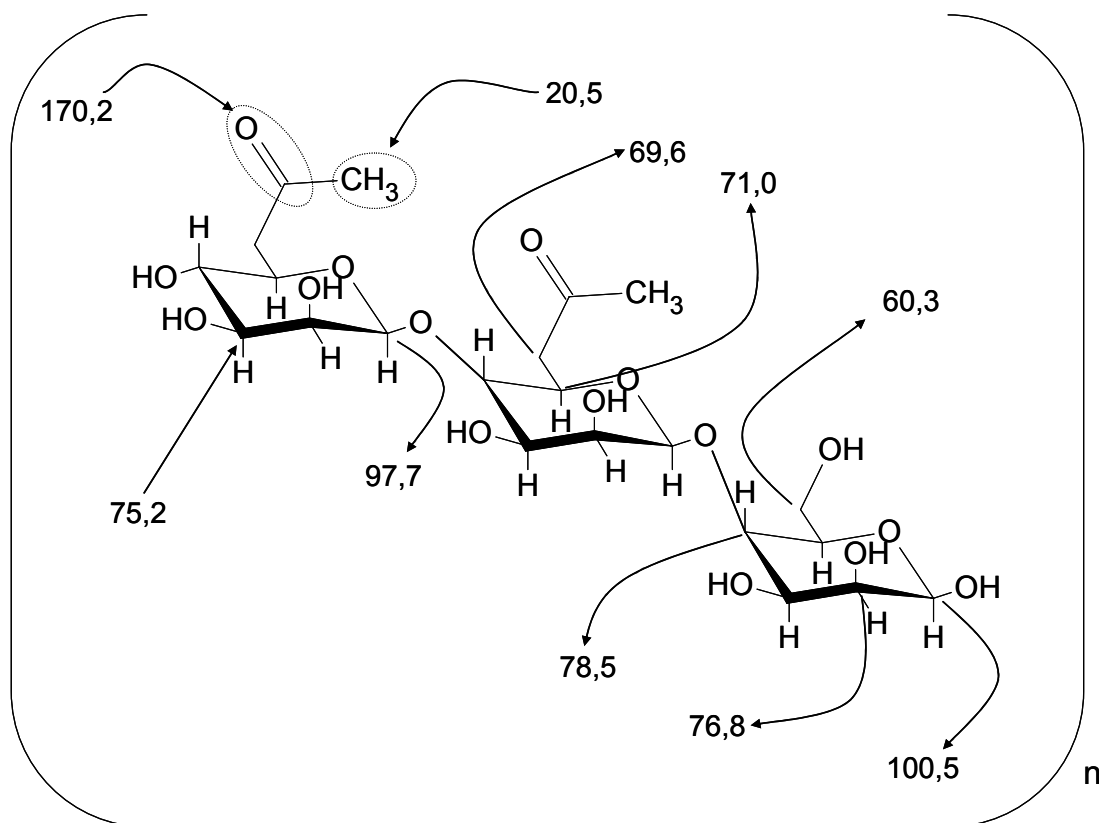


**Figura 37** – Espectros de <sup>13</sup>C-RMN (9,4 Tesla) de amostras da FPD de plantas distintas (PC), representativas das quatro estações do ano, em ordem cronológica crescente.

Conjuntamente, outros sinais, um em 124,6 ppm, apenas observado na coleta de julho nas PC (Figura 37), foi identificado igualmente como um grupamento aromático e o outro com  $\delta = 62,9$  ppm foi identificado como um resíduo pertencente a amidas. Nas amostras de julho/2006 em PM e em março/2006 em PC, não foram observados os sinais  $\delta = 28,8 - 30,6$  ppm, relativos à grupamentos metílicos de grupos acetil (WILLIAMS, FLEMING, 1995).

Em se tratando dos deslocamentos químicos relativos à caracterização do componente polissacarídico especificamente, alguns são considerados determinantes para a caracterização de sua estrutura, constituindo a impressão digital da molécula. Assim, os valores de deslocamentos químicos relativos aos carbonos do anel piranosídico e carbonos ligantes do anel são mostrados nas figuras 38 e 39, enquanto os valores relativos a cada deslocamento estão listados na tabela 7.

Os sinais foram atribuídos a carbonos das unidades de manose, sendo que não foram observados sinais referentes a outros açúcares, sendo as ressonâncias compreendidas entre 79 ppm a 85 ppm relativos a anéis furanosídicos (PERLIN et al., 1970 Apud Santa Rita, 1984).



**Figura 38** – Detalhe da estrutura química do constituinte básico da acemanana isolada da FP de *Aloe barbadensis*, com as indicações dos respectivos valores de deslocamentos químicos (<sup>13</sup>C-RMN, 9,4 Tesla).

**Tabela 7** – Deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN da FPD de coletas de plantas distintas de PM e PC

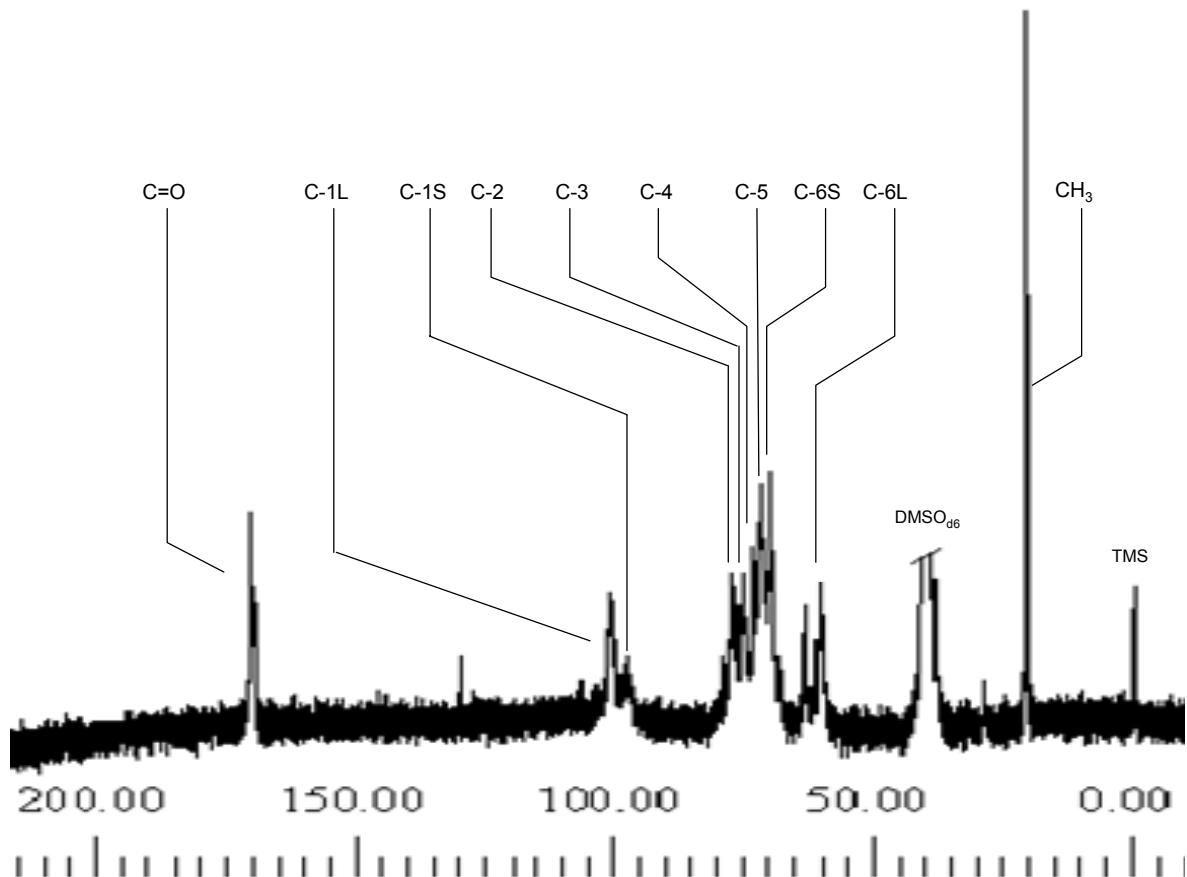
	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)									
	PC Jul/2005	PC Nov/2005	PC Jan/2006	PC Mar/2006	PM Jul/2005	PM Nov/2005	PM Jan/2006	PM Mar/2006	Acemanana	Padrão Comercial
C=O	170,2	170,2	170,2	170,3	170,2	170,4	170,3	170,3	170,3	171,9
C1 - Livre	100,5	100,4	100,5	100,8	100,6	100,6	100,3	100,5	100,2	100,6
C1- Substituído	97,7	97,4	97,5	98,1	97,7	97,8	97,5	99,7	97,4	97,1
C2	76,8	76,8	76,8	77,2	76,9	77,1	76,9	76,8	76,7	77,0
C3	75,2	75,3	75,1	75,3	75,2	75,2	75,3	75,1	75,0	76,6
C4	Nd	Nd	Nd	73,1	Nd	Nd	78,5	Nd	72,8	72,8
C5	70,9	71,1	71,0	71,3	71,0	71,0	71,8	71,0	70,8	71,8
C6-Livre	60,8	60,3	60,0	60,8	60,3	60,5	60,3	60,4	60,3	60,6
C6 - Substituído	69,6	69,6	69,5	70,0	69,6	69,8	69,6	69,6	69,6	69,8
CH <sub>3</sub>	20,5	20,5	20,5	20,9	20,5	20,6	20,5	20,5	20,5	20,9
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	177,6	-
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	173,6	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	177,2
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	176,5
S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	174,5
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	172,8
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	172,1
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S9	-	-	-	171,0	-	-	-	-	-	-
S10	-	-	-	171,0	-	-	-	-	-	-
S11	-	-	-	-	-	-	-	170,3	-	-
S12	-	-	-	170,0	-	-	-	-	-	-
S13	169,8	169,8	-	-	-	-	169,8	169,8	169,8	-





S48	-	-	-	-	-	-	77,1	-	-	-
S49	-	-	-	-	-	-	-	76,7	-	-
S50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S51	-	-	-	73,4	-	-	-	-	-	-
S52	-	-	-	-	-	-	73,1	-	-	-
S53	-	72,9	-	-	72,9	-	-	-	-	-
S54	-	-	72,8	-	-	-	-	-	-	72,8
S55	72,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S56	-	-	-	72,3	-	-	72,3	-	-	-
S57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72,2
S58	-	-	-	72,2	-	-	-	-	-	-
S59	-	71,9	-	-	-	-	-	-	-	-
S60	-	-	-	-	-	-	-	-	71,6	-
S61	-	-	-	-	-	-	71,4	-	-	-
S62	-	-	-	-	-	-	-	71,1	-	-
S63	-	-	70,5	-	-	-	-	-	-	-
S64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67,0
S66	-	-	-	-	-	-	-	-	66,9	66,8
S67	-	-	-	-	-	-	-	63,6	-	-
S68	-	-	-	63,4	-	-	-	-	-	-
S69	63,0	-	-	63,0	63,1	63,1	-	-	-	-
S70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S71	-	-	-	-	-	-	-	63,2	-	-
S72	-	-	-	-	-	-	-	-	63,0	-
S73	-	62,9	-	62,8	-	-	62,9	-	62,9	-
S74	-	-	-	62,1	-	-	-	-	-	-
S75	-	-	-	60,5	-	-	-	-	-	60,6
S76	-	-	-	60,3	-	-	-	-	-	-
S77	60,1	60,1	-	-	-	-	-	60,2	-	-
S78	-	59,8	-	-	-	-	-	59,7	-	-
S79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53,4
S80	49,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44,4
S82	-	30,6	-	-	-	-	-	-	-	30,6





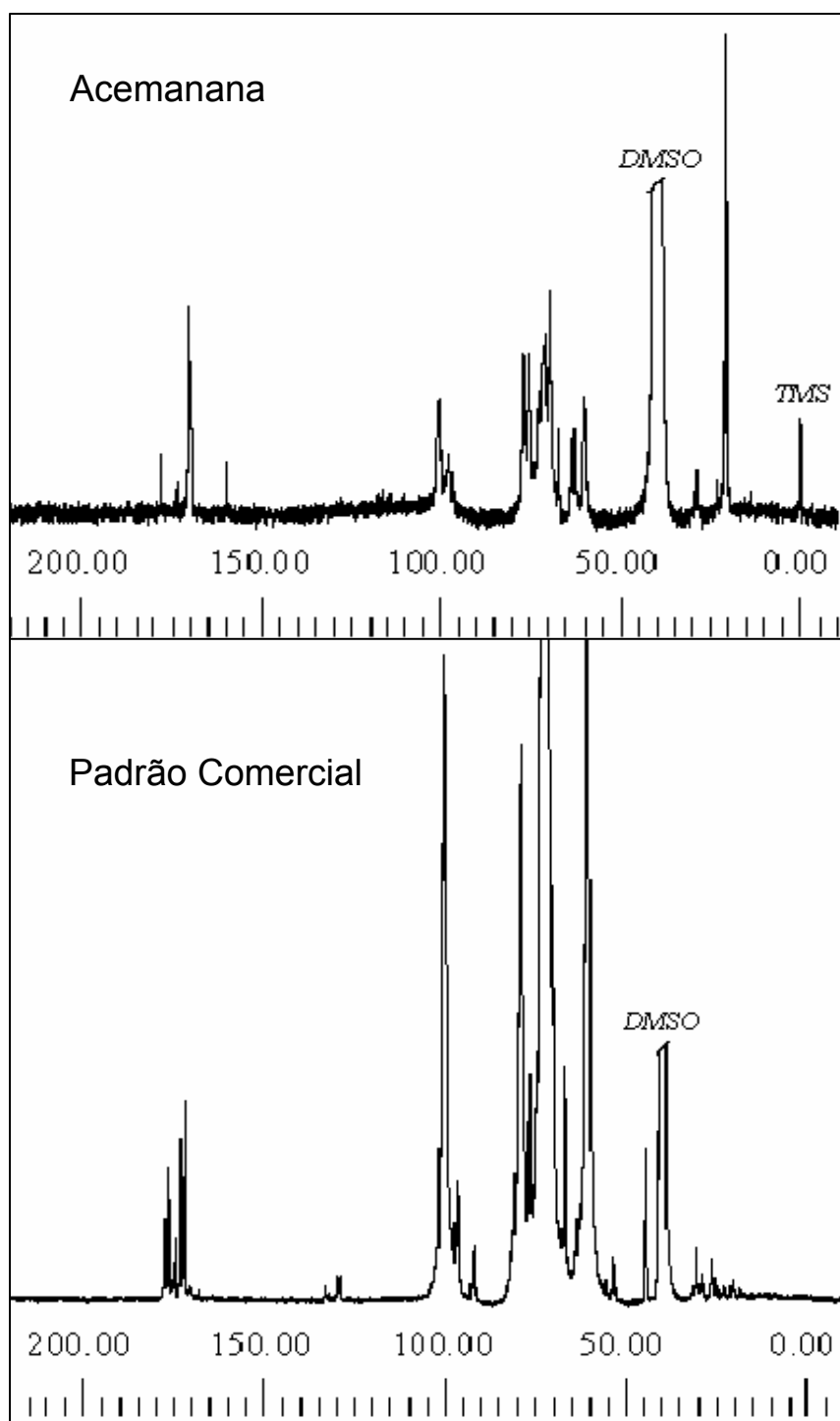
**Figura 39** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (9,4 Tesla) de amostra da FPD evidenciando os sinais de deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{ppm}}$ ) referentes à estrutura polissacarídica encontrada em *A. barbadensis*.

Sinais observados em 100,5 ppm indicam a presença de carbono 1 livre, enquanto as ressonâncias observadas em 97,7-98,1 ppm informa da existência de substituição, proveniente da ligação do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) em unidades manopiranosil. Trabalhos recentes (LEUNG et al., 2004; CHOW et al., 2005; KARDOŠOVA, MACHOVÁ, 2006) revelam que para a acemanana de *Aloe barbadensis* foram obtidos valores semelhantes para o deslocamento químico do carbono 1 livre e substituído: 100,6 e 98,1 ppm, respectivamente. Esta molécula possui C6 livre, o que é assinalado pelo deslocamento em 60,4 ppm, e C6 substituído, marcado pelo

sinal em 170,2 e 20,5 ppm, representando os grupamentos C=O e CH<sub>3</sub> do acetil, respectivamente (Figura 39).

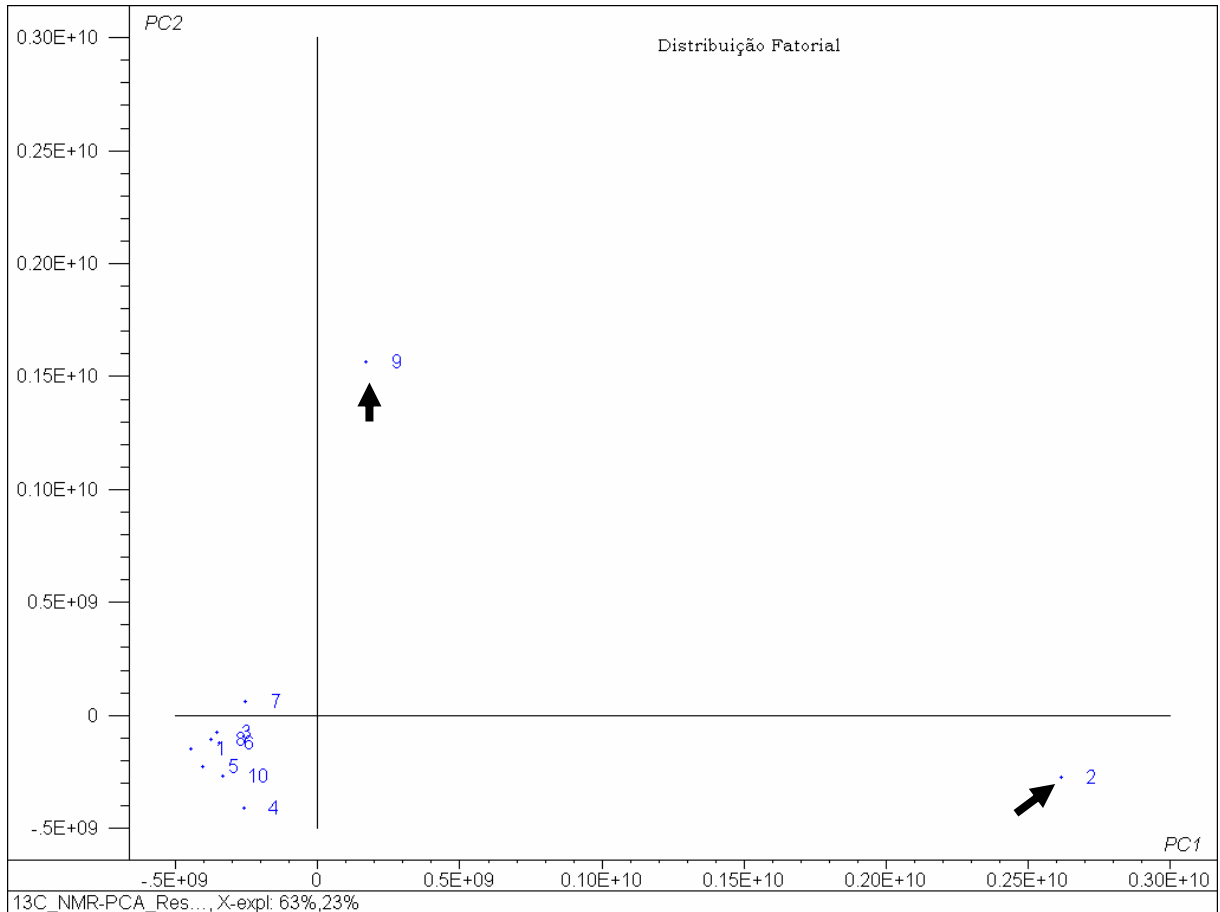
Somente os espectros das amostras de PC de março/2006, PM de janeiro/2006, da acemanana e do padrão comercial revelaram a existência de um sinal detectável para carbono 4. A amostra de PC de março/2006 apresentou um sinal em 73,2 ppm referente a C4, enquanto para as amostras de acemana e do padrão comercial esta ressonância foi detectada em 72,8 ppm e 72,9 ppm, respectivamente. Este carbono, devido à característica da ligação glicosídica é de detecção restrita, por ser um centro quiral. Em *Aloe barbadensis*, Kardošová e Machová (2006) mencionam que o sinal de C4 localiza-se em 77,1 ppm, enquanto outros trabalhos mostram que para espécies do mesmo gênero, a ressonância deste carbono foi detectada em 78,5 ppm, 72,3 ppm, 71,3 ppm, ou ainda em 79,0 ppm, sugerindo discrepâncias estruturais entre as amostras analisadas (LEUNG et al., 2004; YAGI et al., 1986).

É importante ressaltar que o padrão comercial utilizado por empresas apresentou um perfil espectral mais rico em sinais, comparativamente ao encontrado na acemanana purificada via cromatografia de gel permeação a partir da FPD (Figura 40) e também na própria FPD. É importante observar que o sinal em 20,5 ppm, característico do grupamento acetil não foi detectado. Em função disto, sugere-se que o padrão comercial disponível pode não apresentar um grau de pureza adequado para ser utilizado de maneira confiável em sistemas de análise, produção e de controle de qualidade daquela macromolécula ou de produtos derivados de *A. barbadensis*.



**Figura 40** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (9,4 Tesla) da amostra de acemanana isolada da FPD e de amostra de padrão comercial proveniente de *A. barbadensis*.

Os dados espectrais de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras em estudo foram submetidos à análise dos componentes principais e a distribuição fatorial dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) é mostrada na figura 41.

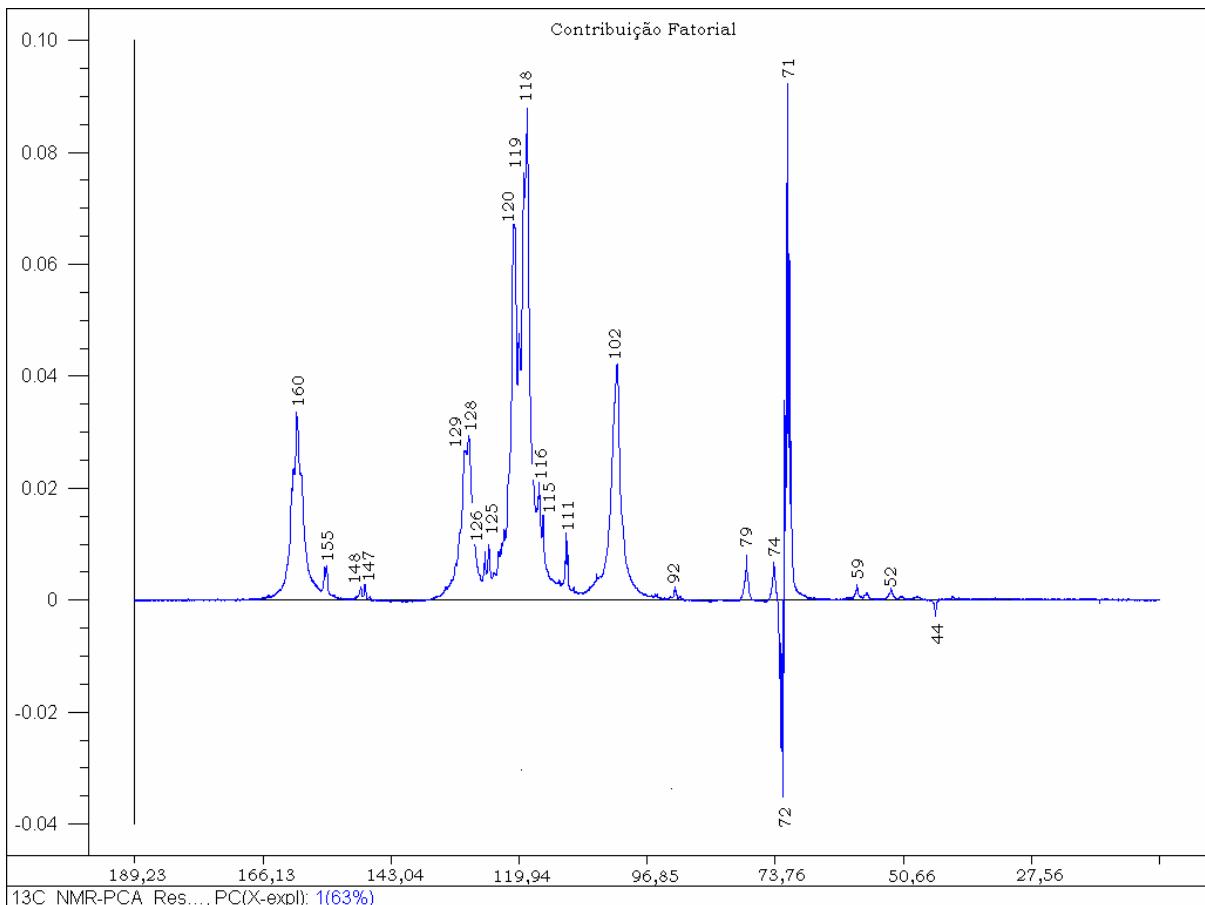


**Figura 41** – Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2 calculada a partir dos dados espectrais de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras da FPD, referentes a amostras de plantas distintas. A seta em (2) indica o padrão comercial, enquanto a seta em (9) a amostra de PC coletada em março/2006

A contribuição de PC1 e PC2 corrobora na elucidação de 86% da variância das amostras em estudo. Observou-se claramente o predomínio das amostras em PC1 negativo e PC2 negativo. De forma semelhante ao observado na análise por espectroscopia vibracional de infravermelho (FT-IR) associada à quimiometria, o padrão comercial de acemanana evidenciou um perfil espectral de  $^{13}\text{C}$ -RMN discrepante (PC1 + e PC2 -) em relação às demais amostras em estudo. Tal fato

subsidiar a crítica relativa à qualidade da amostra comercial, como composto de referência para análises mais detalhadas, no âmbito de sistemas produtivos ou analíticos.

