



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALDAIR CALISTRO DE MATOS

**AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS FRESCAS E
DESIDRATADAS DA *ALOE ARBORESCENS MILL* NO CONTROLE
DO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* E
EXPLORAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS
ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS
OBTIDOS POR PLANEJAMENTO CENTRÓIDE SIMPLEX**

ALDAIR CALISTRO DE MATOS

**AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS FRESCAS E
DESIDRATADAS DA *ALOE ARBORESCENS MILL* NO CONTROLE
DO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* E
EXPLORAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS
ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS
OBTIDOS POR PLANEJAMENTO CENTRÓIDE SIMPLEX**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em
Química da Universidade Estadual de Londrina, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M433a Matos, Aldair Calistro de.

Avaliação dos extratos das folhas frescas e desidratadas da *aloe arborescens mill* no controle do *rhizopicephalus (boophilus) microplus* e exploração quimiométrica dos dados espectroscópicos e cromatográficos dos extratos obtidos por planejamento centróide simplex /Aldair Calistro de Matos. – Londrina, 2010.
96 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Plantas - análise – Teses. 3. Quimiometria – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 543

ALDAIR CALISTRO DE MATOS

**AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS FRESCAS E
DESIDRATADAS DA *ALOE ARBORESCENS MILL* NO CONTROLE
DO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* E EXPLORAÇÃO
QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS ESPECTROSCÓPICOS E
CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS OBTIDOS POR
PLANEJAMENTO CENTRÓIDE SIMPLEX**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Química da Universidade Estadual
de Londrina, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Isabel Craveiro Moreira

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

Londrina, 15 de Dezembro de 2010

A Deus pela oportunidade, aos meus pais, meus irmãos, a minha esposa Taticlis, meu filho Gustavo Henrique e todos os amigos e professores do curso de Química que me acompanharam nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

- ✚ A Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio pela ótima orientação, pelos incentivos e principalmente pela amizade e dedicação na realização de todas as etapas do trabalho.
- ✚ A minha esposa Taticlis, pelo seu carinho, paciência, motivação e companheirismo durante toda esta jornada.
- ✚ A meu filho Gustavo pela alegria de se fazer presente nesta fase da minha vida.
- ✚ A minha família pela confiança, respeito e eterna motivação.
- ✚ Aos colegas de laboratório: Sabrina Afonso, Daniele Xavier, Raquel Justos e Leandro Duo.
- ✚ Aos amigos e colegas do mestrado: Ana Lúcia, Adriana, Gentil Mario Pinheiro, Elaine, Guilherme Vendrameto e Renata Afonso.
- ✚ Aos Professores e a todos do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva pelo auxílio e por terem gentilmente colaborado na realização dos testes biológicos.
- ✚ A médica veterinária Dr^a Elizabete Regina Marangoni Marana pela amizade, colaboração e auxílio nos trabalhos.
- ✚ A todos os professores do Programa de Mestrado em Química.
- ✚ A todo Departamento de Química, professores e técnicos.
- ✚ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

MATOS, Aldair Calistro de. **Avaliação dos extratos das folhas frescas e desidratadas da *aloe arborescens mill* no controle do *rhipicephalus (boophilus) microplus* e exploração quimiométrica dos dados espectroscópicos e cromatográficos dos extratos obtidos por planejamento centróide simplex.** 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

RESUMO

Planejamento estatístico de mistura e análise multivariada foi usado para discriminar diferentes extratos das folhas frescas e desidratadas da espécie *Aloe arborescens* Mill. No processo de extração foram utilizados os solventes etanol, diclorometano e acetona puros e em misturas binárias e ternárias. Três fases móveis foram testadas pela CLAE em fase reversa para avaliar a composição dos extratos e a eficiência das extrações. Os resultados mostraram que existe uma dependência da diversidade dos metabólitos em relação à composição do solvente extrator. Análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica (AH) foram aplicadas aos dados cromatográficos e aos espectros de infravermelho médio (FTIR) para investigar a composição química dos extratos. Além da análise química, neste estudo também foi avaliada a atividade acaricida no carrapato bovino *Rhipicephalus (boophilus) microplus* por meio do teste de eficácia aplicados em fêmeas do carrapato. Os extratos que mostraram atividade acaricida em níveis consideráveis foram: etanol puro, misturas binárias de etanol:diclorometano e misturas ternárias de etanol:diclorometano:acetona. Os resultados mostraram que estes extratos são recomendados para um melhor controle do carrapato bovino podendo ser utilizados como auxiliar ou em conjunto com outros grupos químicos diminuindo os custos e a contaminação do meio ambiente.

Palavras chaves: Química analítica. Plantas - Análise. *Aloe Arborescens* Mill. Quimiometria.

MATOS, Aldair Calistro de. **Evaluation of extracts of the *Aloe arborescens* Mill of the fresh and dried leaves in the control *Rhipicephalus (boophilus) microplus* and chemometric exploration of spectroscopic data and chromatographic of the extracts obtained by simplex centroid planning.** 2011. 96 f. Dissertation (Master's Degree in Chemical) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

ABSTRACT

The influence of different solvents on the diversity of metabolites of the extracts of the *Aloe arborescens* Mill of the fresh and dried leaves were investigated by simplex centroid of ethanol, dichloromethane and acetone mixtures. Three mobile phases were used to evaluate the extraction efficiency of the metabolites. The results show that the dependence of the diversity of metabolites on the solvent composition decreases with the chromatographic strength. Principal component analysis (PCA) and hierarchical analysis (HA), were applied to the chromatographic and the middle infrared (FTIR) spectral data of the different extracts to discriminate the chemical compositions as mixture composition changes. Besides chemical analysis, this study also evaluated the acaricide activity of different extracts through the test of effectiveness applied to females of the cattle tick *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. The results obtained in acaricide activity tests showed that pure ethanol, ethanol:dichloromethane and ethanol:dichloromethane:acetone mixtures can be used as an adjunct or in combination with other chemical groups, reducing costs and environmental contamination.

Key words: Analytical chemistry. Plants - Analysis. *Aloe Arborescens* Mill. Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da aloina.....	18
Figura 2 - Representação do símbolo da quimiometria.....	24
Figura 3 - Sequência de análise de dados multivariados de dados experimentais por métodos quimiométricos	25
Figura 4 - Esquema de decomposição da matriz X no produto de duas matrizes	27
Figura 5 - Resumo do procedimento experimental	30
Figura 6 - Foto da espécie <i>Aloe arborescens</i> Mill e da exsicata	31
Figura 7 - Planejamento centróide simplex com três componentes para obtenção dos extratos brutos	33
Figura 8 - Esquema do teste biológico para determinar a eficácia dos extratos no controle do carrapato bovino	37
Figura 9 - Gráfico dos rendimentos médios dos 11 extratos obtidos com as folhas frescas da <i>Aloe arborescens</i> Mill através do planejamento	42
Figura 10 - Gráfico dos rendimentos médios dos 11 extratos obtidos com as folhas desidratadas da <i>Aloe arborescens</i> Mill através do planejamento	43
Figura 11 - Gráfico das eficácias e inibição da postura das fêmeas do carrapato bovino no teste biológico realizado com os extratos obtidos das folhas frescas.....	43
Figura 12 - Gráfico das eficácias e inibição da postura das fêmeas do carrapato bovino no teste biológico realizado com os extratos obtidos das folhas desidratadas	45
Figura 13 - Espectro no infravermelho dos 11 extratos obtidos das folhas frescas da <i>Aloe arborescens</i> Mill.....	46
Figura 14 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos dos 11 extratos obtidos das folhas frescas da <i>Aloe arborescens</i> Mill.....	47
Figura 15 - Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 11 amostras no FTIR.....	47
Figura 16 - Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR dos extratos das folhas frescas da <i>Aloe arborescens</i> Mill.....	49
Figura 17 - Espectro no infravermelho dos 11 extratos obtidos das folhas desidratadas da <i>Aloe arborescens</i> Mill	50
Figura 18 - Gráfico dos escores das CP3 e CP4 dos dados espectroscópicos dos 11 extratos obtidos das folhas.....	51
Figura 19 - Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 11 amostras desidratadas no FTIR.....	52

Figura 20 - Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR dos extratos brutos obtidos das folhas desidratadas.....	52
Figura 21 - Cromatogramas das 11 amostras dos extratos bruto das folhas frescas da planta <i>Aloe arborescens Mill</i> obtido nas análises por CLAE	55
Figura 22 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 11 amostras dos extratos brutos das folhas frescas.....	56
Figura 23 - Cromatograma das amostras do grupo I discriminado na CP3.....	57
Figura 24 - Cromatograma das amostras do grupo II discriminado na CP2	57
Figura 25 - Cromatograma das amostras do grupo III discriminado na CP2.....	58
Figura 26 - Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 11 amostras dos extratos brutos das folhas frescas da <i>Aloe arborescens Mill</i>	59
Figura 27 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos espectros da amostra 1 dos extratos brutos das folhas frescas da <i>Aloe arborescens Mill</i> obtido por CLAE.....	60
Figura 28 - Gráfico dos loadings dos fatores II e III para os espectros da amostra 1 dos extratos brutos das folhas não desidratada da <i>Aloe arborescens Mill</i> obtido por CLAE	61
Figura 29 - Gráficos dos 10 grupos de espectros dos picos obtidos da análise do extrato 1 por CLAE no comprimento de onda de 200 a 500 cm ⁻¹	61
Figura 30 - Dendrograma obtido com os dados dos espectros do extrato 1 analisado por CLAE com a Fase Móvel C mostrando a formação de 10 grupos	62
Figura 31 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos espectros da amostra 2 dos extratos brutos das folhas não desidratadas da <i>Aloe arborescens Mill</i> obtido por CLAE.	63
Figura 32 - Gráfico dos loadings dos fatores II e III para os espectros da amostra 4 dos extratos brutos das folhas frescas	63
Figura 33 - Gráficos dos 10 grupos de espectros dos picos obtidos da análise do extrato 4 das folhas frescas.....	64
Figura 34 - Dendrograma obtido com os espectros do extrato 2 analisado por HPLC.	65
Figura 35 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos espectros da amostra 8 dos extratos brutos das folhas frescas	65
Figura 36 - Gráfico dos loadings dos fatores III e IV para os espectros da amostra 8 dos extratos brutos das folhas frescas	66
Figura 37 - Gráficos dos 10 grupos de espectros dos picos obtidos da análise do extrato 8 por CLAE	67
Figura 38 - Dendrograma obtido com os espectros do extrato 8 das folhas frescas analisado por CLAE.....	67

Figura 39 - Número de picos obtidos na análise cromatográfica dos extratos das folhas desidratadas.....	68
Figura 40 - Cromatogramas das 11 amostras dos estratos das folhas desidratadas da planta <i>Aloe arborescens Mill</i> obtido nas análises por CLAE	69
Figura 41 - Gráfico dos escores das CP3 e CP4 dos dados cromatográficos das 11 amostras dos extratos das folhas desidratadas	70
Figura 42 - Cromatogramas das amostras do grupo I discriminado na CP3.....	71
Figura 43 - Cromatogramas das amostras do grupo II discriminado na CP3	71
Figura 44 - Cromatogramas das amostras do grupo III discriminado na CP3	72
Figura 45 - Cromatogramas das amostras do grupo IV discriminado na CP3.....	72
Figura 46 - Cromatogramas das amostras do grupo V discriminado na CP3	73
Figura 47 - Cromatogramas das amostras do grupo VI discriminado na CP3.....	73
Figura 48 - Gráfico dos loadings das CP3 e CP4 para os espectros da amostra 8 dos extratos brutos das folhas frescas	74
Figura 49 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos espectros da amostra 1 dos extratos brutos das folhas desidratadas da <i>Aloe arborescens Mill</i> obtido por CLAE com a Fase Móvel C mostrando a formação de 15 grupos.....	75
Figura 50 - Gráfico dos loadings das CP2 E CP3 para os espectros da amostra 1 dos extratos brutos das folhas desidratadas.....	76
Figura 51 - Gráficos dos 15 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE do extrato 1 das folhas desidratadas.....	77
Figura 52 - Dendrograma obtido com os dados espectroscópicos do extrato 1 obtido com as folhas desidratadas	78
Figura 53 - Gráfico dos escores das CP3 e CP4 dos espectros da amostra 4 dos extratos brutos das folhas desidratadas.....	78
Figura 54 - Gráfico dos loadings das CP3 e CP4 para os espectros da amostra 4 dos extratos das folhas desidratadas.....	79
Figura 55 - Gráficos dos 14 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE do extrato 4 das folhas desidratadas	80
Figura 56 - Dendrograma obtido com os dados espectroscópicos do extrato 4 obtido com as folhas desidratadas	80
Figura 57 - Gráfico dos escores das CP3 e CP4 dos espectros da amostra 8 dos extratos brutos das folhas desidratadas.....	81

Figura 58 - Gráfico dos loadings das CP3 e CP4 para os espectros da amostra 8 dos extratos das folhas desidratadas.....	82
Figura 59 - Gráficos dos 11 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE do extrato 8 das folhas desidratadas	83
Figura 60 - Dendograma obtido com os dados espectroscópicos do extrato 8 obtido com as folhas desidratadas	83
Figura 61 - Relação entre os espectros obtidos nas análises dos extratos, estruturas moleculares de alguns compostos descritos na literatura e as amostras....	84
Figura 62 - Cromatogramas dos 10 extratos das folhas desidratadas do planejamento obtidos com a fase móvel C (H ₂ O 68% e ACN 32	86
Figura 63 - Resultado do teste para identificação da antraquinona.....	87
Figura 64 - Resultado do teste para identificação de alcalóides nos extratos da planta utilizando o reagente de Dragendorff.....	88
Figura 65 - Resultado do teste para identificação de compostos fenólicos.....	88
Figura 66 - Resultado do teste para identificação de saponinas	89
Figura 67 - Resultado do teste para identificação de flavonóides	89
Figura 68 - Resultado do teste para identificação de Taninos.....	789

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de planejamento para os solventes extratores	32
Tabela 2 - Composição e força das fases móveis testadas nas análises cromatográficas	36
Tabela 3 - Número de picos dos extratos do planejamento nas três fases móveis.....	54

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Decomposição de matrizes pela ACP.....	27
Equação 2 - Agrupamento no espaço n-dimensional utilizando a distância Euclidiana	27
Equação 3 - Cálculo do índice de similaridade	28
Equação 4 - Cálculo das eficácias	38
Equação 5 - Cálculo do índice de inibição da postura.....	38
Equação 6 - Cálculo das forças dos solventes	53

LISTA DE SIGLAS

APG II	Angiosperm Phylogeny Group
ACN	Acetonitrila
ACP	Análise de Componente Principal
AH	Análise Hierárquica
AC	Acetona
AQ	Extrato aquoso
BOD	Biologyc Oxigen Demand
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
CP1	Componente principal 1
CP2	Componente principal 2
CP3	Componente principal 3
DC	Diclorometano
DC-AC	Diclorometano e Acetona (1:1) v/v
E	Matriz dos resíduos
ET	Etanol
ET-DC	Etanol e Diclorometano (1:1) v/v
ET-AC	Etanol e Acetona (1:1) v/v
ET-DC-AC	Etanol, Diclorometano e Acetona (1:1:1) v/v/v
ET**-DC*-AC*	Etanol, Diclorometano e Acetona (4:1:1) v/v/v
ET*-DC**-AC*	Etanol, Diclorometano e Acetona (1: 4:1) v/v/v
ET*-DC*-AC**	Etanol, Diclorometano e Acetona (1:1: 4) v/v/v
Fase A	Fase móvel 61,5% águas; 38,5% metanol
Fase B	Fase móvel 65% água; 17,5% metanol; 17,5% acetonitrila
Fase C	Fase móvel 68% água; 32% acetonitrila
FTIR	Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier
n	Objetos
p	Matriz dos loadings
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da Vigilância sanitária
S	Força do solvente
T	Matriz dos escores
ε	Erro experimental

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>ALOE ARBORESCENS MILL</i>	17
1.2 FITOTERAPIA	19
1.3 <i>RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS</i>	20
1.4 OBJETIVO GERAL	22
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO II	23
2 QUIMIOMETRIA	24
2.1 PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS	26
2.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)	26
2.3 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO (AH)	27
CAPÍTULO III	29
3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL	30
3.1 A PLANTA	31
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS	32
3.3 IDENTIFICAÇÕES DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	34
3.3.1 ANTRAQUINONA	34
3.3.2 SAPONINA	34
3.3.3 TANINOS	34
3.3.4 FLAVONÓIDES	35
3.3.5 ALCALÓIDES	35
3.3.6 FENÓLICOS	35
3.4 ANÁLISES POR IFTR	35
3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	36
3.5.1 Preparo das Amostras	36
3.5.2 Análise Cromatográfica	36
3.5.3 Escolha da Fase Móvel	36
3.6 TESTES BIOLÓGICOS	37
3.7 ESTATÍSTICA	39

3.8 EQUIPAMENTOS	39
3.9 REAGENTES	39
3.9.1 Reagente de Dragendorff.....	40
3.10 Programas Computacionais	40
CAPÍTULO IV	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 RENDIMENTO	42
4.2 RESULTADO DOS TESTES BIOLÓGICOS	44
4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE POR FTIR.....	45
4.4 RESULTADOS DA CLAE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS FRESCAS	53
4.5 RESULTADOS DA CLAE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DESIDRATADAS.....	68
4.6 TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	87
CAPÍTULO V	90
5 CONCLUSÃO.....	91
CAPÍTULO VI	93
REFERÊNCIAS	94

Capítulo I

Introdução

e

Objetivos

1 INTRODUÇÃO

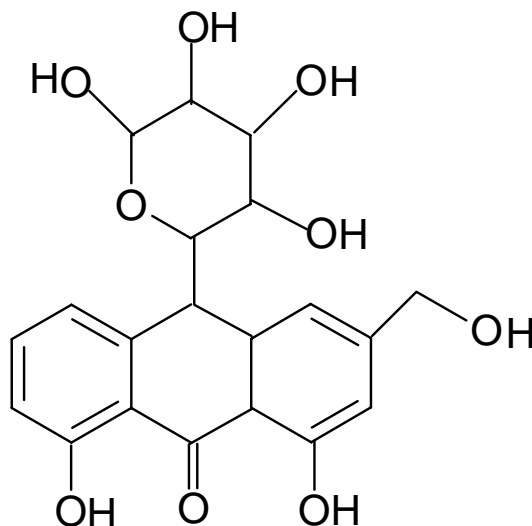
1.1 *ALOE ARBORESCENS MILL*

A *Aloe arborescens Mill*, também conhecida popularmente como babosa, segundo o sistema de classificação clássico pertence à família Liliaceae e de acordo com o sistema APGII (Angiosperm Phylogeny Group) pertence à família Asphodelaceae^{1,6}. A família Liliaceae (Asphodelaceae) é formada por cerca de 360 espécies^{2,3} muitas delas utilizadas popularmente como planta medicinal há vários anos^{3,4,5}. É uma planta suculenta adaptada a viver em áreas de baixa quantidade de água, embora não seja claramente indicada na literatura, a polpa das plantas desta família é um tecido de armazenagem de água⁶. A *Aloe arborescens Mill* é facilmente confundida com a *Aloe barbadensces Mill* (Aloe Vera) devido à grande semelhança entre estas duas espécies. Nativa da África as plantas do gênero Aloe apresentaram boa adaptação ao solo e clima das regiões quentes do sul dos Estados Unidos e das Américas Central e do Sul. Hoje em dia grandes áreas de cultivo são utilizadas com a finalidade de fornecer matéria prima para a fabricação de medicamentos e para fins cosméticos^{4,5}. Dentre as aplicações na utilização das plantas do gênero Aloe, destacam-se a *Aloe barbadensces Mill* (Aloe Vera) que é atualmente utilizada para fins terapêuticos na cicatrização de feridas e queimaduras de pele, contusões, irritações, tônicos, purgativos e cosméticos^{4,6} e *Aloe arborescens Mill* cujos compostos isolados dos extratos mostraram atividades antifúngica, antiinflamatória, hipoglicemiante, hemaglutinante, atividade mitogênica para linfócitos e atividades protetora contra raios-X^{1,7}.

Na *Aloe arborescens Mill*, foram encontrados metabólitos como aloína A e B, aloe-emodina, 10-hidróxi-aloina, aloedina, aloesina A e B, microdontina A e B, saponinas, homonataloína, ácido succínico, emodina, ácido aloético, compostos aromáticos, aloeresina e mucopolissacarídeos¹.

Estudo do efeito antitumoral em cultura de células de melanoma realizando in vitro atribuiu a toxicidade da planta à aloína⁸, cuja estrutura molecular está representada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química da aloína, nome popular: aloína ou barbalóina, fórmula estrutural: $C_{21}H_{22}O_9$, nomenclatura IUPAC: 1,8-di-hidroxi-3-(hidroximetil)-10-[3,4,5-trihidroxi-6-hidroximetil]oxan-2-il]-10H-antracên-9-ona, massa molar = 418,394 g/mol



Yates¹ atribuiu atividades biológicas como antiviral, antibacteriana, laxativa, protetora de radiação e antiinflamatória ao acemannan (6-glicose acetiladas), maior polissacarídeo presente na planta.

A utilização de plantas como recurso terapêutico é uma prática tão antiga quanto à humanidade, no entanto as primeiras informações sobre o uso sistemático de plantas como medicamentos datam da Índia antiga, através do sistema de medicina vigente naquela época⁶.

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos⁸.

As plantas realizam dois sistemas metabólicos que são conhecidos como sistema metabólico primário e secundário. O sistema metabólico primário é associado com processos comuns fundamentais para vida da planta, ele compreende processos de fotossíntese, ciclo pentose, glicólise, ciclo do ácido cítrico, transporte de elétrons, fosforização e gerenciamento na regulação de energia. No metabolismo primário, entidades moleculares são produzidas e convertidas, do metabolismo primário provem a energia química para biossíntese da planta⁹.

Os metabolismos primários e secundários são interconectados, entretanto, em contraste com o metabolismo primário, o metabolismo secundário apresenta características que podem ser expressas em termos ecológicos, taxonômico e bioquímicos diferentes e diversos. Considera-se que uma das principais funções do metabolismo secundário nas plantas seja a biossíntese de estruturas complexas como alcalóides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides⁹. Tais estruturas funcionariam como agentes defensivos na luta contra predadores, a exemplo de microorganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros¹⁰. A ampla diversidade molecular do sistema metabólico secundário representa um recurso biogenético extremamente rico para a descoberta de novas drogas.

1.2 FITOTERAPIA

A palavra fitoterapia deriva dos termos “phyton”, que significa vegetal e “Therapeia”, que significa terapia. Segundo o dicionário Aurélio da língua portuguesa, significa “tratamento de doença mediante o uso de planta”. Sendo assim, a fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sendo suas matérias-primas plantas (folhas, caules, flores, raízes ou frutos) com efeitos farmacológicos medicinais, alimentícios, coadjuvantes técnicos ou cosméticos¹¹. A fitoterapia acompanha a humanidade desde os povos primitivos, que já utilizavam plantas medicinais para curar doenças, e hoje em dia vem ganhando cada vez mais popularidade no mundo todo.

A fitoterapia é uma modalidade de tratamento medicinal que vem crescendo muito nos últimos anos, produzindo uma movimentação financeira mundial de aproximadamente 22 bilhões de dólares¹³. Um dos fatores que contribui para isto é o alto custo dos medicamentos industrializados¹⁰. No Brasil, bem como em outros países da América Latina, a fitoterapia constitui-se em uma alternativa terapêutica econômica em relação aos medicamentos alopáticos uma vez que se caracteriza pela utilização direta de plantas no tratamento de doenças.

Segundo a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, emitida pela ANVISA, que dispõe sobre o registro de drogas fitoterápicas, define os fitoterápicos como sendo medicamentos obtidos empregando-se matérias primas vegetais ativas. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios

clínicos fase 3 (estudos comparativos necessários para demonstrar a segurança e eficácia de uma nova droga). Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais¹⁴.

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, ligninas, etc., tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais¹⁵. Neste contexto, a fitoterapia é considerada uma alternativa importante no controle de parasitas, podendo reduzir os impactos econômicos e ambientais ao uso de pesticidas sintéticos¹⁶. Agrega-se também a isso o fato do aumento na produção de alimentos orgânicos no Brasil e no mundo que necessita cada vez mais de alternativas eficientes no controle de parasitas, já que este tipo de agricultura não permite o uso de pesticidas químicos. Ressalta-se também que o uso de fitoterápicos em sistemas convencionais de produção, como parte da estratégia de controle de parasitas, pode elevar a vida útil dos produtos químicos¹⁶.

1.3 *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, conhecido como carrapato dos bovinos, é um ectoparasita que se distribui mundialmente. São animais metazoários de simetria bilateral, pertencentes ao filo Artropoda, classe Arachnida, ordem Acarina, superfamília Ixodidae, gênero *Rhipicephalus* e espécie *microplus*¹⁷. É encontrado em todo território brasileiro, sendo que a Região Sul, apesar da influência negativa do inverno, é a mais afetada pela ocorrência de carrapato nos bovinos. Dois fatores parecem contribuir significativamente para isso: a predominância de animais de origem européia e a maior densidade populacional de bovinos¹⁸.

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o ectoparasito de maior ocorrência nos bovinos brasileiros, as perdas econômicas causadas por parasitas externos superam a cifra de dois bilhões de dólares ao ano, deste montante 75% são atribuídos ao carrapato bovino¹⁶. Os prejuízos ocorrem devido principalmente à mortalidade dos animais e transmissão dos agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina (*Anaplasma* sp. e *Babesia* spp.)¹⁹. Estudos relataram que os prejuízos econômicos causados pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil, foram estimados sendo 40% por perdas na produção de leite, 27% pela mortalidade, 11% sobre o desempenho reprodutivo, 9% em gastos com acaricida, 5% pela redução no ganho de peso,

5% em juros bancários, 3% pela má qualidade do couro, despesas no controle e prevenção das hemoparasitoses¹⁹.

O combate ao carrapato dos bovinos tem sido na maioria das vezes realizado quase que exclusivamente na sua fase parasitária, com a utilização de carrapaticidas químicos utilizando as mais variadas estratégias em períodos específicos e com critérios bastante diversos de manejo. Porém, o controle dos ectoparasitas exclusivamente por produtos químicos, vem se tornando cada vez mais difícil devido à capacidade dos carrapatos desenvolverem resistência aos produtos químicos (pesticidas) existentes no mercado²⁰. A resistência a determinado princípio ativo ou a um grupo químico é um caráter hereditário do carrapato que se desenvolve a partir da pressão seletiva dos carrapaticidas sobre mutantes resistentes, e esta propagação de resistência aumenta à medida que esta cepa entra em contato com o carrapaticida. Esta situação foi inicialmente evidenciada na Austrália, onde em 1980, identificou-se a cepa denominada “Uhan” a qual apresentou alto nível de resistência ao Amitraz e resistência cruzada ao Cyamiazol e ao Clorometiuron²¹. A utilização desenfreada de produtos químico pelos produtores de leite e carne para controlar os carrapatos, tem comprometido cada vez mais a qualidade destes produtos e causado um grande risco à saúde devido ao acúmulo destes pesticidas na carne e leite dos animais²².