A amostra 9 (PC, março/2006) apresentou um comportamento diferenciado em relação às demais (PC1 + e PC2 +), um fato atribuído, em alguma extensão, à ausência de um sinal característico em 29 ppm, referente ao grupamento metílico, comparativamente às demais amostras.



**Figura 42** – Contribuição fatorial (PC1) dos dados espectrais de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras da FPD (PC e PM).



A análise da contribuição fatorial de PC1 (Figura 42) apresentou sinais de interesse, notadamente no quadrante positivo, com destaque para as ressonâncias em 160 ppm (proteínas), 118-120 ppm (compostos fenólicos) e 71 ppm (carbono 5 do anel manopiranosídico) no quadrante positivo. De interesse em PC1 negativo, apenas o sinal em 72 ppm atribuído ao C4 foi um contribuinte importante na separação das amostras estudadas.

Esses sinais atribuídos aos carbonos do anel e grupamentos a eles associados, como o grupamento acetil ( $\delta=170$  e 20 ppm) são sinais intensos e em parte responsáveis pelo padrão de distribuição das amostras uma vez que a presença de um sinal intenso deste grupo demonstra o grau de degradação do polissacarídeo.

Por outro lado, moléculas contaminantes como proteínas ( $\delta=62$  ppm), formam outra fonte importante no que concerne à distribuição amostral.

## 1.7 CONCLUSÕES

Em coletas de plantas distintas, o maior pico de produção de aloína A foi detectado em julho/2005 para as duas populações (PM e PC).

Os fatores climáticos insolação e temperatura média diária bimestral não afetaram os conteúdos de aloína A nas amostras em estudo, enquanto a precipitação pluviométrica bimestral influenciou de forma significativa a concentração deste metabólito.

Em amostras de PD, a irradiação e a precipitação pluviométrica bimestral foram os fatores climáticos de efeito proeminente sobre a biossíntese de polissacarídeos do parênquima de reserva.

A diálise das amostras da fração polissacarídica mostrou-se como um pré-tratamento com efeito sobre as concentrações de carboidratos totais e proteínas totais, ao longo do período experimental.

O perfil cromatográfico da FPD hidrolisada revelou a predominância de manose, glucose e galactose como açúcares principais que a compõe.

Os espectros de FT-IR revelaram sinais de grupamentos funcionais de proteínas, lipídios e, em menor concentração, de compostos fenólicos, nas amostras da FP e da FPD, sugerindo a ligação destes à estrutura dos polissacarídeos em estudo.

A análise quimiométrica dos dados espectrais de FT-IR mostrou claramente o efeito de coleta, quando se comparam amostras dialisadas e não dialisadas.

A distribuição quimiométrica das amostras foi influenciada principalmente pela presença de sinais de grupamentos funcionais de compostos contaminantes da fração polissacarídica, i.e., proteínas, lipídeos e compostos fenólicos.

As amostras de acemanana e do padrão comercial influenciam na separação quimiométrica obtida a partir dos dados espectrais (FT-IR) do conjunto total de amostras, sendo o padrão comercial de acemanana um *outlier*.

O perfil espectral de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras não apresentou variações de interesse durante o período experimental, sugerindo uniformidade estrutural da composição polissacarídica.

A análise dos dados espectrais de  $^{13}\text{C}$ -RMN demonstrou que a acemanana obtida neste estudo apresentou um grau de pureza superior em relação ao padrão comercial utilizado na indústria como referência, sugerindo que o controle de qualidade efetuado para este polissacarídeo deve ser otimizado no âmbito de sua produção em larga escala.

A análise quimiométrica (PCA) dos dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras sazonais da FPD revelou a existência de similaridades estruturais, exceção feita ao padrão comercial de acemanana, cuja separação em relação às amostras da FPD foi determinada principalmente pelas ressonâncias de C1, C2, C3, C4, C5, C6 do anel piranosídico, bem como do grupamento acetil.

## **CAPÍTULO 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

### **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E ETNOFARMACOLÓGICOS**

O conhecimento acerca das babosas remonta a antiguidade. Em meados do século 16, segundo comentários de Mattioli e Laguna sobre o capítulo 23 do Livro III da obra de Dioscórides, a planta chamada aloe era comum em grande parte da Itália, sendo cultivada em jardins e vasos (QUER, 1982).

Evidências históricas indicam a origem africana das babosas, havendo registros de espécies cultivadas no Egito há milhares de anos, assim como sua utilização pelos povos do Mediterrâneo que remontam ao ano de 400 a.C. (ARAÚJO et al., 2002). As babosas têm sido usadas terapeuticamente desde o período de dominação romana (REYNOLDS, DWECK, 1999; TURNER et al., 2004). O extrato do parênquima clorofiliano seco é usado como catártico, enquanto o extrato do parênquima de reserva é amplamente aceito, desde o século 4 a.C., como um remédio para o alívio de dores e tratamento de uma variedade de doenças (CHOW et al., 2005).

Os chineses têm utilizado há milênios as babosas no tratamento da constipação intestinal (CHUNG et al., 1996; TIAN, HUA, 2005) e como fortificante do estômago (CHUNG et al., 1996). As babosas são utilizadas na medicina tradicional mexicana e em outros países com finalidades medicamentosas e cosméticas (VÁSQUEZ et al., 1996; QUI et al., 2000; BAUTISTA-PÉREZ et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2005).

Embora existam mais de 250 espécies do gênero *Aloe*, somente três ou quatro dessas apresentam propriedades medicinais, sendo *Aloe barbadensis* a de maior interesse terapêutico e nutricional (ARAÚJO et al., 2002). As babosas são plantas importantes, largamente utilizadas na medicina popular, devido aos seus efeitos benéficos, tais como, calmante da pele, no tratamento de queimaduras, em diabetes, hepatite, obesidade e no controle das taxas de lipídios no sangue (DANHOF, McANALLEY, 1983; GRINDLAY, REYNOLDS, 1986; SYDISKIS et al., 1991; McANALLEY et al., 1995; AVILA et al. 1997; OKAY et al., 2001) e ainda como agente cicatrizante, antiulcerativo, antineoplásico e antiviral (SAKAI, 1989; KOBAYASHI et al., 1993; MAEDA et al., 1998; KIM et al., 1999; PAEZ et al., 2000).

Da mesma forma, Simões et al. (1996) citam o uso popular do suco das folhas de *Aloe arborescens* Miller, no Rio Grande do Sul como laxante, emenagogo, antifebril e ainda como abortivo. Em aplicações tópicas, o suco é utilizado como emoliente, revulsivo, cicatrizante e para aliviar as dores de queimaduras (TYLER et al., 1971; NATH et al., 1992; CHITRA et al., 1998).

Uma prática usual do povo loruba, do sudoeste da Nigéria, é a confecção de sabonetes manufaturados localmente utilizando extratos vegetais, com utilização em ferimentos, úlceras e outras afecções da pele. *Aloe barbadensis* e *Ageratum conyzoides* são, por exemplo, incorporados a estes sabonetes pelos curandeiros tradicionais para o tratamento de furúnculos, micoses, ferimentos e odores corporais (MOODY et al., 2004).

## 2.2 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO *Aloe*

### 2.2.1 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO

A aloe-emodina é a aglicona responsável pelo forte efeito laxativo, sendo seu mecanismo creditado à influência na motilidade do intestino grosso, um fenômeno associado à inibição da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ou dos canais de  $\text{Cl}^-$  na membrana colônica, resultando em acelerado trânsito do bolo fecal através do cólon. Adicionalmente, aquele metabólito secundário estimula a secreção de muco e de cloretos que determinam um aumento do conteúdo de fluidos na luz intestinal, determinando um efeito laxativo (CAPASSO et al., 1983; ISHII et al., 1990; ESCOP, 2003). Uma outra antraquinona, a isobarbaloína é decomposta em aloe-emodina-9-antrona e barbaloína, quando administrada oralmente (ISHII et al., 1990).

Atenção considerável vem sendo dada à possibilidade de uso da aloe-emodina como fármaco na quimioterapêutica para o tratamento de vários tipos de câncer. Tem sido relatado que a aloe-emodina apresentou atividade antitumoral em câncer de origem neuroectodérmico (PECERE et al., 2000), em neuroblastoma, carcinoma de pulmão, hepatoma celular e em linhagens de células leucêmicas, células promieloleucêmicas HL-60 e em células de carcinoma de Merkel (LEE et al., 2001; LEE et al., 2001b; CHEN et al., 2002; WASSERMAN et al., 2002; CHUNG et al., 2003).

O mecanismo de ação da aloe-emodina envolve possivelmente o processo de apoptose, em razão da fragmentação do DNA e das características morfológicas apresentada pelas células, assim como das evidências de modulação das famílias

de proteínas Bcl-2, Bax e Faz e do aumento na concentração das proteínas apoptóticas p53 e p21. O mecanismo de indução à apoptose de aloe-emodina parece envolver a proteína quinase C (PKC). Os agentes que inibem as isozimas de PKC podem bloquear a progressão de alguns tipos de tumores. Informações dos efeitos da aloe-emodina na proliferação celular e sobre isozimas de PKC são de interesse, considerando que a superprodução de PKC está relacionada ao rápido crescimento de gliomas em ratos (KUO et al., 2002). Evidências bioquímicas para a ação apoptótica da aloe-emodina indicam que células da linhagem CH27, tratadas com aloe-emodina, mostram ativação de caspases e um aumento na concentração relativa de citocromos C, na fração citosólica. O aumento na concentração de citocromo C resulta em depleção mitocondrial e finalmente na morte apoptótica das células CH27 (LEE et al., 2001).

A emodina é uma antraquinona que tem sido mencionada por exibir propriedades anti-inflamatórias, pela redução da produção de citocinas em linfócitos-T humanos e células endoteliais (KUMAR et al., 1998; KUO et al., 2001). Ela demonstra também efeitos antiproliferativos em várias linhagens celulares de câncer ao promover a apoptose via caspases (SRINIVAS et al., 2003), ou ainda por meio da inibição da proteína tirosina quinase (CHAN et al., 1993). Os efeitos antibacterianos da emodina em *Escherichia coli* são explicados em razão deste interferir na respiração e também no transporte de solutos nas membranas. Outras antraquinonas derivadas de *Aloe barbadensis*, como a aloe-emodina, têm também mostrado efetiva atividade antibacteriana em concentrações micromolares, especialmente para bactérias gram-positivas (CHAN et al., 1993; KUMAR et al., 1998; KUO et al., 2001; SRINIVAS et al., 2003).

Várias antraquinonas, entre as quais a emodina, têm mostrado atividade antiviral e/ou virucida contra vírus envelopados (COHEN et al., 1996; ANDERSEN et al., 1991). O extrato glicérico de babosa e aloe-emodina isolada exerceram efeito virucida em vírus envelopados como herpes vírus simples, vírus da varicela-zoster, pseudorabies e influenza vírus, mais provavelmente pelo rompimento causado ao envelope viral (SYRDISKIS et al., 1991).

As antraquinonas, além de atuarem como antioxidantes e como captadoras de radicais livres, podem exibir atividade antiprotozoária. É também citada sua atividade inibitória sobre o crescimento de *Helicobacter pylori*, uma bactéria associada ao surgimento de câncer gástrico (WANG et al., 1998; CAMACHO et al., 2000).

Ácido crisofânico (1,8-dihidróxi-3-metil-antraquinona) tem mostrado inibir a evolução dos estágios do ciclo de replicação de vírus não envelopados como o poliovírus (Picornaviridae) (SEMPLE et al., 2001). Outras antraquinonas, como a reína, alizarina e quinalizarina exibiram atividade antiviral não virucida contra citomegalovírus humano (BARNARD et al., 1992).

Somando-se aos bem documentados efeitos positivos sobre a saúde humana, existem também os efeitos negativos destas antraquinonas que têm sido descritos, uma vez que um grande número de antraquinonas pode causar desde irritação da pele e eritema até o aumento da proliferação celular (WINTERS et al., 1981; DANHOF, McANALLY, 1983). Quinonas podem elicitar esses efeitos ao induzir reações com grupos tióis de proteínas, ou ainda a produção de espécies reativas de oxigênio. O efeito tóxico relatado para células normais humanas e células tumorais *in vitro* do extrato do parênquima reserva de *Aloe barbadensis* poderia estar relacionado com a geração de antraquinonas, como a aloína, formadas



pela oxidação de compostos de baixo peso molecular (O'BRIEN, 1991; CHAPMAN, 1995).

### **2.2.2 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO PARÊNQUIMA DE RESERVA**

Muitos dos constituintes químicos do extrato do parênquima reserva de babosa são responsáveis por suas propriedades cicatrizantes e imunoestimulantes, a exemplo da glicoproteína aloctina A, que é descrita por suas propriedades anti-ulcerativa e antitumoral (IMANISHI, 1993) e de outra glicoproteína de 29 KDa, que têm sido relacionada ao aumento da proliferação de células da derme humana (YAGI et al., 1997)

Além disso, muitos outros compostos com propriedades imunomodulatórias tipo lectina têm sido isolados do extrato do parênquima de reserva de *Aloe barbadensis* (VÁZQUEZ et al., 1996; BAUTISTA-PÉREZ et al., 2004). Im et al. (2005), estudando uma fração polissacarídica de *Aloe barbadensis* tratada com celulase, mostraram que a atividade imunomodulatória ótima foi conseguida com a aplicação de polissacarídeos de peso molecular entre 5 e 400 KDa e que frações de pesos moleculares acima ou abaixo destes valores mostravam atividade inferior.

Foi documentado a utilização bem sucedida do extrato do parênquima de reserva em doenças do aparelho digestivo, como agente virucida, bactericida e fungicida (FEMENIA et al., 1999). Sampedro et al. (2004) relatam as mesmas propriedades para a espécie *Aloe saponaria* que também é citada por apresentar atividade hemoaglutinante e por promover o crescimento de células humanas

normais em cultura, ao mesmo tempo em que inibe o crescimento de células tumorais.

A acemanana tem sido incluída em produtos cicatrizantes disponíveis comercialmente e indicados para tratamento de ferimentos crônicos, aftas e na redução da cavidade bucal associada ao local da extração do terceiro molar, por exemplo. Além disso, o polissacarídeo purificado apresentou atividade imunoestimulante, demonstrando um efeito adjuvante na produção de anticorpos específicos e no aumento da liberação de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). A liberação destas citocinas determinou um aumento de 300% na replicação dos fibroblastos em cultura de tecidos, além de estimular a atividade fagocítica dos macrófagos. A proliferação dos fibroblastos é significativa em processos de restauração tissular decorrente de queimaduras e úlceras, bem como em outros tipos de ferimentos da pele e do revestimento gastrointestinal (McANALLEY, 1990; KAHLON et al., 1991; SHAND et al., 1999).

O extrato do parênquima de reserva das folhas frescas de *A. barbadensis* é utilizado em uma variedade de estados patológicos, como queimaduras, artrite, gota, acne, dermatites e úlceras pépticas e redução do risco de infecções (GRINDLAY, REYNOLDS, 1986; JOSHI, 1998; MORTON, 1961; DIEZ-MARTINEZ, 1981). Além disto, é utilizado como protetor da pele e como agente amaciante e suavizante em indústrias cosméticas e farmacêuticas e ainda como suplemento dietético em algumas bebidas (BAUDO, 1992; SACCU` et al., 2001). É também citado que o extrato do parênquima de reserva de *A. barbadensis* possui propriedades anti-diabéticas (OKAY et al., 2001). Sugere-se, entretanto, que o extrato do parênquima de reserva de *A. barbadensis* exerça atividades terapêuticas

por meio da interação sinérgica de seus constituintes (FEMENIA et al., 1999), incluindo alcalóides, saponinas, ácidos graxos, glicoproteínas, resinas, esteróis, geloninas, minerais, vitaminas (A, C e E), amino-ácidos, enzimas e outras pequenas moléculas (YUSUF et al., 2004). Por outro lado, há relatos de que os polissacarídeos exercem atividade anti-tumoral sem qualquer ação sinérgica com outros componentes (FEMENIA et al., 1999).

Simultaneamente, os polissacarídeos de babosa mostraram efeito inibitório na formação *in vivo* e *in vitro* do aducto de DNA-benzo[ $\alpha$ ]pireno. Contudo, os mecanismos responsáveis por essa ação quimiopreventiva ainda são pouco entendidos (KIM, LEE, 1997).

Pesquisas em caráter clínico utilizando componentes de *A. barbadensis* resultaram em um produto comercial com base no extrato do parênquima de reserva denominado Acemannan Immunostimulant™, que foi aprovado para tratamento de fibrosarcoma em gatos e cães (KENT, 1993; MANNA, McANELLEY, 1993; NI et al., 2004), via administração parenteral (HARRYS et al., 1991; KING et al., 1995; LEE et al., 2001; SAMPEDRO et al., 2004). Muitos dos processos industriais relativos à obtenção de produtos oriundos de babosa têm sido alvo de patentes, despertando grande interesse por parte das indústrias alimentícia e farmacêutica, conforme demonstrado na Tabela 8.

Adicionalmente, atividades antiviral, antibacteriana, imunoestimulante e redutora de reações induzidas por radiação sobre a pele (FEMENIA et al., 1999), bem como a aceleração da cura de ferimentos têm sido relatadas para outra manana, a Acemannan Hydrogel™, uma manana polidispersa acetilada, encontrada no extrato do parênquima de reserva. (TURNER et al., 2004).

Estudos *in vitro* indicam que a acemanana tem limitada atividade antiviral contra herpes, sarampo e o vírus da imunodeficiência humana, inibindo sua replicação *in vitro*. Além disso, na forma injetável, encontrou-se uma ação benéfica em gatos infectados por FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina) (YATES et al., 1992), porém os mecanismos envolvidos neste processo são desconhecidos até o presente momento.

**Tabela 8** – Patentes de produtos e processos industriais obtidos a partir de *Aloe barbadensis* registrados na Europa entre 1984 e 2001

Número da Patente	Detentor	Inventor	Título	Data
US4446131	Aloe vera of América INC (US)	Maughan Rex G (US)	Controlled temperature process for manufacturing of improved stabilized <i>Aloe vera</i> (Controle da temperatura no processo para melhorar a fabricação de <i>Aloe vera</i> estabilizado)	1984
US4735935		McAnalley	Sterelization by $\gamma$ or microwave radiation (Esterilização por radiação $\gamma$ ou microondas)	1988
US5356811		Coats	Oxidation+membrane filtration (Oxidação+membrana de filtração)	1994
CN1216232	Huang Xiaozhou (CN)	Huang Xiaozhou (CN)	Extraction of Aloe polysaccharide (Extração do polissacarídeo de babosa)	1999
CN1216232	Huang Xiaozhou (CN)	Huang Xiaozhou (CN)	Extraction of Aloe extract (Extração do extrato de babosa)	1999
EP1091970	Steba Beheer N V (NL)	Cohen Avraham (IL)	Method for preparing aloin by extraction (Método para a preparação de aloína por extração)	2001

**Fonte:** www.sbrt.ibict.br. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (TECPAR- Instiuto de Tecnologia do Paraná, 2006; Waller et al., 2004)

Dada à ampla diversidade de atividades biológicas (Tabela 9), sugere-se que um mecanismo comum possa envolver a ativação de macrófagos mediado pela acemanana (ZHANG; TIZARD, 1996), porém essa molécula não é a única com a habilidade de elicitar as atividades farmacológicas citadas. Uma variedade de glicanas são capazes de exercer as atividades antiviral, antitumoral, ativadoras de macrófagos, de células T, entre outras (McANALLEY et al., 1990; KOLENDER et al., 1995; SHAND et al., 1999). Schepetkin e Quinn (2006) apresentaram um modelo de mecanismo pelo qual polissacarídeos oriundos de plantas atuam na via de ativação de macrófagos.

Algumas das atividades imunoestimulantes da acemanana parecem ser mediadas através da ativação de macrófagos, inclusive durante o processo de cicatrização, onde estes atuam como fagócitos e agentes debridantes produzindo fatores que influenciam a angiogênese e o processo de reparação dos ferimentos (CHITHRA, 1998b). Lee et al. (2001) relatam que as acemananas estimularam os macrófagos a produzir citocinas inflamatórias como IL-1, IL-2 e TNF- $\alpha$  e que a acemanana em presença de IFN- $\gamma$ , também levou ao aumento na produção de óxido nítrico (KARACA et al., 1995). A acemanana pode manifestar estas atividades imunomodulatórias via ligação da manose com receptores presentes nos macrófagos, produção de óxido nítrico e estímulo das células T. Células dendríticas são importantes células acessórias para a ativação de células T-*virgens* e a geração de respostas em células T primárias. Em razão de as células dendríticas possuírem receptores de manose, as acemananas podem supostamente ligar-se a elas resultando na atividade imunomodulatória, através da ativação dos receptores de manose., entretanto altas concentrações de acemanana (200 a 2000 $\mu$ g/mL) são requeridas para provocar uma modesta ativação dos macrófagos (KARACA et al.,

1995). A acemanana mostrou aumento na resposta linfocitária a aloantígenos *in vitro*, exibiu atividade adjuvante em vacinas contra vírus e aumenta a taxa de sobrevivência em animais vírus-infectados (LEE et al., 2001).

Foi demonstrada a atividade anti-inflamatória do extrato do parênquima de reserva de babosa associada à atividade inibitória das ciclooxigenases, com a conseqüente inibição da síntese de prostaglandinas, um dos principais mediadores do processo inflamatório (DAVIS et al., 1984).

Efeitos positivos do extrato aquoso de *Aloe barbadensis* têm sido relatados durante o tratamento de lesões em ratos diabéticos. Além disso, um potente antioxidante foi isolado do extrato metanólico de *Aloe barbadensis* Miller, que demonstrou atividade *in vitro*, semelhante a do  $\alpha$ -tocoferol (CHITHRA et al., 1998; SINGH et al., 2000).

Kar e colaboradores (2002), ao estudarem o efeito dos extratos de *Bacopa monnieri*, *Aegle marmelos* Linnè e *Aloe barbadensis* na eficácia da regulação da função da tireóide, concluíram que *A. barbadensis* diminuiu a concentração de hormônios T3 e T4, em 25% e 13% respectivamente. Estes resultados indicam que o extrato desta planta é menos efetivo na redução da concentração destes hormônios se comparada, por exemplo, à *B. monnieri* que apresentou redução de 62% da concentração de T3. Porém, os autores citam que o extrato de babosa poderia ser utilizado no tratamento em casos de hipertiroidismo suave, por não haver apresentado efeito hepatotóxico.

Saks, Barkai-Golan (1995), estudaram a atividade anti-fúngica do extrato do parênquima de reserva de *A. barbadensis* nas concentrações de  $1 - 10^5 \mu\text{L.L}^{-1}$  sobre quatro fungos de pós-colheita de frutos: *Penicillium digitatum*, *Penicilum expansum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*. Foi constatado que o efeito inibitório ocorria

pela supressão da germinação e do crescimento micelial. Estes autores também demonstraram que o retardamento da colonização da lesão nos frutos de toranja *in vivo* por *Penicillium digitatum*, dependia da concentração do extrato.

De forma similar, Rodriguez e colaboradores (2005) testaram o extrato do parênquima de reserva e uma fração líquida do parênquima clorofiliano de *A. barbadensis* contra fungos fitopatogênicos: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum coccodes*, isolados de culturas de batata. Testando concentrações de 0 a  $10^5 \mu\text{L.L}^{-1}$  do extrato do parênquima de reserva, os autores concluíram que houve eficácia na inibição do crescimento dos patógenos testados. O extrato do parênquima de reserva demonstrou maior atividade antifúngica contra *F. oxysporum* e a fração líquida sobre todos os três fitopatógenos. Desta forma, ambos poderiam ser uma alternativa natural para o controle de fungos em plantações comerciais, em relação à aplicação de fungicidas químicos.

**Tabela 9** – Compostos presentes em *Aloe barbadensis* Miller e suas atividades biológicas (Adaptado de CHOI e CHUNG, 2003).