No Brasil, as atividades de controle da qualidade do leite têm se restringido, basicamente, à prevenção de fraudes ou adulteração do produto. Entretanto, muitas substâncias como os pesticidas, podem ser secretadas no leite pela exposição dos animais de produção a esses agentes²³. Um levantamento da presença de resíduos químicos no leite realizado por Nero²⁴, onde 209 amostras de leite cru foram coletadas em propriedades leiteiras localizadas em quatro Estados brasileiros, sendo 47 propriedades na região de Viçosa (MG), 50 propriedades na região de Pelotas (RS), 63 propriedades na região de Londrina (PR) e 49 propriedades na região de Botucatu (SP) revelaram dados alarmantes onde a maioria das amostras (93,8%), estavam contaminadas com pesticidas.

Alternativas de produtos carrapaticidas e estratégias de combate as infestações são necessárias. Neste sentido, vários produtos naturais com efeitos carrapaticidas têm sido investigados. Substâncias de origem vegetal contendo óleos essenciais e terpenóides foram isoladas e têm demonstrado atividades favoráveis para o combate de diversas espécies de carrapatos²². Apesar da legislação brasileira não ser muito clara em relação aos níveis de resíduos químicos no leite, muitos produtores tem se preocupado em produzir cada vez mais produtos com qualidade e com baixo custo de produção, desta forma, muitos produtores têm

encontrado uma alternativa substituindo os pesticidas químicos convencionais por produtos naturais²³.

O Brasil, na primeira metade do século XX, foi um grande produtor e exportador de inseticidas vegetais, como a rotenona (extraída das raízes e rizomas de *Lonchocarpus* sp. E *Derris* sp.), piretro (extraído de flores de *Chrysanthemum cinerariifolium*) e nicotina (extraída de folhas de *Nicotiana tabacum*). Entretanto, seguindo a tendência mundial, após os anos 50 passou a utilizar principalmente os produtos sintéticos, cujos efeitos danosos foram posteriormente conhecidos²⁵.

1.4 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade acaricida dos extratos obtidos das folhas frescas e desidratadas da planta *Aloe arborescens* Mill no combate ao carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e exploração quimiométrica de planejamento experimental e de análise multivariada associados aos dados espectroscópicos e cromatográficos para discriminar os diferentes extratos da planta *Aloe arborescens* Mill.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos sinérgicos de diferentes solventes como meio extrator usando planejamento estatístico de misturas com três componentes na preparação dos extratos das folhas frescas e desidratadas da planta *Aloe arborescens* Mill.
- Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada associados aos dados espectroscópicos para comparar a variação composicional dos extratos das folhas frescas e desidratadas da planta *Aloe arborescens* Mill.

Capítulo II

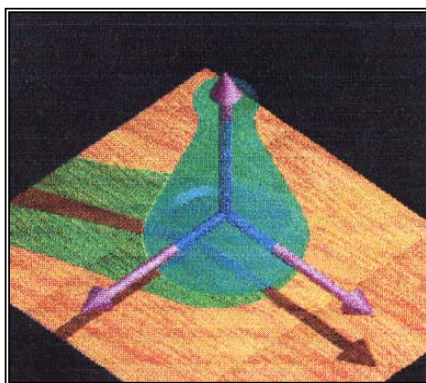
Métodos Quimiométricos

2 QUIMIOMETRIA

O uso de computadores para analisar dados químicos cresceu drasticamente nos últimos vinte anos, em parte devido aos recentes avanços em "hardware" e "software". Por outro lado, a aquisição de dados principalmente na área de química analítica, atingiu um ponto bastante sofisticado com o interfaceamento de instrumentos aos computadores produzindo uma enorme quantidade de informação, muitas vezes complexas e variadas.

Uma das características mais interessantes dos modernos instrumentos é o número das variáveis que podem ser medidas em uma única amostra. Um exemplo notável é a intensidade de absorção em mil ou mais comprimentos de onda que é rotineiramente registrada em um único espectro. De posse de tal quantidade de dados, a necessidade de ferramentas novas e mais sofisticadas para tratá-los e extrair informações relevantes cresceu muito rapidamente, dando origem à Quimiometria, que é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada²⁶. A Figura 2 representa o símbolo da Quimiometria.

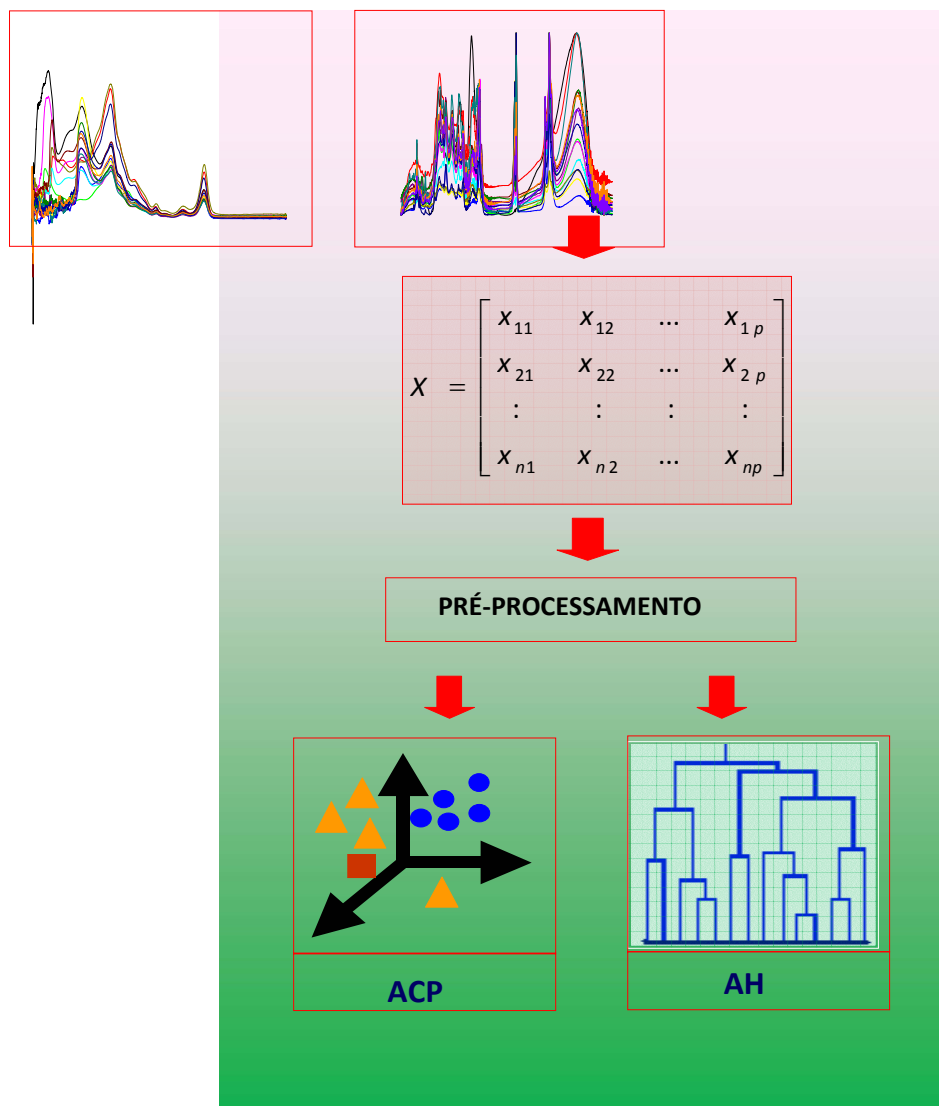
Figura 2 - Representação do símbolo da Quimiometria



De maneira mais direta, a Quimiometria pode ser definida como uma disciplina que utiliza de métodos matemáticos e de estatística multivariada para definir ou selecionar as condições ótimas de medição e experiência extraindo assim o máximo de informações dos dados químicos²⁷.

Uma seqüência de análise de dados multivariados de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 3.

Figura 3 - Sequência de análise de dados multivariados de dados experimentais por métodos quimiométricos.



Na análise de dados multivariados, os dados fornecidos pelos equipamentos são inspecionados visualmente de modo a se verificar possíveis problemas como variação de linha de base, sobreposição de bandas e ruídos. Os dados são então convertidos em tabela de dados, como matriz, representadas por X . As linhas da matriz representam os objetos, que são as amostras, onde cada valor representa uma medida de uma amostra específica e as p colunas são variáveis que representam propriedades medidas para cada amostra²⁷. Em seguida é realizada uma pré-seleção das variáveis quando necessário para definir a região do espectro ou cromatograma que contém a informação que será utilizada no cálculo.

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos ou unidades

diferentes. Ele é definido como qualquer manipulação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação^{27,28}.

2.1 PRÉ - PROCESSAMENTO DE DADOS

O pré-processamento pode ser classificado em dois tipos básicos, dependendo de como são operados. O pré-processamento por linhas, que opera sobre as amostras, e o pré-processamento por colunas, que opera sobre as variáveis. Dentre os tipos de pré-processamento por linhas está a normalização.

A normalização é um passo importante no pré-processamento dos dados e a escolha do critério de normalização não são arbitrários, os critérios de normalização mais usados para as amostras são: a normalização por área unitária e normalização por comprimento do vetor.

2.2 ANÁLISES DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

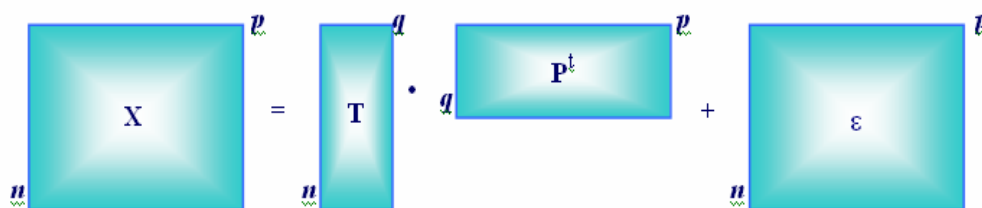
A análise de componentes principais (ACP) consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n variáveis originais geram através de suas combinações lineares q componentes principais (CP), cuja principal característica é a ortogonalidade. A componente principal 1 retém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante²⁸.

A ACP transforma a matriz de dados originais $X_{n \times p}$, formada por n objetos e p variáveis, no produto de duas matrizes menores, como mostra a Equação 1.

$$\mathbf{X}_{n \times p} = \mathbf{T}_{n \times q} \mathbf{P}^t_{q \times p} + \mathbf{\epsilon}_{n \times p} \quad \text{Eq. 1}$$

Nesta equação, \mathbf{T} representa a matriz dos escores, \mathbf{P} a matriz dos pesos, $\mathbf{\epsilon}$ a matriz dos resíduos e q é o número de componentes principais. Como q normalmente é menor do que p ou n , uma matriz maior é transformada em duas matrizes menores tornando a análise da matriz mais simples como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Esquema da decomposição da matriz **X** no produto de duas matrizes



A ACP pode ser realizada utilizando-se dois tipos de métodos, o método do tipo-R e o método do tipo-Q. A ACP do tipo-R se refere ao estudo da relação entre as variáveis e a ACP do tipo-Q se refere ao estudo da relação entre os objetos. Neste trabalho utilizou-se o método tipo-R.

2.3 ANÁLISES DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO (AH)

A AH relaciona as amostras por associações de acordo com suas semelhanças, formando um dendrograma onde as amostras, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. O dendrograma formado parte do princípio de que quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras, podendo assim formar grupos diferenciados²⁷. Os dendrogramas são de fato, úteis na visualização de semelhanças entre as amostras ou objetos representados por pontos em espaço com dimensão maior que três, onde as representações de gráficos convencionais não são possíveis.

A maneira mais simples de agrupamentos no espaço n-dimensional, consiste em agrupar os pares de pontos que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana, como mostra a Equação 2 e substituí-los por um novo ponto localizado na metade da distância entre eles.

$$d_{ik} = \left[\sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2} \quad \text{Eq. 2}$$

Nesta equação, d_{ik} é a Distância Euclidiana entre os pontos i e k , este procedimento, quando repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, leva a construção de um dendrograma onde, no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical, o índice de similaridade (S_{ij}) entre os pontos i e j , calculado segundo a Equação 3.

$$S_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{\max}} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde d_{ij} é a distância entre os pontos i e j , e d_{\max} é a distância máxima entre qualquer par de pontos. Os dendrogramas, portanto, consistem em diagramas que representam a similaridade entre pares de amostras numa escala que vai de um à zero²⁸.

A análise de agrupamentos complementa a análise de componentes principais, sendo outra forma de visualizar as semelhanças e diferenças na composição das amostras.

Capítulo III

Descrição

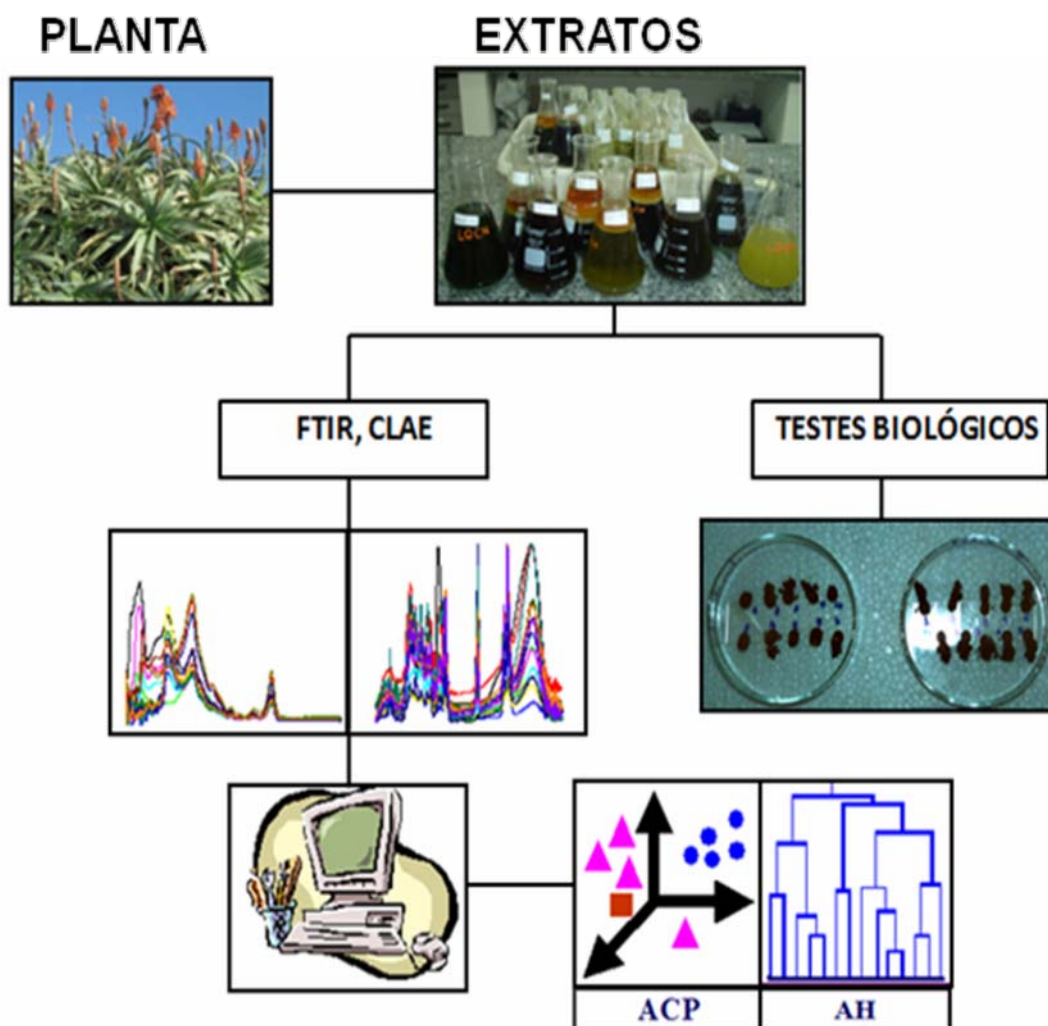
Experimental

3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão abordados os aspectos relacionados aos procedimentos experimentais para a obtenção de informações sobre os compostos químicos presente nos extratos da *Aloe arborescens* Mill, dados espectroscópicos e cromatográficos e eficácia dos extratos das folhas frescas e desidratadas da planta no controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Um resumo do procedimento experimental está apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Resumo do procedimento experimental



3.1 A PLANTA

As folhas da *Aloe arborescens* Mill foram coletadas no canteiro de cultivo do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina durante os meses de Janeiro a Setembro de 2010 no período da manhã, uma vez que a variação de temperatura influencia na quantidade dos metabólitos secundários das plantas²⁹. Uma amostra da planta foi enviada ao herbário da instituição para a identificação e depósito da exsicata.

A Figura 6 mostra as fotos da espécie *Aloe arborescens* Mill e da exsicata depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina sob o número FUEL 46852.

Figura 6 - *Aloe arborescens* Mill, Nome popular: babosa; Família: Liliaceae (Asphodelaceae); Gênero: *Aloe*; Espécie: *arborescens* Mill



A planta possui caule de aproximadamente 30 centímetros do qual saem folhas, formando uma densa roseta, mais ou menos carnosas com 40 a 50cm de comprimento e 3 a 5cm de largura, com base alargada e ápice em forma de lança com espinhos suculentos e não lenhosos. Geralmente é confundida com *Aloe barbadensces* Mill (*Aloe vera*) devido à grande semelhança entre as duas espécies.

Nossos testes preliminares demonstraram que os extratos aquosos da *Aloe arborescens* Mill possuem ação inibidora da reprodução do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

3.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos foram preparados seguindo um planejamento de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1 - Composição dos extratos preparados com misturas de etanol, diclorometano e acetona.

Extratos	Solventes/Fração			Solventes/mL		
	Etanol	Diclorometano	Acetona	Etanol	Diclorometano	Acetona
Ext. 1	1	0	0	120	0	0
Ext. 2	0	1	0	0	120	0
Ext. 3	0	0	1	0	0	120
Ext. 4	1/2	1/2	0	60	60	0
Ext. 5	1/2	0	1/2	60	0	60
Ext. 6	0	1/2	1/2	0	120	120
Ext. 7	1/3	1/3	1/3	40	40	40
Ext. 8	2/3	1/6	1/6	80	20	20
Ext. 9	1/6	2/3	1/6	20	80	20
Ext. 10	1/6	1/6	2/3	20	20	80

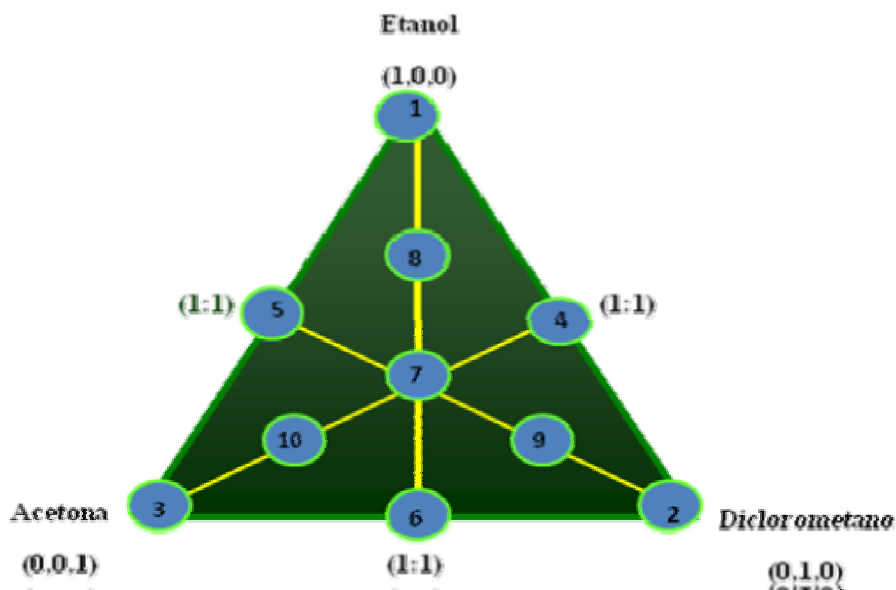
Para obter os extratos com as folhas frescas, cerca de 900g de folhas da planta foram coletadas, picotadas e divididas em 11 porções de 75g cada, trituradas individualmente em liquidificador com 120 mL dos respectivos solventes, conforme planejamento experimental do tipo centróide simplex (Tabela 1), representado por um triângulo equilátero (Figura 7). Os vértices do triângulo representam os solventes puros, etanol (1), diclorometano (2) e acetona (3), as arestas (4, 5 e 6) representam as misturas binárias dos solventes com volumes proporcionais, o ponto central (7) uma mistura ternária de volumes proporcionais dos respectivos solventes e os pontos 8, 9 e 10 representam as misturas ternárias com proporções diferentes (4:1:1) V/V/V, respectivamente. Para obter os extratos com as folhas desidratadas, cerca de 2.500g de folhas da planta foram coletadas, picotadas e espalhadas em uma bandeja de plástico forrada com papel jornal e deixada em temperatura ambiente, sob ventilação durante aproximadamente 14 dias para a desidratação. Após este período as folhas picotadas e secas foram trituradas em liquidificador até os grânulos adquirirem tamanho e aparência aproximado de pó seco.

No processo de extração, foram pesados 10g de folhas desidratadas e trituradas para cada extrato e depois de adicionado 120 mL dos respectivos solventes, os extratos foram submetidos ao banho em Ultra-som durante 30 minutos, trocando se a água do banho a intervalos de 15 minutos para evitar o super aquecimento. Em seguida, os extratos foram filtrados com “peneira comum” em balões volumétricos, sendo os resíduos devolvidos aos frascos de origem, acrescidos mais 120 mL dos respectivos solventes e levados ao banho em Ultra-som por mais 30 minutos repetindo se o procedimento por oito vezes.

O processo de obtenção dos extratos das folhas frescas e desidratadas foi igual, contudo para os extratos das folhas frescas foram utilizados 75g das folhas frescas enquanto que na obtenção dos extratos das folhas desidratadas foi utilizado 10g das folhas desidratadas. O extrato aquoso com as folhas frescas foi preparado pesando-se 75g de folhas frescas, trituradas e submetidas à extração com 600 mL de água destilada em 60°C por 30 minutos. O extrato aquoso com as folhas desidratadas foi preparado pesando-se 10g de folhas desidratadas e submetidas à extração com 600 mL de água destilada em 60°C por 30 minutos. Ao final do processo, os conteúdos foram filtrados com algodão e levados à evaporação em um evaporador rotativo, em uma temperatura inferior a 70°C e velocidade de rotação em torno de 80 rpm.

Após a evaporação dos solventes, os extratos concentrados foram transferidos para frascos de 30 mL devidamente identificados e tarados, e mantidos em temperatura ambiente, sob ventilação durante aproximadamente 40 dias.

Figura 7 - Planejamento centróide simplex



3.3 IDENTIFICAÇÕES DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3.3.1 Antraquinonas

Este teste foi realizado através da reação de “Born Trages” direta a fim de se obter informações químicas a respeito dos constituintes dos extratos da *Aloe arborescens Mill.* Em um tubo de ensaio, adicionou-se 2,0g do pó das folhas da planta, 6,0 mL de amônia diluída 10%, agitou-se por 2 minutos e filtrou-se com algodão para outro tubo de ensaio. Adicionou-se ao filtrado 1 mL da solução de hidróxido de sódio 10%. Neste teste, a coloração rosa avermelhada indica reação positiva para antraquinona³⁰.

3.3.2 Saponina

Segundo Yates¹ (2004) a *Aloe vera* possui saponinas, entre outros metabólitos. Este teste foi realizado para se obter informação a respeito da presença ou não de saponinas nos extratos da *Aloe arborescens Mill.* O teste foi realizado adicionando-se 0,1g do pó da planta em um tubo de ensaio de 10 mL e acrescentado 5 mL de água destilada fervendo-se o tubo por 3 minutos. O conteúdo do tubo foi então filtrado, transferido para outro tubo e em seguida, agitado energicamente por 15 minutos. Foi então observado a formação de espumas e deixado em repouso por 15 minutos marcando com uma caneta a altura da espuma. Neste teste, após este período, a permanência da espuma indica a presença de saponinas³⁰.

3.3.3 Taninos

Em um becker de 50 mL, pesou-se 2,5g do pó da planta seca, acrescentou-se 50 mL de água destilada e ferveu-se por 15 minutos. Após, filtrou-se e deixou em repouso até esfriar. Retirou-se 2 mL desta solução, acrescentou-se 10 mL de água destilada e adicionou-se quatro gotas de cloreto de ferro 1%. Neste teste, o surgimento da coloração azulada indica positivo para taninos hidrolisáveis ou gálico. O surgimento da coloração verde indica positivo para taninos condensados ou catético³⁰.

3.3.4 Flavonóides

Em um Becker de 50 mL, pesou-se 2,5g do pó da planta seca, acrescentou-se 22,5 mL de álcool etílico 75% e levou-se ao banho com Ultra-som por 15 minutos. Filtrou-se o conteúdo com algodão em um balão e completou-se o volume para 25 mL com o mesmo etanol 75%. Transferiu-se 2 mL dessa solução para uma capsula de porcelana e evaporou-se em banho maria a 45°C até a secagem.

Lavou-se o resíduo da cápsula com 1 mL de etanol 70% e transferiu-se para um tubo de ensaio. Adicionou-se 0,05g de magnésio metálico em fita no tubo e verteu-se cuidadosamente pelas paredes do tubo 0,5 mL de HCl concentrado e observou-se a coloração. Neste teste, o aparecimento de coloração róseo-avermelhado indica positivo para flavonóides³⁰.

3.3.5 Alcalóides

Adicionou-se 5 gotas do extrato dissolvido no solvente e 5 gotas do reagente de Dragendorff em uma placa. Esperou-se a secagem durante 3 dias. A formação de cristais castanhos avermelhado indica a presença de alcalóides³⁰.

3.3.6 Fenólicos

Em uma placa, adicionou-se cinco gotas do extrato dissolvido no solvente e cinco gotas de solução de cloreto de ferro 10%. O aparecimento da coloração verde indica teste positivo para compostos fenólicos³⁰.

3.4 ANÁLISES POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para análise FTIR, foram pesados 1,00mg de cada extrato bruto e misturados uniformemente com 300 mg de KBr e 5 gotas de clorofórmio.

Os espectros de FTIR foram registrados na região de 4000-400 cm^{-1} , em resolução de 1,93 cm^{-1} , usando um espectrômetro Shimdzu FTIR-800.

3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

3.5.1 Preparo das Amostras

Foram pesados 5,00 mg de cada extrato bruto e diluídos em 10 mL dos respectivos solventes extratores do planejamento no banho em Ultra-som durante 15 minutos mantendo em repouso por uma hora. Filtrou-se o extrato em papel filtro comum, pipetou-se então 1 mL da solução e filtrou-se em filtro millipore Millex com 0,22 μm .

3.5.2 Análise Cromatográfica

Para a análise cromatográfica, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Termo - Electron corporation, modelo Finnigan Surveyor com detector PDA SPD-M10AV, coluna Metasil C18 ODS PN0380 Metachem com dimensões de 250 mm x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 μm , volume de injeção de 20 μl , eluição monitorada nos comprimentos de onda 210, 240 e 254 nm, vazão 1mL/min.

3.5.3 Escolha da Fase Móvel

As análises dos extratos com as folhas frescas por cromatografia líquida foram realizadas utilizando-se três fases móveis diferentes. Como o número dos extratos foram 11 (10 extratos do planejamento centróide simplex e um extrato aquoso), foram feitas 33 injeções. A composição e força das fases móveis testadas estão apresentadas na Tabela 2. Nas análises cromatográficas com as folhas desidratadas foram realizadas utilizando-se apenas a fase móvel C (11 amostras injetadas).