<b>Classe</b>	<b>Composto</b>	<b>Atividades biológicas</b>
Antraquinonas	Aloe-emodina, emodina, aloína, barbaloína, ácido aloético, antranol e isobarbaloína	Purgativa, proliferação celular, antitumoral, antiprotozoário, antibacteriana, antioxidante, antifúngica, genotóxicas, mutagênicas.
Carboidratos	Celulose Glucose Manose Aldopentose Manana acetilada (acemanana) Glucomanana Glucomanana acetilada Glucogalactomanana Galactoglucoarabinomanana	Imunomodulatória, antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória, antiviral, antifúngica, antioxidante, hipoglicemiante, cicatrizante munomoduladoria, antitumoral, proliferação celular, cicatrizante Imunomoduladoria, antitumoral Imunomoduladoria, antitumoral
Vitaminas	B1 B2 B6 C  β-caroteno Colina Ácido fólico α-tocoferol	Antioxidante
Enzimas	Amilase Carboxipeptidase Catalase Ciclooxidase Lípase Oxidase	
Substâncias de baixo peso molecular	Ácido araquidônico Giberilina Substâncias tipo lectina Lignina Ácido salicílico Esteróides Triglicérides Ácido úrico β-sitosterol Aloesina	Antiinflamatório, pró-angiogênico Aumento da proliferação celular, inibição da síntese de melanina



### 2.3 CARACTERÍSTICAS DOS PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE VASOS SANGÜÍNEOS.

A formação de vasos sangüíneos envolve os mecanismos celulares de proliferação, migração e diferenciação. Entre os diversos processos de vascularização, vasculogênese e angiogênese apresentam entre si importantes similaridades e diferenças (RISAU et al., 1988; RIBATTI et al., 2001)

A vasculogênese é um processo definido como o desenvolvimento de vasos sangüíneos a partir da diferenciação *in situ* de células mesodérmicas, progenitoras de células endoteliais (angioblastos e hemangioblastos). Estas células precursoras são recrutadas de áreas de mesoderma adjacentes ao embrião e/ou, originadas por divisão celular local, organizando ilhotas sangüíneas e estabelecendo um plexo vascular primordial (RUITER et al., 1992).

Durante a embriogênese inicial, a vascularização se processa por vasculogênese. Subseqüentemente, através da angiogênese, a rede de vasos primários apresenta uma remodelagem, combinando eventos de morte e regressão vascular com a ramificação de capilares a partir de vasos preexistentes, os quais proliferam para viabilizar o crescimento do corpo (FOLKMAN, 1971). No embrião, os dois processos de formação de vasos coexistem; por exemplo, o desenvolvimento do coração e dos grandes vasos ocorre por vasculogênese, enquanto órgãos que requerem invasão de vasos sangüíneos para o desenvolvimento (cérebro, pulmões e fígado) são supridos por angiogênese (RISAU et al., 1988).

Em uma visão ortodoxa, considerava-se que a vasculogênese está limitada à embriogênese inicial, não ocorrendo no adulto, enquanto a angiogênese ocorre em ambos os períodos. Entretanto, observações recentes indicam que essa distinção

não é absoluta, visto que ambos os processos requerem proliferação e migração de células endoteliais, bem como a reorganização qualitativa e quantitativa (remodelagem) dos vasos recém-formados (RIBATTI et al, 2001). Além disso, evidenciando que a vasculogênese não estaria restrita à embriogênese, células precursoras vasculares, podem em determinadas condições, ser incorporados aos vasos sanguíneos, que se formam a partir da vascularização pré-existente, em adultos, tanto em patologias vasculares, como fisiologicamente (ZAMMARETTIA, ZISCH, 2005).

Os eventos teciduais que se sobrepõem nos processos de vasculogênese e angiogênese incluem a perda de adesão das células vizinhas, proteólise da matriz extracelular proximal, migração e proliferação celulares, formação do tubo vascular (tubulogênese) e deposição da membrana basal (D'AMORE, THOMPSON, 1987; TOBELEM, 1990; GUMBINER, 1996; KALLURI, 2003).

Segundo Risau et al. (1998), os processos de vasculogênese e angiogênese são regulados de maneira distinta, entretanto, de acordo com Rafii et al. (2002) e Bergers e Benjamin (2003), fatores que estimulam a angiogênese, tais como VEGFA (*Vascular Endothelial Growth Factor – A*), PGF (*Placental Growth Factor*) e ANG1 (*Angiopoietin-1*), são conhecidos também por estimular o processo de vasculogênese, sendo que a formação de capilares a partir de vasos preexistentes (angiogênese) é usualmente desprezível após ter sido alcançada a estatura do adulto (FOLKMAN, 1971; FOLKMAN, SHING, 1992). Porém, ao longo da vida esse processo continua desempenhando um papel fundamental em inúmeros processos fisiológicos, por exemplo, no ciclo reprodutivo feminino e na cicatrização (FOLKMAN et al., 1988; BERGERS, BENJAMIN, 2003). Além disso, a angiogênese é um processo estritamente regulado, que pode ser rapidamente estimulado ou

inibido (HANAHAN, FOLKMAN, 1996). Nos últimos anos, os mecanismos básicos deste processo têm sido cada vez mais compreendidos e têm sido demonstrado que ele é fortemente controlado pelo balanço da síntese de numerosos fatores pró e anti-angiogênicos (TUETEMBERG et al., 2006).

A angiogênese é, na maioria das vezes, mediada pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que em condições de hipóxia ou hiperóxia contribui para a progressão de tumores, por exemplo. Baixo pH intratumoral, hipoglicemia, stress e inflamação induzidos pelo aumento da massa tumoral, também promovem a angiogênese (FAYETTE, 2005), sendo essencial para o crescimento de tumores primários e as metástases subseqüentes (PANDYA et al., 2006). A lista de reguladores inclui ainda as citocininas, hormônios e fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular como a laminina e fibronectina e seus receptores: integrinas alfa V, metaloproteinases da matriz e seus inibidores nos tecidos, outras proteases (i.e., urokinases e ativadores de plasminogênio, uPA, tPA), fibrina, células inflamatórias e pericitos (Tabela 10) (ZYGMUNT et al., 2003).

**Tabela 10** – Promotores e inibidores da angiogênese, produtos comercializados ou que se encontram em fase de testes clínicos.

Promotores	Inibidores	Fatores angiostáticos (terapêuticos) ou inibidores em desenvolvimento
VEGF – A, B, C, D	Angostatina	Talidomida
Angiopoietina-1	Anti-angiogênico anti-trombina III	CM 101 (polissacarídeo bacteriano de GBS)*
β-Estradiol, estrógenos	Constatina	Fumagilina (de <i>Aspergillus fumigatus</i> )
aFGF, Bfgf	Endostatina (fragmentos de colageno XII and XVIII)	TNP – 470 (derivado da fumagilina)*
IL-8	Fragmentos de Fibronectina	RU-486*
Leptina	Heparinases	Esteróides (?)
MCP-1, IGF	INF-α, β, γ, Vasostatina (fragmento de calreticulina)	Neo vastat**
MMPs	IL4, IL12, IL18	Angiozyme**
NOS	PAI-1	Endostatin**
PDGF-BB	PEDF	Bevacizumab**
TNF-α	Prolactina – fragmento 16 kDa	ZD6474*
Angiogenina	TSP-1	SU 6668*
TGF α, β	Retinóides	PTK 787/vatalanib**
HGF/scattered factor	Carotenóides	BMS-275291*
EGF	Trombospondina	COL-3*
PGF	Troponina 1	WX-UK1, WK293*
G-CSF	Angiopoietina 2	Avastin**
Pleiotrofina	PF 4	ZD6474, SU6668, NM3*

Proliferina

Enzimas – catepsina B, D, uroquinase, metaloproteinases, COX-2, LOX 1, 2, proteases, farnesiltransferase

Suramina

2 – Metoxiestradiol

Gleevec\*\*

Angiostatina

Dopamina

Fucoidanas, sarg (sargassanas) e outros polissacarídeos sulfatados.

Polissacarídeos de parede Celular (de fungos)

\* Produtos em fase de testes clínicos

\*\* Nomes comerciais dos produtos

(CRISTOFANILLI et al., 2002; LOSSO, 2003; ZYGMUNT et al., 2003; COLLINSON, DONELLY, 2004; FAYETTE et al., 2005; DIAS, 2005; DIAS, 2007)

Muitas técnicas *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidas para o estudo das respostas angiogênicas. Dentre os modelos de estudo *in vivo*, Byrd e Grabel (2004) utilizaram a técnica de estudo em vasos axilares de zebra-fish e em saco vitelínico de embriões e indivíduos adultos de camundongo. Zygmunt et al (2003) lista ainda como métodos *in vivo*, a microcirurgia corneal e os ensaios de membrana corioalantóica em embriões de aves.

#### **2.4 MODELOS DE ESTUDO DE VASCULARIZAÇÃO E MORFOGÊNESE EMBRIONÁRIA VOLTADOS À INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE *A. barbadensis*.**

No âmbito dos estudos de vascularização, através dos ensaios de vesícula vitelínica e de membrana corioalantóica, a utilização de ovos de galinha fertilizados traz algumas vantagens aos laboratórios. A rotina de incubação em estufas é simples, econômica e oferece a possibilidade de manipulação de um número racional de unidades amostrais (SCHOENWOLF, 1994).

A fisiologia, a genética e a embriologia da espécie *Gallus domesticus* estão extensamente documentadas e apresentam significativa similaridade com o correspondente no organismo humano. Além disso, cada embrião desenvolve-se em um ambiente próprio, livre da influência materna ou placentária, e o acesso aos vasos sanguíneos e ao embrião é facilitado, podendo os tratamentos ser realizados precocemente, com menos de 20 h de incubação (MOURY, SCHOENWOLF, 1995).

O primeiro indício da presença de vasos sanguíneos nos ovos de *G. domesticus* é observado após 24 h de incubação (EYAL-GILADI, 1991). Na área

vasculosa localizada nas bordas do blastodermo (camada germinativa de desenvolvimento do embrião) são evidenciadas as ilhotas sangüíneas. Tais estruturas consistem em agregados de células endoteliais que têm origem na camada germinativa intermediária do embrião – o mesoderma extra-embriônico. Entre 26 e 29 h de desenvolvimento (estádio 8). As ilhotas sangüíneas anastomosam-se e adquirem uma luz vascular, formando os primeiros vasos sangüíneos (HAMBURGER, HAMILTON, 1951; AREY, 1974).

No período de 33 h de incubação, estabelece-se uma rede vascular, limitada pelo vaso sino terminal. Esse plexo vascular, associado ao endoderma subjacente, envolve parcialmente o vitelo do ovo, organizando a vesícula vitelínica em anexo ao embrião. Nesse anexo embrionário, as artérias e veias onfalomesentéricas, originadas no coração estabelecem uma circulação vitelínica (PATTEN, 1951; HOUILLON, 1972).

No período de 40 h de incubação os movimentos de dobramento do coração e o processo de formação de novos vasos a partir das ilhotas sangüíneas têm seqüência. As células localizadas internamente formam os hemocitoblastos, dos quais derivam os tipos celulares das diferentes linhagens sangüíneas (AREY, 1974; SWEENEY, 1998).

No decorrer do terceiro dia de incubação, verifica-se o surgimento de outro componente da vascularização extraembrionária: os vasos alantóicos. O alantóide – um divertículo da parede ventral do intestino posterior – aumenta de volume a partir do 4º dia de incubação, devido à deposição de produtos da excreção, e interpõe-se entre dois anexos pré-existentes: o âmnio e o cório. A associação do mesoderma somático dos dois anexos com o mesoderma angiogênico do alantóide resulta na membrana corioalantóica. No 8º dia de incubação, a membrana corioalantóica

consiste numa vesícula achatada, vascularizada, que recobre o embrião e o saco vitelínico (HUETTNER, 1949; PATTEN, 1951).

Um crescente corpo de evidências vem sendo obtido e estabelece relações funcionais entre princípios moduladores da formação de vasos sanguíneos e indutores endógenos da forma do corpo do embrião (PRINCIVALLE, AGOSTINI, 2002; AYBAR, MAYOR, 2002).

No tecido vascular e em outros tipos de tecidos, moléculas de proteoglicanas e outros componentes de matriz extracelular ligam-se a múltiplas espécies de fatores de crescimento, como também a morfógenos, a exemplo do bFGF. (*basic Fibroblasts Growth Factor*). Este peptídeo é um indutor de angiogênese bem conhecido, que está envolvido também na especificação dos limites do tubo neural, durante a etapa final da indução da crista neural. Esta estrutura acompanha o crescimento embrionário ao longo dos domínios cefálico - caudal (DHOOOT et al., 2001). Além disso, um morfógeno referido como NOTCH, tem sido estudado devido à sua habilidade de orientar a diferenciação de células endoteliais nas redes vasculares (GRIDLEY, 2001).

No embrião de galinha, os primórdios da topografia e os diversos sistemas estabelecem-se rapidamente (em menos de 96 h de incubação), provendo ainda uma base razoável para estimativas de toxicidade e teratogenicidade (BUPP et al., 1998) e estudos relacionados ao desenvolvimento vascular, particularmente nos processos de vasculogênese e angiogênese.



## 2.5 OBJETIVOS

### 2.5.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana, obtidos de *A. barbadensis* sobre a formação de vasos sanguíneos em embriões de *Gallus domesticus*

### 2.5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Determinar a atividade do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana isolada da FP no processo de vasculogênese na vesícula vitelínica, dos embriões no período de 2 a 4 dias.
- Determinar a atividade do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana isolada da FP no processo de angiogênese da membrana corioalantóica, dos embriões no período de 6 a 8 dias.
- Avaliar os efeitos da administração do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana sobre o crescimento (comprimento total) e a morfogênese com base na proporção do comprimento da cabeça em relação ao comprimento total, dos embriões, nas idades de 2 a 4 dias.

## 2.6 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.6.1 MODELO BIOLÓGICO - EMBRIÕES DE *Gallus domesticus* - Linnaeus, 1758

Ovos de galinha da linhagem Ross, de tamanho padrão médio (aproximadamente 55g), fertilizados e livres de patógenos específicos, foram fornecidos pela indústria do setor aviário de corte (Macedo Koerich<sup>®</sup>; SC, Brasil), em um período de até 12h após a postura. No laboratório, esse material foi estocado (19 - 20°C), por 48h, até o início da incubação.

Os experimentos descritos a seguir enfocaram os processos de vasculogênese a angiogênese de embriões de *Gallus domesticus* e foram realizados de acordo com os procedimentos descritos em protocolo PP00069/2006 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC, Florianópolis, SC).

### 2.6.2 VASCULOGÊNESE EM VESÍCULA VITELÍNICA

Ovos de galinha foram preliminarmente mantidos em estufa incubadora (Gera-Petersime) equipada com ventilação forçada, controle digitalizado de umidade (33%) e temperatura (37,5°C), por um período de 48h.

Após 48h de incubação, os ovos foram removidos da incubadora e uma janela (10mm de diâmetro) foi aberta na casca, posição que se encontra o embrião. Embriões não-viáveis foram descartados.

Os tratamentos *in ovo* (n = 8) foram realizados por meio de suportes de metilcelulose em forma de disco (2mm de diâmetro, 1 disco/embrião), implantados

sobre ilhotas sangüíneas da membrana vascular da vesícula vitelínica próximas ao embrião, na idade de 2 dias.

Amostras de extrato do parênquima de reserva, da FP e da acemanana foram adsorvidas em metilcelulose, considerando-se os valores de concentração de 10, 30 e 90  $\mu\text{g}/\text{ovo}$ . Uma solução-mãe para cada composto em estudo foi preparada (concentração final = 0,45% (P/V) foi seca ao ar em câmara de fluxo laminar, sobre superfície de Teflon<sup>®</sup>. Como controle foram utilizados discos de metilcelulose contendo apenas água destilada e deionizada (veículo) e discos de metilcelulose contendo heparina 50 UI (Unidades Internacionais).

Após os tratamentos, as aberturas nas cascas foram fechadas com filme de celofane preto e os ovos retornaram à incubadora, para continuarem o desenvolvimento por mais 48h, até a idade embrionária de 4 dias. A zona circunvizinha ao disco de metilcelulose foi analisada quanto ao número de vasos sangüíneos com auxílio de um microscópio estereoscópico (Olympus modelo SZ40), com aumento de 3,5 vezes. A quantificação dos vasos sangüíneos da vesícula vitelínica que interceptavam o limite do disco de metilcelulose foi expressa em percentagem em relação ao número de vasos do controle (água) .

### **2.6.3 ANGIOGÊNESE EM MEMBRANA CORIOALANTÓICA**

Para a avaliação do processo de angiogênese, foi realizado o ensaio *in vivo* da membrana corioalantóica, de acordo com os mesmos procedimentos previamente descritos para a vasculogênese.

A fim de evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares, após as 48h iniciais de incubação, fez-se uma abertura (10mm  $\varnothing$ ) na casca dos ovos, em

posição imediatamente acima do embrião. Embriões não-viáveis foram descartados. Estas aberturas na casca foram ocluídas com filme de celofane preto e os ovos foram re-incubados até o 6º dia (total de 144 h de incubação no período preliminar aos tratamentos). Após esse período, as coberturas de celofane removidas, sendo os tratamentos *in ovo* (n = 8) foram realizados por meio de suportes de metilcelulose em forma de disco (2mm de diâmetro, 1 disco/embrião), implantados sobre os vasos sanguíneos, no terço externo da membrana corioalantóica. Para aplicação dos tratamentos, os compostos em estudo foram dissolvidos na solução de metilcelulose e volumes de 5 µL foram secos em fluxo laminar sobre superfície de Teflon<sup>®</sup>, obtendo-se com a polimerização um filme em forma de disco.

Imediatamente após os tratamentos, as aberturas na casca foram fechadas com filme de celofane preto e os ovos, re-incubados (37,5°C/48 h). Subsequentemente, os ovos foram retirados da estufa e a região contígua ao disco de metilcelulose foi examinada, com o auxílio de um microscópio estereoscópico a fim de observar os vasos. A inibição da angiogênese foi determinada considerando-se a redução do número de vasos que interceptavam o disco de metilcelulose (aspecto de uma zona avascular), sendo os valores expressos em percentagem em relação à 100%, representados pelo número vasos do controle (discos de metilcelulose e água).

#### **2.6.4. MEDIDAS DA MORFOGÊNESE EMBRIONÁRIA NA VASCULOGÊNESE**

A morfogênese embrionária foi expressa como a percentagem de comprimento cefálico e determinada através de medidas de comprimento corporal nos segmentos definidos como eixos entre as flexuras cefálica-cervical-caudal. Os eixos de comprimento entre as flexuras cefálica-cervical (CCV) e as flexuras

cervical-caudal (CVC), juntamente com a somatória destes dois segmentos embrionários (CCC), foram relacionadas por meio da percentagem de comprimento cefálico (CCV/CCC), i.e., o comprimento da região cefálica em relação ao comprimento total do embrião, calculada através da seguinte expressão:  $CCV/CCC=[CCV\div(CCV+CVC)]\times 100$ .

Quando a percentagem do comprimento cefálico (CCV/CCC) nos grupos tratados resultou significativamente ( $P<0,05$ ) maior, ou menor que o valor correspondente ao controle, verificou-se que a taxa de crescimento no segmento da cabeça foi alterada e isto foi considerado no presente estudo, um indicativo de modificação no padrão de morfogênese embrionária.

### **2.6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS**

Todos os resultados foram expressos como média e erro padrão da média e comparados através da análise de variância (ANOVA). Foi realizada a análise dos desvios, utilizando-se o teste “*post hoc*” de Tukey, sendo que valores de  $P<0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa STATISTICA 6.0, e para confecção dos gráficos, o programa PRISMA GRAPH 3.

## 2.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

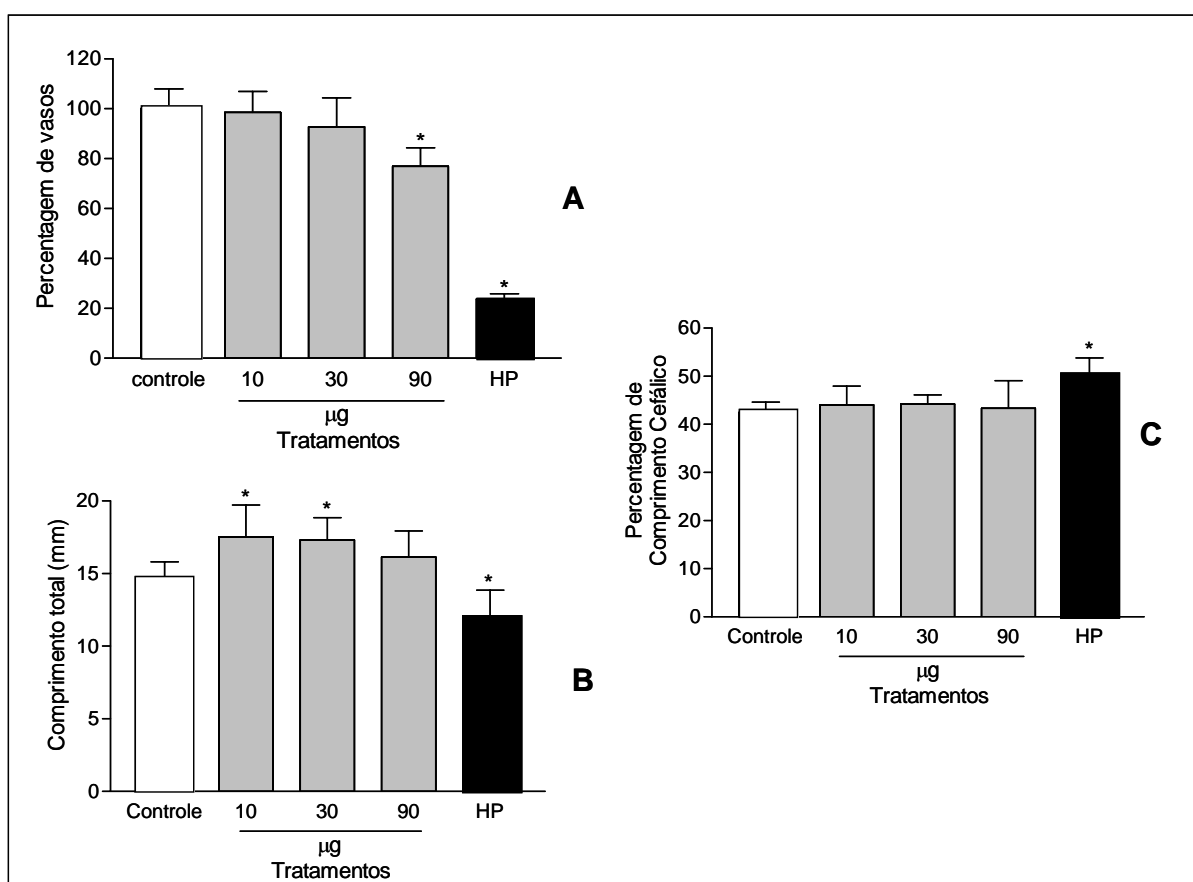
### 2.7.1 TRATAMENTOS REALIZADOS NA VESÍCULA VITELÍNICA.

As avaliações foram efetuadas a partir da quantificação dos vasos sanguíneos da vesícula vitelínica que interceptaram os suportes de metilcelulose e da biometria dos embriões com base no comprimento cefálico, correspondente ao eixo mesencefálico-cervical (CCV), em relação ao comprimento total relativo aos eixos mesencéfalo-cervical-caudal (CCC), expresso em percentagem, ao final do 4º dia de incubação.

A avaliação dos efeitos dos tratamentos com o extrato do parênquima de reserva são mostrados na Figura 43. A análise do número de vasos mostrou que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com as concentrações de 10 e 30  $\mu\text{g}$ , em relação ao grupo controle, contudo, foi detectado um efeito anti-vasculogênico de cerca de 23% de inibição da formação de vasos, na concentração de 90  $\mu\text{g}$  (Figura 43 A) enquanto a heparina mostrou uma diminuição do número de vasos de 77% em relação ao controle.

A avaliação da biometria mostra que nenhum dos tratamentos apresentou diferenças significativas na percentagem de comprimento cefálico, o que implica dizer que não houve modificações na morfogênese embrionária (Figura 43 B). Somente os embriões tratados com a heparina apresentaram modificação na morfogênese evidenciada por um aumento do comprimento cefálico em relação ao controle. A relação entre a percentagem do comprimento cefálico e o comprimento total foi causada pela mudança no comprimento cefálico-caudal. Observou-se que as concentrações de 10 e 30  $\mu\text{g}$  modificaram o padrão de crescimento, sendo que

os valores de comprimento total apresentaram-se superiores ao verificado no grupo controle. Diferentemente do ocorrido com o número de vasos, a concentração de 90  $\mu\text{g}$  (Figura 43 C) não interferiu no padrão de crescimento em relação ao controle. Os embriões tratados com heparina apresentaram redução no comprimento total em relação ao controle.