Tabela 2 - Composição e força das fases móveis testadas nas análises cromatográficas.

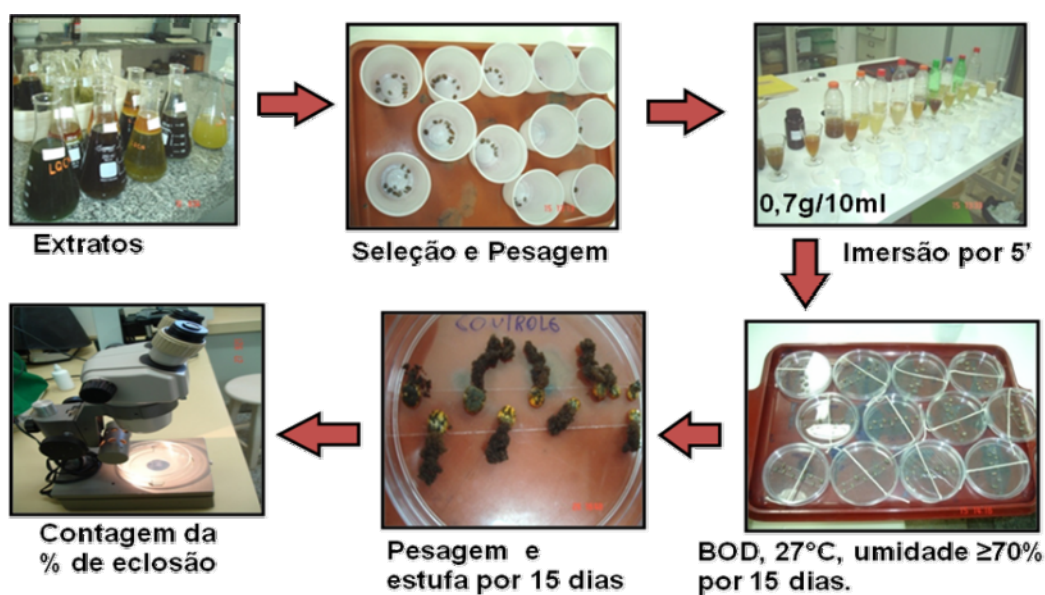
FASE	COMPOSIÇÃO	R _F
Fase A	% Águas; 38,5% Metanol	1,16
Fase B	Água; 17,5% Metanol; 17,5% Acetonitrila	1,07
Fase C	Água; 32% Acetonitrila	0,99

3.6 TESTES BIOLÓGICOS

Os testes biológicos foram realizados no Laboratório de Parasitologia Veterinária no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina. As teleóginas (fêmeas do carrapato) foram coletadas diretamente em bovinos da raça Holandesa em uma propriedade leiteira localizada no distrito de São Luiz, Município de Londrina no Norte do Paraná. O esquema do procedimento realizado no teste biológico está representado na Figura 8. Os testes de eficácias foram realizados em triplicatas.

Para os testes, foram pesados 700mg de cada extrato e dissolvidos individualmente em 10 mL de água destilada. Após a coleta, as teleóginas foram levadas até o laboratório, separadas em grupos de 10 indivíduos e feitas as pesagens. Os grupos de teleóginas foram imersos na solução dos extratos durante cinco minutos e após, fixados em uma placa de Petri com fita dupla face. Cada grupo foi testado com um extrato, ficando um grupo como controle que foi imerso em água da torneira. Foram então mantidos por 15 dias em estufa B.O.D.(Biologic Oxigen Demand) com temperatura de 27°C e umidade relativa acima de 70%. Após este período, as posturas dos grupos foram recolhidas separadamente em frasco de vidro, pesadas e incubadas novamente na estufa B.O.D. nas mesmas condições por mais 15 dias. Após este período, o conteúdo do frasco contendo larvas e ovos foram imersos em 5 mL de etanol 70% para garantir a mortalidade das larvas eclodidas e assim facilitar a contagem da porcentagem de ovos e larvas eclodidas com auxílio de uma lupa.

Figura 8 - Esquema do teste biológico para determinar a eficácia dos extratos



Ao final destes procedimentos, foram obtidos dados como peso do grupo das fêmeas, peso da massa de ovos de cada grupo e percentagem da eclosão dos ovos dos grupos. De posse destes dados, pode se determinar a eficácia dos extratos utilizando-se a equação descrita por Drummod³¹, como mostra a Equação 4.

$$ER = \frac{(\text{massa ovos grupo}) \times (\% \text{ eclosão grupo}) \times (20.000)}{(\text{massa das fêmeas grupo})}$$

$$EP = \left\{ \frac{(\text{ER grupo controle}) - (\text{ER grupo teste})}{(\text{ER grupo controle})} \right\} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

A eficiência reprodutiva (ER) do grupo é calculada para todos os grupos, inclusive para o grupo controle. A sigla EP se refere à eficácia do produto que está sendo testada, neste caso, a eficácia do extrato. A constante 20.000 se refere à média do número de larvas contidas em um grama.

Com o peso dos grupos das fêmeas e a massa dos ovos, também pode se determinar o índice de inibição de postura através da Equação 5.

$$IP = 100 - \left\{ \frac{(\text{massa de fêmeas controle}) \times (\text{massa de ovos grupo})}{(\text{massa de fêmeas do grupo}) \times (\text{massa de ovos controle})} \right\} \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

O índice de inibição de postura (IP) do grupo é calculado para todos os grupos, exceto para o grupo controle, que é apenas utilizado como referência no cálculo dos outros grupos. O índice (IP) apesar de ser pouco utilizado, mostra se o produto age inibindo a postura das fêmeas ou se o produto age impedindo a eclosão dos ovos ou ainda se age das duas formas. Ele é uma representação numérica do efeito de diminuição da fertilidade que uma determinada substância, neste caso um extrato exerce em um grupo de fêmeas em relação a um grupo controle. Este índice depende exclusivamente da massa dos grupos de fêmeas e das massas de ovos dos grupos, desta forma, o grupo teste que apresentar baixa massa de ovos, terá índice IP alta e vice versa. Um índice de inibição alto implicará em uma alta eficácia do extrato, já que neste caso haverá baixa postura do grupo teste. No entanto, um índice de inibição baixo não necessariamente implicará em uma eficácia baixa do extrato devido ao fato

de que uma grande massa de ovos pode ter percentagem de eclosão baixa conferindo assim, alta eficácia ao extrato testado.

3.7 ESTATÍSTICA

A percentagem de ovos eclodidos foi calculada através da contagem de 4 campos de visão em uma lupa com aumento de 25 vezes em uma placa de Petri contendo os ovos e larvas imersos em etanol. Foram contadas ao todo 1200 unidades (ovos e larvas) para cada amostra testadas sendo 300 unidades por campo. Utilizou-se o teste-t de Student ao nível de confiança de 95%. As médias das eficácias dos extratos frescos e desidratados foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) de probabilidade.

3.8 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: balança analítica Marte modelo AL 500; Lupa Nikon modelo SMZ-1; Estufa B.O.D. Fanen modelo 347F; evaporador rotativo FISATOM 802; desumidificador Pyrex 40/35; liquidificador Britânia; sonicador Ultra Cleaner 750; espectrômetro de infravermelho espectrômetro Shimadzu FTIR-800; cromatógrafo líquido de alta eficiência Termo - Electron corporation, modelo Finnigan Surveyor com detector PDA SPD-M10AV, coluna Metasil C18 ODS PN0380 Metachem com dimensões de 250 mm x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 µm.

3.9 REAGENTES

Os reagentes utilizados nas extrações e nas análises foram: álcool etílico absoluto P.A. (99,5%) da marca VETEC; diclorometano P.A. (99,5%) da marca VETEC; acetona P.A. (99,5%) da marca VETEC. Para análise no FTIR foram usados: clorofórmio P.A-ACS da marca Synth (99,85%) e brometo de potássio P.A-ACS da marca Synth (99%). Para a identificação de metabólitos secundários foram utilizados: nitrato de bismuto (III) P.A. da marca VETEC; ácido nítrico P.A. da marca Nuclear; iodeto de potássio P.A-ACS da marca VETEC; cloreto férrico P.A. da marca BIOTEC; ácido clorídrico P.A. da marca VETEC; hidróxido de sódio P.A-ACS da marca ECIBRA e hidróxido de amônio da marca CHEMCO.

3.9.1 Reagente de Dragendorff

Solução A: dissolveu-se 5,0g de nitrato de bismuto (III) em 5 mL de ácido nítrico 30%.

Solução B: dissolveu-se 5,7g de iodeto de potássio em um volume mínimo de água.

Reagente: a **solução A** foi vertida lentamente sobre a **solução B** e, após repouso de uma hora a solução foi filtrada. Em um balão completou-se o volume para 100 mL e a solução foi guardada ao abrigo de luz.

3.10 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

Os cálculos de classificação foram realizados com o programa computacional ARTHUR/75 e os demais foram desenvolvidos pela Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio do Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais (LQCN) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

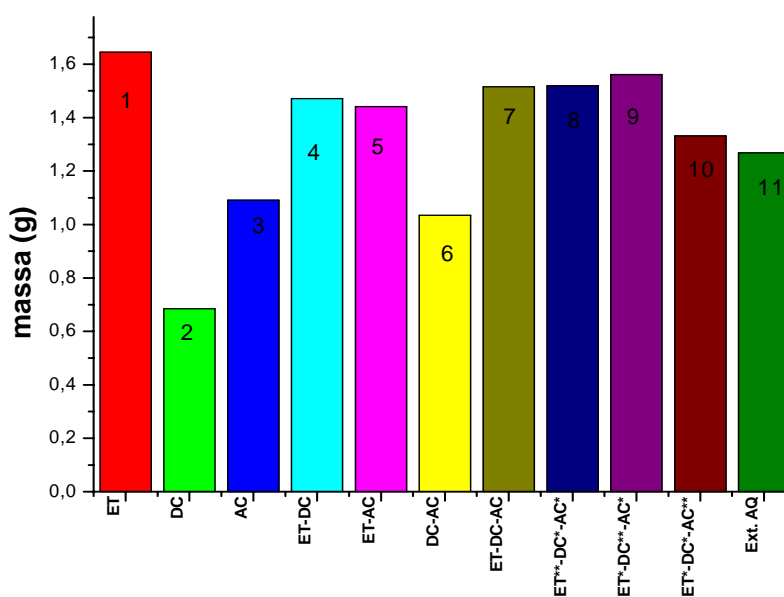
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTOS

Na primeira etapa do trabalho foi investigado o efeito dos três solventes: etanol, diclorometano e acetona no rendimento dos extratos obtidos das folhas frescas e desidratadas da planta *Aloe arborescens Mill.* A matriz de planejamento, cujos elementos são as proporções utilizadas para preparar as várias misturas está representada na Tabela 1. Foi utilizada água pura na obtenção do extrato 11 e todas as extrações foram feitas em triplicatas.

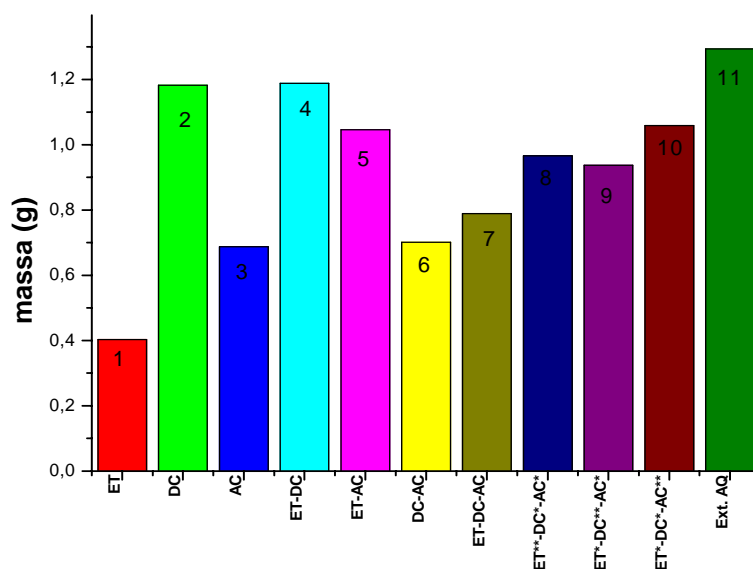
A Figura 9 mostra os valores médios das massas em gramas para os 11 extratos brutos obtidos com 75g de folhas frescas da *Aloe arborescens Mill.* Observa-se na Figura que o maior rendimento dos extratos obtidos a partir das folhas frescas da planta ocorreu com o extrator 1, ou seja, o solvente com etanol puro e misturas de solventes que contém etanol na sua composição, mas isto não significa maior variedade de compostos químicos.

Figura 9 - Gráfico dos rendimentos médios dos 11 extratos obtidos com 75g de folhas frescas da *Aloe arborescens Mill* seguindo o planejamento experimental centróide simplex.*corresponde a 16,67%; **corresponde a 66,67% do solvente.



Para calcular o rendimento dos extratos com a planta desidratada, foi coletada uma quantidade de 2.500g de folhas. Ao final do processo obteve-se uma quantidade em massa de 126,918g de folhas secas, ou seja, apenas 5,07% da massa mostrando que cerca de 95% das folhas frescas da planta *Aloe arborescens Mill* é constituída de água e substâncias voláteis. A Figura 10 mostra os valores médios das massas obtidas para os 11 extratos preparados com 10g de folhas desidratadas.

Figura 10 - Gráfico dos rendimentos médios dos 11 extratos obtidos com 10g de folhas desidratadas da *Aloe arborescens Mil* seguindo o planejamento experimental. *corresponde a 16,67%; **corresponde a 66,67% do solvente.

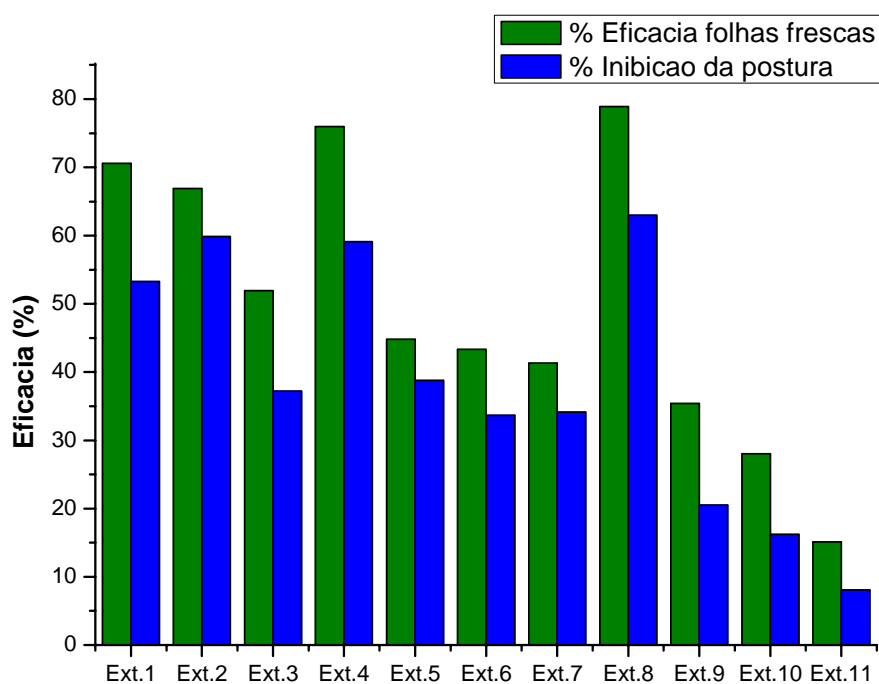


Na figura podemos observar que o maior rendimento dos extratos foi obtido com os solventes extratores diclorometano (2) e a mistura etanol:diclorometano (4) (v:v) misturados na mesma proporção e água pura. Uma observação interessante na comparação entre os rendimentos foi que na extração com as folhas frescas obteve-se maior rendimento médio no extrato 1 preparado em etanol (1,645g) e baixo rendimento no extrato 2 com diclorometano puro (0,685g). Na extração com as folhas desidratadas, obteve-se o contrário, ou seja, baixo rendimento médio no extrato 1 com etanol como solvente (0,403g) e alto rendimento médio no extrato 2 com diclorometano puro (1,183g).

4.2 RESULTADOS DOS TESTES BIOLÓGICOS

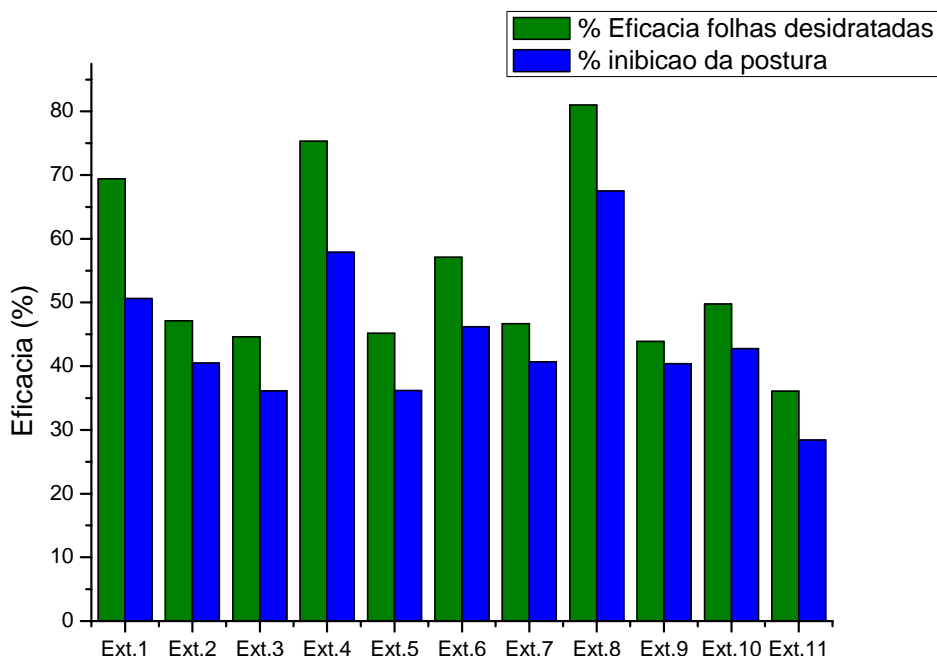
A Figura 11 mostra os resultados das médias dos testes das eficácias e da inibição da postura das fêmeas do carrapato bovino nos testes biológicos realizados com os 10 extratos obtidos com as folhas frescas da planta seguindo o planejamento mostrado na tabela 1 e com o extrato aquoso (extrato 11). Podemos observar na Figura que os extratos 1, 4 e 8 apresentaram maiores valores de eficácia mostrando serem mais indicados no controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Figura 11 - Gráfico das eficácias realizado com os extratos obtidos das folhas frescas da planta mostrando maior eficácia no controle do carrapato bovino e maior inibição da postura com os extratos: 1 (etanol puro), 4 (etanol:diclorometano) 1:1 v/v e 8 (etanol:diclorometano:acetona) 4:1:1 v/v/v.



A Figura 12 mostra os resultados das médias das eficácias e da inibição da postura das fêmeas do carrapato bovino nos testes biológicos com os 10 extratos obtidos com as folhas desidratadas. Podemos observar na Figura que os extratos 1, 4 e 8 também apresentaram maiores valores de eficácia mostrando serem mais indicados no controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

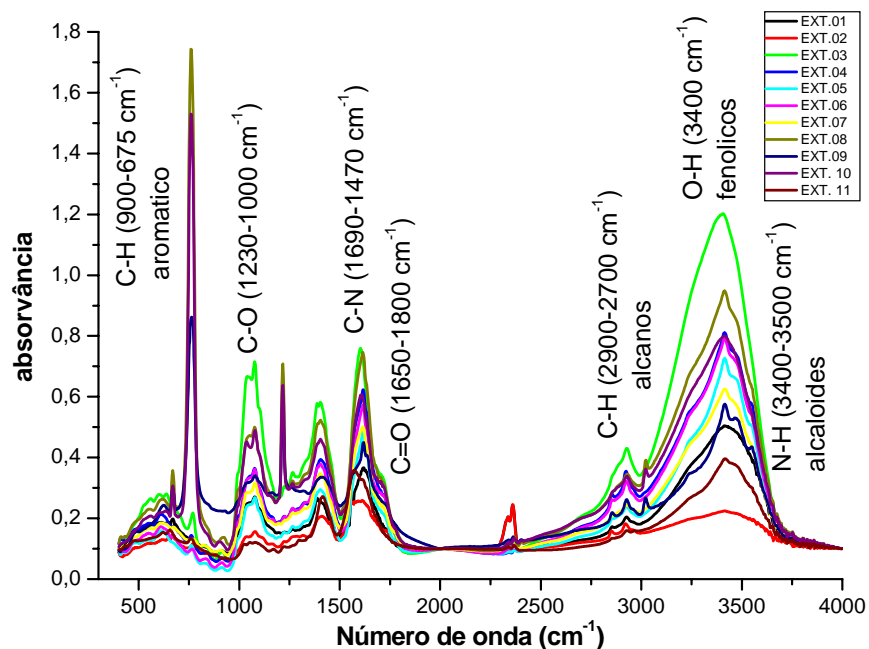
Figura 12 - Gráfico das eficácias realizado com os extratos obtidos das folhas desidratadas da planta mostrando maior eficácia no controle do carrapato bovino e maior inibição da postura com os extratos: 1 (etanol puro), 4 (etanol:diclorometano) 1:1 v/v e 8 (etanol:diclorometano:acetona) 4:1:1 v/v/v.



4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE POR FTIR

Uma das etapas deste trabalho teve como objetivo fazer estudos exploratórios dos dados espectrais dos extratos brutos obtidos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Os extratos das folhas frescas da *Aloe arborescens* Mill, preparados de acordo com o planejamento mostrado na Tabela 1 e o extrato aquoso foram analisados por FTIR e os espectros foram submetidos a análises quimiométrica. A Figura 13 mostra os espectros dos 11 extratos registrados na região entre 4000-400 cm^{-1} .

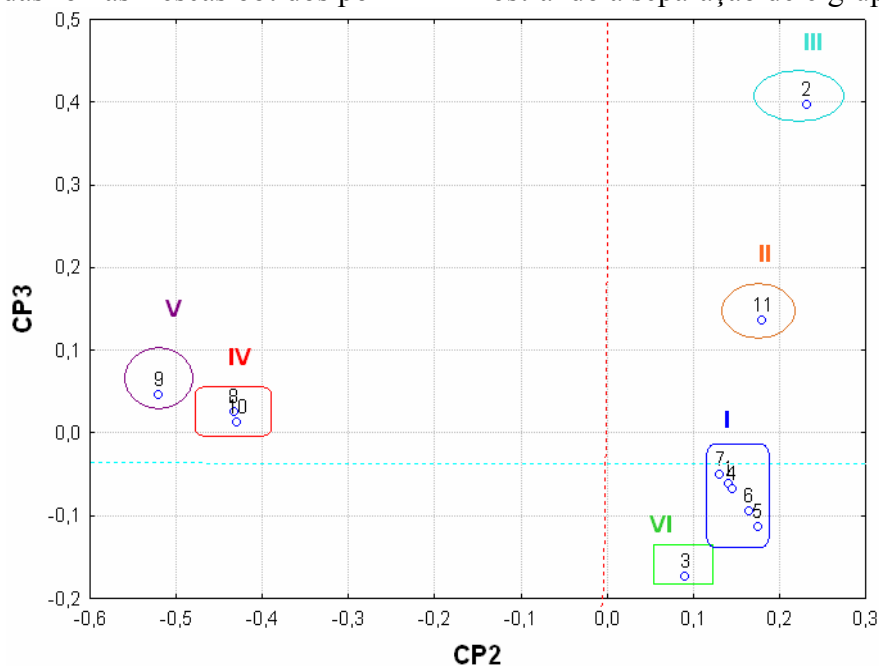
Figura 13 - Espectro no infravermelho dos 11 extratos brutos obtidos das folhas frescas da *Aloe arborescens* Mill de acordo com o planejamento experimental centróide simplex.



Os valores de absorvância foram colocados em uma matriz 11 x 1866 (11 amostras/1866 variáveis/absorbâncias) e submetidos à análise de componentes principais (ACP). A Figura 14 mostra o gráfico dos escores da CP2 com a CP3. Neste gráfico é possível observar a formação de seis grupos, o grupo I é formado pelas amostras 1, 4, 5, 6 e 7; o grupo II formado pela amostra 11 (extrato aquoso); o grupo III formado pela amostra 2; o grupo IV formado pelas amostras 8 e 10; o grupo V formado pela amostra 9 e o grupo VI é formado pela amostra 3. As três primeiras componentes principais explicam 98,02% da variância total contida nos dados.

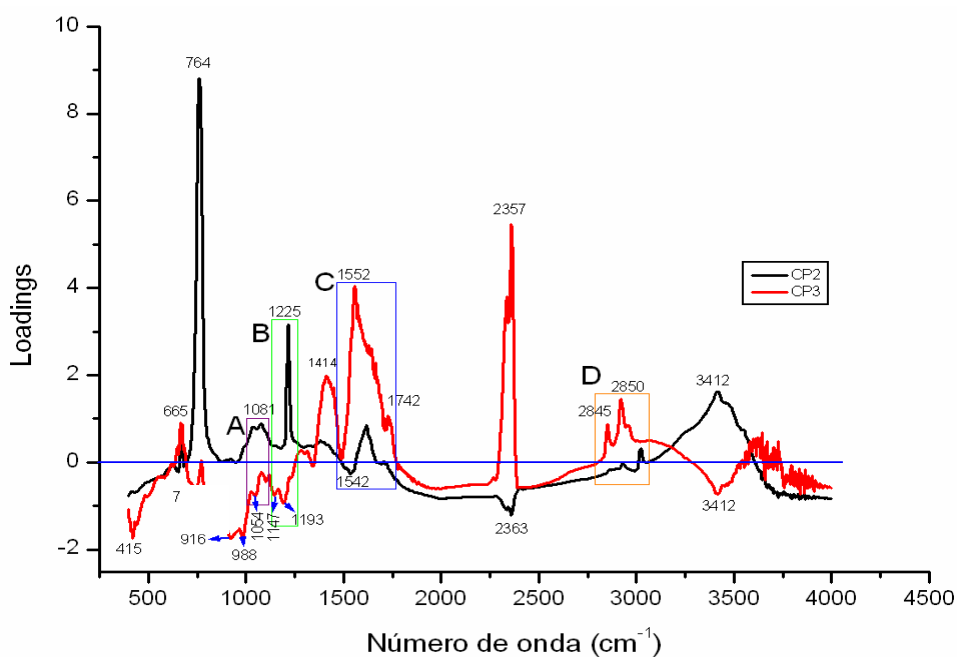
A CP2 é capaz de discriminar com 7,74% de variância os grupos I, II, III e VI, localizados na região positiva, dos grupos IV e V localizados na parte negativa da CP2. A CP3 com apenas 2,19% de variância consegue discriminar todos os grupos.

Figura 14 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos dos 11 extratos das folhas frescas obtidos por FTIR mostrando a separação de 6 grupos.



O gráfico dos valores dos loadings das CP2 e CP3 está apresentado na Figura 15. Nesta figura podemos verificar e discriminar os números de onda que implicam a distância entre os grupos mostrados no gráfico dos escores.]

Figura 15 - Gráfico dos loadings das CP2 e CP3 para as 11 amostras dos extratos das folhas frescas analisadas por FTIR.



Os grupos IV e V localizados na parte negativa da CP2 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP2 no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os números de onda de 1542 e 2363. A banda presente na região C, em torno de 1542 cm^{-1} pode indicar a presença de estiramento de C=C em compostos aromáticos (1620-1450 cm^{-1}) e a banda observada na região em torno de 2363 cm^{-1} é característica de aminas terciárias (2700 e 2250 cm^{-1}) que absorvem em comprimento de onda maiores do que as aminas primárias e secundárias³².

Os grupos I e VI localizados na parte negativa da CP3 no gráfico dos escores são influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP3 no gráfico dos loadings, as regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os números de onda de 732, 916, 988, 1054, 1147, 1193 e 3412. As bandas presentes nestas regiões indicam a presença de vibrações correspondente ao estiramento de t-butila (1310-650 cm^{-1}), vibrações de deformação angular de N-H de lactamas (800-666 cm^{-1}) ou de vibrações de deformação angular fora do plano de C-H de hidrocarbonetos aromáticos polinucleados (900-675 cm^{-1}), as deformações em fase fora do plano dos átomos de hidrogênio adjacentes dos anéis aromáticos são fortemente acoplados entre si³². São também compatíveis com deformação axial assimétrica de C-O de éteres que apresentam bandas entre 1075 e 1020 cm^{-1} , também são bandas características de estiramento de C-O de alcoóis e fenóis (1230-1000 cm^{-1}), éteres (1150-1070 cm^{-1}) e éster (1275-1020 cm^{-1}) podendo ainda ter contribuição de deformações angulares C-H em alcanos (1310-1175 cm^{-1}).

A banda observada em torno de 3412 cm^{-1} pode ser proveniente de vibrações de deformação axial de O-H presente em fenóis que apresenta uma banda larga em torno de 3400 cm^{-1} ou ainda proveniente de vibrações de deformação axial de N-H, as aminas primárias e secundárias mostram, em solução diluída, duas bandas de absorção fracas, a primeira em 3500 cm^{-1} e a outra em 3400 cm^{-1} , que correspondem aos modos de deformação axial assimétrica e simétrica N-H livre³².

Os grupos II e III localizados nas partes positivas dos fatores 2 e 3 no gráfico dos escores são influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP2 e CP3. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os números de onda de 665, 764, 1081, 1225, 1414, 1552, 1742, 2357, 2845, 2850 e 3412 cm^{-1} . A banda em torno de 1225 cm^{-1} pode ser proveniente de ácidos (1320-1210 cm^{-1}) podendo ainda ter contribuição de deformações angulares C-H em alcanos (1310-1175 cm^{-1}). A banda de absorção observada na região de 1414 e 1552 cm^{-1} é proveniente de uma vibração de deformação angular N-H em

amidas primárias ($1650-1515\text{ cm}^{-1}$), imidas ($1496-1445\text{ cm}^{-1}$), podendo ainda ter contribuição de absorções de estiramento do grupo carbonila em amidas substituídas (1540 cm^{-1}), estiramento do grupo C-N em alquilaminas ($1690-1470\text{ cm}^{-1}$). As bandas presentes na região D, em torno de 2845 e 2850 cm^{-1} são compatíveis com o estiramento de $\text{Csp}^3\text{-H}$ em alcanos e aminas primárias ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$) provenientes das deformações axiais assimétricas e simétricas do grupo N-H_2 .

O resultado da análise hierárquica (AH) concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores. O dendrograma obtido está apresentado na Figura 16.

Os extratos das folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill, também foram analisados por FTIR e os dados obtidos foram submetidos a análises quimiométrica. A Figura 17 mostra os espectros dos 11 extratos das folhas desidratadas registrados na região entre $4000-400\text{ cm}^{-1}$.

Figura 16 - Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR dos extratos brutos obtidos das folhas frescas da *Aloe arborescens* Mill de acordo com o planejamento experimental.

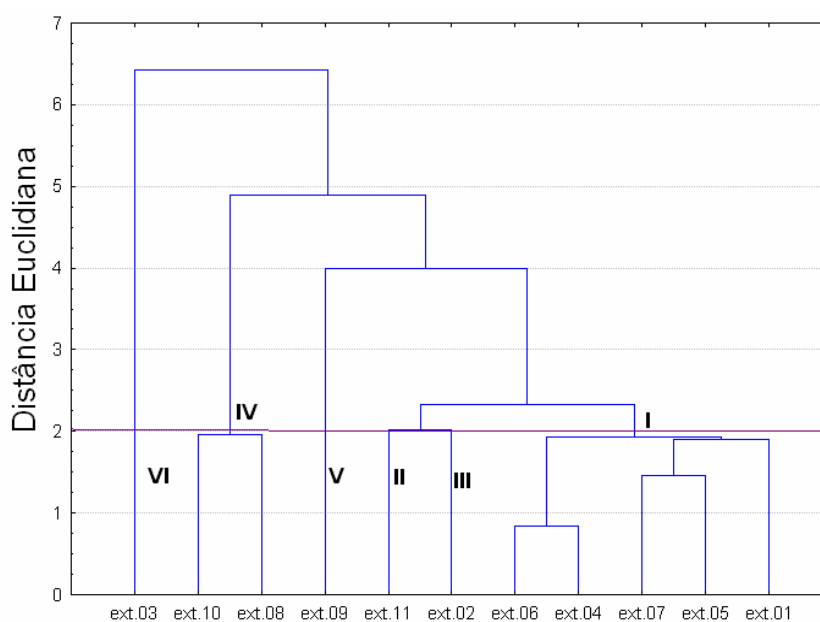
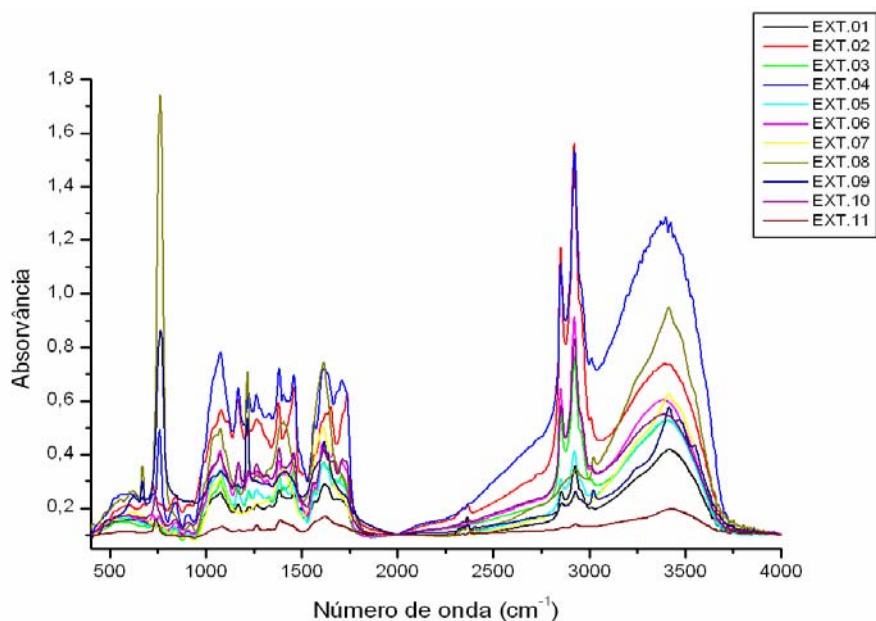


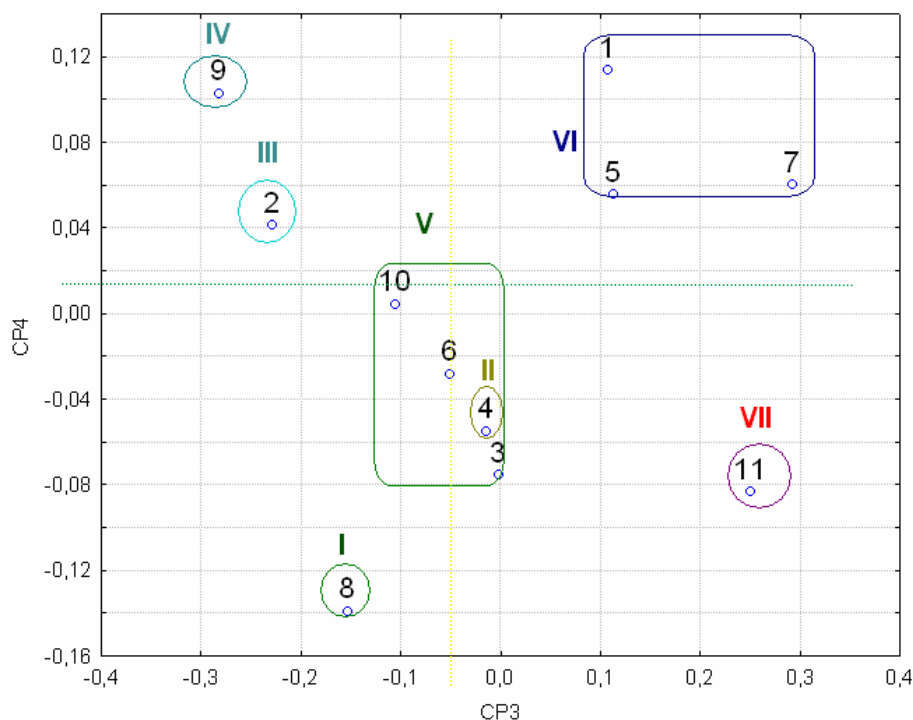
Figura 17 - Espectro no infravermelho dos 11 extratos brutos obtidos das folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill de acordo com o planejamento experimental centróide simplex.



As quatro primeiras componentes principais (CP) explicam 99,1% da variância total contida nos dados. Uma melhor descrição dos grupos pode ser verificada na projeção da CP3 com a CP4 no gráfico dos escores, como mostra a Figura 18.

Neste gráfico é possível observar a formação de sete grupos, sendo que o grupo I é formado pela amostra 8; o grupo II formado pela amostra 4; o grupo III formado pela amostra 2; o grupo IV formado pelas amostras 9; o grupo V formado pelas amostras 3, 6 e 10; o grupo VI formado pelas amostras 1, 5 e 7 e o grupo VII é formado pela amostra 11(extrato aquoso). A CP3 com 3,10% de variância é capaz de discriminar os grupos VI e VII, localizados na região positiva, dos grupos I, II, III, IV e V localizados na parte negativa no gráfico dos escores. A CP4 com apenas 0,62% de variância consegue discriminar os grupos III, IV e VI localizados na região positiva, dos demais grupos que estão localizados na parte negativa da CP4 no gráfico dos escores.

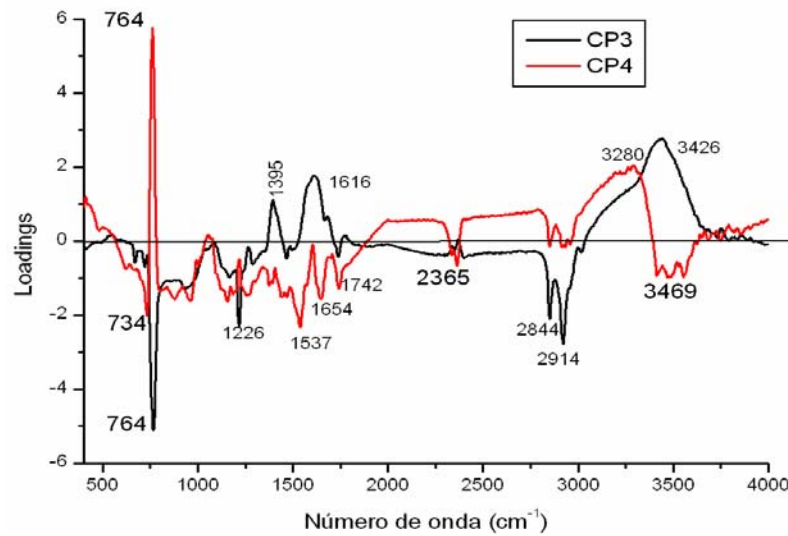
Figura 18 - Gráfico dos escores das CP3 e CP4 dos dados espectroscópicos dos 11 extratos das folhas desidratadas obtidos por FTIR mostrando a separação de 7 grupos.



O gráfico dos valores dos loadings das CP3 e CP4 está apresentado na Figura 19, onde pode ser verificado e discriminado os números de onda que implicam a distância entre os grupos mostrados no gráfico dos escores. Os grupos I, II, III, IV e V localizados na parte negativa da CP3 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP3 no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os números de onda de 734, 1160, 1537, 1654, 1742, 2365 e 3469 cm^{-1} .

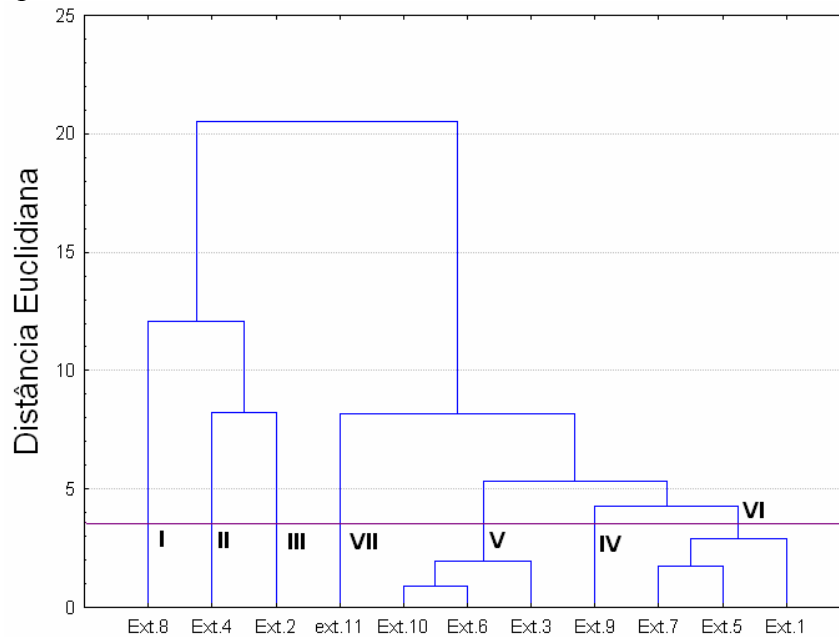
Os grupos VI e VII localizados na parte positiva da CP3 no gráfico dos escores são influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivo na CP3 no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os números de onda de 764 e 3280 cm^{-1} . Os grupos III, IV e VI localizados nas partes positivas da CP4 no gráfico dos escores são influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP4 no gráfico dos loadings, as regiões do espectro que caracterizam estas amostras são os números de onda de 1395, 1616 e 3426 cm^{-1} e os grupos I, V e VII localizados na região negativa da CP4 são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP4 no gráfico dos loadings, as regiões do espectro que caracterizam estas amostras são os números de onda de 764, 1226, 2844 e 2914 cm^{-1} .

Figura 19 - Gráfico dos loadings das CP2 e CP3 para as 11 amostras dos extratos das folhas desidratadas analisadas por FTIR.



O resultado da análise hierárquica (AH) concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores, o dendrograma obtido está representado na Figura 20.

Figura 20 - Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR dos extratos obtidos das folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill de acordo com o planejamento experimental.



4.4 RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DOS EXTRATOS DAS FOLHAS FRESCAS.

Outra etapa do trabalho realizado teve como objetivo comparar a influência da composição do meio extrator (solvente) e da fase móvel na qualidade da impressão digital cromatográfica dos metabólitos secundários da planta *Aloe arborescens* Mill. Desta forma, a fim de se obter o perfil cromatográfico com maior número de picos e investigar possíveis discriminações na composição química, os extratos obtidos com as folhas frescas foram submetidos às análises cromatográficas.

Nas análises cromatográficas, a técnica utilizada foi à cromatografia em fase reversa utilizando-se água como eluente em todas as fases móveis testadas. Foram testadas três fases móveis de forças cromatográficas diferentes, como mostradas na Tabela 2.

Foi utilizado metanol e acetonitrila como modificadores orgânicos. Com base em dados da literatura, foi possível calcular a força dos solventes das fases testadas, Equação 6.

$$S = \sum S_i \times \phi_i \quad \text{Eq. 6}$$

onde $\sum S_i$ representa a somatória do produto da força do solvente puro, Água ($S_i = 0$), metanol ($S_i = 3,0$), acetonitrila ($S_i = 3,1$) e ϕ_i = fração de volume do solvente³³.

O monitoramento foi feito nos comprimentos de onda de 210, 240 e 254 nm nas três fases investigadas, obtendo-se o número de picos como mostra a Tabela 3.

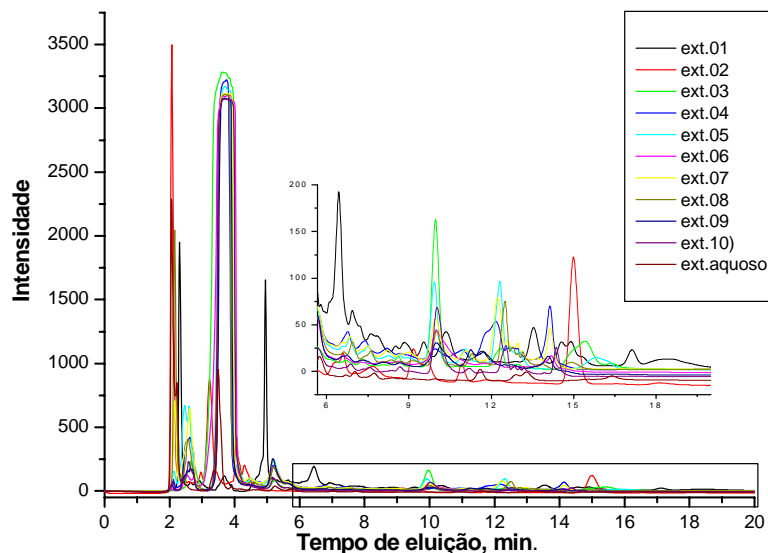
Tabela 3 - Número de picos para os extratos do planejamento nas três fases móveis estudadas e nos três comprimentos de onda monitorados.

λ (nm)	FM A			FM B			FM C		
	210	240	254	210	240	254	210	240	254
Ext.1	21	6	3	31	11	28	31	31	30
Ext.2	12	19	27	28	37	17	26	28	18
Ext.3	23	13	13	15	19	13	20	8	13
Ext.4	6	12	11	17	25	17	23	14	21
Ext.5	9	13	15	18	21	8	22	25	22
Ext.6	9	10	16	18	13	11	13	18	16
Ext.7	16	17	13	19	28	10	13	24	23
Ext.8	11	14	15	18	22	13	17	14	26
Ext.9	15	15	14	17	23	9	12	16	16
Ext.10		15	7	16	16	8	16	10	15
Ext.11	8	23	9	17	28	11	15	10	13

Neste trabalho para aplicação dos métodos quimiométricos, foi considerando o monitoramento em 254 nm com a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%) por apresentar melhores resultados, ou seja, maior número de picos. Apesar de as análises terem sido feitas com tempo de eluição de 40 minutos, as informações foram todas obtidas nos primeiros 20 minutos de corrida. O extrato aquoso, por não se ajustar ao planejamento, foi tratado separadamente dos outros extratos, sendo que na análise do extrato aquoso com a Fase Móvel A (H₂O 61,5% e MeOH 38,5%) obteve-se 9 picos, com a Fase Móvel B (H₂O 65% + MeOH 17,5% + ACN 17,5%) obteve-se 11 picos e com a Fase Móvel C (H₂O 68% + ACN 32%) obteve-se 13 picos.

Analisando o número de picos obtidos durante as análises cromatográficas com as três fases móveis, observa-se que a maior quantidade de número de picos obtidos ocorreu com a fase móvel C para todos os extratos analisados mostrando que com esta fase ocorreu melhor separação dos compostos químicos presente nos extratos. A Figura 21 mostra os cromatogramas das 11 amostras dos extratos brutos obtidos das folhas frescas da *Aloe arborescens* Mill com a fase móvel C monitorada em 254 nm.

Figura 21 - Cromatogramas das 11 amostras dos estratos bruto das folhas frescas da planta *Aloe arborescens* Mill obtido nas análises por HPLC utilizando-se a fase móvel C, (H₂O 68% e ACN 32%) monitoradas no comprimento de onda de 254 nm.



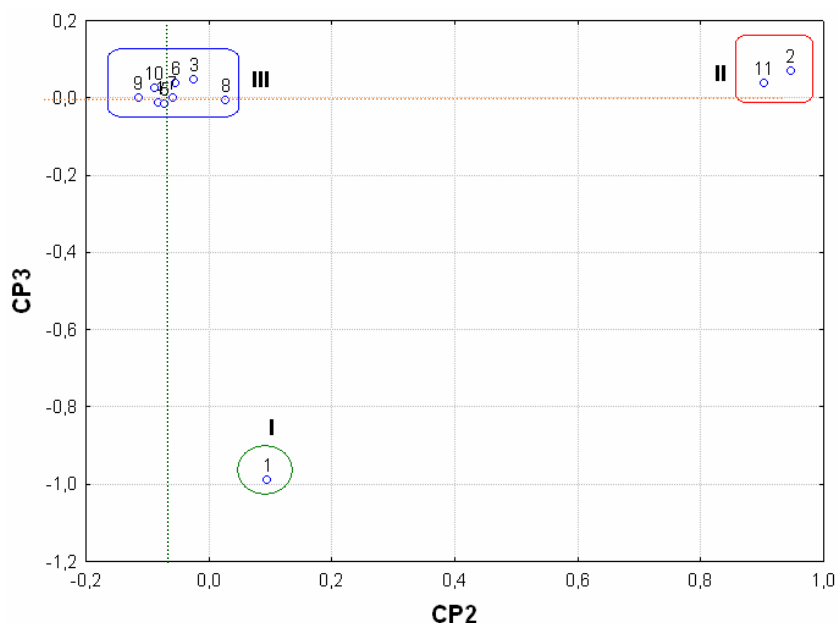
Observa-se no cromatograma a influência da composição do sistema extrator na concentração dos compostos químicos, principalmente nos tempos de retenção próximos a 2,08; 2,16; 2,29; 2,63; 3,67 e 4,95 minutos, ou seja, os mais polares.

A Figura mostra também que a intensidade dos picos cromatográficos depende da composição do solvente extrator.

Os dados originais obtidos destes cromatogramas foram transformados em matriz de dimensão 11 X 4801 (11 amostras/cromatograma por 4801 variáveis/alturas dos picos), correspondendo ao tempo de retenção de 40 minutos. Essa matriz foi então submetida ao pré-processamento para minimizar as variações causadas pela quantidade de amostras injetada e em seguida submetida à análise de componentes principais.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 93,25 % da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 68,23% da variância, a melhor discriminação dos grupos pode ser verificada na projeção das CP2 e CP3, Figura 22.

Figura 22 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 11 amostras dos extratos das folhas frescas da *Aloe arborescens* Mill mostrando a separação das amostras em três grupos.



A CP2 consegue discriminar com apenas 16% de variância os grupos I, II localizados na região positiva, do grupo III que está localizado na região negativa da CP2 no gráfico dos escores. A CP3 com apenas 9,01% de variância consegue discriminar os grupos II e III localizados na região positiva e em torno do zero do grupo I, localizado na região mais negativa da CP3 no gráfico dos escores.

O grupo I é formado apenas pelo extrato obtido com etanol puro (extrato 1), o grupo II contém os extratos obtidos com diclorometano puro (extrato 2) e o extrato aquoso (extrato 11); o grupo III contém o extrato com acetona pura (extrato 3), misturas binárias de etanol e diclorometano (extrato 4), etanol e acetona (extrato 5), diclorometano e acetona (extrato 6), o ponto central com mesmas quantidade de etanol, diclorometano e acetona (extrato 7) e as outras misturas terciárias do planejamento (extratos 8, 9 e 10). As Figuras 23, 24 e 25 mostram os cromatogramas das amostras dos grupos I, II e III.

Figura 23 - Cromatograma das amostras do grupo I discriminado na CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 254 nm.

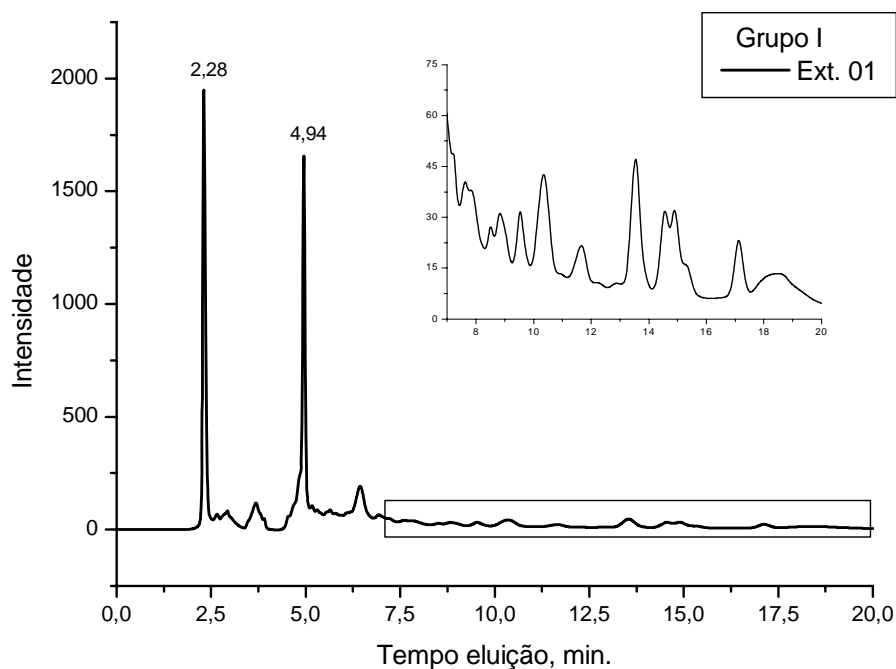


Figura 24 - Cromatograma das amostras do grupo II discriminado na CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 254 nm.