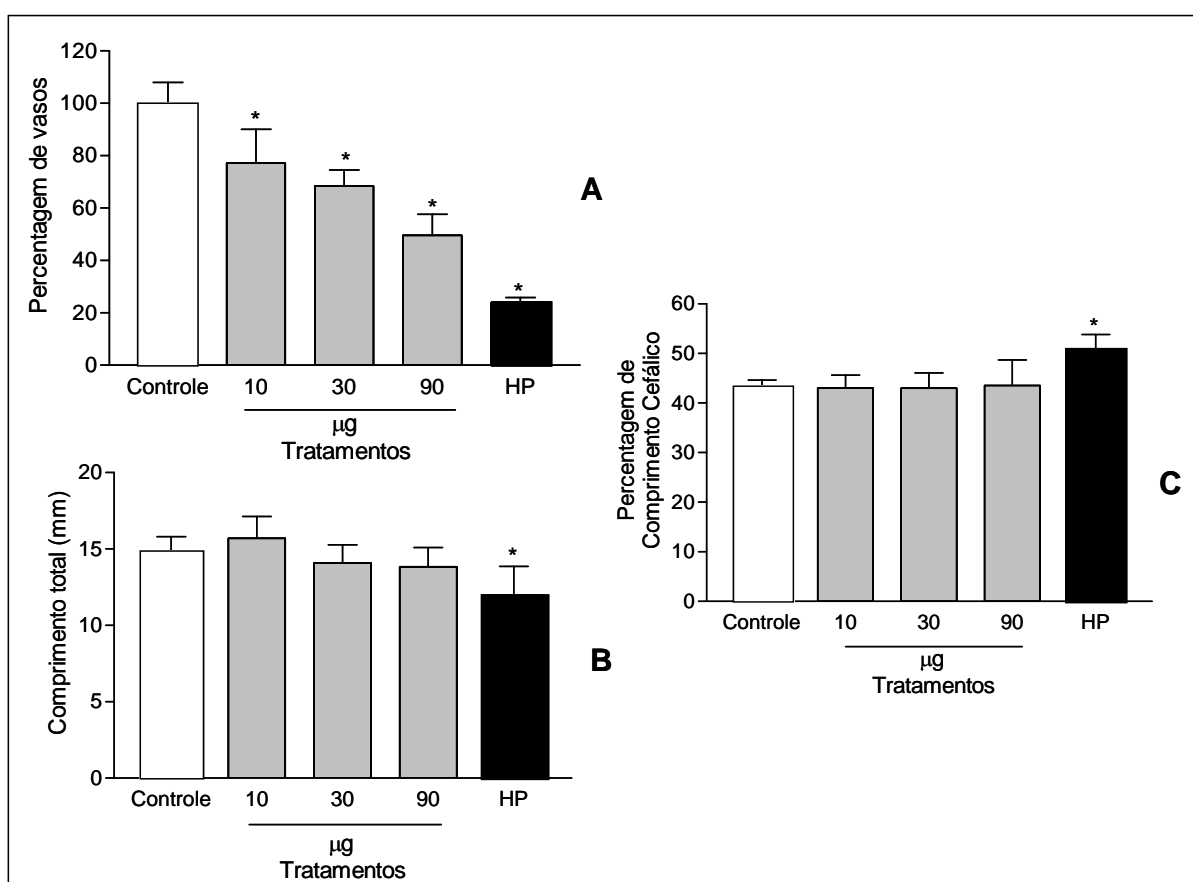


**Figura 43** – (A) Percentagem de vasos observados na vesícula vitelínica nos tratamentos com 10, 30 e 90  $\mu\text{g}$  do extrato do parênquima de reserva e da heparina (HP, controle positivo), em comparação ao controle (água destilada). (B) Percentagem de comprimento cefálico (medida do eixo mesencéfalo-cervical). (C) Comprimento total. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  EPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

Os tratamentos com a Fração Polissacarídica (FP) (Figura 44) apresentaram uma inibição da formação de vasos sanguíneos, de um modo

dependente da dose, nas três concentrações testadas em relação ao grupo controle, assim como a heparina, o que para as concentrações testadas evidencia um efeito anti-vasculogênico (Figura 44).

As vesículas vitelínicas tratadas com a concentração de 90  $\mu\text{g}$  apresentaram o maior efeito inibitório quando comparado ao grupo controle (aproximadamente 50% de redução do número de vasos capilares).



**Figura 44** – (A) Percentagem de vasos observados na vesícula vitelínica nos tratamentos com 10, 30 e 90  $\mu\text{g}$  da FP e da com heparina (HP, controle positivo), em comparação ao controle (água destilada). (B) Percentagem de comprimento cefálico (medida do eixo mesencéfalo-cervical). (C) Comprimento total. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  EPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey).



A avaliação das medidas de comprimento, mostraram que os tratamentos com a FP também não alteraram o crescimento embrionário, quando comparados com o controle, como ocorreu no tratamento com a heparina, em que o comprimento total foi inferior aos demais. Da mesma forma, a morfogênese, com base na percentagem de comprimento cefálico, também não foi afetada, exceto nos embriões tratados com heparina. Desta forma, podemos inferir que o efeito da FP dá-se somente sobre a formação dos vasos sanguíneos, não afetando negativamente o desenvolvimento embrionário.

A acemanana (Figura 45), não exerceu efeito sobre a vasculogênese na concentração de 10  $\mu\text{g}$ , quando comparada com o grupo controle. Entretanto, as concentrações de 30 e 90  $\mu\text{g}$ , inibiram a formação de vasos capilares em cerca de 48% e 69%, respectivamente, os quais apresentaram o menor número de vasos dentre todas as substâncias testadas (Figura 45 A).

Da mesma forma que o verificado nos ensaios com a FP, os embriões submetidos ao tratamento com acemanana não apresentaram mudanças no padrão do comprimento total nem na morfogênese embrionária. Entretanto, na avaliação da percentagem do comprimento cefálico, apenas os embriões tratados com heparina mostraram alteração nesta característica.

Os resultados do presente estudo mostraram que quando as amostras de extrato do parênquima de reserva, da FP e da acemanana foram administradas, estes tratamentos promoveram um importante efeito anti-vasculogênico na vesícula vitelínica, evidenciado pela diminuição do número de vasos.

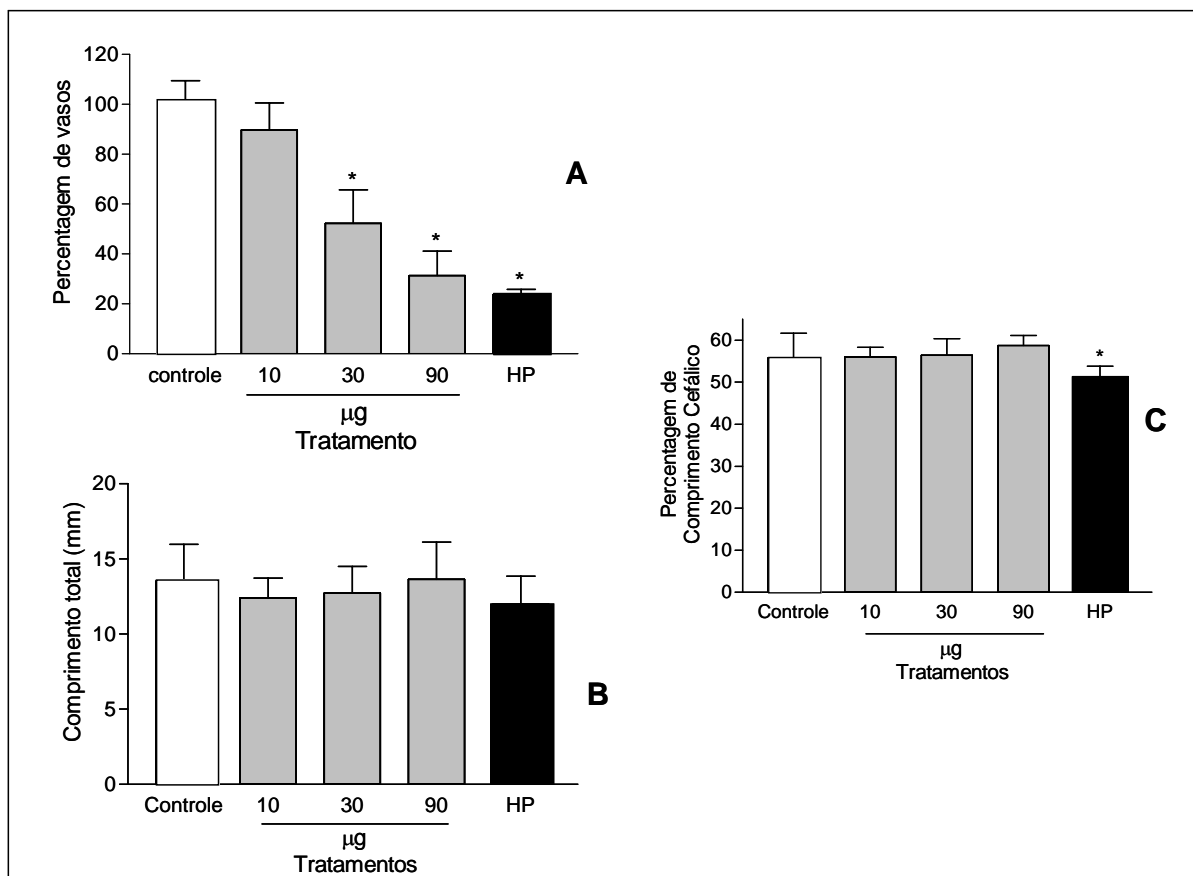
Como hipóteses para os possíveis alvos da ação anti-vasculogênica desencadeada pelas substâncias estudadas, principalmente da FP e da acemanana, esta ação poderia ser atribuída à modulação de moléculas reguladoras, como o

bFGF e o VEGF, que são sabidamente mitógenos altamente específicos para células endoteliais (DRAKE et al., 2000; ZYGMUNT et al., 2003). Estudos demonstram que os receptores de VEGF são capazes de ativar eventos de sobrevivência, proliferação e migração celular, sendo que, somente os receptores VEGFR-2 e 3 são capazes de transduzirem sinais para a formação de túbulos de vasos (tubulogênese), a diferenciação de vasos sanguíneos (artérias e veias) e de células endoteliais linfáticas (SHIBUYA, 2006).

Além do VEGF, outras moléculas como as angiopietinas Ang-1 e Ang-2, também atuam diretamente no processo de vasculogênese, sendo que elas estão envolvidas no processo de estabilização e remodelagem da rede vascular primária (ZYGMUNT et al., 2003).

Esses fatores de crescimento são também, responsáveis pela regulação da concentração de macrófagos (SPRINGER et al., 1998).

Segundo Zygmunt (2003), os receptores de VEGF apresentam diferenças na sua taxa de expressão, dependendo das condições do endotélio vascular. Por exemplo, o VEGFR-2 tem sua expressão aumentada em tumores e outras condições patológicas e o VEGFR-1 atua como um regulador negativo das ações do VEGF no endotélio vascular, competindo antagonisticamente pelo seu ligante (YANCOPOULOS et al., 1998; ZYGMUNT, 2003; SHIBUYA, 2006). Springer et al. (1998), estudando eventos vasculogênicos em tecido muscular de indivíduos adultos, concluíram que o VEGF pode induzir a vasculogênese, de um modo dose-dependente.



**Figura 45** – (A) Percentagem de vasos observados na vesícula vitelínica nos tratamentos com 10, 30 e 90 µg da acemanana e da heparina (HP, controle positivo), em comparação ao controle (água destilada). (B) Percentagem de comprimento cefálico (medida do eixo mesencéfalo-cervical). (C) Comprimento total. Cada barra vertical representa a média ± EPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

É possível sugerir que as substâncias polissacarídicas derivadas da babosa, possam atuar inibindo a vasculogênese em razão do bloqueio da expressão do VEGF ou pelo aumento da expressão do VEGFR-1. Uma possibilidade, neste caso, é de que os polissacarídeos em estudo tenham a capacidade de se ligarem a sítios de receptores específicos nas membranas celulares de macrófagos, por exemplo. Além disso, de acordo com Schepetkin, Quinn (2006), polissacarídeos isolados de espécies vegetais podem se ligar a diferentes receptores, como o TLR4, CD14, CR3, dectina 1 e receptores de manose, a partir do que, ativariam cascatas de

sinalização intracelular que resultam na produção de moléculas como as citocinas pró-inflamatórias, modulando a ação de fatores de crescimento endotelial.

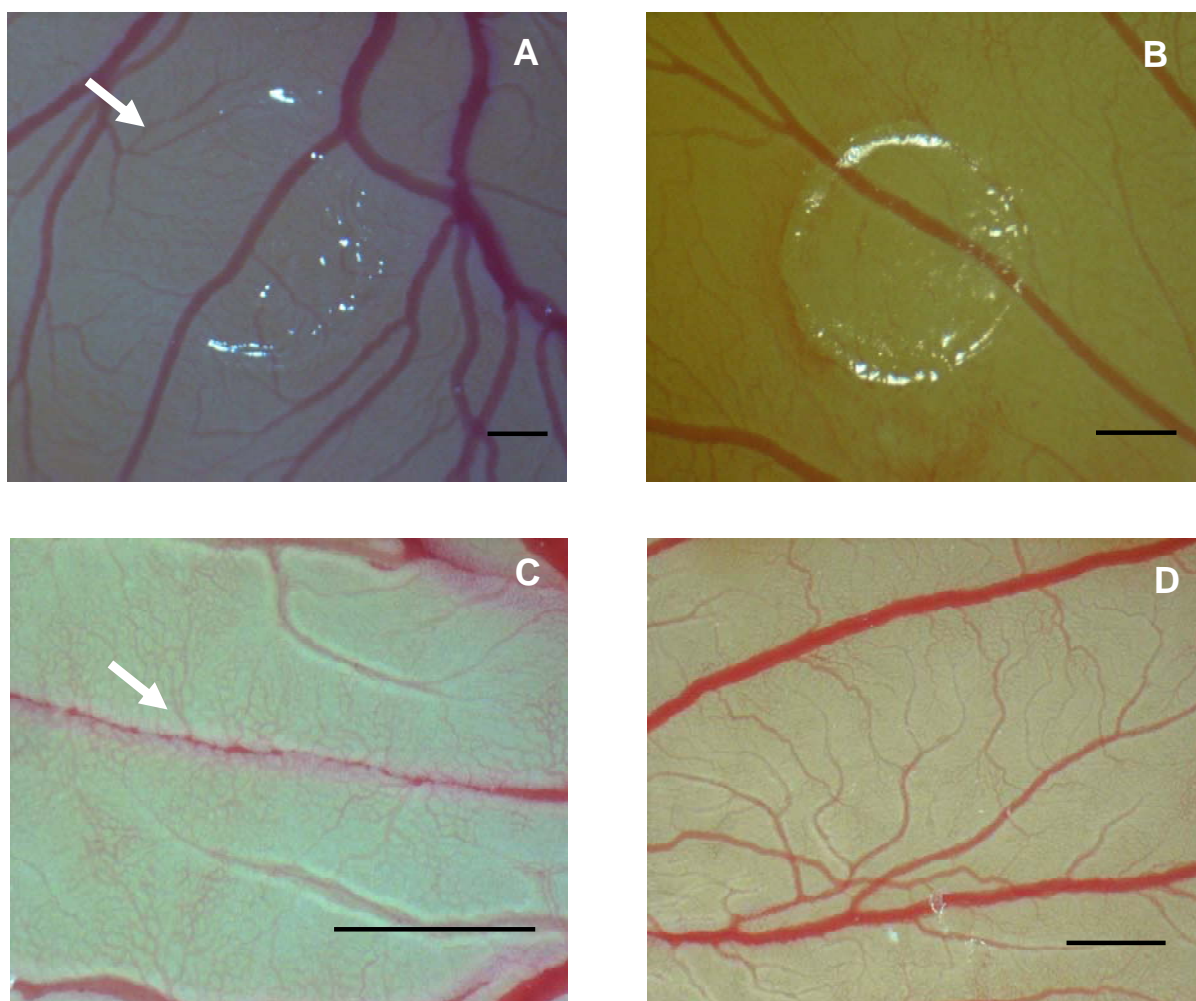
De fato, diversos polissacarídeos possuem a capacidade de desencadear respostas anti-vasculogênicas. Sarg, um polissacarídeo isolado da alga marinha da espécie *Sargassum stenophilum*, mostrou efeitos inibitórios na ordem de 26 a 100% sobre a vascularização de anexos embrionários de *G. domesticus*. Além disso, esse polissacarídeo foi capaz de reverter os efeitos pró-vasculogênicos e pró-angiogênicos do bFGF (DIAS, 2005; DIAS, 2007). No entanto, outros polissacarídeos, podem ativar respostas pró-vasculogênicas, a exemplo de  $\beta$ -D-glucanas isoladas do fungo da espécie *Agaricus brasiliensis*, as quais mostraram um aumento de vasos da ordem de 30% em vesículas vitelínicas de embriões de galinha (CAMELINI et al, 2006).

Um estudo sobre as atividades farmacológicas da acemanana utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7, mostrou um aumento na produção de citocinas como o IL-6 e TNF- $\alpha$ , de forma dose-dependente, sem contudo, modificar a morfologia celular (ZHANG; TIZARD, 1996). Essa mesma linhagem celular foi exposta ao tratamento com acemanana por Ramamoorthy et al. (1996), que observaram que o polissacarídeo, em presença do IFN- $\gamma$  promoveu a ativação dos macrófagos, sendo esta ação evidenciada pelo aumento na expressão do mRNA que codifica a forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), com conseqüente aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) intracelular. O NO é o principal mediador citotóxico de células imuno-efetoras e constitui importante molécula reguladora do sistema imune. Exerce um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. Por outro lado o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em

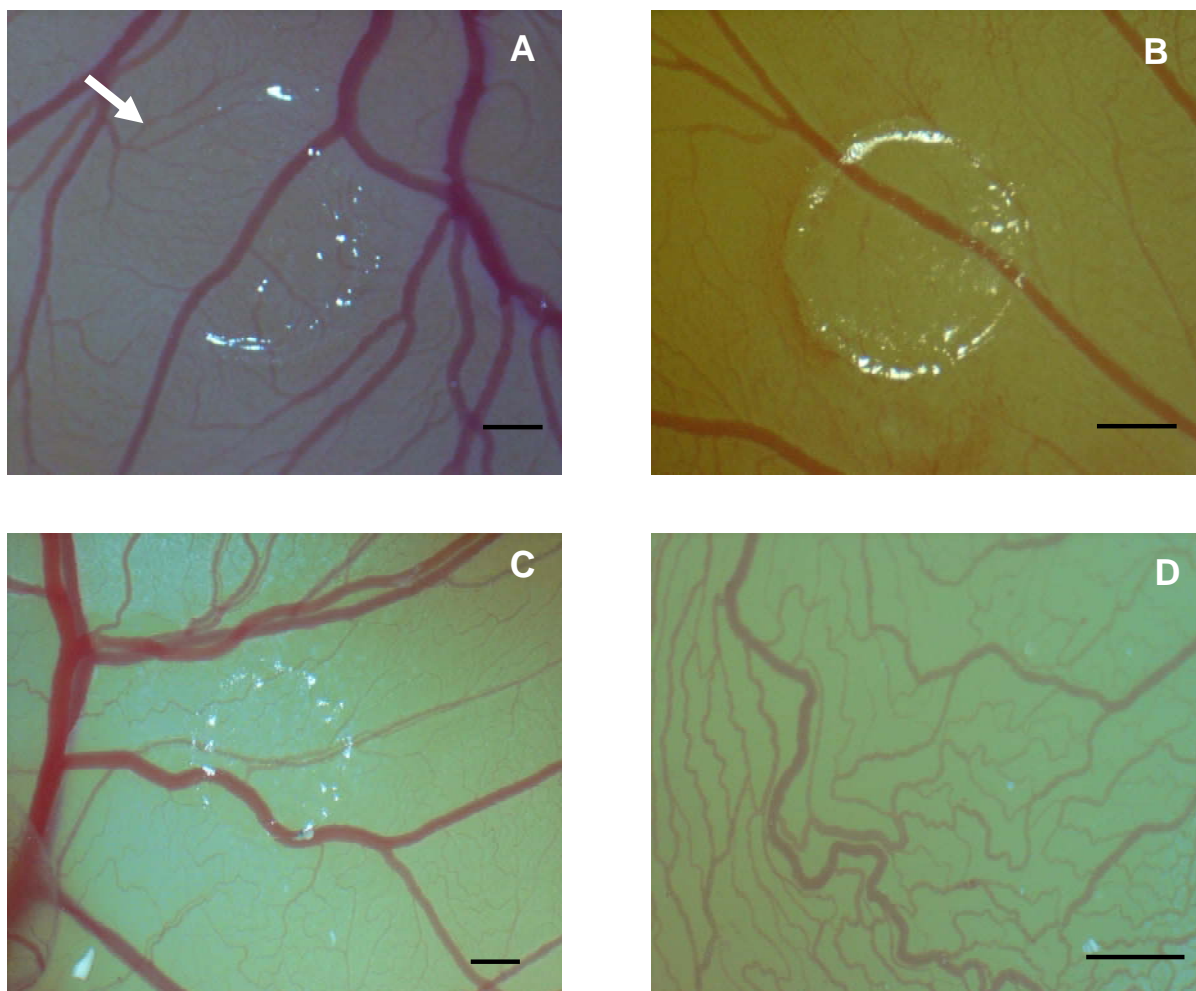
situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE et al., 2003).

Ainda, quando expostos à acemanana, os macrófagos apresentaram-se apoptóticos, sugerindo que a esse polissacarídeo possa atuar como um agente pró-apoptótico cujo mecanismo envolveria a inibição da molécula *bcl-2* (RAMAMOORTHY, TIZARD, 1998).

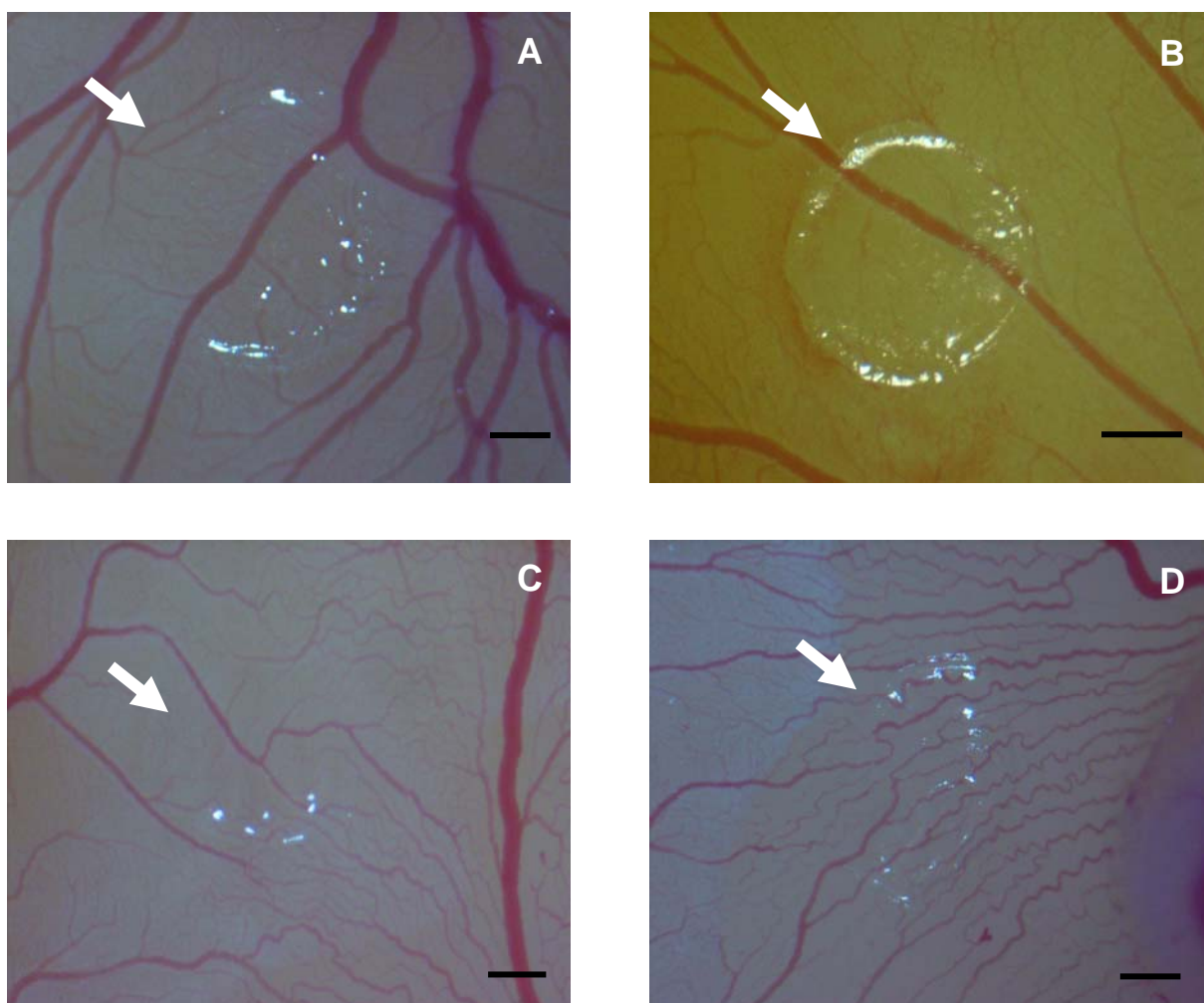
Drake et al. (2000), em um estudo comparativo sobre os genes que codificam para o VEGF entre embriões de aves e camundongos, demonstraram que a regulação da vasculogênese é um processo altamente conservado entre essas duas espécies de animais, o que nos permite uma extrapolação para diferentes espécies.