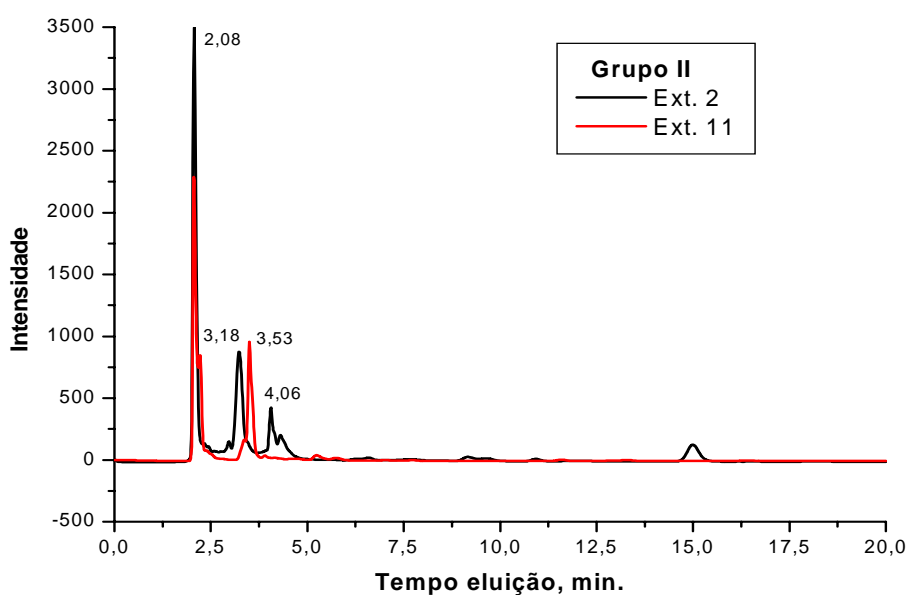
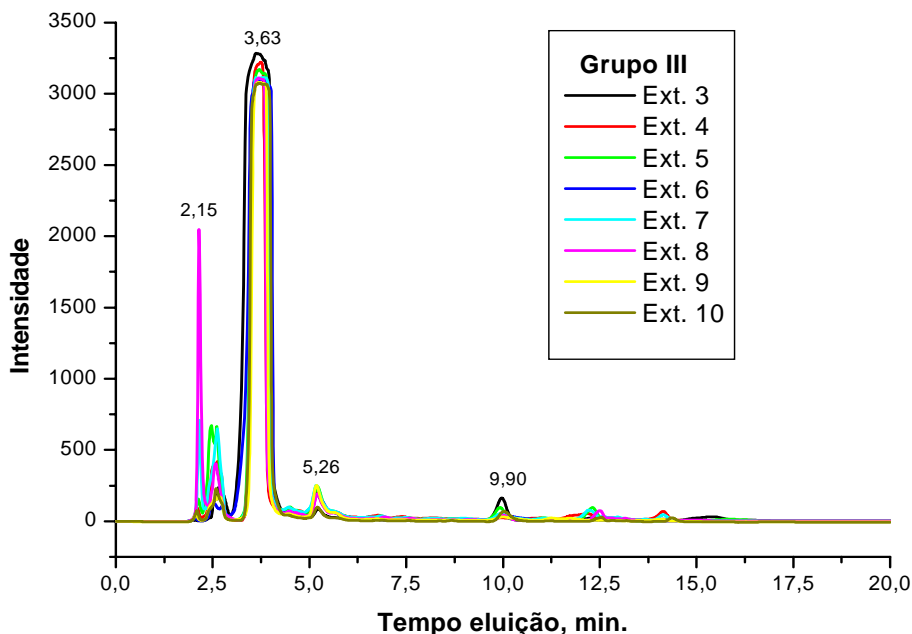


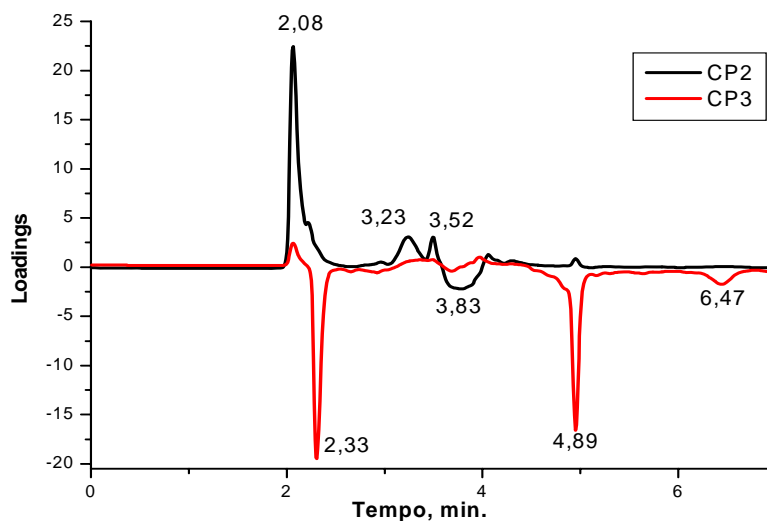
Figura 25 - Cromatograma das amostras do grupo III discriminado na CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 254 nm.



O gráfico dos valores dos loadings dos fatores 2 e 3 está apresentado na Figura 26. Esta Figura mostra que os valores dos loadings da CP2 são praticamente positivos com exceção do pico em 3,63 minutos. Isto implica que o grupo III, tem maior concentração de espécies com tempo de retenção em torno de 3,63 min.

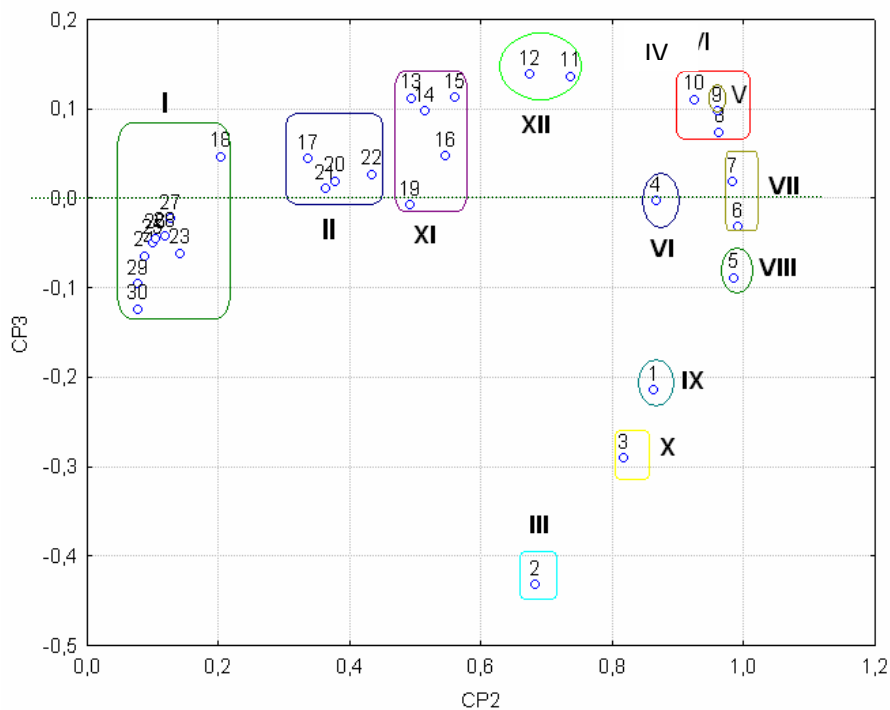
Os grupos I e II localizados na região positiva da CP2 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP2, ou seja, com tempos de retenção em torno de 2,08; 3,23 e 3,52 minutos. O Grupo I localizado na região negativa do fator 3 no gráfico dos escores, é mais influenciado pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP3 no gráfico dos loadings, os valores correspondem às substâncias com tempo de retenção em torno de 2,33, 4,89 e 6,47 minutos. Os loadings da CP3 mostram uma forte influência nos tempos de eluição de 2,33 e 4,89 minutos na discriminação dos grupos I, II e III.

Figura 26 - Gráfico dos loadings dos fatores II e III para as 11 amostras dos extratos das folhas frescas da planta *Aloe arborescens Mill* obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%).



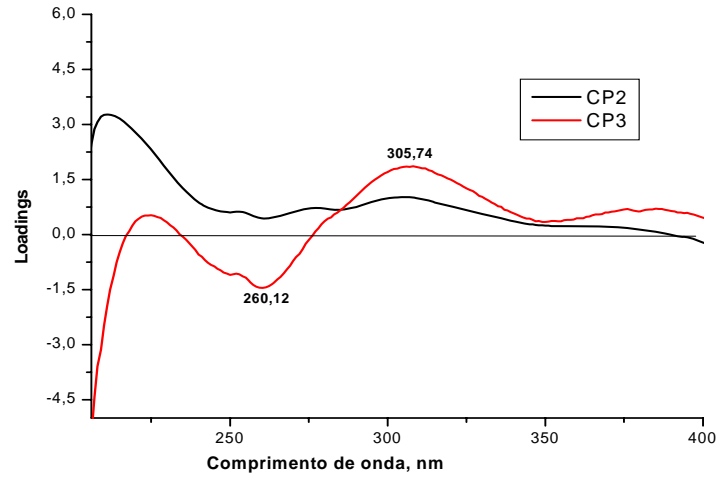
Os espectros UV das amostras 1, 4 e 8 foram extraídos dos cromatogramas dos extratos das folhas frescas analisados com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%) , foram normalizados e submetidas à ACP para verificar a variedade de grupos de moléculas presentes em cada extrato. A amostra 1 obteve-se 30 picos, cada pico formado por espectro com varredura feita em comprimentos de onda de 190 até 800 nm, desta forma, na análise do extrato 1 obteve-se uma matriz de 30 x 800 (30 picos, cada um com informações sobre a absorvância em comprimentos de onda de 190 até 800 nm). A Figura 27 mostra o gráfico dos escores da CP2 e CP3 para os 30 espectros obtidos dos 30 picos na análise cromatográfica por CLAE da amostra do extrato 1 do planejamento centróide simplex e a separação de 12 grupos.

Figura 27 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos espectros da amostra 1 dos extratos das folhas frescas da *Aloe arborescens Mill* obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 28%) mostrando a formação de 10 grupos.



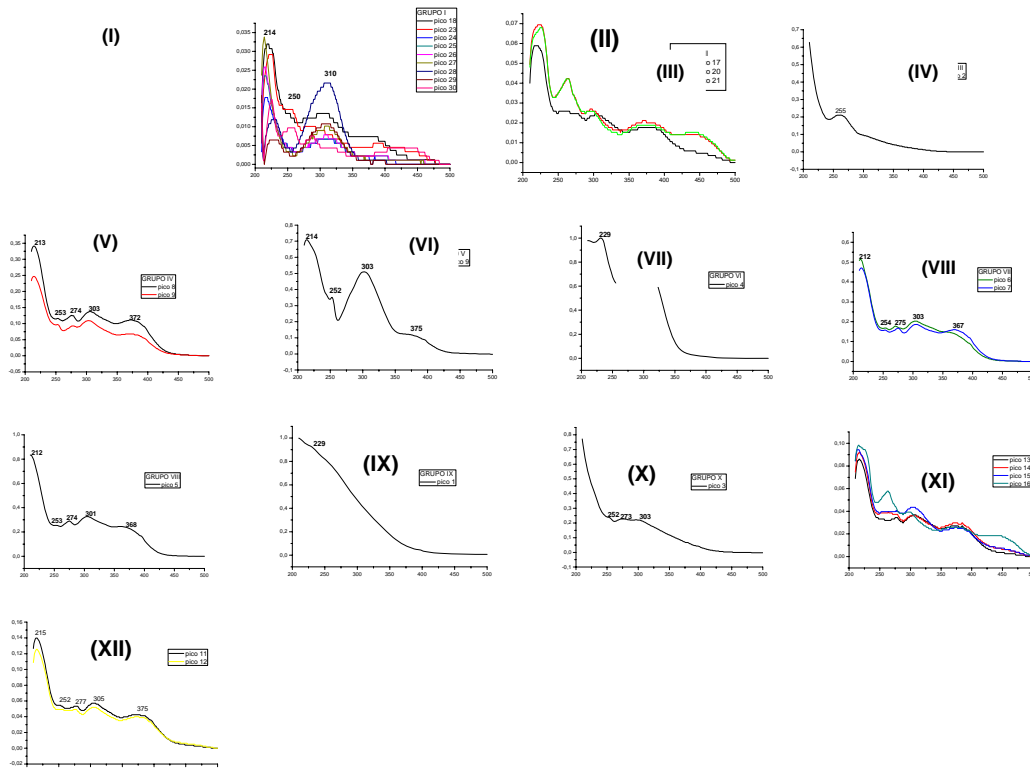
A Figura 28 mostra o gráfico dos loadings da CP2 X CP3 para os espectros obtidos na análise por HPLC do extrato 1 das folhas frescas. Na figura podemos observar que os espectros do extrato 1 que possuem valores mais positivos de loadings na CP3 são os espectros dos grupos I, II, IV, V, XI e XII e os espectros que possuem valores de loadings mais negativos na CP3 são os espectros dos grupos III, VIII, IX e X. Na CP3 as bandas mais importantes apresentam máximos em torno de 260 e 306 nm.

Figura 28 - Gráfico dos loadings dos fatores II e III para os espectros da amostra 1 dos extratos brutos das folhas frescas da *Aloe arborescens mill* obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O68% e ACN 32%).



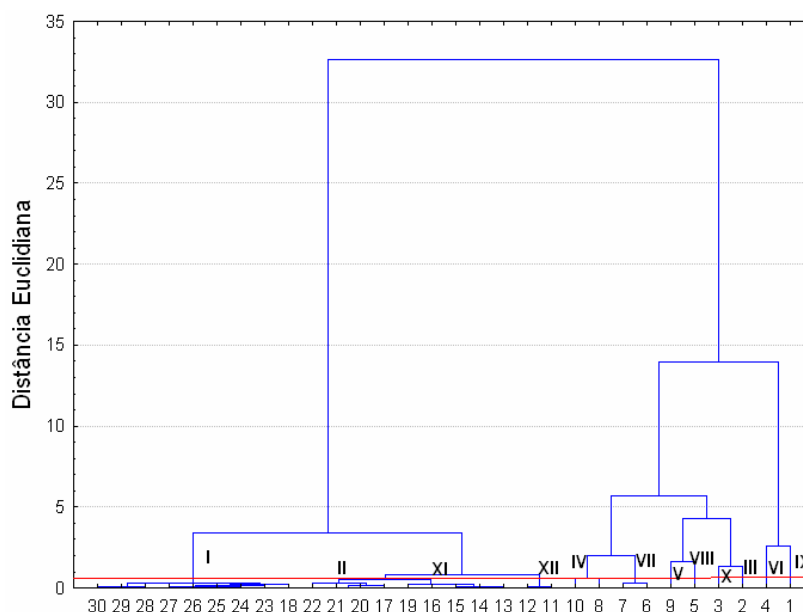
Na Figura 29 podemos observar os gráficos dos espectros dos 12 grupos de compostos químicos presentes no extrato 1 obtido das folhas frescas da planta.

Figura 29 - Gráficos dos 12 grupos de espectros dos picos obtidos da análise do extrato 1 das folhas frescas por CLAE no comprimento de onda de 200 a 500 nm.



O resultado da análise hierárquica (AH) concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores, o dendrograma obtido com os 10 está representado na Figura 30.

Figura 30 - Dendrograma obtido com os dados dos espectros do extrato 1 das folhas frescas analisado por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%) mostrando a formação de 12 grupos.



Na análise cromatográfica por CLAE do extrato 4 do planejamento centróide simplex, obteve-se 21 picos e uma matriz 21 X 800 (21 picos, cada um com informações sobre a absorvância em comprimentos de onda de 190 até 800 nm). A Figura 31 mostra o gráfico dos escores das CP2 e CP3 para os 21 espectros obtidos dos 21 picos na análise por CLAE da amostra do extrato 4 das folhas frescas e a separação de 10 grupos.

A CP2, com apenas 11,58% de variância, consegue discriminar os grupos IV, V, VI, VII, IX e X, localizados na região positiva da CP2, do grupo VIII localizado na região negativa da CP2 no gráfico dos escores. A CP3 consegue discriminar com apenas 1,78% da variância, os grupos III, V, VIII, IX e X localizados na região positiva da CP3, dos grupos I, II, IV e VI localizados na região negativa da CP3 no gráfico dos escores.

A Figura 32 mostra o gráfico dos loadings das CP2 e CP3 para os espectros obtidos na análise por CLAE do extrato 4 das folhas frescas. Na Figura podemos observar que na CP2 as bandas com máximo em 225 e 300 nm discrimina o grupo VIII dos demais grupos, enquanto que na CP3, mais negativo maior a contribuição das bandas com máximo em 260 e 340 nm e na região positiva 249 e 282 nm.

Figura 31 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos espectros da amostra 4 dos extratos das folhas frescas da *Aloe arborescens* Mill obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O68% e ACN 32%) mostrando a formação de 10 grupos.

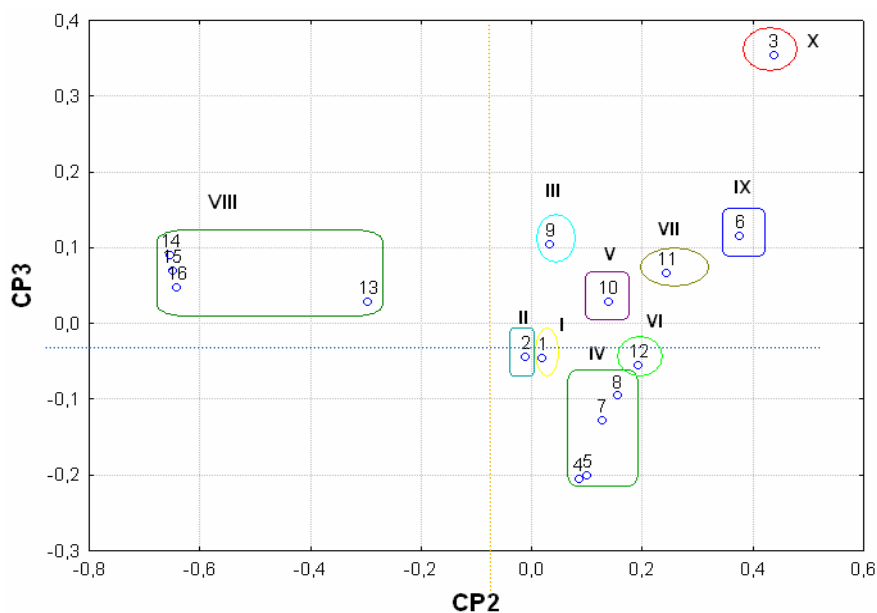
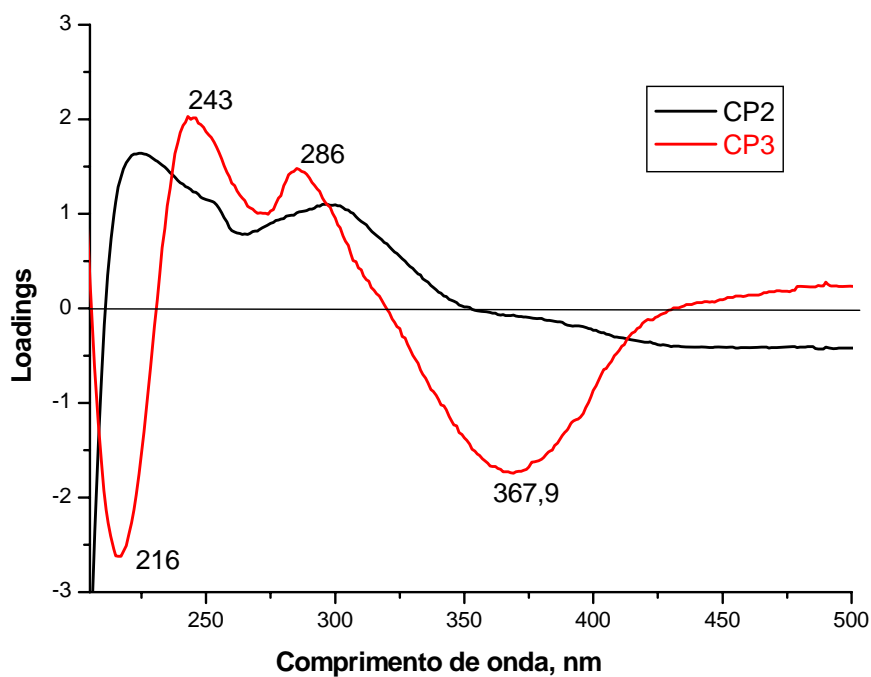
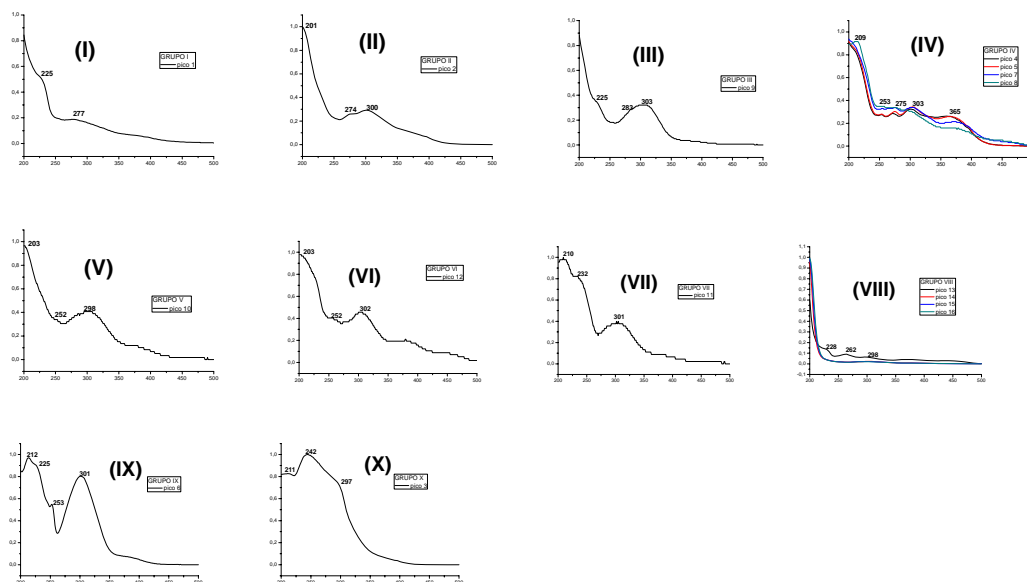


Figura 32 - Gráfico dos loadings das CP2 e CP3 para os espectros da amostra 4 dos extratos das folhas frescas da obtidos por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%).



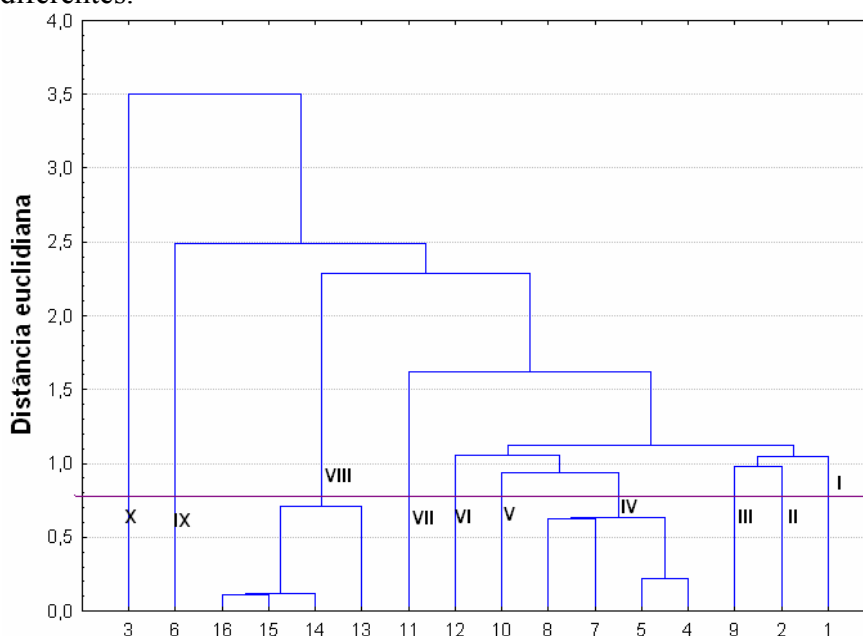
Na Figura 33 podemos observar os gráficos dos espectros dos grupos de compostos químicos presentes no extrato 4 obtido da planta *Aloe arborescens Mill.*

Figura 33 - Gráficos dos 10 grupos de espectros dos picos obtidos da análise do extrato 4 das folhas frescas com CLAE no comprimento de onda de 200 a 500 nm.



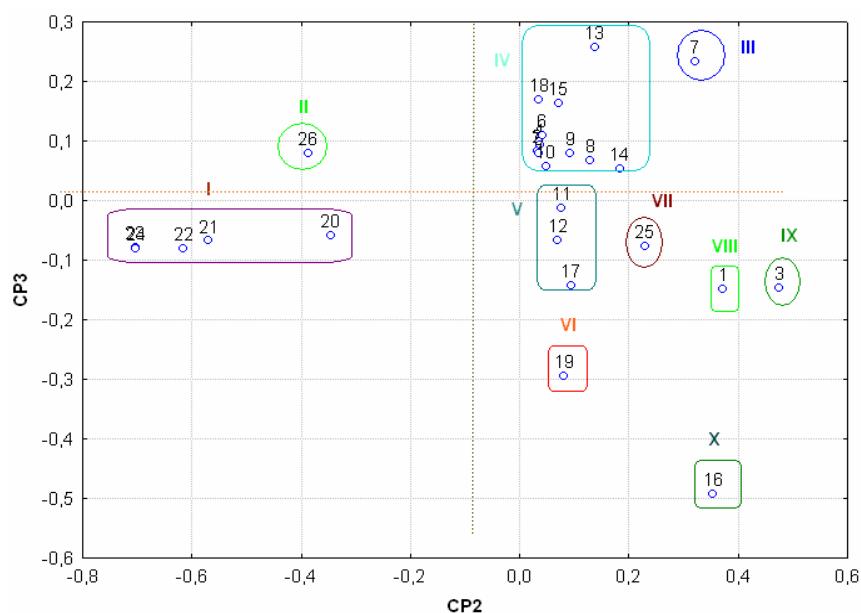
O resultado da análise hierárquica concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores da CP2 e CP3, o dendrograma obtido com os 10 grupos está representado na Figura 34.

Figura 34 - Dendrograma obtido com os espectros do extrato 4 analisado por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%) mostrando a formação de 10 grupos diferentes.



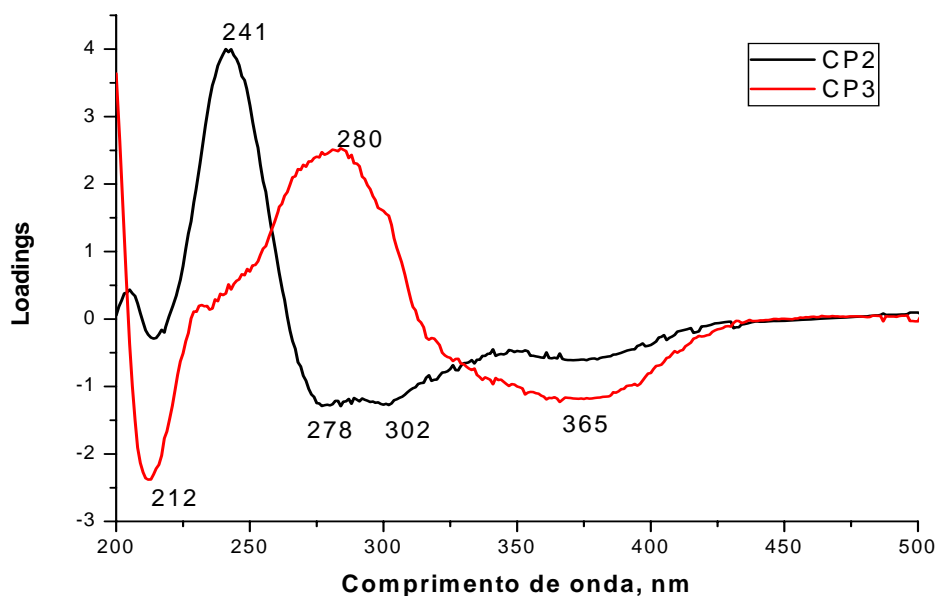
Na análise cromatográfica por CLAE do extrato 8 das folhas, obteve-se 26 picos e uma matriz 26 X 800 (26 picos, cada um com informações sobre a absorvância em comprimentos de onda de 190 até 800 nm). A Figura 35 mostra o gráfico dos escores da CP2 e CP3 para os 26 espectros obtidos dos 26 picos na análise por CLAE da amostra do extrato 8 a separação de 9 grupos (13 % da variância total).

Figura 35 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos espectros da amostra 8 dos extratos das folhas frescas da *Aloe arborescens* Mill obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), mostrando a formação de 10 grupos.