**Figura 46** – Seqüência de microfotografias onde são observados os efeitos da administração do extrato do parênquima de reserva sobre a vascularização da vesícula vitelínica de embriões de *G. domesticus* no 6º dia de desenvolvimento. Em (A) tratamento controle, (B) tratamento com heparina 50 UI, (C) tratamento com 30 µg do extrato e (D) tratamento com 90 µg do extrato. A seta em (A) indica vestígios do disco de metilcelulose e água destilada e a seta em (C) indica um capilar sanguíneo em processo de remodelagem. Barra = 1 mm



**Figura 47** – Seqüência de microfotografias onde são observados os efeitos da administração da FP sobre a vascularização da vesícula vitelínica de embriões de *G. domesticus* no 6º dia de desenvolvimento. Em (A) tratamento controle, (B) tratamento com heparina 50 UI, (C) tratamento com 30 µg da FP e (D) tratamento com 90 µg da FP. A seta em (A) indica vestígios do disco de metilcelulose e água destilada. Barra = 1 mm

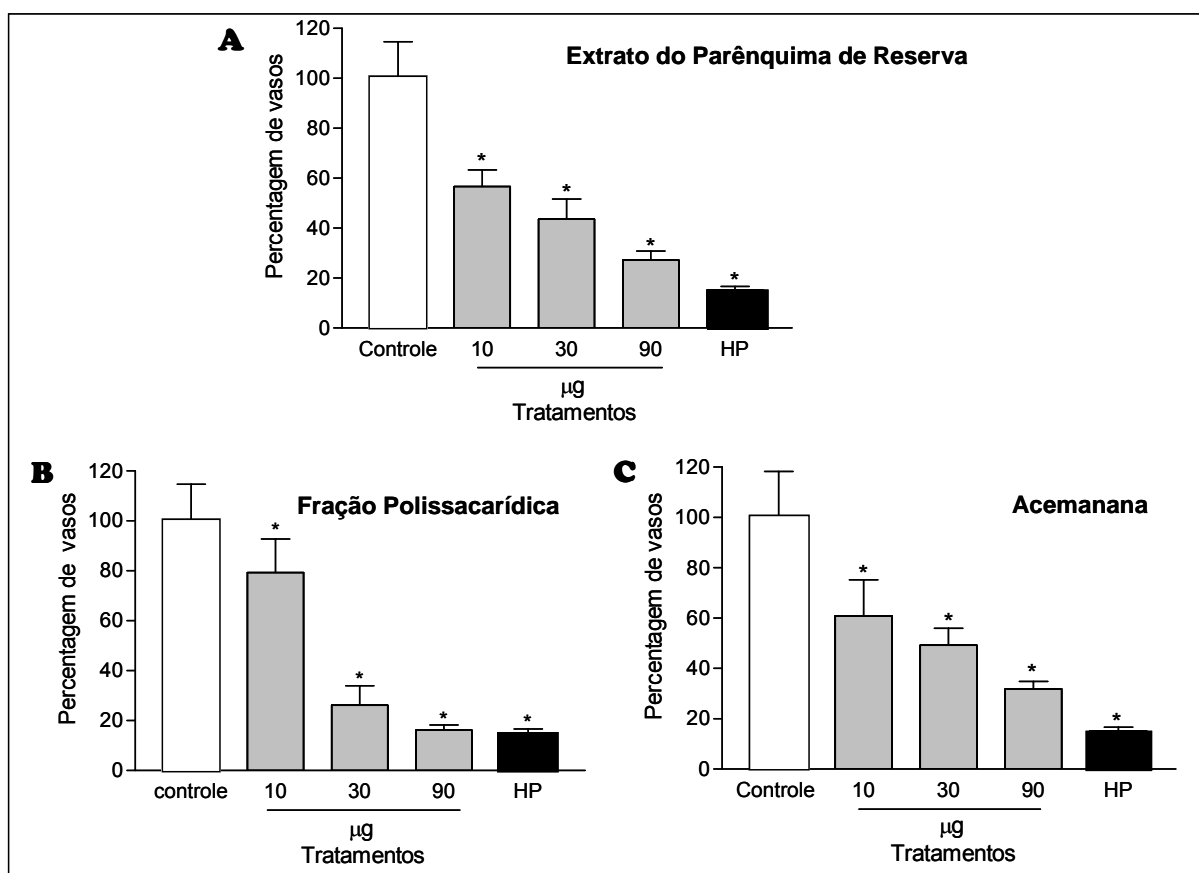


**Figura 48** – Seqüência de microfotografias onde são observados os efeitos da administração da acemanana sobre a vascularização da vesícula vitelínica de embriões de *G. domesticus* no 6º dia de desenvolvimento. Em (A) tratamento controle, (B) tratamento com heparina 50 UI, (C) tratamento com 30 µg da acemanana e (D) tratamento com 90 µg da acemanana. As setas indicam vestígios do disco de metilcelulose. Barra = 1 mm



## 2.7.2 TRATAMENTOS REALIZADOS NA MEMBRANA CORIOALANTÓICA.

O desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (angiogênese) foi avaliado por meio do ensaio da membrana corioalantóica. Os resultados quanto ao efeito das substâncias em estudo sobre a angiogênese estão reunidos na figura 49.



**Figura 49** – Percentagem de vasos nos limites do disco implantados na membrana corioalantóica nos tratamentos com as concentrações de 10 µg, 30 µg e 90 µg do extrato do parênquima de reserva (A), da fração polissacarídica (FP) (B) e com a acemanana (C), em relação ao controle (água destilada). 50 U.I. de heparina (HP), foi utilizada como controle positivo. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  EPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  em relação ao controle (água destilada) (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

Como mostra a figura 49, em todos os tratamentos houve uma redução estatisticamente significativa e de modo dose-dependente, do número de vasos evidenciando o efeito anti-angiogênico das substâncias em estudo.

Nos tratamentos com o extrato do parênquima de reserva o número médio de vasos na concentração de 10  $\mu\text{g}$  foi de 66 vasos, na concentração de 30  $\mu\text{g}$ , 51 e na concentração de 90  $\mu\text{g}$ , 31 vasos, o que implica em uma inibição daquele processo da ordem de 73% em relação ao controle.

A FP inibiu de modo mais efetivo a proliferação de vasos capilares se comparado com o extrato do parênquima de reserva, principalmente nas concentrações de 30  $\mu\text{g}$  e de 90  $\mu\text{g}$ , onde o número de capilares no limite do disco foi de 30 e 19 vasos, respectivamente. O tratamento com a concentração de 90  $\mu\text{g}$  foi a que provocou a maior inibição da angiogênese, com um percentual de 84% de redução no processo em relação ao controle (117 vasos).

A heparina (controle positivo) causou 85% de inibição de capilares na membrana corioalantóica, em relação ao controle (água destilada). Este valor é idêntico ao observado para a concentração de 90  $\mu\text{g}$  da FP (84%), o que demonstra a efetividade desta fração.

A angiogênese exerce papel relevante nos processos fisiológicos a exemplo do ciclo reprodutivo feminino, reparação tecidual além do próprio desenvolvimento fetal (RIBATTI et al., 2001; PANDYA et al., 2006). Existe uma oposição entre a atividade dos pró-angiogênicos e anti-angiogênicos. O equilíbrio entre estes dois tipos de fatores, ou a predominância de atividade pró-angiogênica, estão presentes em processos patológicos, tais como a psoríase, artrite reumatóide e alguns tipos de tumores (CARMELIET, 2003; FAYETTE et al., 2005). Os VEGFRs além de estarem diretamente envolvidos nesses processos fisiopatológicos, também estão

relacionados aos processos de formação de ascites, metástases, doenças inflamatórias como hipertireoidismo e aterosclerose (SHIBUYA et al., 2006).

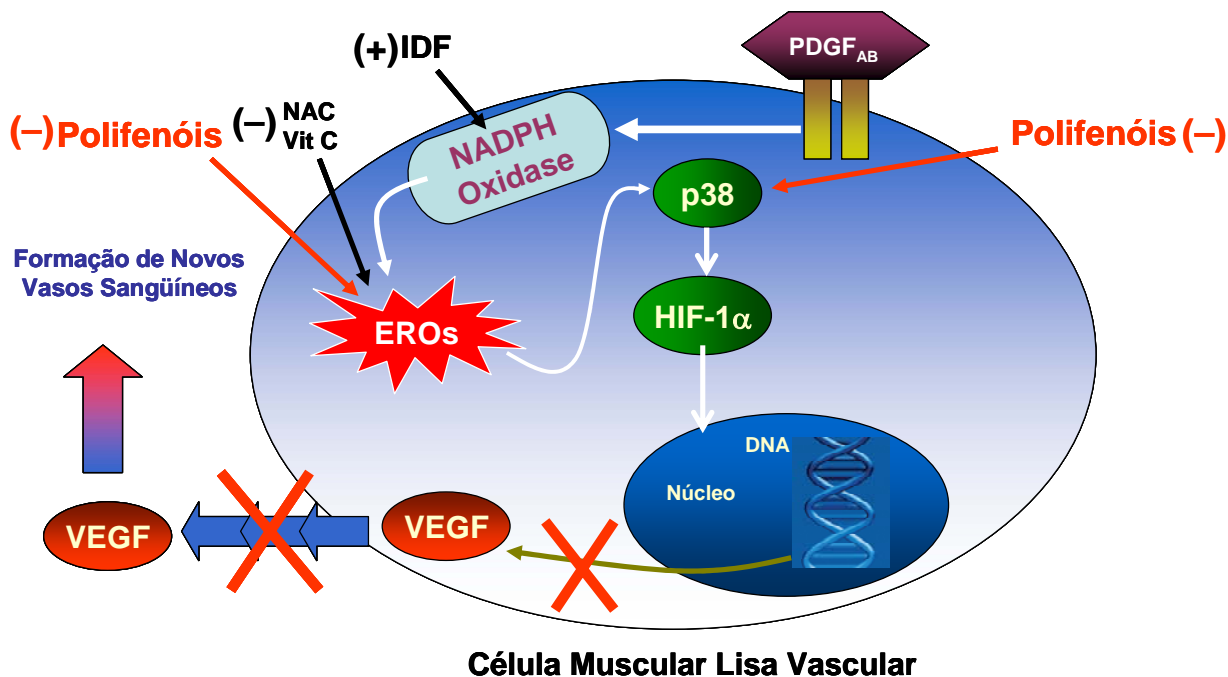
Entretanto, os mecanismos envolvidos na regulação da angiogênese ainda não são suficientemente entendidos. Algumas substâncias foram utilizadas como modelo para elucidar alguns destes mecanismos, a exemplo dos polifenóis encontrados em vinhos tintos, chás e outros produtos (OAK et al., 2005; HUANG, ZHENG, 2006). Esses autores descreveram um mecanismo pelo qual os polifenóis seriam capazes de inibir muitos eventos-chave no processo angiogênico, como a proliferação e a migração de células do endotélio vascular liso e a expressão de dois principais fatores pró-angiogênicos, como o VEGF e a metaloproteinase de matriz-2 (Figura 50).

Fatores de crescimento como o PDGF<sub>AB</sub> estimulam fortemente a expressão do VEGF pela formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs). A formação de EROS pela NADPH oxidase, media a ativação da via das MAP quinase p38 redox-sensível, que por sua vez ativa o fator induzido por hipóxia- $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ), uma molécula chave na regulação da expressão do VEGF. Os polifenóis podem inibir o efeito estimulatório do PDGF<sub>AB</sub> por prevenir a formação intracelular de EROs, o que impede que a MAP quinase p38 redox-sensível seja fosforilada e ative o fator induzido por hipóxia- $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) (OAK et al., 2005; HUANG; ZHENG, 2006).

Schepetkin e Quinn (2006), propuseram outros modelos de mecanismo, pelos quais polissacarídeos oriundos de plantas, dentre esses as polimanas de babosa, atuariam na via de ativação de macrófagos (Figura 51).

A acemanana possui a capacidade de estimular macrófagos através de sua ligação a receptores específicos na membrana sendo que esta ligação resulta não somente em atividade fagocítica (ZHANG; TIZARD, 1996). Utilizando mananas de

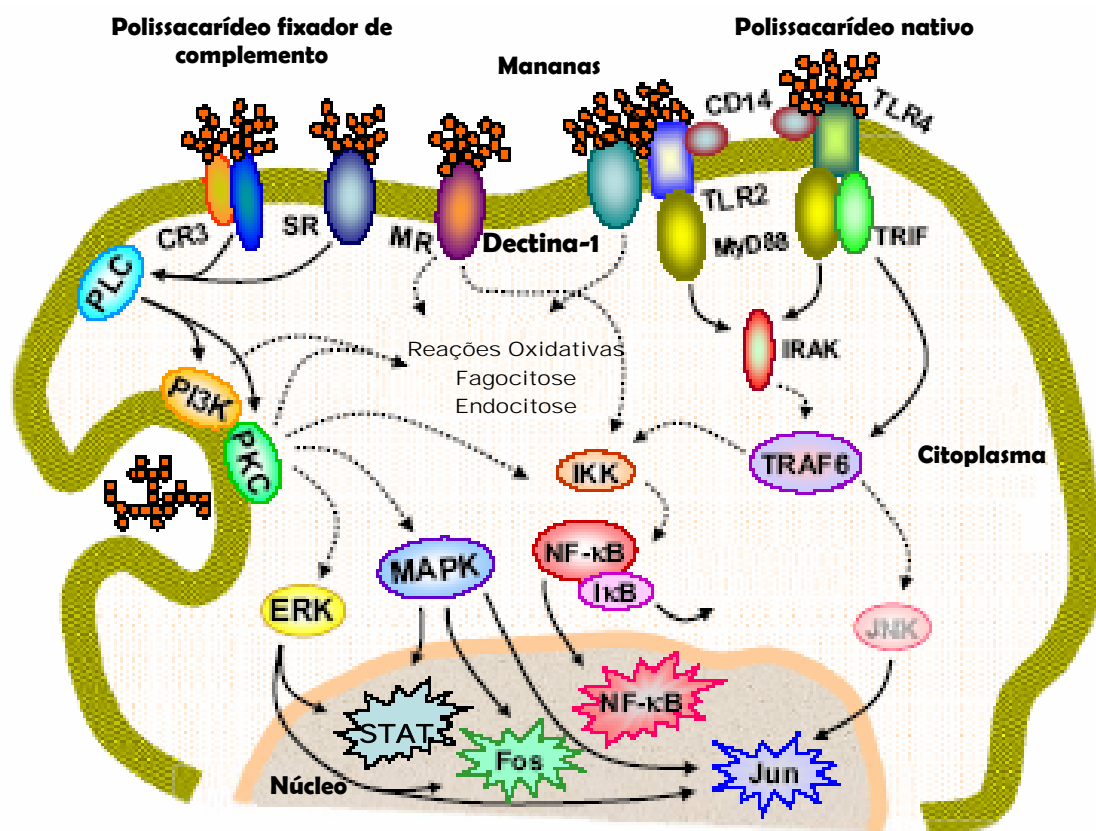
outra espécie de babosa, a *Aloe saponaria*, Sampedro et al. (2004), observaram que as mananas apresentam efeito inibitório da proliferação, com especificidade de células tumorais.



**Figura 50** – Modelo de mecanismo de ação da inibição da formação de novos vasos sanguíneos pela ação de polifenóis nas células da musculatura lisa vascular. IDF – Iodeto de Difenila, NAC – N-Acetilcisteína, Vit C – Vitamina C (OAK et al., 2005).

A ativação de macrófagos por polissacarídeos derivados de plantas dar-se-ia através do reconhecimento desses carboidratos por receptores específicos, que possuem a capacidade de reconhecer padrões moleculares e ligantes estranhos ao organismo, durante a fase inicial da imunomodulação. Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas oriundos de plantas poderiam se ligar aos macrófagos através de receptores tipo-Toll-4 (TLR4), CD14, receptor complemento 3 (CR3, também

conhecido como CD11b/CD18, Mc-1 ou Integrina- $\alpha_M\beta_2$ ), receptores captadores (SR), dectina-1 e os próprios receptores de manose (MR) (Figura 51).



**Figura 51** – Modelo esquemático da via de sinalização envolvendo a ativação de macrófagos por polissacarídeos de plantas. A partir da ativação dos receptores de membrana dos macrófagos, desencadeia-se a transdução deste sinal estimulatório para o interior da célula, levando à síntese dos fatores de transcrição (SCHEPETKIN, QUINN, 2006).

A ativação desses receptores desencadearia uma cascata de sinalização intracelular, resultando na ativação da transcrição de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6, IL12 e TNF- $\alpha$  e da iNOS, por exemplo. Outro mecanismo inibitório seria pela via dependente da endocitose, a partir da qual polissacarídeos de alto peso molecular, como os encontrados na babosa, seriam endocitados após se

ligarem a receptores na superfície celular e não seriam digeridos totalmente pelas enzimas lisossomais. Desta forma, os oligossacarídeos resultantes serviriam como um sinal dependente do receptor, adicional, contribuindo para a ativação dos macrófagos (SCHEPETKIN e QUINN, 2006).

No caso de células tumorais, estudos vêm demonstrando que muitos desses tipos celulares têm se tornado resistentes a fármacos antiangiogênicos, possivelmente por mutações genéticas e associados à própria instabilidade das células tumorais (PANDYA et al., 2006). Diante desse quadro, têm-se recorrido a novas substâncias que possam apresentar uma efetiva inibição da angiogênese.

Moon et al. (1999) avaliou o efeito do extrato do parênquima de reserva de *A. barbadensis* e também de sub-frações sobre a membrana corioalantóica e concluíram que estas substâncias apresentavam propriedades pró-angiogênicas, que foram atribuídas ao  $\beta$ -sitosterol, principalmente. No entanto, não foram feitos comentários acerca da fração polissacarídica. Em um trabalho anterior, grupos de fito-esteróis foram responsáveis pela pronunciada atividade anti-inflamatória encontrada naquela espécie vegetal (VÁZQUEZ et al., 1996).

Dessa forma, os polissacarídeos de *A. barbadensis* podem ser considerados como uma opção voltada à uma nova estratégia terapêutica, uma vez que apresentam uma atividade antiangiogênica pronunciada. No entanto, são necessários estudos complementares mais aprofundados utilizando a biomassa dessa planta para obter a caracterização da atividade vasculogênica e angiogênica, o que remete à avaliação dos possíveis mecanismos de ação, no sentido de compreender melhor o papel dos polissacarídeos de babosa nos processos relacionados à formação de vasos sanguíneos.

Em suma, podemos considerar que os resultados mostrados pelos ensaios de vasculogênese e angiogênese revelaram que a concentração de 90 ug foi a mais efetiva na formação dos vasos sanguíneos para todas as substâncias testadas e que estas não afetaram negativamente o desenvolvimento embrionário, o que constitui uma vantagem adicional para um possível candidato à produção de um medicamento. Os mecanismos responsáveis por essas atividades ainda não estão esclarecidos, entretanto, três principais alvos podem ser definidos, com fins de futura elucidação: (1) a ligação entre receptores de membrana i.e. receptores de manose, o que desencadeia uma série de respostas intracelulares, como a liberação de citocinas inflamatórias a exemplo de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  ou (2) a inibição da síntese de fatores de crescimento como o VEGF ou seus receptores e (3) o mecanismo de endocitose do polissacarídeo, sua interação com receptores de membrana intracelulares (pós fagocitose quando se tratar de células fagocíticas), agindo de forma semelhante à interação com receptores de manose.

## 2.8 CONCLUSÕES

Todas as substâncias testadas quanto ao efeito vasculogênico mostraram-se eficazes na diminuição do número de vasos no ensaio da vesícula vitelínica, sendo que o efeito mais potente correspondeu a FP 90 µg e a acemanana 90 µg.

Apesar dos efeitos inibitórios sobre os vasos sanguíneos, não foi observado alteração na morfogênese embrionária dos grupos tratados, indicando a ausência de toxicidade relacionada aos tratamentos.

Os embriões tratados com o extrato do parênquima de reserva, no ensaio da vesícula vitelínica, apresentaram alteração no comprimento total, indicando uma possível sinergia entre os polissacarídeos e outras substâncias presentes no extrato.

Tanto o extrato do parênquima de reserva como a fração polissacarídica parecem ter provocado uma desestabilização da rede vascular, mostrando que as substâncias estudadas interferem significativamente no processo de formação dos vasos.

Nos ensaios relativos a angiogênese todas as substâncias testadas apresentaram atividade inibitória pronunciada, sendo que a mais ativa foi a FP na concentração de 90µg.

Devem ser realizados estudos voltados à elucidação dos mecanismos de ação relacionados às respostas de inibição sobre a vasculogênese e a angiogênese, observados no presente estudo.



### 3. REFERÊNCIAS

ALVES, D.S.; PÉREZ-FONS, L.; ESTEPA, A.; MICOL, V. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 549-561, 2004.

ANDERSEN, D. O.; WEBER, N. D.; WOOD, S. G.; HUGHES, B. G.; MURRAY, B. K.; NORTH, J. A. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. **Antiviral Research**. v. 16, p. 185–196, 1991.

ARAÚJO, P.S.; SILVA, J.M.O.D.; NECKEL, C.A.; IANSSEN, C.; OLTRAMARI, A. C.; PASSOS, R.; TIEPO, E.; BACH, D.B.; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - Liliaceae). **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, n. 25, p. 54-57, 1999.

AREY, L. B. **Development Anatomy**. London:Sunders. 695p, 1974.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16.ed. Arlington. AOAC.1995.

AVILA, H.; RIVERO, J.; HERRERA, F.; FRAILA, G. Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel. **Toxicon**, v. 35, n. 9, p. 1423-1430, 1997.

AYBAR, M. J.; MAYOR, R. Early induction of a neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. **Current Opinion in Genetic & Development**, v. 12, P. 452-458, 2002

BAUDO, G. Aloe vera. **Erboristeria Domani**. v. 2, p. 29-93, 1992.

BAUTISTA-PEREZ, R., SEGURA-COBOS, D., VÁSQUEZ-CRUZ, B. *In vitro* antibradikinin activity of *Aloe barbadensis* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 89-92, 2004

BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J. H.; MORRIS, J. L.; WOOD, S. G.; HUGHES, B. G.; SIDWELL, R. W. Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. **Antiviral Research**. v. 17, p. 63–77, 1992.

BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Applications of chemometrics to the <sup>1</sup>H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**. v. 61, n. ½, p. 207-213, 1998.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenesis switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 401-410, 2003.

BEPPU, H.; KAWAI, K.; SHIMPO, K.; CHIHARA, T.; TAMAI, I.; IDA, C.; UEDA, M.; KUZUYA, H. Studies on the components of *Aloe arborescens* from Japan – monthly variation and differences due to part and position of the leaf. **Biochemical System and Ecology**. v. 32, p. 783-795, 2004.

BOERIU, C. G.; BRAVO, D.; GROSSELINK, R. J. A.; VAN DAM, J. E. G. Characterization of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. **Industrial Crops and Products**. v. 20, p. 205-218, 2004.

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**, San Diego, v. 72, n.1-2, p. 248-254, 1976

BRASIL. Farmacopéia Brasileira IV. 1988.

BUPP BECKER, S. R.; SHIBLEY, I. A. JR. Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. **Alcohol**, v. 33, n. 5, p. 457-464, 1998.

BYRD, N.; GRABEL, L. Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. **Trends in Cardiovascular Medicine**. v. 14, n. 8, p. 308-313, 2004.

CAMACHO, M. R.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; CROFT, S. L.; PHILLIPSON, J. D. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. **Planta Medica**. v. 66, p. 478-480, 2000.

CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M. M.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. β-glucanas do cogumelo *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets). **Biociência**. v. 35, p. 36-47, 2006.

CAMPEOL, E.; ANGELINI, L. G.; TOZZI, S.; BERTOLACCI, M. Seasonal variation of indigo precursors in *Isatis tinctoria* L. and *Polygonum tinctorium* Ait. as affected by water deficit. **Environmental and Experimental Botany**. v. 58, p. 223-233, 2000.

CAMPESTRINI, L. H.; KUHNEN, S.; LEMOS, P. M. M.; BACH, D. B.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Cloning protocol of *Aloe vera* as study-case for "tailor-made" biotechnology to small farmers. **Journal of Technology Management & Innovation**. v. 1, n. 5, p. 76-79, 2006.

CANTER, P.H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 180-185, 2005.

CAPASSO, F.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; DURACCIO, M. R. Effect of indomethacin on aloin and 1,8 dioxanthraquinone-induced production of prostaglandins in rat isolated colon. **Prostaglandins**. v. 26, n. 4, p. 557-562, 1983.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**. v. 9, n. 6, p. 656-660, 2003.

CELIK TAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V. OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**. v. 100, p. 553-559, 2007.

ČERNÁ, M.; BARROS, A. S.; NUNES, A.; ROCHA, S. M.; DELGADILLO, I.; COPIKOVA, J.; COIMBRA, M. A. Use of FT-IR spectroscopy as tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**. v. 51, p. 383-389, 2003.

CHAN, T. C.; CHANG, C. J.; KOONCHANOK, N. M.; GEAHLEN, R. L. Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 193, p. 1152-1158, 1993.

CHAPMAN, M. Excessively high cell proliferation in sigmoid colon after an oral purge with anthraquinone glycosides. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 87, p. 1086-1087, 1995.

CHEN, Y. C.; SHEN, S. C.; LEE, W. R.; HSU, F. L.; LIN, H. Y.; KO, C. H.; TSENG, S. W. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspases 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. **Biochemical Pharmacology**. v. 64, p. 1713-1724, 2002.

CHITHRA, P.; SAJITHLAI, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.59, p. 195-201, 1998.

CHITRA, P.; SAJITHALAL, G. B. CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 36, p. 896–901, 1998b.

CHOI, S.; CHUNG, M.H. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. **Seminars and Integrative Medicine**, v. 1, p. 53-62, 2003.

CHOI, Y. H.; HYE, K. K.; HAZEKAMP, A.; ERKELENS, C.; LEFEBER, A. W. M.; VERPOORTE, R. Metabolomics differentiations of *Cannabis sativa* cultivars using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Natural Products**. v. 67, p. 953-957, 2004.

CHOW, J. T. N.; WILLIAMSON, D. A.; YATES, K. M.; GROUX, W. J. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.1131-1142, 2005

CHRIST, B.; ORDAHL, C. P. Early stages of chick somite development. **Anatomy and Embryology**, v 46, p. 381-396, 1995.

CHUNG, J.H.; CHEONG, J.C.; LEE, J.Y.; ROH, H.K.; CHA, Y.N. Acceleration of the alcohol oxidation rate in rats with aloin, a quinine derivative of Aloe. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 1461-1468, 1996.