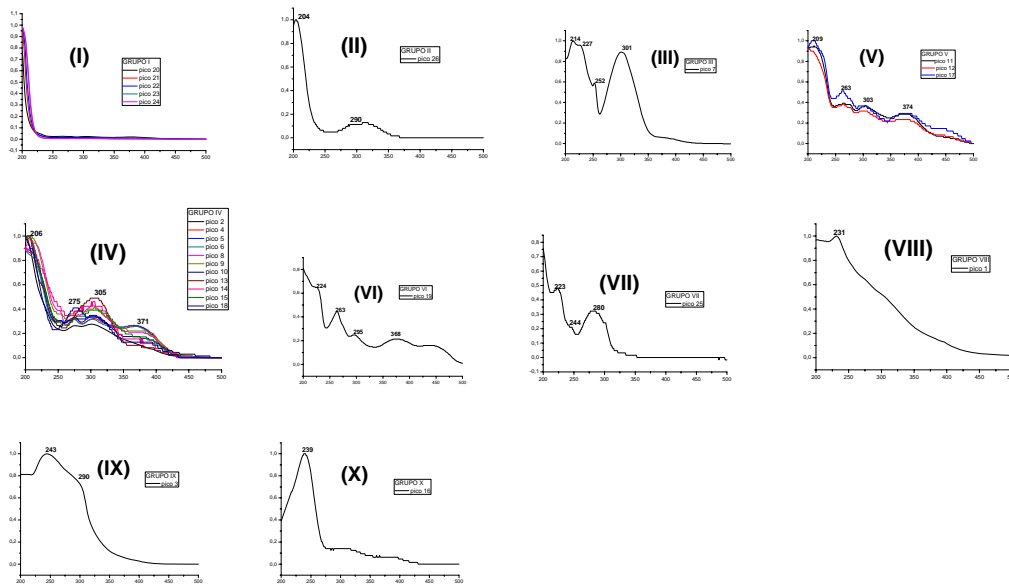
A Figura 36 mostra o gráfico dos loadings da CP2 e CP3 para os espectros obtidos na análise por CLAE do extrato 8. Na Figura podemos observar que os espectros do extrato 8 que possuem valores de loadings mais positivos na CP2 são os espectros dos grupos III, IV, V, VI, VII, IX e X e os espectros que possuem valores mais negativos de loadings na CP2 são os espectros dos grupos I e II. Na CP3, os espectros do extrato 8 que possuem valores mais positivos de loadings são os espectros dos grupos II, III e IV e os espectros que possuem valores mais negativos de loadings na CP3 são os espectros dos grupos I, VI, VII, VIII, IX e X.

Figura 36 - Gráfico dos loadings dos fatores III e IV para os espectros da amostra 8 dos extratos das folhas frescas obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%).



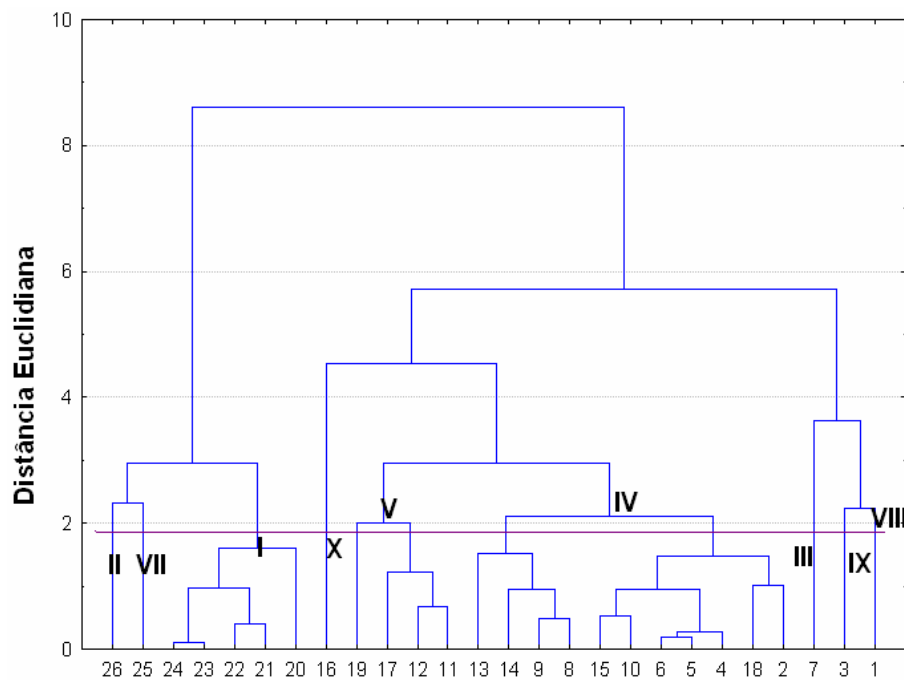
Na Figura 37 podemos observar os gráficos dos espectros dos 10 grupos de compostos químicos presentes no extrato 8 obtido da planta *Aloe arborescens* Mill.

Figura 37 - Gráficos dos 10 grupos de espectros dos picos obtidos da análise do extrato 8 por CLAE no comprimento de onda de 200 a 500 nm.



O resultado da análise hierárquica concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores da CP3 e CP4, o dendrograma obtido com os 14 grupos está representado na Figura 38.

Figura 38 - Dendrograma obtido com os espectros do extrato 8 das folhas frescas analisado por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 28%) mostrando a formação de 10 grupos diferentes.

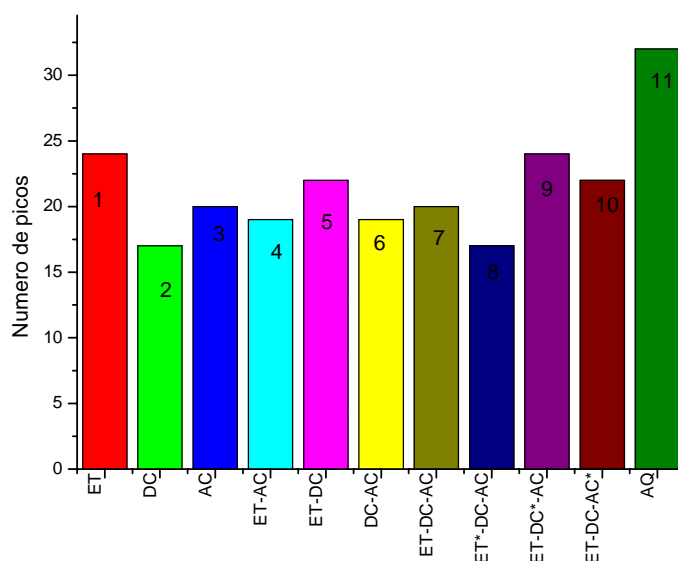


4.5 RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DESIDRATADAS.

Nesta etapa do trabalho foram realizadas análises cromatográficas com as amostras dos extratos obtidos com as folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill. Nestas análises foi testada apenas a fase móvel C (H₂O 68% e CH₃CN 32%) de força cromatográfica 0,99. O monitoramento também foi feito nos comprimentos de onda de 210, 240 e 254 nm, obtendo-se os números de picos como mostra a Figura 39.

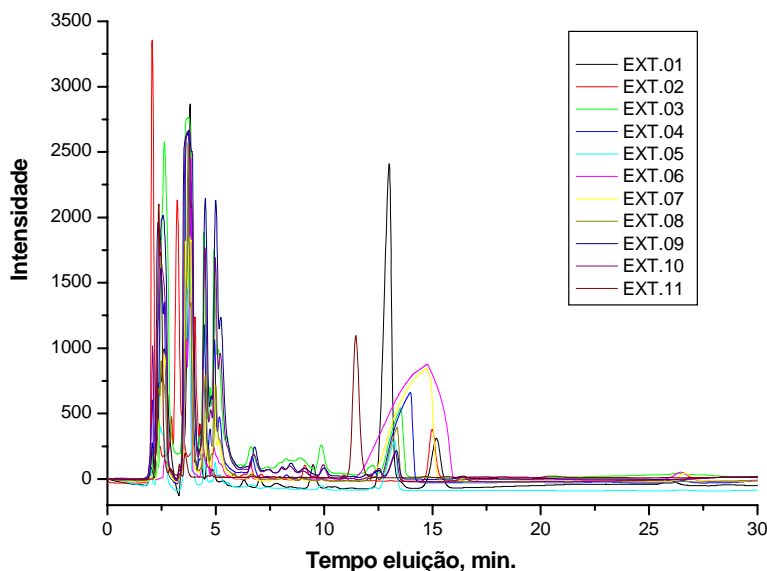
Analisando o número de picos obtidos durante as análises cromatográficas com a fase móvel C, observa-se que a maior quantidade de número de picos obtidos ocorreu com o extrato aquoso (extrato 11), o contrário da análise dos extratos frescos o qual o extrato aquoso apresentou apenas 13 picos.

Figura 39 - Número de picos obtidos na análise cromatográfica dos 11 extratos das folhas desidratadas. *corresponde a 16,67%; **corresponde a 66,67% do solvente.



A Figura 40 mostra os cromatogramas das 11 amostras dos extratos brutos obtidos das folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill com a fase móvel C monitorada em 210 nm.

Figura 40 - Cromatogramas das 11 amostras dos estratos das folhas desidratadas da planta *Aloe arborescens* Mill obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 210 nm.



Para aplicação dos métodos quimiométricos, foi considerando o monitoramento feito em 210 nm com a fase C por apresentar melhores resultados, ou seja, maior número de picos. Os dados originais obtidos destes cromatogramas foram transformados em matriz de dimensão 11 X 4801 (11 amostras/cromatograma por 4801 variáveis/alturas dos picos), correspondendo ao tempo de retenção de 30 minutos, o qual não se obteve informações relevantes após 20 minutos de eluição. Essa matriz foi então submetida ao pré-processamento por comprimento de vetor para minimizar as variações causadas pela quantidade de amostras injetada e em seguida submetida à análise de componentes principais.

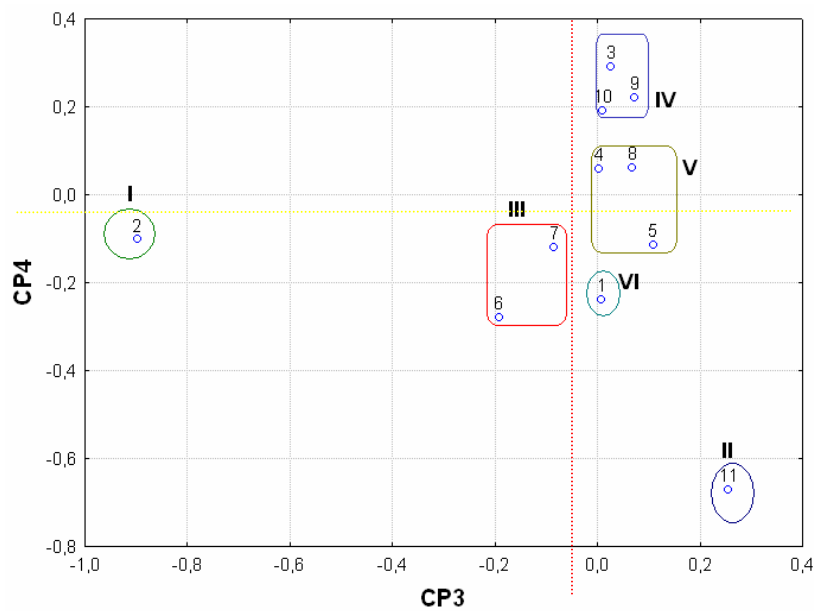
As quatro primeiras componentes principais (CP) explicam 86,67 % da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 58,96% da variância, a melhor discriminação dos grupos pode ser verificada na projeção das CP3 (8,5 % da variância) e CP4 (7,48 % da variância), Figura 41.

Neste gráfico é possível observar a formação de seis grupos, o grupo I é formado pela amostra 2; o grupo II formado pela amostra 11(aquoso); o grupo III formado pelas amostras 6 e 7; o grupo IV formado pelas amostras 3, 9 e 10; o grupo V formado pelas amostras 4, 5 e 8; e o grupo VI formado pela amostra 1.

O grupo I é formado apenas pelo extrato obtido com diclorometano puro; o grupo II contém o extrato aquoso; o grupo VI é formado pelos extratos obtidos com etanol

pura; o grupo III contém os extratos obtidos com misturas binárias de diclorometano e acetona e misturas ternárias de etanol, diclorometano e acetona; o grupo IV é formado pelos extratos com acetona pura, mistura ternária de etanol, diclorometano e acetona; o grupo V é formado pelos extratos com etanol e diclorometano, diclorometano e acetona e mistura ternária dos três.

Figura 41 - Gráfico dos escores das CP3 e CP4 dos dados cromatográficos das 11 amostras dos extratos das folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill mostrando a separação das amostras em 6 grupos.



As Figuras 42, 43, 44, 45, 46 e 47 mostram os cromatogramas das amostras dos grupos I, II, III, IV, V e VI.

Figura 42 - Cromatograma das amostras do grupo I discriminado na CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 210 nm.

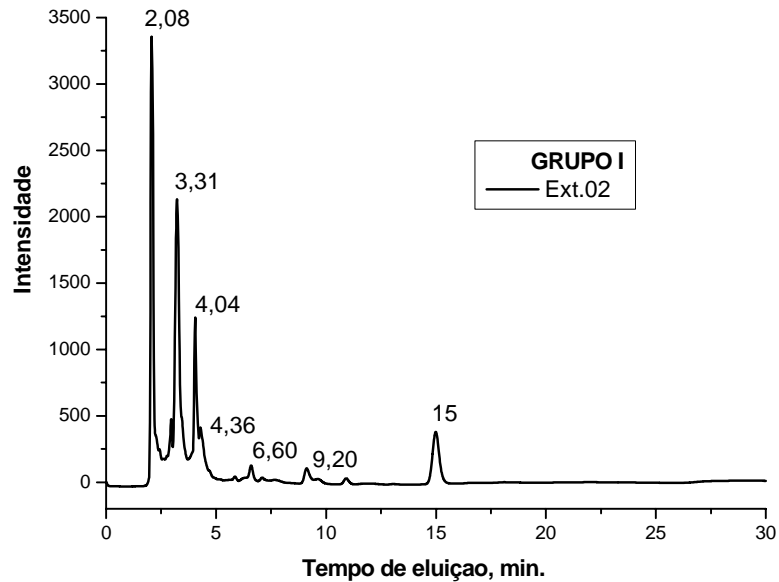


Figura 43 - Cromatograma das amostras do grupo II discriminado na CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 210 nm.

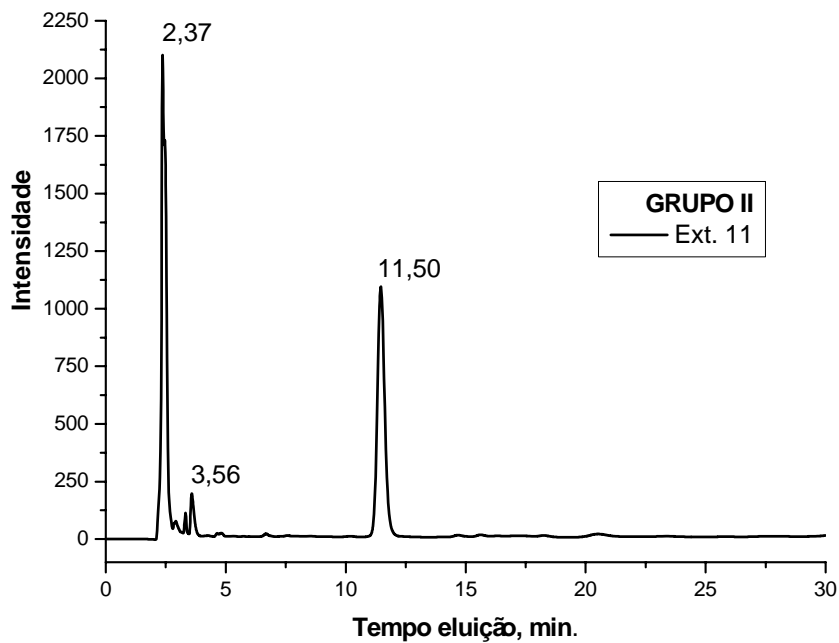


Figura 44 - Cromatograma das amostras do grupo III discriminado na CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 210 nm.

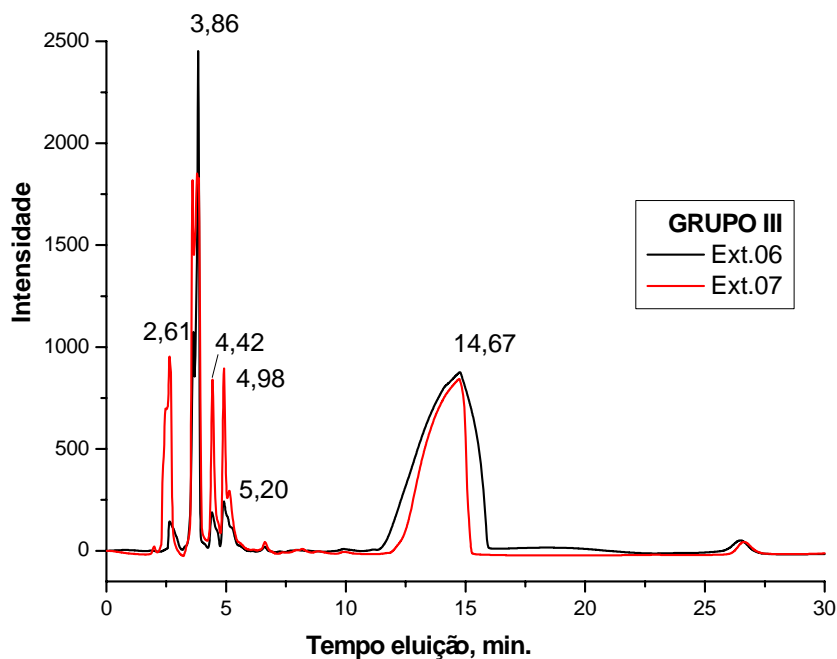


Figura 45 - Cromatograma das amostras do grupo IV discriminado na CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 210 nm.

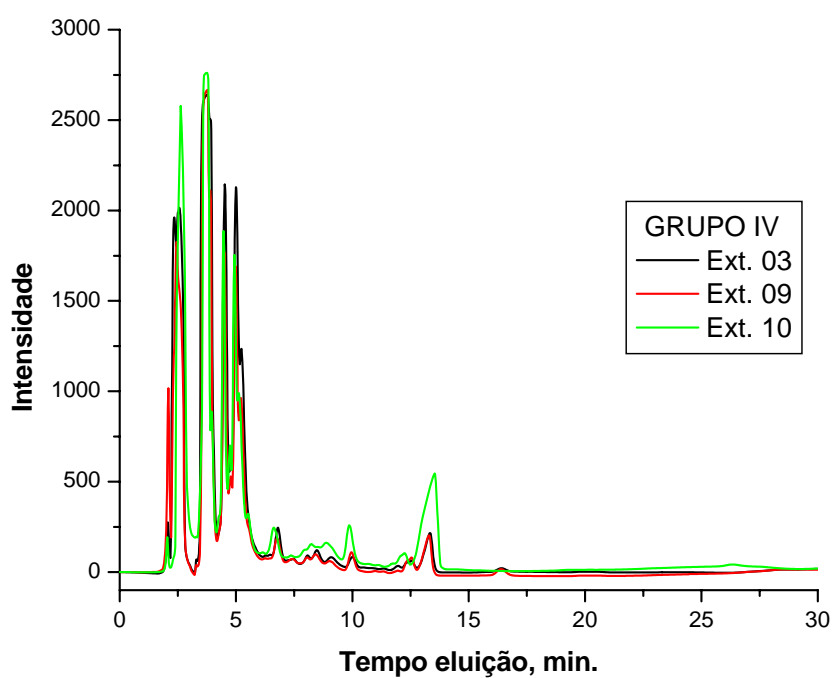


Figura 46 - Cromatograma das amostras do grupo V discriminado na CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 210 nm.

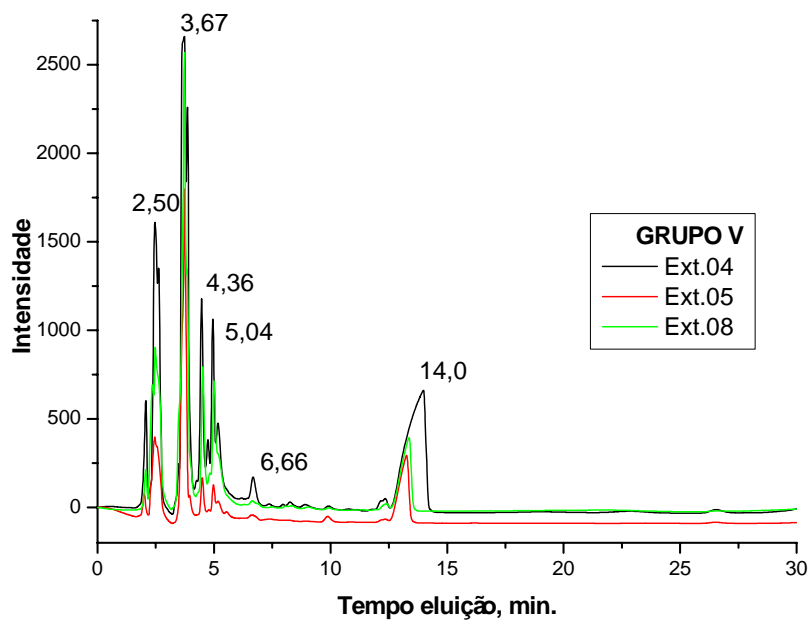
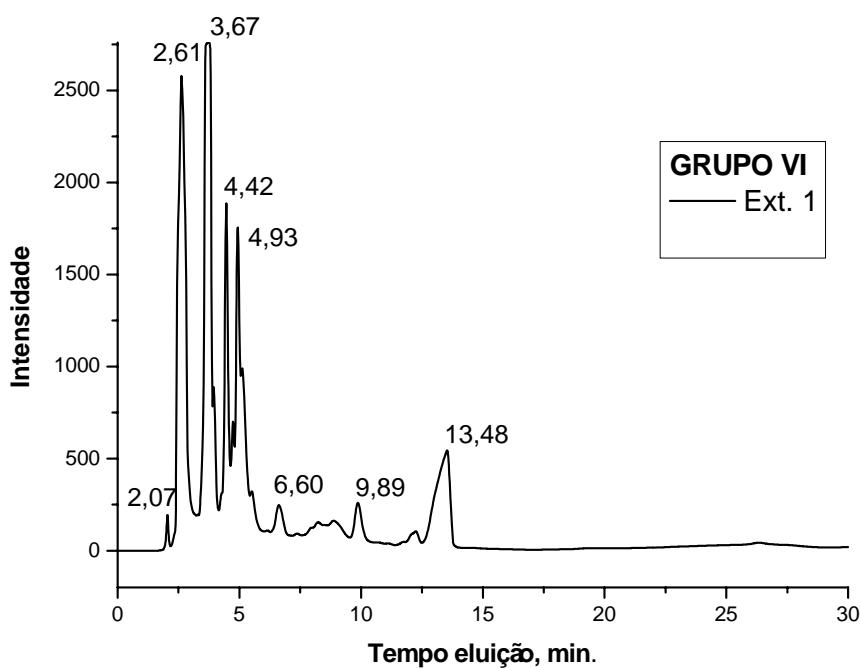
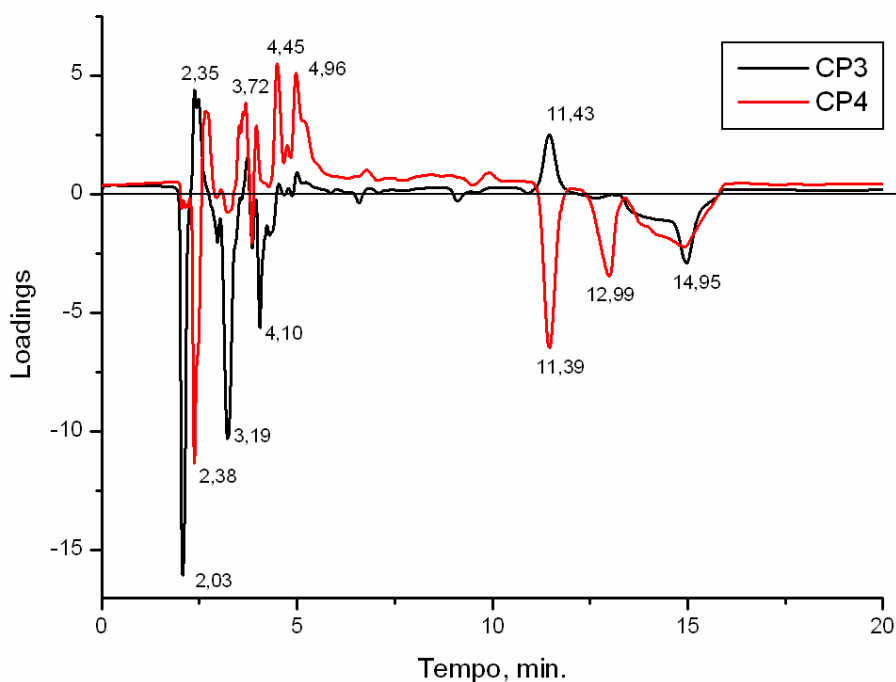


Figura 47 - Cromatograma das amostras do grupo VI discriminado na CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando-se a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), monitoradas no comprimento de onda de 210 nm.



O gráfico dos valores dos loadings das CP3 e CP4 esta apresentado na Figura 48, os grupos I e III localizados na região negativa da CP3 no gráfico dos escores, são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP3 no gráfico dos loadings, os valores mais altos correspondem às substâncias com tempos de retenção em torno de 2,03; 3,19; 3,52 e 14,95 minutos. Os grupos II, IV, V, VI e VII localizado na região positiva da CP3 no gráfico dos escores, é mais influenciada pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP3 no gráfico dos loadings, os valores correspondem às substâncias com tempo de retenção em torno de 2,35 e 11,43 minutos.

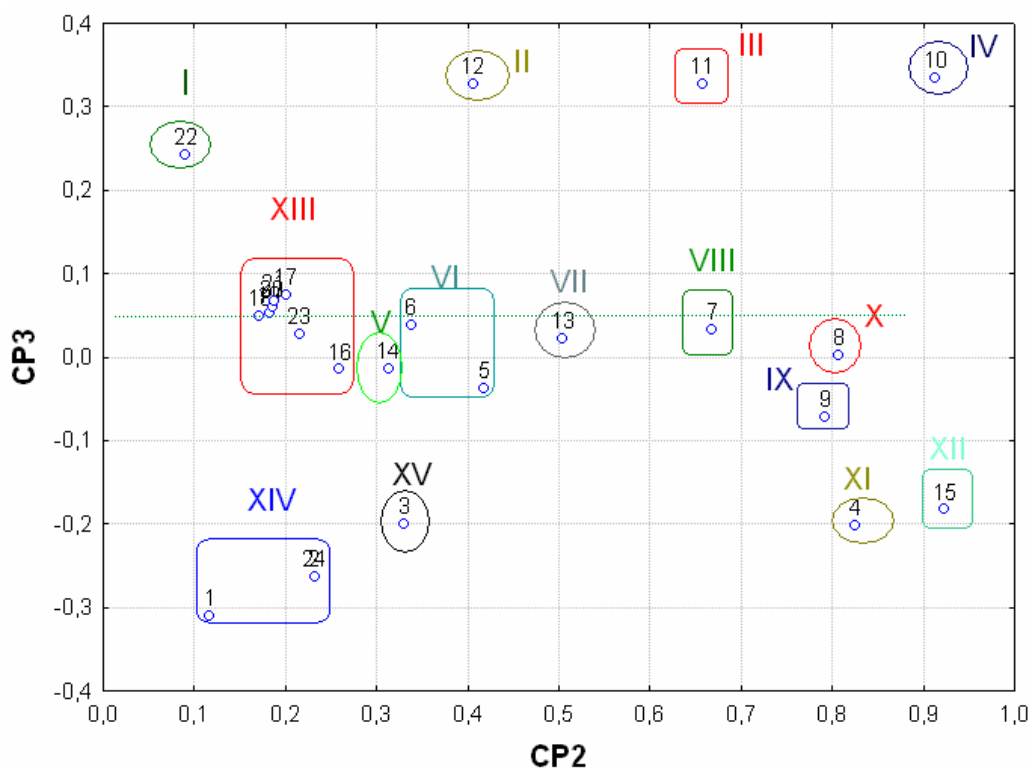
Figura 48 - Gráfico dos loadings das CP3 e CP4 para os espectros da amostra 8 dos extratos das folhas frescas obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%).