CHUNG, J. G.; LI, Y. C.; LEE, Y. M.; LIN, J. P.; CHENG, K. C.; CHANG, W. C. Aloe-emodin inhibited N acetylation and DNA adduct of 2-aminofluorene and arylamine N-acetyltransferase gene expression in mouse leukemia L 1210 cells. **Leukemia Research**. v. 27, p. 831-840, 2003.

COHEN, P. A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. **Experientia**. v. 52, p. 180–183, 1996.

COLLINSON, D. J.; DONNELLY, R. Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: Can biotechnology produce an effective collateral circulation? **European Journal of Endovascular Surgery**. v.28, p. 9-23, 2004.

CORREIA, M. J.; OSÓRIO, M. L.; OSÓRIO, J.; BARROTE, I.; MARTINS, M.; DAVID, M. M. Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. **Environmental and Experimental Botany**. v. 58, p. 75-84, 2006.

CRISTOFANILLI, M.; CHARNSANGAVEF, C.; HORTOBAGYI, G.; Angiogenesis modulation in cancer research: Novel clinical approaches. **Nature Reviews**. v.1, p. 415-426, 2002.

DANHOF, I. E.; McANALLEY, B. H. Stabilized Aloe vera: effect on human skin cells. **D&C**. v. 52, p. 105-106, 1983.

D'ÁMORE, P. A.; THOMPSON, R. N. Mechanism of angiogenesis. **Annual Review of Physiology**, v. 49, p. 453-464, 1987.

DAVIS, P., BAYLEY, P.J.; GOLDENBERG, M. M.; FORD-HUTCHINSON, A. W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annual Review of Immunology**. v. 2, p. 335–357, 1984.

DÉLÉRIS, G.; PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. **Vibrational Spectroscopy**. v. 32, p. 129- 136, 2003.

DELFINE, S.; LORETO, F.; PINELLI, P.; TOGNETTI, R.; ALVINO, A. Isoprenoids content and photosynthetic limitation in rosemary and spearmint plants under water stress. **Agriculture Ecosystems & Environment**. V. 106, p. 243-252, 2005.

DHOOT, G. K.; GUSTAFSSON, M. K.; AL, X.; SUN, W.; STANDIFORD, D. M.; EMERSON Jr, C. P. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. **Science**, v. 293, p. 1663-1666, 2001.

DIAS, P. F.; SIQUEIRA Jr, J. M.; VENDRUSCOLO, L. F.; NEIVA, T. J.; GAGLIARDI, A. R.; MARASCHIN, M.; VALLE, R. M. R. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from a seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 56, p. 436–446. 2005.

DIAS, P.F. SIQUEIRA JR, J. M.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A. G.; GAGLIARDI, A. R.; VALLE, R. M. R. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenetic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvascular Research**. In press. 2007.

DIEHL, B.; TEICHMULLER, E. E. Aloe vera, quality inspection and identification. **Agro Food Industry Hi-Tech**. v. 9. n. 1, p. 14-16. 1998.

DIEZ-MARTINEZ. **La Zábila**. In: Comunicado Sobre Recursos Bióticos Potenciales del País. Instituto Nacional De Investigaciones de Recursos Bióticos (INIREB). N°. 46. México, 1981.

DRAKE, C. J.; LaRUE, A.; FERRARA, N.; LITTLE, C. VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. **Developmental Biology**. v. 224, p. 178-188, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DURÌ, L.; MORELLI, C. F.; CRIPPA, S.; SPERANZA, G. 6-Phenylpyrones and 5-methychromones from Kenya aloe. **Fitoterapia**. v. 75, p. 520-522. 2004.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n.4, p. 343-350. 2003.

ELSWORTH, C.; GILL, M.; SAUBERN, S. Biosynthesis of tetrahydroanthraquinones in fungi. **Phytochemistry**. V. 55, p. 23-27, 2000.

ESUA, M. F.; RAUWALD, J. W. Novel bioactive maloil glucans from *Aloe vera* gel: isolation, struture elucidation and in vitro bioassays. **Carbohydrate Research**. v. 341, p. 355-364. 2006.

ESTEBAN-CARRASCO, A.; SERRANO, M. L.; ZAPATA, J. M.; SABATER, B.; MARTIN, M. Oxidation of phenolic compounds from *Aloe barbadensis* by peroxidase activity: Possible involvement in defense reactions. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 39, p. 521-527, 2001.

EUROPEAN SCIENTIFIC COOPERATIVE ON PHYTOTHERAPY – ESCOP. **Monographs**. 2<sup>a</sup> ed. Exeter: Thieme, 2003. 556 p. pp. 26-31

EYAL-GILADI, H. The early embryonic development of the chick, as na epigenetic process. **Critical Review Poultry Biology**, v. 3, p. 143-166, 1991.

FALKENBERG, M. B. **Quinonas**. In: Farmacognosia da planta ao medicamento [SIMÕES, C. M. O. et al.org]. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS,2004.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica**. In: Farmacognosia da planta ao medicamento [SIMÕES, C. M. O. et al.org]. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS,2004.

FAYETTE, J.; SORIA, J. C.; ARMAND, J. P. Use of angiogenesis inhibitors in tumor treatment. **European Journal of Cancer**. v. 41, p. 1109-1116, 2005.

FEMENIA, A.; SÁNCHEZ, E. S.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999.

FEMENIA, A.; GARCÍA-PASCUAL, P.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 397-405, 2003.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. v. 22, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. **Eclética Química**. v. 27, p. 77-90, 2002.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides, **Advances in Experimental Medicine in Biology**, v. 313, p. 355-364, 1992.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M.; SASSE, J.; WADZINSKI, M.; INGBER, D.; VLODAVSKY, I. Heparin-binding angiogenic protein-basic Fibroblast Growth Factor is stored within basement membrane. **American Journal of Pathology**, v. 130, p. 393-400, 1988.

GAURHARI, M.; DAS, A. Structure of the D-galactan isolated from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**. v. 86, p. 247, 1980.

GAURHARI, M.; DAS, A. Structure of the glucomannan isolated from the leaves of *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**. v. 87, p. 249, 1980b.

GIL, V. M .S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear. Fundamentos e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2002.

GOWDA, D. C.; NEELISIDDAIAH, B.; ANJANEYALU, Y.V. Structural studies of polysaccharides from *Aloe vera*. **Carbohydrate Research**. v. 83, p. 402-405, 1980

GRIDLEY, T. Notch signaling during vascular development. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.98, p. 10733-10738, 2001.

GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 16, p. 117-151, 1986.

GUMBINER, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v. 84, p. 345-357, 1996.

GUTTERMAN, Y.; CHAUSER-VOLFSTON, E. Peripheral defense strategy: variation of barbaloin content in the succulent leaf parts of *Aloe aborescens* Miller (Liliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 132, p. 385-395. 2000.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**. v. 88, p. 49-92, 1951.

HANAHAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353-364, 1996.



HARRIS, K.; PIERCE, K.; KING, G.; YATES, K. M.; HALL, J.; TIZARD, I. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. **Molecular biotherapy** . v. 3, p. 207-213, 1991.

HOULLION, C. **Embriologia**. São Paulo: Edgard Blücher, , 1972. 160p.

HUANG, S. S.; ZHENG, R. L. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. **Cancer letters**. v. 239, p. 271-280, 2006.

HUERTTNER, A. **Fundamentals Comparative Embryology of the Vertebrates**. New York:Mc Millan, 1949. 309 p.

IMANISHI, K. Aloctin A, an active substance of *Aloe arborescens* as an immunomodulator. **Phytotherapy Research**. v. 7, p. S20-S22, 1993.

ISHII, Y., TANIZAWA, I. I.; TAKINO, Y. Studies of aloe III. Mecanismo of cathartic effect. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 38, p. 197-200, 1990.

IKAN, R. **Natural Products**. San Diego: Academic Press. 1991

IM, S. A.; OH, S. T.; SONG, S.; KIM, M. R.; KIM, D. S.; WOO, S. S.; JO, T. H.; PARK, Y. I.; LEE, C. K. Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. **International immunopharmacology**. v. 5, p. 271-279. 2005.

JOSHI, S. P. Chemical constituents and biological activity of *Aloe barbadensis* – a review. **Journal of Medicinal and Aromatic Plants Science**. v. 20, p. 768-773, 1998.

KAHLON, J. B.; KEMP, M. C.; CARPENTER, R. H.; McANALLEY, B. H.; McDANIEL, H. R.; SHANNON, W. M. Inhibition of AIDS virus replication by acemannan in vitro. **Molecular Biotherapy**. v. 3, p. 127–135, 1991.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 423-433, 2003.

KAR, A.; PANDA, S.; BHARTI. Relative efficacy of three medicinal plant extract in the alteration of thyroid hormone concentration in male mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 281-285, 2002.

KARACA, K.; SHARMA, J. M.; NORDGREN, R. Nitric oxide production by chicken macrophages activated by acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. **International Journal of Immunopharmacology**. v. 17, p. 183-188, 1995.

KARDOŠOVÁ, A.; MACHOVÁ, E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. **Fitoterapia**. v. 77, p. 367-373. 2006.

KATON, J. E. Infrared microspectrometry. A review of fundamentals and applications. **Micron**. v. 27, n. 5, p. 303-314. 1996.

KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON, R. H. Discrimination between *Coffea Arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. v. 54, p. 321-326, 1995.

KENT, E. Use of an immunostimulant as an aid in the treatment and management of fibrosarcoma in three cats. **Feline Practical**. v. 21, 1993.

KIM, H.S.; KACEW, S.; LEE, B. M. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1637-1640, 1999.

KIM, H. S.; LEE, B. M. Inhibition of benzo[ $\alpha$ ]pyrene-DNA adduct formation by *Aloe barbadensis* Miller. **Carcinogenesis**. v. 18, p. 771-776, 1997.

KING, G. K.; YATES, K. M.; GREENLEE, P. G.; PIERCE, K. R.; FORD, C. R.; McANALLEY, B. H.; TIZARD, I. R. The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. **Journal of the American Hospital Association**. v. 31, p. 439-447, 1995.

KOBAYASHI, H.; MATSUNAGA, K.; FUJII, M. PSK as a chemopreventive agent. **Cancer Epidemiology Biomarkers Preventive**. v. 2, p. 271-276, 1993.

KOCH, A. Metabolism of aloin – the influence of nutrition. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1335-1338, 1996.

KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. Structural analysis of antiviral sulfated  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-linked mannans. **Carbohydrate Research**. v. 273, p. 179–185, 1995.

KUMAR, A.; DHAWAN, S.; AGGARWAL, B. B. Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. **Oncogene**. v. 17 n. 7, p. 913–918, 1998.

KUO, Y. C.; MENG, H. C.; TSAI, W. J. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. **Inflammation Research**. v. 50, n. 2, p. 73–82, 2001.

KUO, P.; LIN, T. C.; LIN, C. C. The antiproliferative activity of aloe–emodin is through p53 dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. **Life Science**, v. 71, p. 1879-1892, 2002.

LAMBERT, J. B.; SHURVELL, H. F.; LIGHTNER, D. A.; COOKS, R. G. **Organic structural spectroscopy**. Upper Sadle River: Prentice Hall, 1998.

LE GALL, G.; PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between orange juice and pulp wash by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 580-588, 2001.

LEE, J. K.; LEE, M. K.; YUN, Y. P.; KIM, Y.; KIM, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, K.; HUAN, S.S.; LEE, C. K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1275-1284, 2001.

LEE, H. Z.; HSU, S. L.; LIU, M. C.; WU, C. H. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. **European Journal of Pharmacology**. v. 431, p. 287-295, 2001b.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **Glycobiology**. v. 14, n. 6, p. 501-510. 2004.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**. v. 46, n. 4, p. 689-693, 1997.

LOSSO, J. N. Targeting excessive angiogenesis with functional foods and nutraceuticals. **Trends in Food Science & Technology**. v. 14, p. 455-468, 2003.

MAEDA, Y. Y.; TAKAHAMA, S.; YONEKAWA, H. Two dominant loci for the vascular responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. **Immunogenetics**. v. 47, p. 159-165, 1998.

McANALLEY, B. H. **Processes for preparation of aloe products produced thereby and compositions thereof**. U.S. Patent 4,959,214, 1990

McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Wound healing accelerated by systemic administration of polysaccharide from aloe**. U.S. Patent 5,468,737, 1995.

MANNA, S.; McANALLEY, B. H. Determination of the position of the O-acetyl group is a  $\beta$ -(1,4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**. v. 241, p. 317-319, 1993.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428. 1959.

MONNEVEUX, P.; PASTENES, C.; REYNOLDS, M. P. Limitations to photosynthesis under light and heat stress in three high-yielding wheat genotypes. **Journal of Plant Physiology**. v. 160, p. 657-666, 2003.

MOODY, J.O., ADEBIYI, O. A., ADNIYI, B.A. – Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (osedudu)? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 57-60, 2004.

MOON, E.J.; LEE, Y. M.; LEE, O. H.; LEE, M. J.; LEE, S.K.; CHUNG, M. H.; PARK, Y. I.; SUNG, C. K.; CHOI, J.S.; KIM, K. W. A novel angiogenic factor from *Aloe vera* gel:  $\beta$ -sitosterol, a plant sterol. **Angiogenesis**, v. 3, p. 117-123, 1999.

MOURY J. D.; SCHOENWOLF, G. C. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movement of the epidermis and interaction in the neural plate/epidermis transition zone. **Development Dynamic**, v.204, p. 185-194, 1995.

MORTON, J. F. Folk uses and commercial exploitation of Aloe leaf pulp. **Economic Botany**. v. 15, p. 311-319, 1961.

NATH, D.; SETHI, N.; SINGH, R. K.; JAIN, A. K. Commonly used Indian abortifacient plants with special reference to their teratologic effects in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 36, p. 147–154, 1992.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K. M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1745-1755, 2004.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K. M.; TIZARD, I. **Aloe polysaccharides**. In *Aloes – The genus Aloe* [Tom Reynolds org]. Boca Raton: CRC press, 2004b.

OAK, M.; BEDOUI, J.; SCHINI-KERTH, V. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 1-8, 2005.

O' BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**. v. 80, p. 1–41, 1991.

OKAMURA, N.; HINE, N.; HARADA, S.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; YAGI, A. Three chromone components from *Aloe vera* leaves. **Phytochemistry**. v. 43, n. 2, p. 495-498, 1996.

OKAMURA, N.; HINE, N.; TATEYAMA, Y.; NAKAZAWA, M.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; YAGI, A. Five chromones from *Aloe vera* leaves. **Phytochemistry**. v. 49, n. 1, p. 219-223, 1998.

OKAY, A.; CAN, A.; AKEV, N.; BAKLER, G. SUTLUPINAR, N. Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 157–161, 2001.

PAEZ, A.; GEBRE, G. M.; GONZALEZ, M. E.; TSCHAPLINSKI, T. J. Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 133-139, 2000.

PANDYA, N. M.; DHALLA, N. S.; SANTANI, D. D. Angiogenesis – a new target for future therapy. **Vascular Pharmacology**. v. 44, p. 265-274, 2006.

PATTEN, B. M. **Early Embryology of the Chick**. 4<sup>a</sup>. ed, Philadelphia: Blakiston, 1951. 244 p.

PECERE, T.; GAZZOLA, M. V.; MICIGNAT, C.; PAROLIN, C. VECCHIA, F. D.; CAVAGGIONI; DIASPRO, A.; SALVATO, M. C.; PALÙ, G. Aloe–emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. **Cancer Research**. v. 4, p. 60-2800, 2000.

PERLIN, A. S.; CASU, B.; KOCH, H. J. Configurational and conformational influence on the carbon-13 chemical shifts of some carbohydrates. **Canadian Journal Chemistry**. v. 48, p. 2596

PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; GIN, H.; DÉLÉRIS, G. Differentiation of populations with different physiologic profiles by plasma Fourier-transform infrared spectra classification. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**. v. 137, p. 184-190.

PRASHANTH, M. R. S.; PARVATHY, K. S.; SUSHEELAMMA, N. S.; PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N.; CHA, A.; ANILKUMAR, G. Galactomannan esters – A simple, cost-effective method of preparation and characterization. **Food Hydrocolloids**. v. 20, p. 1198-1205, 2006.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N. P. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 578p. 1985.

PRINCIVALLE, M.; AGOSTINI, A. De. Development roles of heparin sulfate proteoglycans a comparative review in Drosophila, mouse and human. **International Journal of Developmental Biology**, v. 9, n. 6, p. 677-684, 2002.

PURCELL, D. E.; O'SHEA, M. G.; KOKOT, S. Role of chemometrics for at-field applications fo NIR spectroscopy to predict sugarcane clonal performance. **Chemometrics and Inteligent Laboratory Systems**. IN PRESS, 2006.

QIU, Z.; JONES, K.; WYLIE, M.; JIA, Q.; ORNDORFF, S. Modified *Aloe barbadensis* polysaccharide with immunoregulatory activity. **Planta Medica**. v. 66, p. 152–156, 2000.

QUER P.F. **Plantas Medicinales**. 5<sup>a</sup>. ed., Barcelona: Editorial Labor, S. A., 1982.

RAFII, S.; LYDEN, D.; BENEZRA, R.; HATTORI, K.; HEISSIG, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? **Nature Reviews Cancer**, v. 626-635, 2002.

RAMAMOORTHY, L.; KEMP, M. C.; TIZARD, I. R. Acemannan, a  $\beta$ -(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. **Molecular Pharmacology**. v. 50, p. 878-884, 1996.

RAMAMOORTHY, L.; TIZARD, I. R. Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a  $\beta$ -(1,4)-acetylated mannan. **Molecular Pharmacology**. v. 53, p. 415-421, 1998.

REYNOLDS, T. **Aloe chemistry**. In: Aloes – The genus Aloe [REYNOLDS, T. org]. Boca Raton: CRC press, 2004.

REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 3-37, 1999.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; NICO, B.; RONCALI, L.; CAMMACCO, F. Postnatal vasculogenesis. **Mechanisms of Development**, v. 100, p. 157-163, 2001.

RISAU, W.; SARIOLA, H.; ZERVES, H. G.; SASSE, J.; EKBLUM, P.; KEMLER, R.; DOETCHMAN, T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. **Development**, v. 102, n. 3, p. 471-478, 1988.

ROBOZ, E.; HAAGEN-SMITH, M. A mucilage from *Aloe vera*. **Journal American Chemical Society**. v. 70, p. 3248, 1948.

RODRIGUEZ, J.D.; HERNANDEZ-CASTILLO, D.; RODRIGUEZ-GARCIA, R.; ANGULO-SANCHEZ, J.L. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**. v. 21, p. 81-87, 2005.

RUITTER, M. C. (ed) A concept of the origin of systemic-pulmonary collateral arteries. Cap. 5. Koninklijke. Leiden. p. 99-186. 1992.

SACCÙ, D.; BOGONI, P.; PROCIDA, G. Aloe exudates: Characterization by reverse phase HPLC and headspace CG-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4526-4530, 2001.

SAKAI, R. Epidemiologic survey on lung cancer with respect to cigarette smoking and plant diet. **Japanese Journal Cancer Reserarch**. v. 80, p. 513-520, 1989.

SAKS, Y.; BARKAI-GOLAN, R. Aloe vera gel activity against planta pathogenic fungi. **Postharvest Biology Technology**, v. 6, p. 159-165, 1995.

SALEEM, R.; FAIZI, SHAHEEN, F.; DEEBA, F.; SIDDIQUI, B. S.; QAZI, M. H. Anthrones from *Aloe barbadensis*. **Phytochemistry**. v. 45, n. 6, p. 1279-1282. 1997.

SAMPEDRO, M. C.; ARTOLA, R. L.; MARATURE, M.; MARATURE, D.; DITAMO, Y.; ROTH, G. A.; KIVANITZ, S. Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 411-418, 2004.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: Farmacognosia da planta ao medicamento [SIMÕES, C. M. O. et al.org]. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS,2004.

SANTA RITA, T. G. **Estudo e estrutura dos polissacarídeos da *Aloe africana* Mill.** 1984. 89 f. Tese (Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Pós Graduação em Engenharia de Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas, 1984.

SCHOENWOLF, G. C. Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses. **Ciba Foundation Symposium**. v. 181, p. 25-50, 1994.

SEMPLE, S. J.; PYKE, S. M.; REYNOLDS, G. D.; FLOWER, R. L. In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. **Antiviral Research**. v. 49, p. 169–178, 2001.

SENA, M. M. de; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**. v. 23, n.4, p.547-556, 2000.

SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS. Produtos químicos. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em: 15/01/07.

SHAND, D. G.; YATES, K.; MOORE, D. E.; McANALLEY, B. H.; RODRIGUEZ, S. **Bioactive factors of aloe vera plants**. U.S. Patent 5,902,796, 1999.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potencial. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 317-333. 2006.



SHIBUYA, M.; CLAESSION-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Experimental Cell Research**. v. 312, p. 549-560, 2006.

SHOU, S.; LU, G.; HUANG, X. Seasonal variations in nutritional components of green asparagus using the mother fern cultivation. **Scientia Horticulturae**. Article In Press, 2007.

SILVA, P. C. S. C. **Efeito da variação sazonal na produção de compostos ativos em *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray, utilizando ensaios com microorganismos**. 2004. 37f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica Vegetal). Universidade de São Paulo, 2004.

SILVA JÚNIOR, A. **Essentia herba – Plantas bioativas**.. Florianópolis: EPAGRI, 2003. Volume 1. 441p. p. 120-148

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Introdução à Espectroscopia de Compostos orgânicos**. 6ª ed. Rio de Janeiro:LTC Editora, 2000.

SIMÕES, C. M.O; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS, 1996.

SINGH, R.P.; DHANALAKSHMI, S.; RAO, A. R. Chemomodulatory action of Aloe vera on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. **Phytomedicine**. v.7, p. 209-219. 2000.

SMALL, G. W. Chemometrics and near-infrared spectroscopy: Avoiding the pitfalls. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 25, n. 11, p.1057-1066, 2006.

SOUTHWELL, I. A.; BOURKE, C. A. Seasonal variation in hypericin of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). **Phytochemistry**. v. 56, p. 437-441, 2001.

SPECTRAL SERVICE LABORATORIUM FÜR AUFTRAGSANALYTIK GmbH. **Analysenbericht MKA 10492**. Köln, 2002

SPRINGER, M. L.; CHEN, A. S.; KRAFT, P. E.; BEDNARSKI, M.; BLAU, H. M. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculoecgenesis in adults. **Molecular Cell**. v. 2, p. 549-558, 1998.

SRINIVAS, G.; ANTO, R. J.; SRINIVAS, P.; VIDHYALAKSHMI, S.; SENAN, V. P.; KARUNAGARAN, D. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. **European Journal of Pharmacology**. v. 472, p. 117–125, 2003.

SWEENEY, L. J. Hematopoietic System. In: **Basic Concepts in Embryology**. New York: McGraw-Hill, 1998. p. 397-411.

SYDISKIS, J.; OWEN, D. G.; LOHR, J. L.; ROSLER, K. H.; BLOMSTER, R.N. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 35, p. 2463–2466, 1991.

TALMADGE, J.; CHAVEZ, J.; JACOBS, L.; MUNGER, C.; CHINNAH, T.; CHOW, J. T.; WILLIAMSON, D.; YATES, K. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1757-1773, 2004.

TANG, Y.; LEE, T. S.; LEE, H. Y.; KHOSLA, C. Exploring the biosynthetic potential of bimodular aromatic polyketide synthases. **Tetrahedron**. v. 60, p. 7659-7671, 2004.

TIAN, B.; HUA, Y. Concentration-dependence of prooxidant effects of aloin and aloemodin on DNA. **Food Chemistry**, v. 91, p. 413-418, 2005.

TOBELEM, G. Endothelial cell growth: Biology and Pharmacology in relation to angiogenesis. **Blood Coagulation and Fibrinology**, v. 1, p. 703-705, 1990.

TUETTENBERG, J.; FRIEDEL, C.; VAJKOCZY, P. Angiogenesis in malignant glioma – A target for antitumor therapy? **Critical Review in Oncology/Hematology**. v. 59, p. 181-193, 2006.

TURNER, C. C.; WILLIAMSON, D. A.; STROUD, P. A.; TALLEY, D. J. Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1727-1737, 2004.

TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; CLAUS, E. P. **Glycosides**. In: Pharmacognosy. Henery Kimpton Publishers, London. 6a. Ed.1971.

VAZQUEZ, B.; AVILA, G.; SEGURA, D.; ESCALANTE, B. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 69-75, 1996.

VLACHOS, N.; SKOPELITIS, Y.; PSAROUDAKI, M.; KONSTANTINIDOU, V.; CHATZILAZAROU, A.; TEGOU, E. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. **Analytica Chimica Acta**. v. 573-574, p. 459-465, 2006.

WALLER, G. R.; MANGIAFICO, S.; RITCHEY, C. R.; A chemical investigation of *Aloe barbadensis* Miller. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**. v. 58, p. 69-76. 1978.

WALLER, T.A.; PELLE, R.P.; STRICKLAND, F.M. **Industrial processing and quality control of *Aloe barbadensis* (*Aloe vera*) gel**. In: Aloes – The genus *Aloe* [REYNOLDS, T. org]. Boca Raton: CRC press, 2004.

WANG H. H.; CHUNG, J. G.; HO, C. C.; ET AL. Aloe emodin effects on arylamine N-acetyltransferase activity in bacterium *Helicobacter pylori*. **Planta Médica**. v. 64, p. 176-178, 1998.

WASSERMAN, L. AVIGARD, S. BEERY, E.; NORDENBERG, J.; FENIG, E. The effect of aloe emodin on the proliferation of a new Merkel carcinoma cell line. **American Journal of Dermatopathology**. v. 24, p. 17-22, 2002

WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytotoparmaceuticals**. Stutgard: Medpharma Scientific Publishers, 2004. 704 p. pp. 25-29.

WIJNSMA, R. **Anthraquinones and alkaloids in cell and tissue cultures of *Cinchona* species**. 1986. 131 f. Tesis (Doctor in Farmacognosy) – Leiden University, 1986.

WILLIAMS D. H.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. Londres: McGraw-Hill, 5. ed, 1995.

WINTERS, W. D.; BENAVIDES, R.; CLOUSE, W. J. Effects of aloe extracts on human normal and tumor cells *in vitro*. **Economic Botany**. v. 35, p. 89–95, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva, 1999. v. 1, 289 p. pp. 33-49.

XIE, L.; YING, Y.; YING, T.; YU, H.; FU, X. Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near-infrared spectra. **Analytica Chimica Acta**. IN PRESS, 2006.

XU, F.; SUN, J. X.; SUN, R. C.; FOWLER, P.; BAIRD, M. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. **Industrial Crops and Products**. v. 23, p. 180-193, 2006.

YAGI, A.; NISHIMURA, H.; SHIDA, T.; NISHIOKA, I. Structure determination of polysaccharides in *Aloe arborescens* var. natalensis. *Planta Medica*, v. 3, p. 213-218, 1986.

YAGI, A.; EGUSA, T.; ARASE, M.; TANABE, M.; TSUJI, H. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells in vitro from the *Aloe vera* gel. **Planta Medica**. v. 63, p. 18-21, 1997

YANCOPOULOS, G. D.; KLAGSBRUN, M. Vasculogenesis, angiogenesis and growth factors: Ephrins enter the fray at the border. **Cell**. v. 93, p. 661-664, 1998.

YANG, L.; XU, Y.; SU, Y.; WU, J.; ZHAO, K.; CHEN, J.; WANG, M. FT-IR spectroscopy study on variations of molecular structures of some carboxyl acids induced by free electron laser. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 62, p. 1209-1265. 2005.

YATES, K. M.; ROSENBERG, L. J.; HARRIS, C. K.; BRONSTAD, D. C.; KING, G. K.; BICHLE, G. A.; WALKER, B.; FORD, C. R.; HALL, J. E.; TIZARD, I. R. Pilot study of the effect of acemannan in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 35, p. 177-189, 1992.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; CHUANG, D. Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. **Food Chemistry**. v. 70, p. 437-441. 2000.

YUSUF, S.; AHUNU, A.; DIANA, M. The effect of *Aloe vera* A. Berger (Liliaceae) on gastric acid secretion and acute gastric mucosal injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 33-37, 2004.

ZAMMARETTIA, P.; ZISCH, A. H. Adult 'endothelial progenitor cells' renewing vasculature. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 493-503, 2005.

ZHANG, L.; TIZARD, I. R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. **Immunopharmacology**, v. 35, p. 119-128, 1996.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MÜNSTEDT, K.; LANG, U.; LIANG, O. D. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, p. 10-18, 2003.

ZONTA, F.; BOGONI, P.; MASOTTI, P.; MICALI, G. High-performance liquid chromatographic profiles of aloe constituents and determination of aloin in beverages, with references to the EEC regulation for flavouring substances. **Journal of Chromatography A**, v. 718, p. 99-106, 1995.

# **ANEXOS**



## CLONING PROTOCOL OF Aloe vera AS A STUDY-CASE FOR “TAILOR-MADE” BIOTECHNOLOGY TO SMALL FARMERS

Campestrini, LH<sup>1</sup>; Kuhnen, S<sup>1</sup>; Lemos, PMM<sup>1</sup>; Bach, DB<sup>2</sup>; Dias, PF<sup>3</sup>; Maraschin, M<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory – University Federal of Santa Catarina – CCA, P.O. Box 476, 88049-900, Phone: 55-48-3331-5328, Florianopolis – SC, Brazil.

<sup>2</sup> Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltd. Estrada Geral Santa Rita, s/n - Fazenda Cafezal, 88.490-000, Phone: 55-48-3223-3265, Paulo Lopes – SC, Brazil

<sup>3</sup> Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, CCB - University Federal of Santa Catarina, Florianopolis – SC, Brazil.

E-mail: [m2@cca.ufsc.br](mailto:m2@cca.ufsc.br) \*

### Abstract

Aloe vera has been used worldwide both for pharmaceutical, food, and cosmetic industries due to the plethora of biological activities of some of its metabolites. A study case is reported focusing on the development of a cloning protocol of *A. vera* to provide propagation material with superior quality to the private sector in southern Brazil, i.e., *A. vera* juice industry. Such biotechnological approach afforded ca. 4,300 plantlets from 20 explants, over a 6-month period, overcoming the drawback of the lack of propagation material. Typically, the results have led to the increase of the cultured area and juice production of that species coming true the goal of the partnership between the public and private sectors herein involved. The transference of the resulting technology was successfully performed to the company and a patent covering the biotechnological process has been recently requested to official organisms on behalf of the partners.

### Keywords:

Biotechnological process innovation, Aloe vera, technology transference, university-private sector cooperation.

## Introduction

Historical evidences point to Africa as origin center of *Aloe vera* Müller, a species already cultured by Egyptian and Mediterranean people thousands of years B.C. Phytochemical studies have shown the presence of several bioactive compounds originated from *Aloe vera*'s primary and secondary metabolism pathways, which have been widely used in formulations (gels and juices, e.g.) in commercial scale all over the world. As example of those compounds is worth mentioning enzymes (lipases, bradykinases and proteases), mono e polysaccharides (glucomannans), amino acids, vitamins (A, B12, C and D), anthraquinones (aloin and emodin), saponins, salicylic acid, lignin and steroids (lupeol, campesterol, and sitosterol). A number of biological activities have been claimed to those substances, such as antiseptic [saponins and anthraquinones], anti-tumoral [mucopolysaccharides], anti-inflammatory [steroids and salicylic acid], antioxidant [vitamins], and immune-regulator [glucomannans] effects (Weiner & Weiner, 1994). Due to the wide spectrum of application in human health, the products containing *A. vera*'s compounds have showed a strong demand in both national and international markets. Accordingly, an increasing search for *A. vera* biomass of high quality can be envisaged in local markets. However, since the biomass availability in Brazil is restricted, the expansion of this activity finds its "bottleneck". In order to overcome this constraint, high yields should be a goal to be pursued in conventional cultures systems of *Aloe vera*, as well as the enlargement of the cultivated area. For that, a basic question should be addressed, i.e., the utilization of propagation material of high genetic and sanitary quality and its commercial availability.

*Aloe vera* is usually propagated through lateral shoots which the donor-plant produces mostly over the growth season. The number of lateral shoots/donor plant is low and also variable over time, becoming difficult to plan in a rational basis a production system in commercial scale for obtainment of plant propagation material. In general, 3 to 4 lateral shoots/donor plant/year are found in conventional production systems, what is a time-consuming and tedious task, as well as an obviously meaningful drawback for purpose of large scale production of plant propagation material. In fact, this can be more easily visualized as one aims at obtaining propagation material to, for instance, 1 hectare, having a plant density of 12,000 to 16,000 plants/ha, as usually found in commercial production systems. Additionally, a higher incidence of diseases is expected to happen due to lesions caused to donor-plant after withdrawing of the lateral shoots.

This picture points to a significant constraint concerning the availability of propagation material from *A. vera* with superior genetic and sanitary qualities, so that the enlargement of the cultured area is a difficult task. Accordingly, the production of cosmetics, foods and pharmaceuticals containing *A. vera* has experienced a slow increase due to limited offering of raw material with high quality.

As a feasible solution for the production of higher quality propagation material of *A. vera* in large scale, biotechnological techniques have been thought of. Such approach has allowed the *in vitro* cloning and multiplication (by means of development of apical meristems as explants cultured in appropriate basal medium, for instance) in commercial scale of several plant species, as well as of superior germoplasms, being especially important for that recalcitrant species to conventional propagation techniques (cuttings and grafting, e.g.).

Over the last years, a micropropagation protocol for genotypes of *A. vera* was developed by Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory (University Federal of Santa Catarina PMBL/UFSC) upon request and on behalf of small farmers, hereafter named Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltd. Naturama is a small scale industry of *A. vera* juice in southern Brazil (Paulo Lopes county, Santa Catarina State), with an increasing participation in the local market. This partnership found financial support with the Brazilian Service for Support to Micro and Small Enterprises (SEBRAE/SC), a private institution that aims to promote the development of small producers in both rural and urban areas. Based in such a study case, some technical subjects are presented and discussed afterwards, which allowed in a consistent manner to increase the availability of *A. vera*'s propagation material to the partner company, with the consequent enlargement of the cultured area of that medicinal plant. Furthermore, it was possible to realize a significant decrease in the occurrence of diseases in the *A. vera* population at field conditions just by replacing of the plant propagation material obtained through conventional methods (lateral shoots) for the micropropagated one. The transference of the developed technology was successfully performed to the company and a patent for purpose of registration of the intellectual property has been recently requested to official organisms. To the best of our knowledge, no previous report has been published on the transference of a biotechnological product to the private sector, i.e., *A. vera* juice industry, as herein described in Brazil.



## Method

The protocol for micropropagation of *Aloe vera* was previously reported (Araújo et al. 2002). Briefly, the protocol was developed using apical meristems as explants cultured in basal medium of Murashige and Skoog (1962) – MS medium, supplemented with sucrose (3g%), agar (0.7%) and the growth regulators naphthalene acetic acid (4.03 $\mu$ M) and 6-benzylaminopurine (6.67 $\mu$ M). The in vitro multiplication rate (number of lateral shoots/explant) of sixteen *A. vera* genotypes furnished by small farmers and originated from Florianópolis and Araquari counties (Santa Catarina State), Pato Branco, Rolândia, and Colombo counties (Paraná State) and also from Paraguay was assayed, over a 8 months period. During the experimental time the cultures were kept in growth chamber at 24 $\pm$ 1°C, 85% relative humidity of the air, 14-hour-photoperiod, and 100  $\pm$  5 $\mu$ M photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (as active photosynthetic radiation), with a subculture interval of 35 days.

After the in vitro growth stage, plantlets taller than 3cm were transferred to trays containing commercial substrate (Plantmax®) and kept at growth chamber under intermittent mist, for seven days. Further, the plantlets were transferred to plastic containers (~ 200mL internal volume) containing a mixture of soil and commercial substrate (Plantmax®, 1:1) and grown in greenhouse with periodic irrigation (3 days) and leaf manuring (15 and 21 day intervals, respectively for summer and winter seasons). After ca. two months growing under greenhouse conditions, the plantlets were directly transferred to field conditions, at Paulo Lopes county, and monitored over a 18-month period as to their agronomic traits (survival rate, phenological state evolution, resistance to pest and disease, and yield) and somaclonal variation occurrence (visual analysis of the phenotypes).

## Results

The data obtained for in vitro multiplication of the lateral shoots showed that experimental conditions induced a mean rate of new lateral shoots/explant of ca. 1:2. However, this value was strongly dependent of the genotype, i.e., the donor-plant, since a multiplication rate of 1:8 was obtained as well. These findings suggest the existence of distinct morphogenetic potentials among the genotypes in study. More specifically the genotype originated from Paraguay showed the highest multiplication rate, with values ranging from 1:6 to 1:8 and was further selected to massal multiplication. Similar results have been reported for the micropropagation of other medicinal species with high commercial value as *Coleus forskohlii*, *Camptotheca acuminata*, and *Valeriana edulis* sp. *procera*, for instance (Pletsch, 1998).

The protocol used for multiplication of lateral shoots was also able in inducing the rhizogenesis, but in a time-dependent way. Thus, in all the cultures older than 35 days were found platelets in different rooting stages, so that the subculture interval was changed to forty-five days. The data suggest that rhizogenesis induction is correlated, in any extension, to depletion of nutrients in culture medium. In fact, this methodology has allowed the obtainment of whole plants, i.e., aerial and rooting systems, without the need of transferring of the plantlets to rooting culture medium. Furthermore, in vitro rooting strongly influenced the survival rate of the plantlets over the acclimatization step. Notably, the rooted plantlets reached survival values of about 80% to 95%, as lower value was found to non-rooted plantlets (about 30% of survival). Interestingly, just after the transplant to commercial substrate, all the *A. vera* plantlets presented pronounced root degeneration, followed by the emission of new primary and secondary roots. In average, in vitro growth stage of the plantlets lasted for about 45-50 days, followed by an acclimatization step no longer than 2 months (spring and summer seasons) or 3 months (autumn and winter seasons) without temperature control in the greenhouse.

The occurrence of individuals evidencing any phenotypic variation both in vitro or ex vitro was not detected over 18 months after transplantation to the field, except for two young plants which showed albinism and variegation in leaf tissue during the acclimatization step. Such findings probably results from somaclonal variation, a common phenomenon with aleatory occurrence in plant cell and tissue cultures that leads to the arising of variant phenotypes with genetic or epigenetic origin. Up to date, the results indicate that somaclonal variation is not a meaningful phenomenon as the protocol herein reported is used for the micropropagation of *A. vera* genotypes.

## Discussion

The described protocol seems to be technologically suitable for clonal multiplication of *A. vera* in large scale, affording propagation material with high genetic and sanitary quality. Over a 6-month-period, about 4,300 plantlets were obtained in vitro from 20 initial explants, clearly revealing the potential of such a technological strategy to overcome the lack of propagation material of superior quality. Preliminary estimation point to a cost of ca. US\$ 1, 00/plantlet (December - 2006), but it is assumed that the methodology herein described might be optimized in any extension, leading to a reduction in that value. However, comparatively to the conventional propagation system used to *A. vera* the results herein shown are significantly superior. In fact, it was possible to produce a large number of propagation materials, which are presently

in cultivation by the partner company, in a less expensive and time-consuming way. Additionally, this biotechnological approach has allowed the increase of the economic activity of Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltd. as technological improvements in its A. vera juice production system are claimed and are matter of currently concerns. In a near future, it is possible to envisage the complete autonomy of that company property regarding both the production of A. vera raw material and its transformation to juices and other derivative products (i.e., nutraceuticals).

In a more wide sense, the adoption of this biotechnological strategy could, in any extension and taking into account the specific conditions of each enterprise, be applied as a model (“tailor made”) to increase the incoming of Aloe-related companies, as a short-term goal, since it seems to be both technological and economical feasible.

## References

Weiner, M., & Weiner, J. A. (1994). *Herbs that heal*. Mill Valley: Quantum Books.

Araújo, P. S., Silva, J. M. O., Neckel, C., Ianssen, C., Oltramari, A. C., Passos, R., Tiepo, E., Bach, D. B., & Maraschin, M. (2002). Micropropagação de babosa (Aloe vera) – Biotecnologia de Plantas Mediciniais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 25, 54-57. Available at [www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br)

Murashige, T., & Skoog, D. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15, 473-497.

Pletsch, M. (1998). Compostos naturais biologicamente ativos: a aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 4, 12-15.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Pró-Reitoria de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais

Fone: (048) 3331-9206 - Fax: (048) 3331-9599

**CERTIFICADO DE CREDENCIAMENTO**

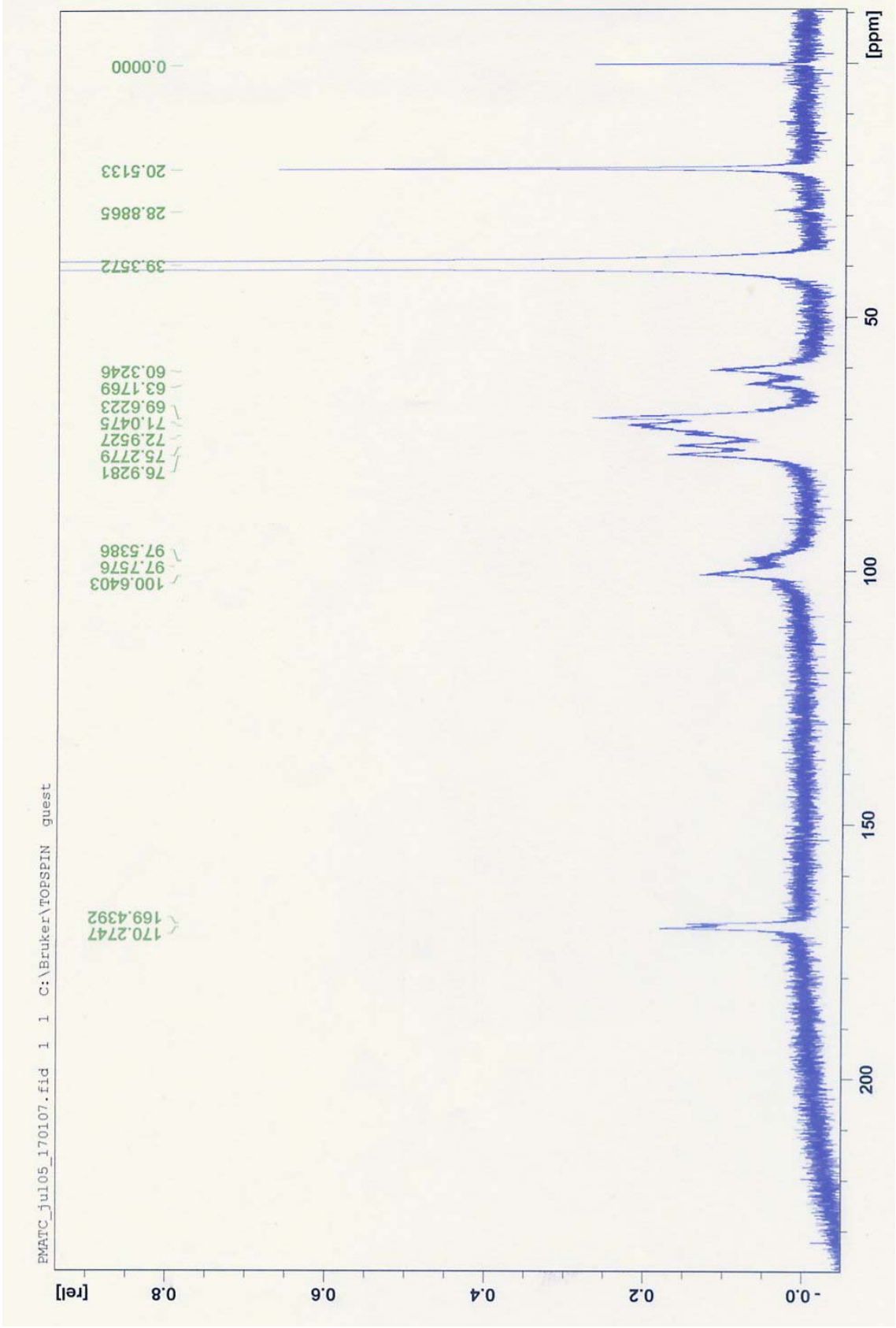
Certificamos que o Protocolo de Pesquisa/Ensino cadastrado sob os números PP00069/CEUA e 23080.028290/2006-11/UFSC, intitulado "Avaliação da ação moduladora de extratos, frações e compostos isolados de Aloe Vera (L) Burm, Zea mays L. e Ilex paraguariensis A. St.-Hil na vasculogênese, angiogênese e morfogênese embrionária", sob a responsabilidade do(a) Dr(a) Paulo Fernando Dias, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, do Centro de Ciências Biológicas; está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC, em 10 de novembro de 2006.

Este certificado expira em 10/11/2010.

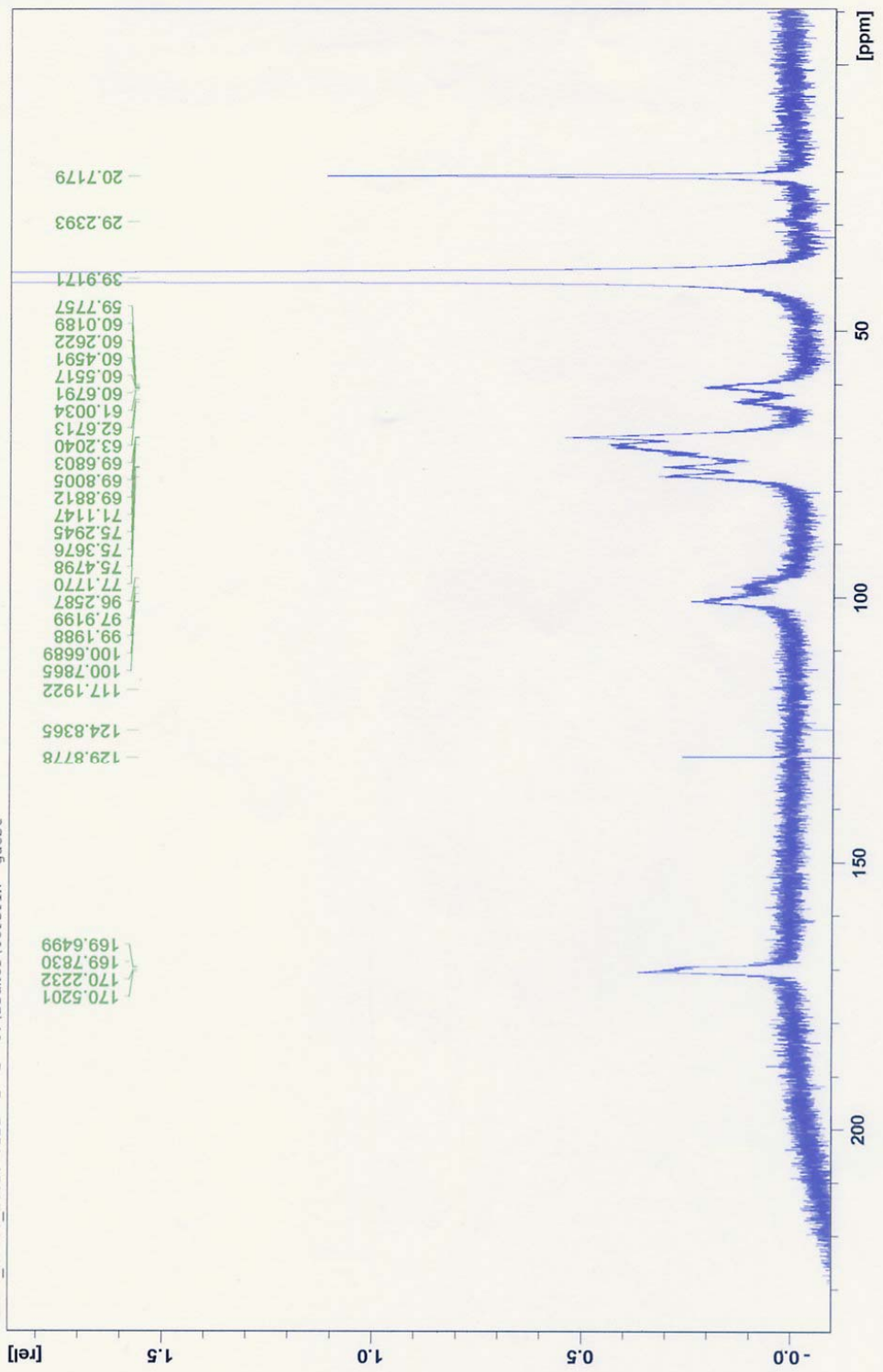
Florianópolis, 23 de novembro de 2006..