Os espectros das amostras 1, 4 e 8 dos extratos desidratados também foram extraídos dos cromatogramas e colocados na forma de matriz. Os dados foram analisados e submetidos a ACP para verificar a variedade de moléculas presentes nestes extratos. Na amostra 1 obteve-se 24 picos, cada pico formado por espectro com varredura feita em comprimentos de onda de 190 até 800 nm, desta forma, na análise do extrato 1 obteve-se uma matriz de 24 x 800 (24 picos, cada um com informações sobre a absorvância em comprimentos de onda de 190 até 800 nm).

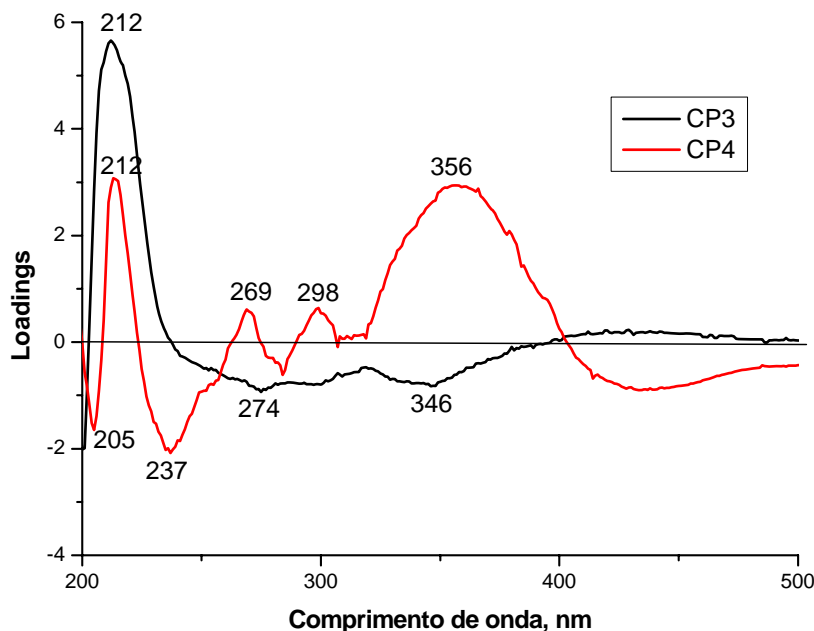
A Figura 49 mostra o gráfico dos escores da CP2 e CP3 para os 24 espectros obtidos dos 24 picos na análise cromatográfica por CLAE da amostra do extrato 1 e a separação de 15 grupos. As três primeiras componentes principais explicam 93,11% da variância contida nos dados.

Figura 49 - Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos espectros da amostra 1 dos extratos das folhas frescas da *Aloe arborescens* Mill obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%) mostrando a formação de 15 grupos.



A Figura 50 mostra o gráfico dos loadings da CP2 e CP3 para os espectros obtidos na análise por CLAE do extrato 1 das folhas desidratadas.

Figura 50 - Gráfico dos loadings dos fatores II e III para os espectros da amostra 1 dos extratos das folhas desidratadas da *Aloe arborescens Mill* obtido por CLAE com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%).



Podemos observar que os grupos IX, X, XI, XII, XIV e XV localizados na parte negativa da CP3 no gráfico dos escores (Figura 49) são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP3 no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 190, 254 e 310 nm. Os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII localizados na parte positiva da CP3 no gráfico dos escores são influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP3 no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 211 nm. Todos os grupos se encontram na região positiva da CP2 no gráfico dos escores, estes grupos são influenciados pelos valores positivos no gráfico dos loadings, as regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 226 e 285 nm.

Na Figura 51 podemos observar os gráficos dos espectros dos 15 grupos de compostos químicos presentes no extrato 1 obtido da *Aloe arborescens Mill*.

O resultado da análise hierárquica concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores, o dendrograma obtido com os 15 grupos e está representado na Figura 52.

A Figura 53 mostra o gráfico dos escores da CP3 e CP4 para os espectros obtidos na análise cromatográfica por CLAE da amostra do extrato 4 do planejamento e a separação de 14 grupos.

As quatro primeiras componentes principais explicam 97,36% da variância contida nos dados, CP3 consegue discriminar com apenas 4,08% da variância os grupos I, II e III localizados na região negativa da CP3 no gráfico dos escores, do grupo XII localizado na região positiva da CP3, a CP4, com apenas 2,52% da variância consegue discriminar os grupos II, V, VI e XIV localizados na região positiva da CP4 dos grupos I, VII, XIII, IX, X e XI localizados na região negativa da CP4 no gráfico dos escores.

Figura 51 - Gráficos dos 15 grupos de espectro dos picos obtidos da análise por CLAE do extrato 1 das folhas desidratadas no comprimento de onda 200 a 500 nm.

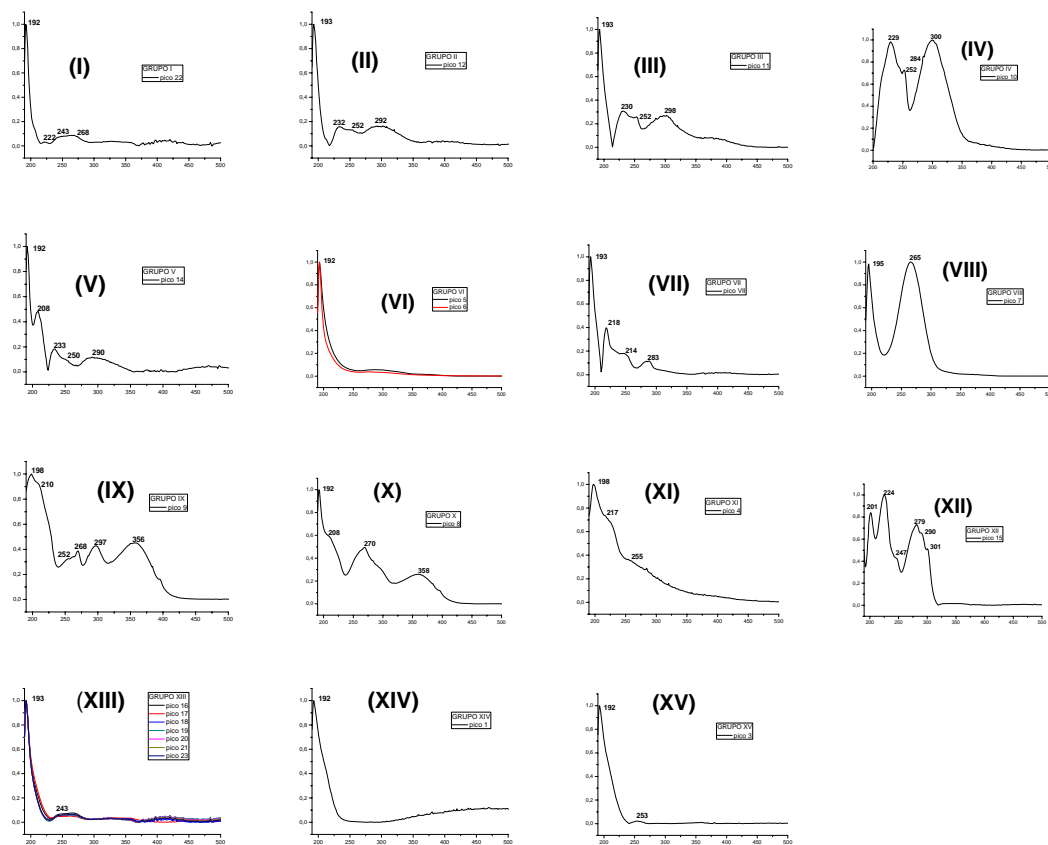


Figura 52 - Dendrograma obtido com os dados espectroscópicos do extrato 1 obtido com as folhas desidratadas de acordo com o planejamento mostrando a formação de 15 grupos de espectros.

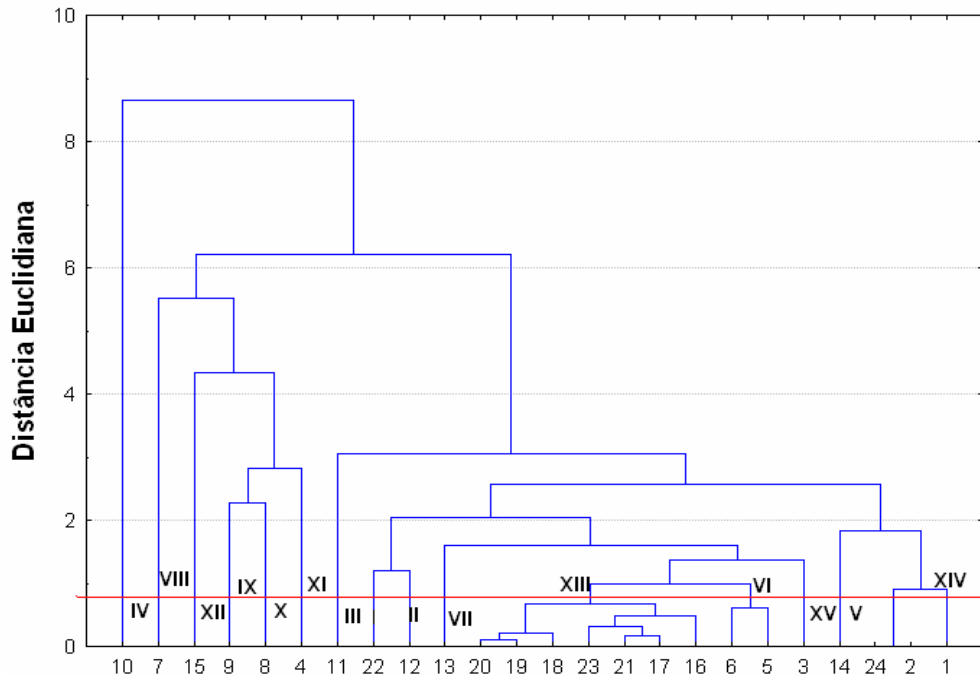
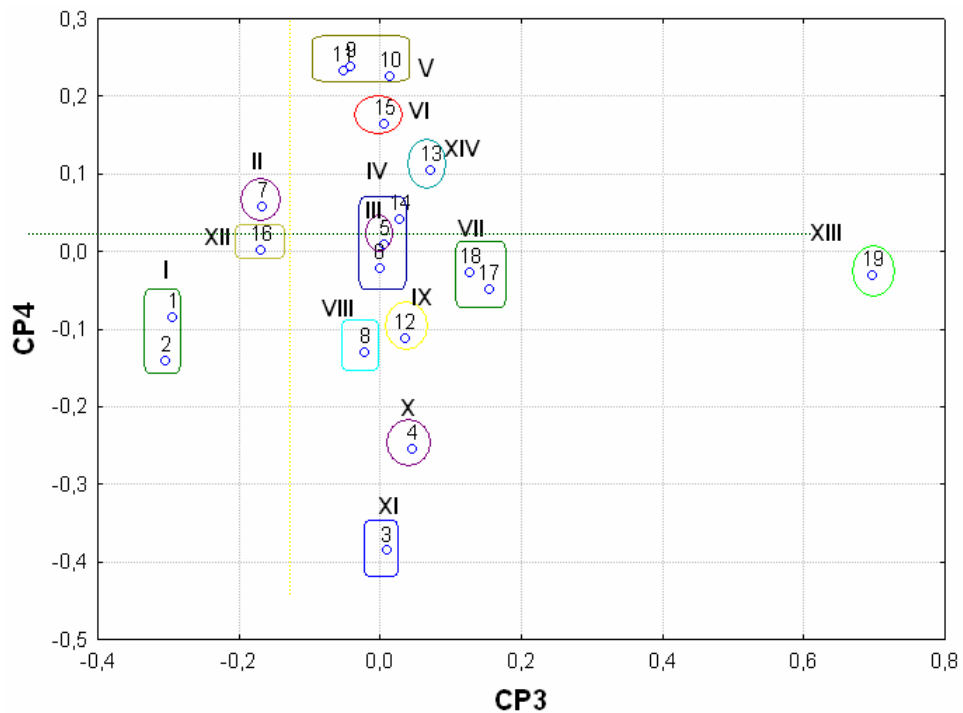
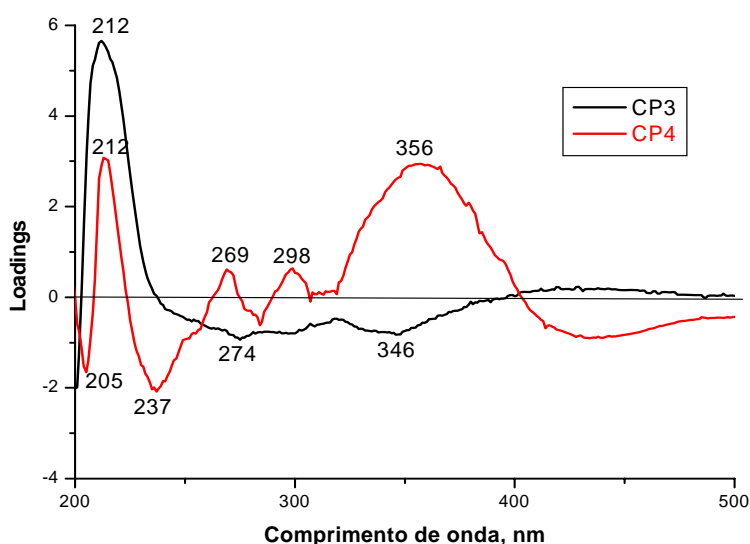


Figura 53 - Gráfico dos escores das CP3 e CP4 dos espectros da amostra 4 dos extratos das folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill obtido por HPLC com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%), mostrando a formação de 10 grupos.



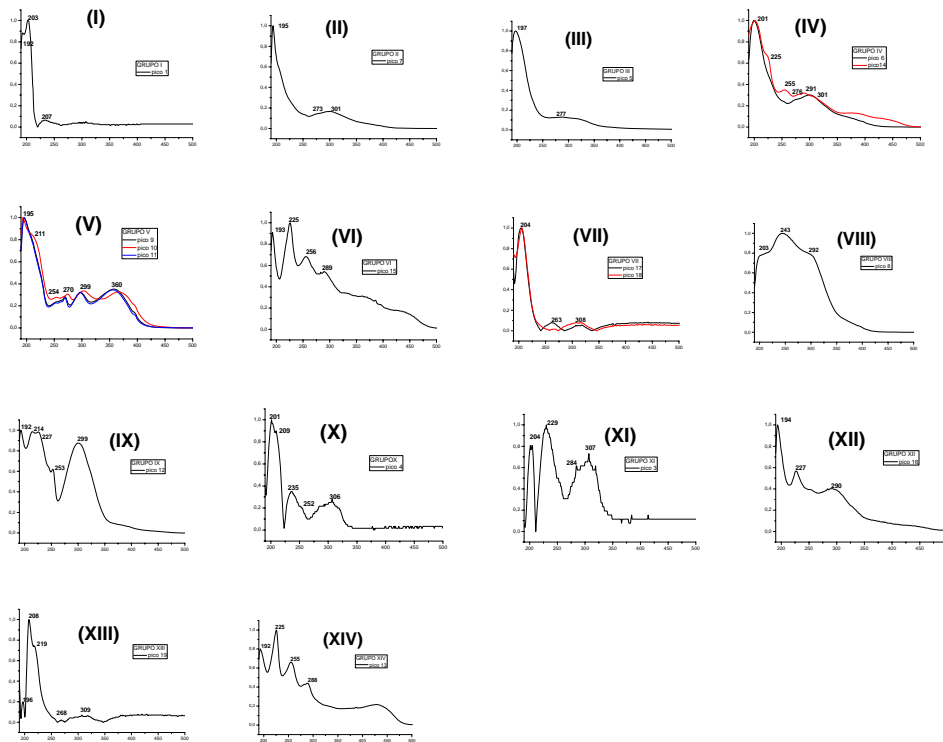
A Figura 54 mostra o gráfico dos loadings da CP3 e CP4 para os espectros obtidos na análise por HPLC do extrato 4 das folhas desidratadas. Podemos observar que os grupos I, II e XII localizados na parte negativa da CP3 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP3 no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 274 e 346 nm. O grupo XIII localizado na parte positiva do fator 3 no gráfico dos escores é influenciado pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP3 no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 212 nm. Os grupos II, V, VI e XIV que se encontram na região positiva da CP4 no gráfico dos escores são influenciados pelos valores de loadings positivos no gráfico dos loadings, as regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 212 e 356 nm. Os grupos I, VII, XIII, IX, X e XI que se encontram na região negativa no gráfico dos escores, são influenciadas pelos valores de loadings negativos no gráfico dos loadings. As regiões que caracterizam estas amostras são os comprimentos de onda de 205 e 237 nm.

Figura 54 - Gráfico dos loadings das CP3 e CP4 para os espectros da amostra 4 dos extratos das folhas desidratadas da planta obtido por HPLC com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%).



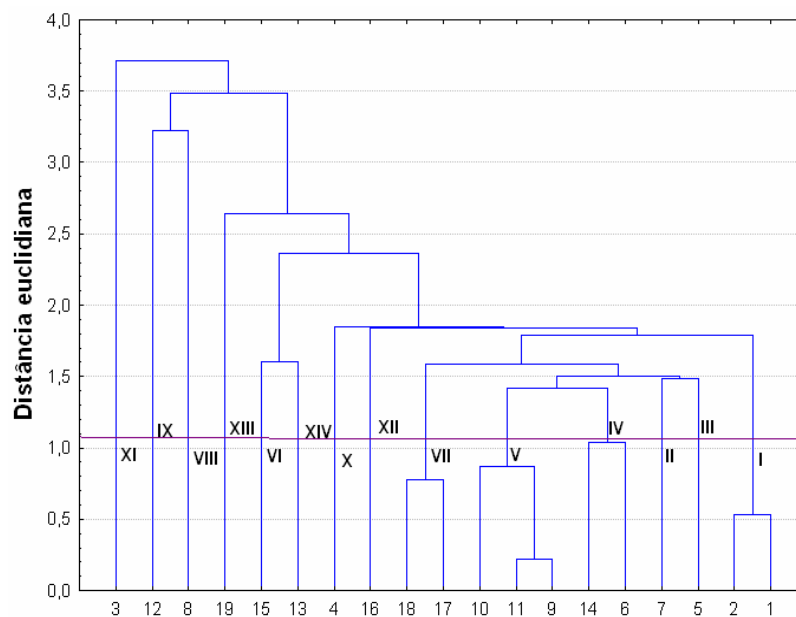
Na Figura 55 podemos observar os gráficos dos espectros dos 14 grupos de compostos químicos presentes no extrato 1 obtido da planta *Aloe arborescens* Mill.

Figura 55 - Gráficos dos 14 grupos de espectro dos picos obtidos da análise por HPLC do extrato 4 das folhas desidratadas no comprimento de onda 200 a 500 nm.



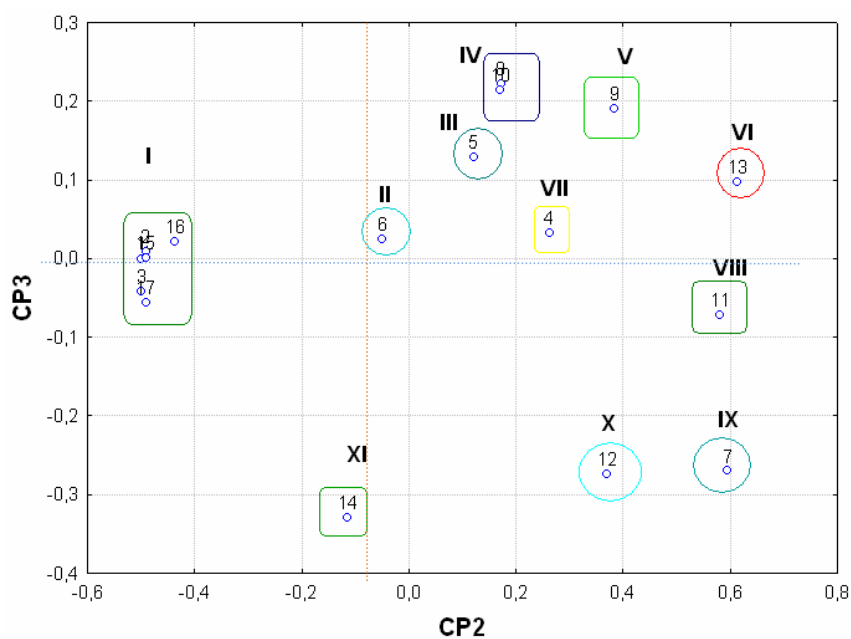
O resultado da análise hierárquica concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores mostrado, o dendrograma obtido com os 14 grupos e está representado na Figura 56.

Figura 56 - Dendrograma obtido com os dados espectroscópicos do extrato 4 obtido com as folhas desidratadas de acordo com o planejamento mostrando a formação de 14 grupos de espectros.



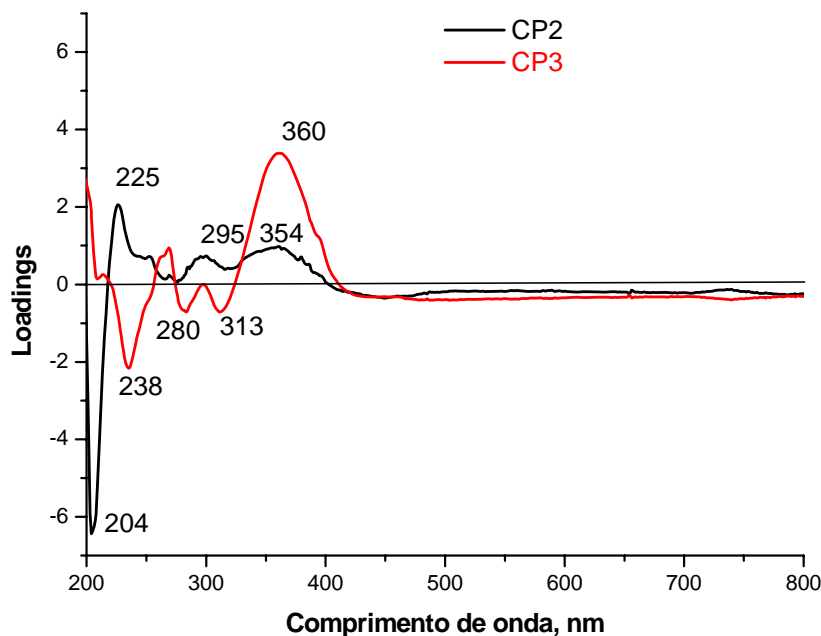
A Figura 57 mostra o gráfico dos escores da CP2 e CP3 para os espectros obtidos na análise cromatográfica por HPLC da amostra do extrato 8 do planejamento e a separação de 11 grupos. As três primeiras componentes principais explicam 97,09% da variância contida nos dados, CP2 consegue discriminar com apenas 17,19% da variância os grupos III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X localizados na região positiva da CP2 dos grupos I, II e XI localizados na região negativa da CP2 no gráfico dos escores. A CP3, com apenas 2,50% da variância consegue discriminar os grupos II, VII, VI, V e IV localizados na região positiva da CP3 dos grupos VIII, IX, X, e XI localizados na região negativa da CP3 no gráfico dos escores.

Figura 57 - Gráfico dos escores das CP3 e CP4 dos espectros da amostra 8 dos extratos brutos das folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill obtido por HPLC com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%) mostrando a formação de 11 grupos.



A Figura 58 mostra o gráfico dos loadings da CP2 e CP3 para os espectros obtidos na análise por HPLC do extrato 8 das folhas desidratadas.

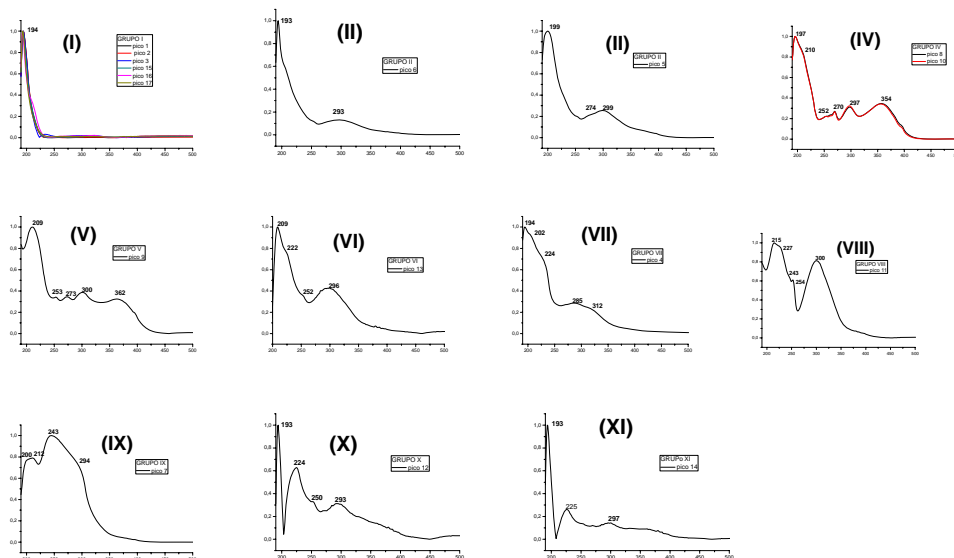
Figura 58 - Gráfico dos loadings das CP3 e CP4 para os espectros da amostra 8 dos extratos das folhas desidratadas da planta obtido por HPLC com a Fase Móvel C (H₂O 68% e ACN 32%).



Podemos observar que os grupos III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X localizados na região positiva da CP2 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 255, 297 e 358 nm. Os grupos I, II e XI localizado na parte negativa da CP2 no gráfico dos escores são influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP2 no gráfico dos loadings. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 206 nm. Os grupos II, IV, V, VI e VII que se encontram na região positiva da CP3 no gráfico dos escores são influenciados pelos valores de loadings positivos no gráfico dos loadings, as regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os comprimentos de onda de 359 nm. Os grupos VIII, IX, X e XI que se encontram na região negativa da CP3 no gráfico dos escores, são influenciadas pelos valores de loadings negativos no gráfico dos loadings. As regiões que caracterizam estas amostras são os comprimentos de onda de 235, 282 e 312 nm.