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da CEUA

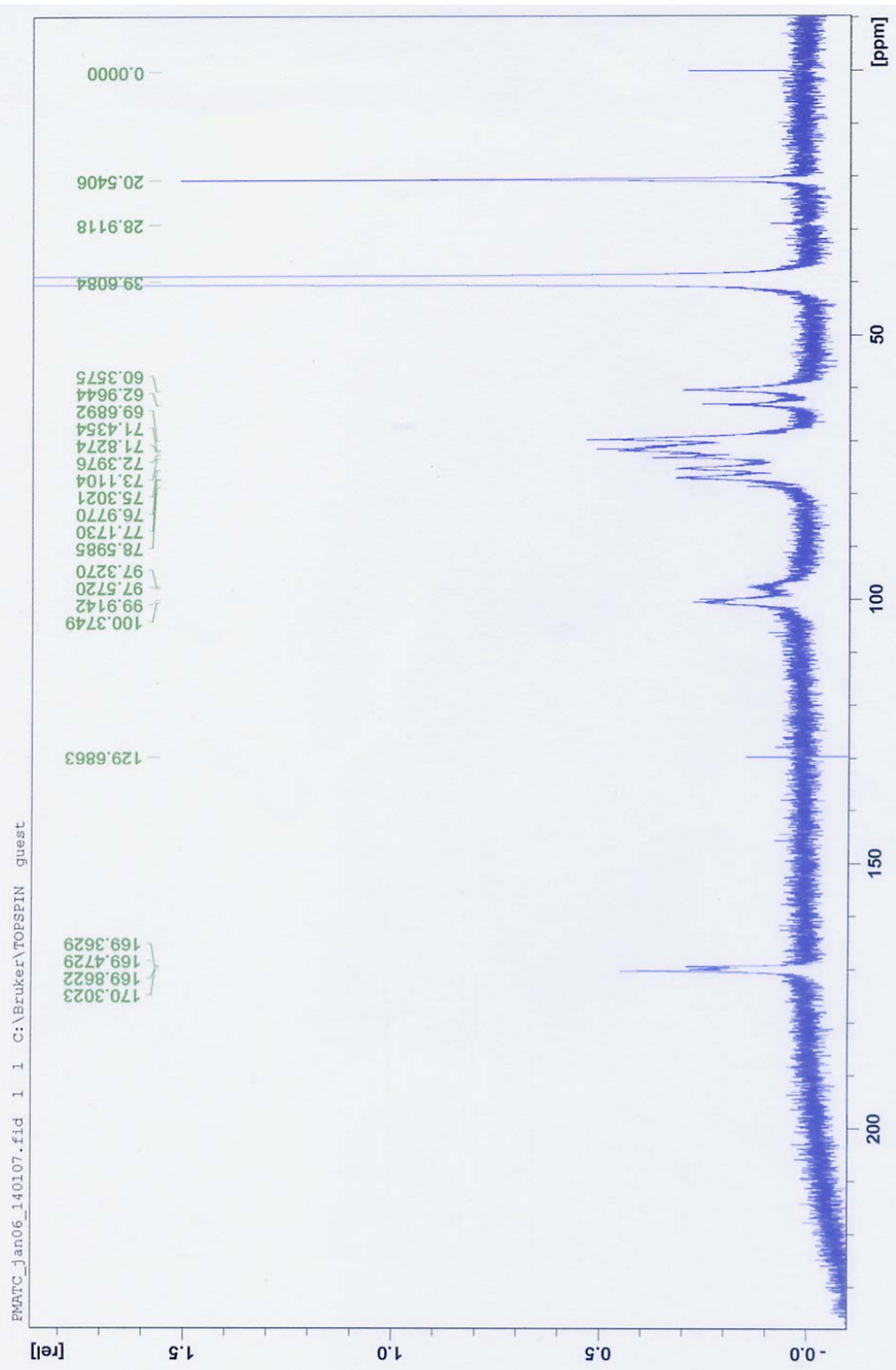
  
\_\_\_\_\_  
Professor responsável



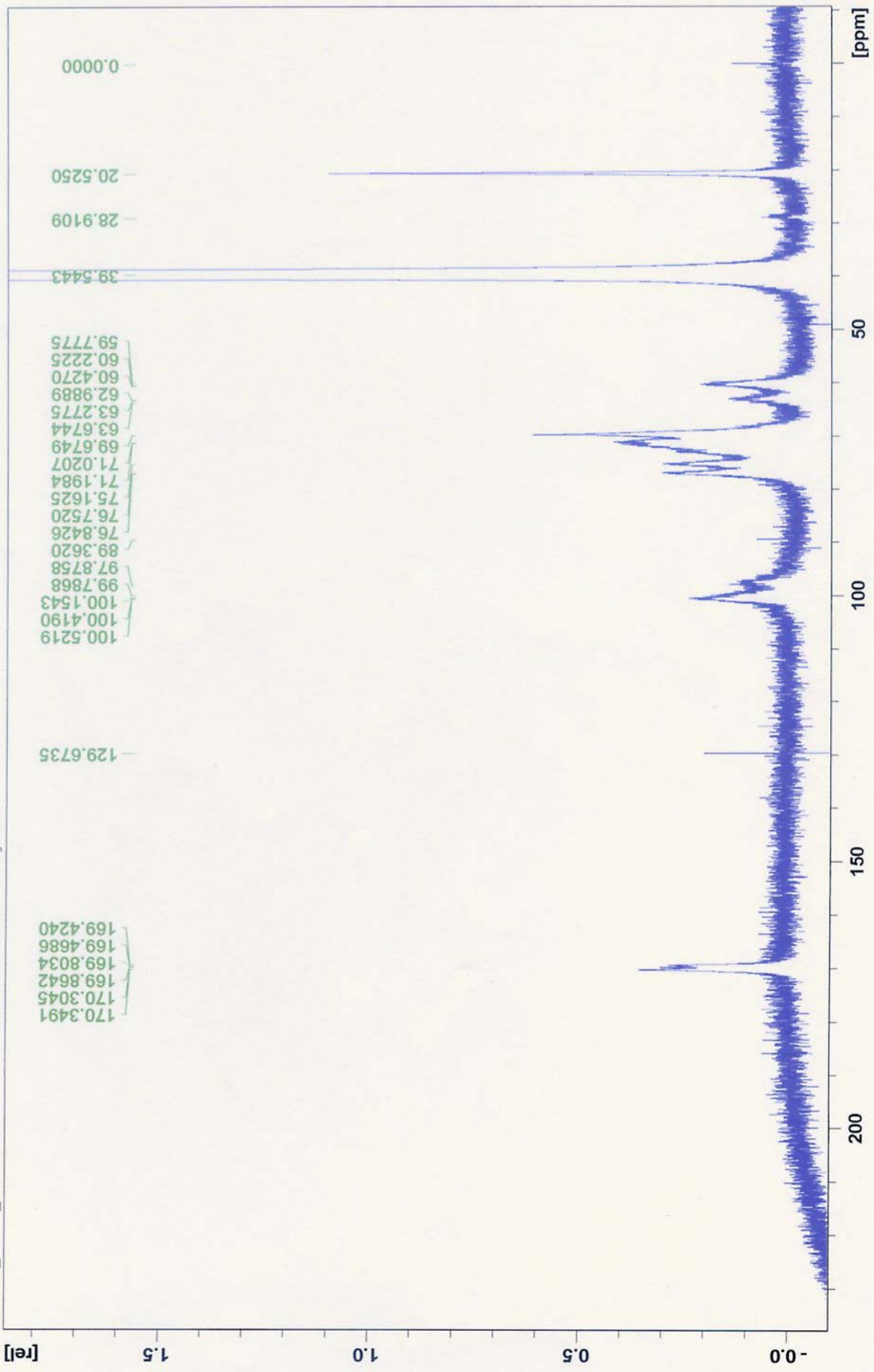
PMATC\_nov05\_160107.fid 1 1 C:\Bruker\TOPSPIN quest



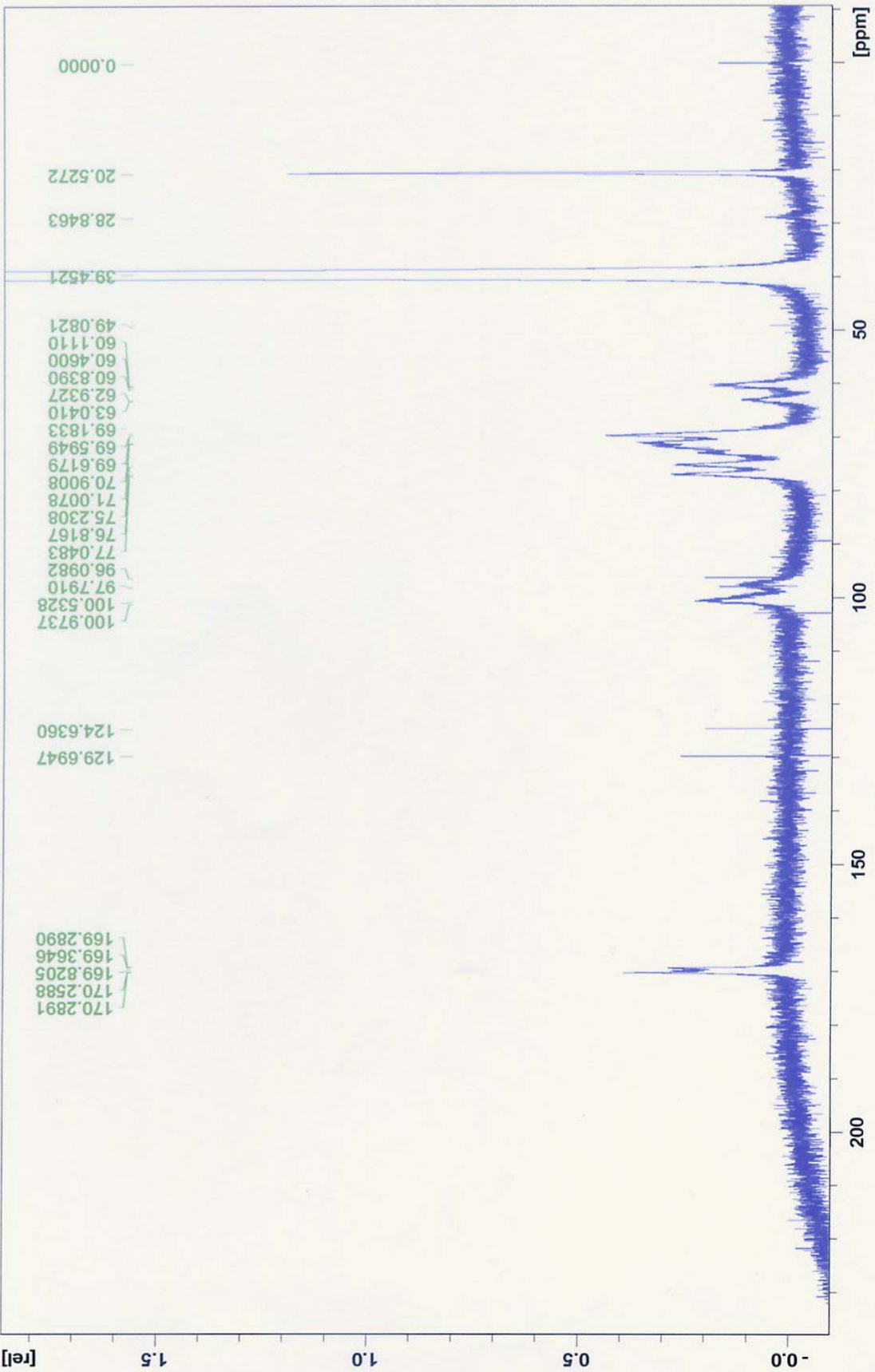




PMATC6\_mar06\_150107.fid 1 1 C:\Bruker\TOPSPIN quest

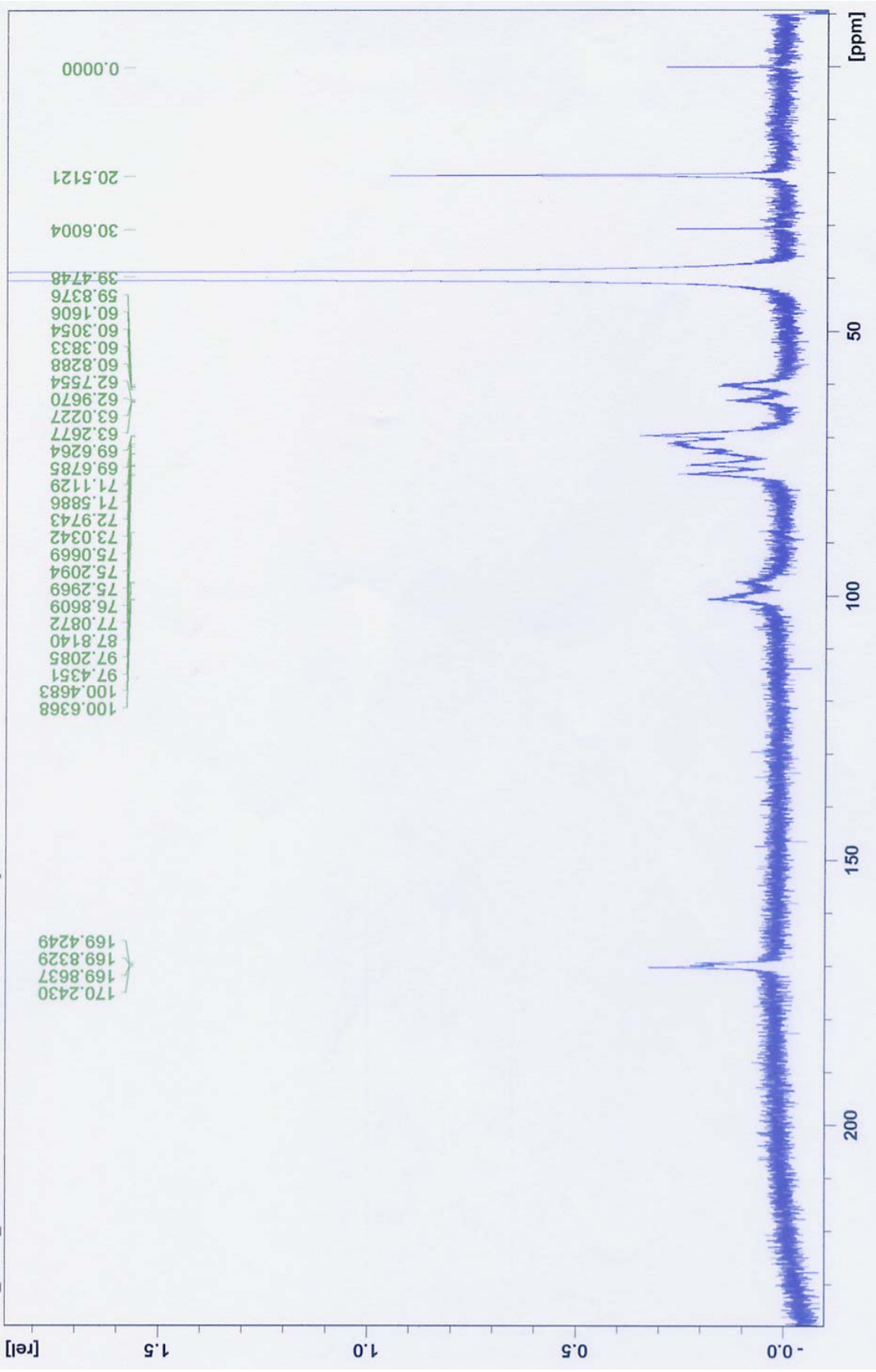


PPC\_jul05\_130107.fid 1 1 C:\Bruker\TOPSPIN guest

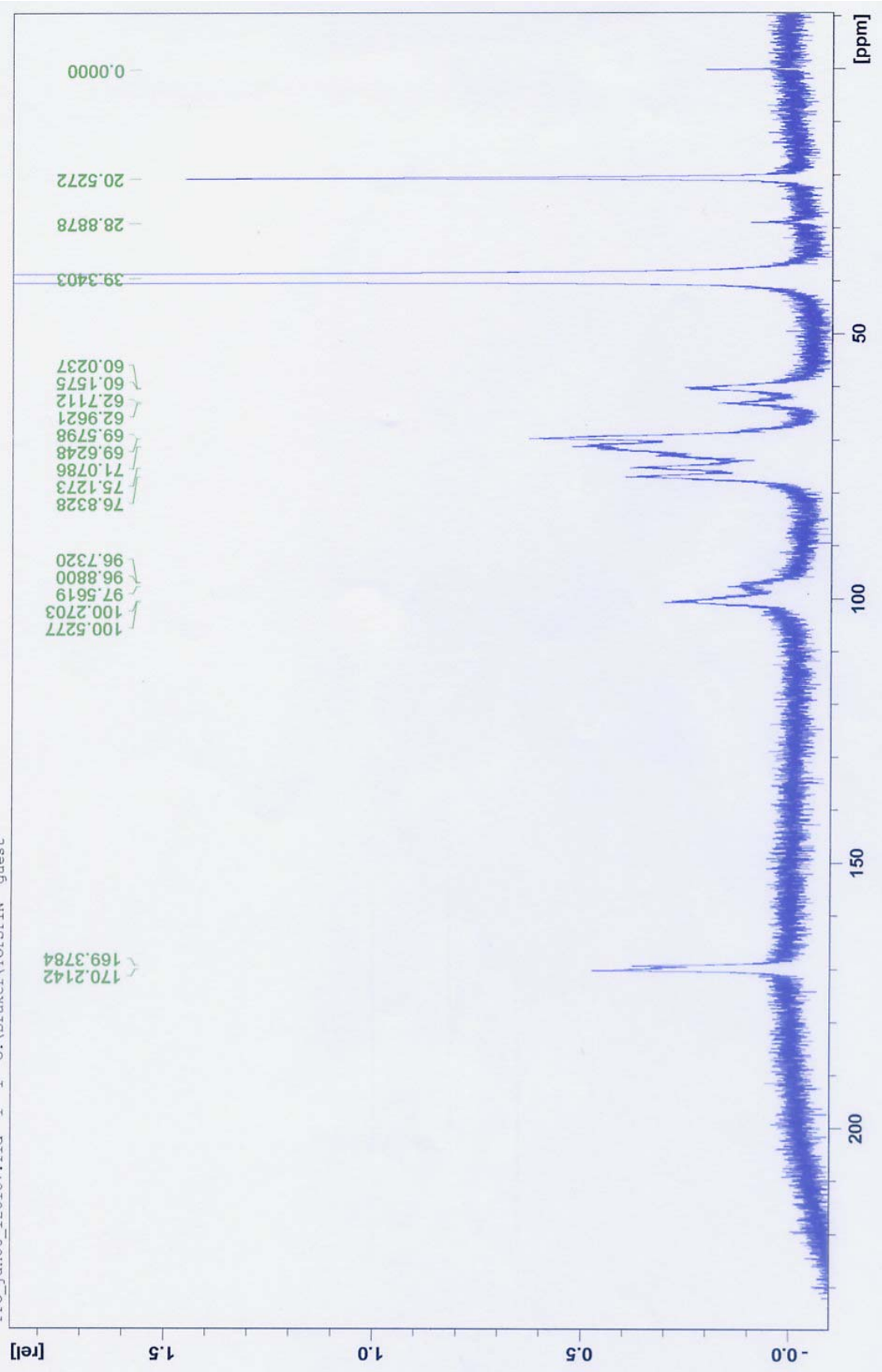




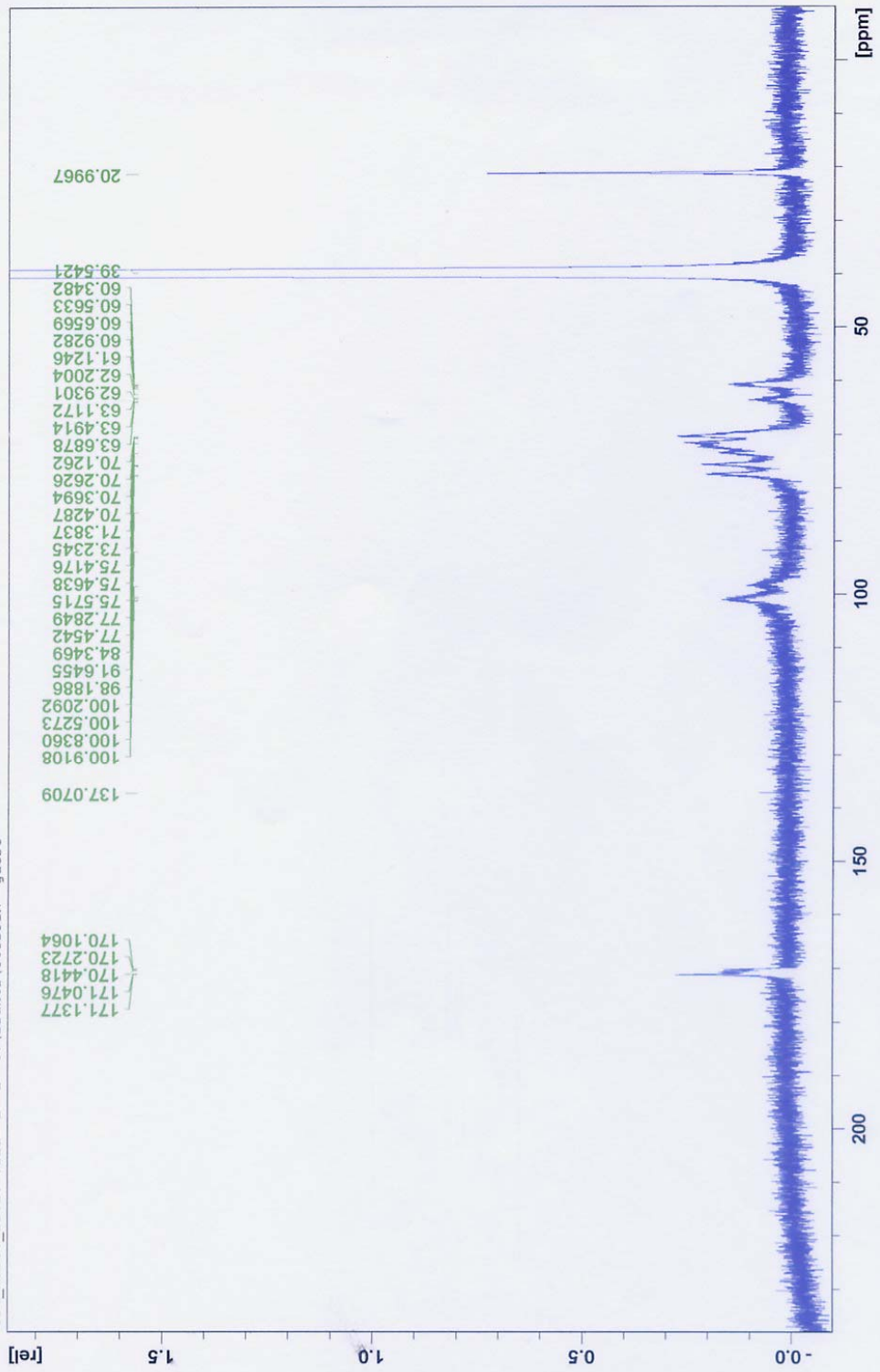
PPC\_nov05\_100107.fid 1 1 C:\Bruker\TOESPIN guest



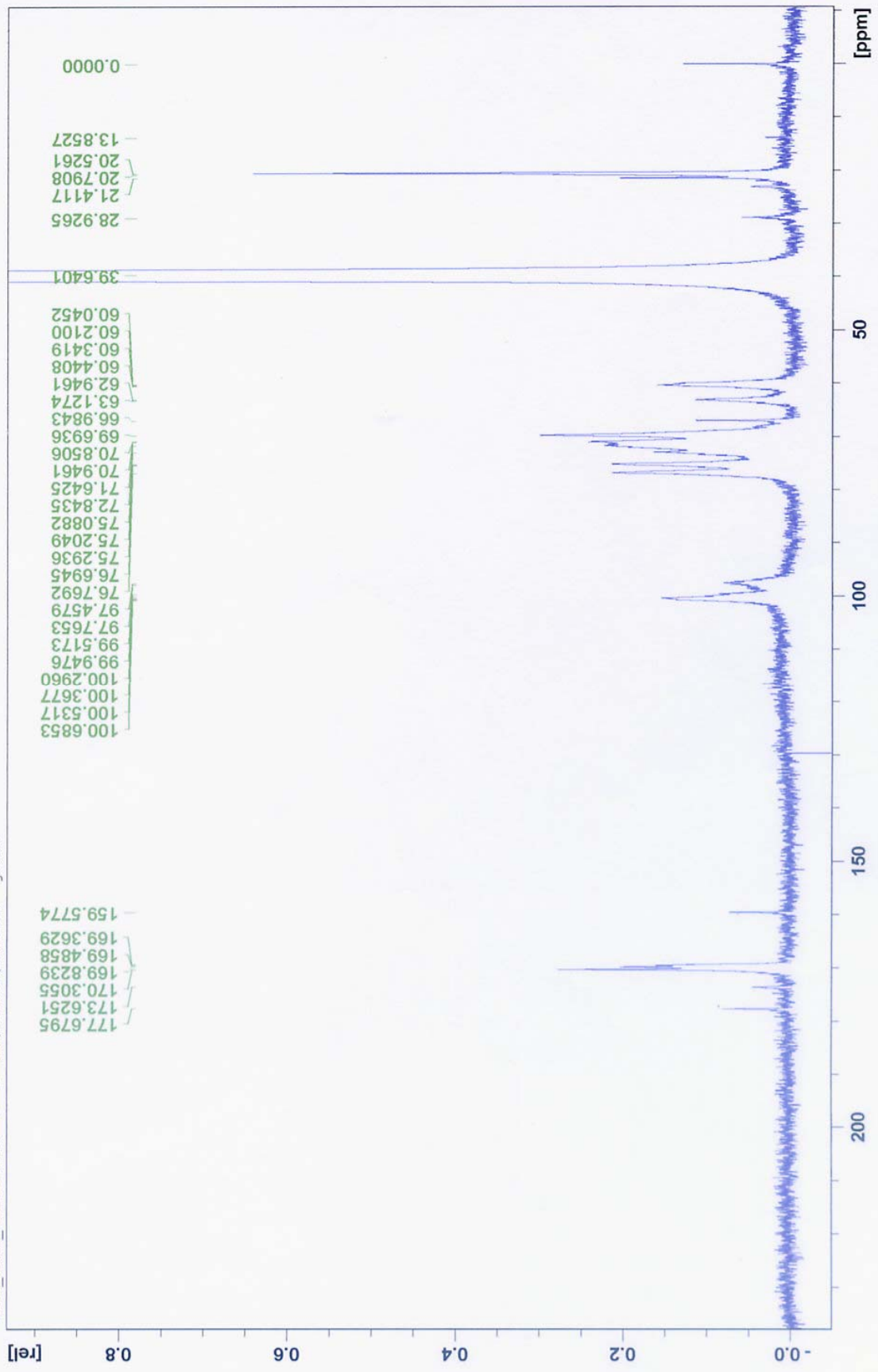
PPC\_jan06\_120107.fid 1 1 C:\Bruker\TOPSPIN guest



PFC\_mar06\_110107.fid 1 1 C:\Bruker\TOEspin guest



FAPM\_col2\_270107.fid 1 1 C:\Bruker\TOPSPIN guest



Padrao.fid 1 1 C:\Bruker\TOPSPIN guest