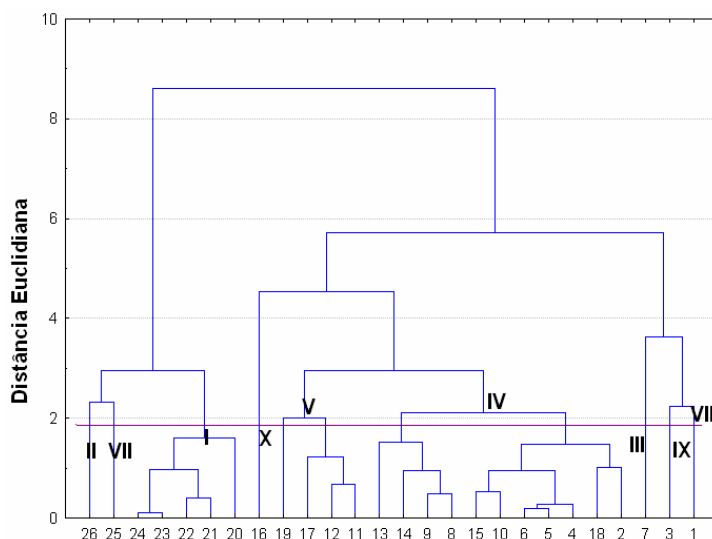
Na Figura 59 podemos observar os gráficos dos espectros dos 11 grupos de compostos químicos presentes no extrato 1 obtido da planta *Aloe arborescens Mill.*

Figura 59 - Gráficos dos 11 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por HPLC do extrato 8 das folhas desidratadas no comprimento de onda de 200 a 500 nm.



O resultado da análise hierárquica concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores, o dendrograma obtido com os 11 grupos e está representado na Figura 60.

Figura 60 - Dendrograma obtido com os dados espectroscópicos do extrato 8 obtido com as folhas desidratadas da *Aloe arborescens* Mill de acordo com o planejamento experimental mostrando a formação de 11 grupos de espectros.

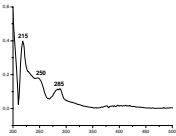
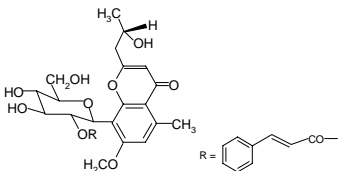
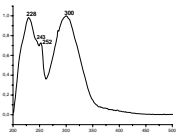
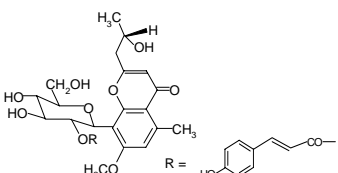
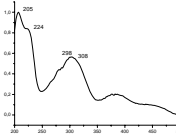
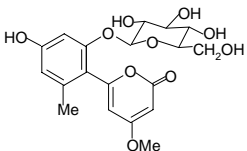
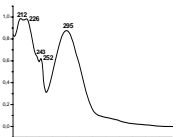
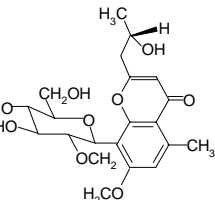
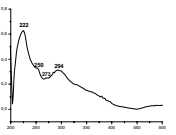
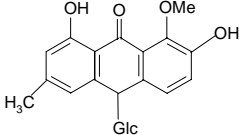
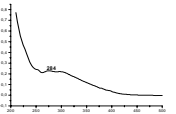
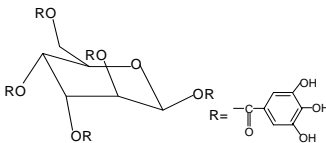


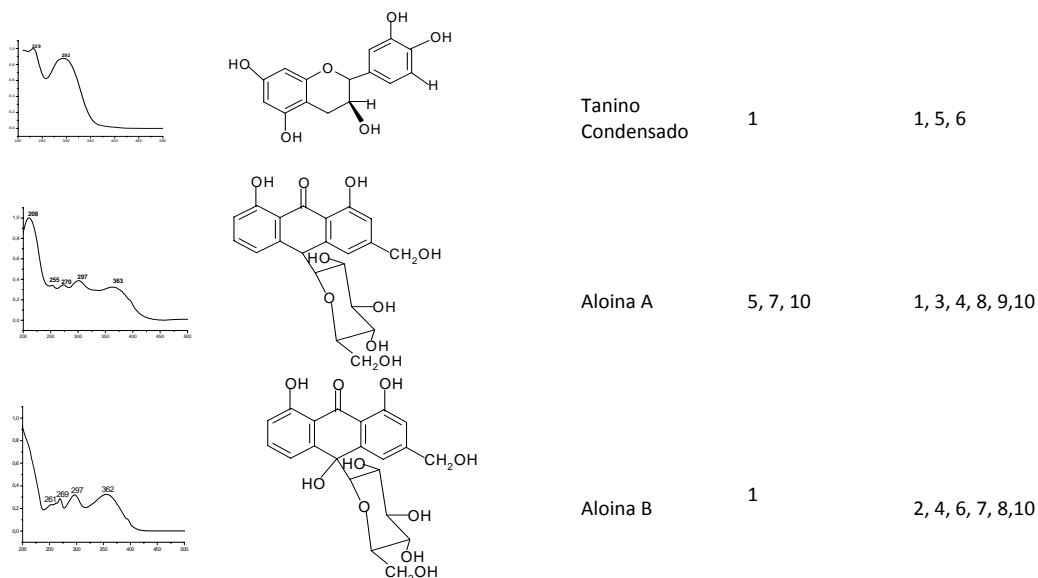
A Figura 61 mostra a relação entre alguns espectros obtidos nas análises dos extratos com as estruturas moleculares de alguns compostos descritos na literatura. Fanie e

colaboradores³⁴ isolaram um composto do extrato de *Aloe peglerae* com absorvâncias em 215, 250 e 285 nm, atribuídas a Antraquinona Aloeresina E. Ryszard

e colaboradores³⁵ estudaram a separação de complexos de taninos das folhas de Bearberry por CLAE, onde taninos hidrolisáveis isolados apresentaram absorvância de 300 nm e taninos condensados apresentaram absorvância de 284 nm. Zonta e colaboradores³⁶ isolaram seis compostos (antraquinonas) da Aloe e atribuíram as bandas de absorção de 208, 255, 270, 297, 363 nm e 261, 269, 297, 362 nm às cromonas aloina A e B; 216, 248, 254, 297nm à aloesina; 228, 243, 252, 300 nm à aloeresina A; 205, 224, 298, 308 nm à aloenina B e 222, 250, 273, 294, 347 nm à homonataloína.

Figura 61 - Relação entre os espectros obtidos nas análises dos extratos, estruturas moleculares de alguns compostos descritos na literatura.

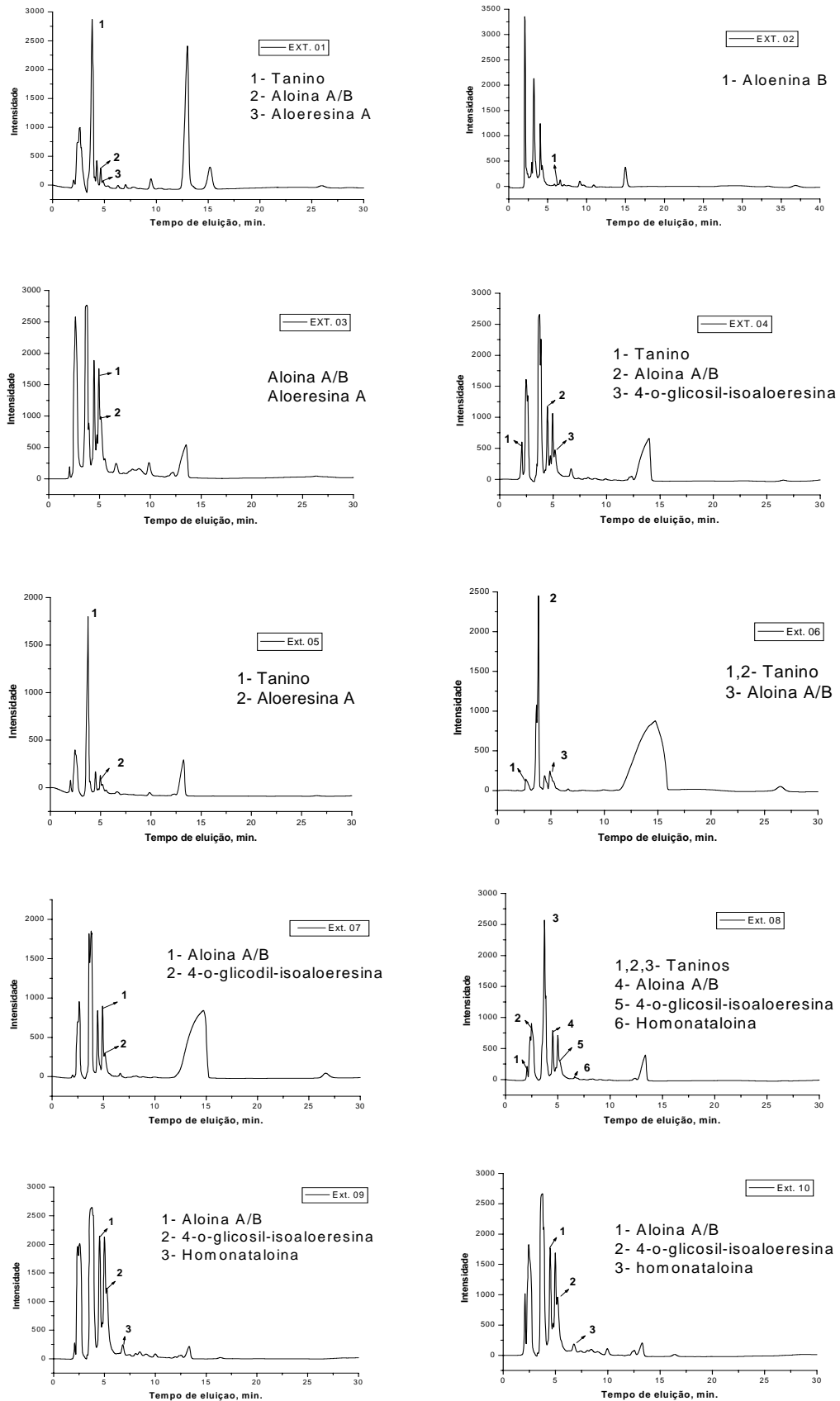
ESPECTRO UV	ESTRUTURA	COMPOSTO	EXT. FOLHA	EXT. FOLHA
			FRESCA	DESIDRATADA
		Aloeresina E	2	1,3
		Aloeresina A	-	1
		Aloenina B	1	2, 4, 6, 7, 8, 10
		4-o-glicosil-isoaloesina	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	3, 4, 7, 8, 9, 10
		Homonataloína	-	8, 10
		Tanino Hidrolisável	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	4, 6, 8



Okamura e colaboradores^{37,38} isolaram cromonas das folhas de Aloe vera, uma delas apresentou bandas de absorção de 212, 226, 243, 252, 295 nm atribuídas ao composto 4-o-glicosil-isoaloesina. Estas bandas de absorção foram encontradas em alguns espectros UV dos extratos sugerindo que a *Aloe arborescens Mill* contém as antraquinonas aloina A e B, aloeresina A, aloeresina E, aloenina B, 4-O-Glicosil-Isoaloesina, homonataloína, taninos condensados e taninos hidrolisáveis.

A Figura 62 mostra os cromatogramas dos 10 extratos das folhas desidratadas do planejamento obtidos com a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%) e os picos referentes aos compostos discriminados através dos espectros UV e os respectivos tempos de eluição.

Figura 62 - Cromatogramas dos 10 extratos das folhas desidratadas do planejamento obtidos com a fase móvel C (H₂O 68% e ACN 32%) e os picos referentes aos compostos discriminados através dos espectros UV com os respectivos tempos de eluição.



4.5 TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Para a identificação dos metabólitos secundários, alguns testes foram realizados com o material vegetal (folhas secas) e outros com os extratos obtidos de acordo com o planejamento experimental mostrado na tabela 2.

A Figura 63 mostra os resultados dos testes específicos para Antraquinonas realizado com a planta desidratada e triturada, a coloração rosa ou avermelhada indica a presença de Antraquinonas na amostra.

Figura 63 - Teste para identificação da presença da Antraquinonas apresentando coloração avermelhada.



A Figura 64 mostra os resultados dos testes para alcalóides dos 10 extratos obtidos de acordo com o planejamento experimental e do extrato aquoso (extrato 11). O resultado mostra a formação do precipitado alaranjado, principalmente no extrato 11, confirmando a presença de alcalóides.

A Figura 65 mostra os resultados dos testes específicos para compostos fenólicos nos 10 extratos obtidos de acordo com o planejamento experimental e do extrato aquoso (extrato 11). O surgimento de coloração verde confirma a presença de compostos fenólicos nos extratos. Visualmente observa-se que os extratos 3, 4, 5, 7 e 8 apresentaram coloração verde mais forte, portanto pode-se afirmar que estes extratos extraem maior quantidade de compostos fenólicos.

Figura 64 - Teste para identificação de alcalóides nos extratos da planta utilizando o reagente de Dragendorff.

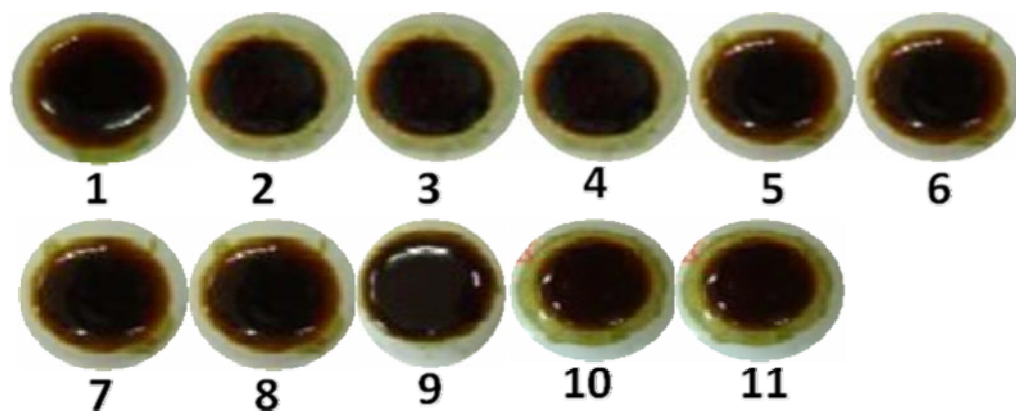
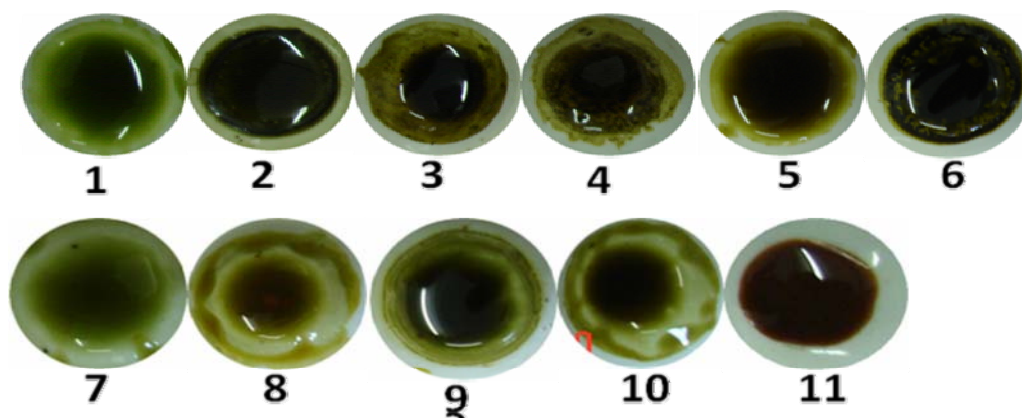


Figura 65 - Teste para identificação de compostos fenólicos



O teste para saponinas foi realizado com as folhas de *Aloe arborescens* Mill desidratadas e trituradas. Neste teste a presença de saponinas é caracterizada pela formação de espuma persistente. A Figura 66 mostra o resultado do teste, a marca azul no tubo mostra a altura da espuma indicando a presença da Saponinas.

A Figura 67 mostra o resultado do teste específico para flavonóides, realizado com o material vegetal seco. A ausência do aparecimento de coloração rósea mostra que não há flavonóides nas folhas da planta.

Figura 66 - Teste para identificação de Saponinas.

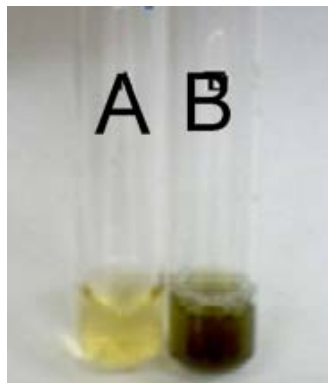


Figura 67 - Teste para identificação de Flavonóides. O tubo contém o material vegetal seco com raspas de magnésio e ácido clorídrico concentrado.



A Figura 68 mostra resultado do teste específico para taninos, realizado com o material vegetal seco. A coloração verde confirma a presença de.

Figura 68 - Teste para identificação de Taninos. No tubo A contém o material vegetal seco puro e no tubo B contém o material vegetal seco com FeCl_3 1% em metanol.



Capítulo V

Conclusão

5 CONCLUSÃO

➤ Os resultados dos rendimentos dos extratos das folhas frescas e desidratadas mostraram que existem efeitos sinérgicos entre os solventes e a água presente nas folhas, com exceção do diclorometano puro. O maior rendimento para o extrato com as folhas frescas foi obtido com o etanol puro (1,645g/75g), enquanto que para o extrato das folhas desidratadas foi a água (1,294g/10g).

➤ Os resultados dos testes biológicos com o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com os extratos das folhas frescas e desidratados mostraram que existe atividade acaricida, diminuindo a ovoposição das fêmeas e a eclosão dos ovos. Não houve diferença significativa nos resultados da atividade acaricida, independente do estado da planta, fresca ou desidratada. Os extratos que apresentaram melhores resultados em termos de eficácia foram os extratos 1, 4 e 8 com etanol puro, a mistura binária ET-DC (1:1) (v/v) e a mistura ternária ET*-DC-AC (4:1:1)(v/v/v) respectivamente. Estes resultados mostraram que a planta *Aloe arborescens Mill* pode ser utilizada no controle do carrapato bovino, diminuindo os custos e o risco de contaminação dos alimentos e do meio ambiente. No entanto sugere-se que sejam feitos mais estudos das eficácias e estabilidade dos extratos e testes *in vivo*.

➤ Nas análises dos extratos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foi possível traçar o perfil dos diferentes extratos, identificando qualitativamente os grupos funcionais que diferenciam os extratos quanto a sua composição química. A forte banda observada em torno de 3412 cm^{-1} encontrada em todos os extratos indica a presença de compostos fenólicos e polissacarídeos.

➤ Com a cromatografia líquida de alta eficiência foi possível diferenciar a composição do solvente com a diversidade metabólitos tanto para os extratos da planta fresca quanto da desidratada, a melhor fase móvel foi $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}(68:32, \%V/V)$, monitorados em 254 nm e 210 nm, respectivamente. O extrato com a planta fresca que apresentou maior número de metabólitos foi preparado em etanol puro, ao contrário do extrato aquoso que apresentou menor número de metabólitos (13 picos). Houve discriminação dos extratos em III grupos. Para a planta desidratada, o extrato aquoso apresentou maior diversidade de metabólitos (28 picos). Com a ACP, houve discriminação dos extratos em 6 grupos diferentes.

➤ A aplicação dos métodos quimiométricos aos espectros obtidos na análise cromatográfica dos extratos 1, 4 e 8 das folhas frescas mostrou que cada um dos três

cromatogramas apresentam 10 diferentes grupos de espectros, enquanto que os mesmos extratos com as folhas desidratadas apresentaram 15, 14 e 11 grupos, respectivamente.

➤ Com a utilização de técnicas cromatográficas e espectroscópicas (CLAE-DAD e FTIR) e dados referentes à absorvâncias de espectros na literatura, foi possível inferir a existência de alguns compostos presentes nos extratos das folhas frescas e desidratadas da *Aloe arborescens* Mill, entre eles, a maior quantidade das antraquinonas aloina A e B.

Capítulo VI

Referências

REFERÊNCIAS

1. Yates, K.M., Ni, Y., Tizard, I., Turner, D. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, 4: 1745 – 1755, 2004.
2. Nirmal, P., Samir, A.R., Mahmoud, A.E.; David, S.P. Characterization of Aloeride, a New High-Molecular-Weight Polysaccharide from *Aloe vera* with Potent Immunostimulatory Activity. **Journal of Agricultura, Food Chem.**, 49: 1030-1034, 2001.
3. Rajasekaran, S., Sivagnanam, K., Subramanian, S. Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Pharmacology. Rep.**, 57(1): 90-6, 2005.
4. Renjin, K., Gülhan, A., Aynure, O. Microscopic examination of placenta of rats prenatally exposed to *Aloe barbadensis*: A preliminary study. **International Journal Morphology**, 26(2): 275-281, 2008.
5. Faleiro, C.C., Elias S.T.H., Cavalcanti, L.C., Cavalcanti, A.S.S. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. **Natureza on line**, 7 (2): 56- 60, 2009.
6. Murakami, C., Cardoso, F. L., Mayworm, M. A. S. Potencial fitotóxico de extrato foliar de *Aloe arborescens* Mill (Asphodelaceae) produzidos em diferentes épocas do ano. **Acta Bot. Brás.** 23(1): 2009.
7. Fujita, K., Yamada, Y., Azuma, K., Hirozawa, S. Effect of leaf extracts of *Aloe arborescens* Mill subsp. *natalensis* Berger on growth of *Trichophyton mentagrophytes*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 14: 132-136, 1978.
8. Berti, V.F., Pértili, R.A.N., Siqueira, J.J. M., Ribeiro, V.R.M., Dias. P.F., Porto, L.M. Estudo in vitro do efeito antitumoral da aloína em cultura de células de melanoma. **Exacta**, 5(1):169-176, 2007.
9. Fakim, A.G. Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Faculty of science, University of Mauritius, Reduit, Mauritius. **Molecular Aspects of Medicinal** 27: 1-93, 2006.
10. Gobbo, L.N., Lopes, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30(2): 374-381, 2007.
11. Araújo, C.R.F., Pereira, M.S.V., Higino, J. S. Atividade antifúngica in vitro da casaca do anacardium occidentale linn. Sobre levedura do gênero cândida. **Arquivo em odontologia**, 41(3):193-272, 2005.
12. Yunes, R.A, Pedrosa, R.C., Cechinel, F.V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, 24: 147-152, 2001.
13. Brandão, M.G.L., Freire, N., Vianna, S.C.D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Caderno de Saúde Pública**, 14: 613-16, 1998.

14. **ANVISA** RDC nº 48, 16 de março de 2004, Registro de drogas fitoterápicas. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf. Visitado em 05/05/2010 às 12h45min.
15. Cechinel, F.V., Yunes, R.A. Estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21(1):99-105, 1998.
16. Olívio, C.J, Carvalho, M.N., Silva, J.H.S., Vogel, F.F., Massariol, P., Meinerz, G., Agnolin, G., Morel, A.F, Viau, L. V. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, 38(2):406-410, 2008.
17. Gonzáles, J.C.O carrapato do boi. Porto alegre: **Ed. do autor**, p.79, 1995.
18. Horn, S.C. Carrapato, berne e bicheira no Brasil. Brasília/DF: **Ministério da Agricultura/Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária**, p.153, 1983.
19. Furlong, J. Controle do carrapato dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Caderno Técnico Veterinário**, 8:49-61, 1993.
20. Merlini, L.S., Yamamura, M.H. Estudo in vitro da resistência de *Boophilus microplus* a carrapaticidas na pecuária leiteira do norte do estado do Paraná. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, 19(1):38-44, 1998.
21. Vargas, M.S., Cespedes, N.S., Sanches, H.F., Martins, J.R., Cespedes, C.O.C. Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. **Ciência Rural**, 33(4):737-742, 2003.
22. Mirian, A. A., Ribeiro, V. L. S., Bordignon, S. A. L., Henriques, A. T. Pose, G. V. Chemical composition and toxicity of essential oils from cunila species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitol Res.**, (105): 863-868, 2009.
23. Ciscato, C.C.H.P., Gebara, A.B., Spinosa, H.S. Resíduos de pesticidas em leite bovino e humano. Pesticidas: **Ecotoxicologia e meio ambiente**14:25-38, 2004.
24. Nero, L.A., Mattos, M.R., Beloti, V., Barros, M. A.F., Netto, D.P., Franco, B.D.G.M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: Ocorrência e ação sobre *Listeria Monocystogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27 (1): 201-204, 2007.
25. Martinez, S.S. **O NIM – Azadirachta indica**: natureza, usos múltiplos, produção. Instituto agrônômico do Paraná. Editado por Sueli Souza Martinez. Londrina: **IAPAR**, p.142, 2002.
26. Ferreira, M.M.C., Antunes, A.M., Melgo, M.S., Volpe, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 22 (5):724-731, 1999.
27. Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2ª Ed., Campinas, Editora da UNICAMP, p.313-319, 2001.

28. Machado, J.M.N., Ciaramello, G.M. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. Departamento de Química Universidade Federal do Piauí. 64.049-550-Terezina Pi. **Química Nova**, 21 (4). 1998.
29. Moraes, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, 27: 4050-4063, 2009.
30. Diniz, A.;Lonni, A.A.S.G.;Mello, J.C.P. Farmacognosia prática: roteiro para controle de qualidade de drogas vegetais. Londrina, 2009.
31. Drommond, R.O., Ernest, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J, Graham, O.H. Boophilus annulatus an Boophilus microplus: Laboratory Test of Inseticides. **Entomology Research Division**, 66(1):130-133, 1973.
32. Silverstein, R.M., Webster, F.X. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**. Livros Técnicos e Científicos Editora, Sexta edição p. 70-220, 1998.
33. Snyder, I.R; Kirkland, J.J.; Glajch, J. L. **Practical HPLC Method Development**. New York: Jhon Wiley & Sons, inc. p. 722-723, 1997.
34. Fanie R. Van Heerden, Ben-Erik Van Wyk e Alvaro M. Viljoen. Aloeresins E and F, Two Cromone Derivatives From Aloe peglerae. **Elsevier Science, Phytochemistry**, 43(4):867-869, 1996.
35. Ryszard, A., Ronald, B.P., Agnieszka, k. SE-HPLC Separation of Myosin Complex With Tannins of Bearberry (Arctostaphylos uva-ursi L. Sprengel) Leaves. **Czech Journal Food Science**, 27(5):386-391, 2009.
36. Zonta, F., Bogoni. P., Msotti, P., Micali, G. High-performace liquid chromatographic profiles of aloe constituents and determination of aloin in beverages, with reference to the EEC regulation for flavouring substaces. **Journal of Chromatography A**, 718: 99-106, 1995.
37. Okamura, N., Noriko, H., Yukiko, T., Motoko, N., Toshihiro, F., Kuniride, M., Akiro, Y. Five Chromones From Aloe Vera Leaves. **Elsevier Science, Phytochemistry**, 49(1):219-223, 1998.
38. Okamura, N., Noriko, H., Yukiko, T., Motoko, N., Toshihiro, F., Kuniride, M., Akiro, Y. Three Chromones of Aloe Vera Leaves. **Phytochemistry**, 45(7):1511-1513, 1997.