

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar
Campus Sorocaba

**INCORPORAÇÃO EM LIPOSSOMOS DA ALOÍNA E
IMOBILIZAÇÃO EM FILMES NANOESTRUTURADOS PARA
APLICAÇÃO EM LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS**

Mestranda: Aline Carla Farrapo Xavier

Orientadora: Dr(a) Marystela Ferreira

Co-Orientadora : Dr(a) Marli Leite de Moraes

Sorocaba

2011

DEDICATÓRIA

**Aos meus filhos Angélica e Alexandre;
Ao meu marido Alexandre pelo incentivo
e apoio constantes.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela ajuda em ter chegado até aqui, e a oportunidade de seguir em frente.

À Professora Marystela Ferreira pela orientação e oportunidade.

À minha co-orientadora Marli Leite Moraes pela orientação e conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Vadim Viviani, pelo uso constante de seu equipamento.

A todos os Professores do Programa de Pós Graduação em Ciência de Materiais, que de forma direta ou indireta ajudaram em minha pesquisa.

A toda minha família pelo apoio, paciência e conselhos.

Aos meus amigos do laboratório: Anerise, Laís, Rafael, Matheus, Celina, Cleber.

A Capes e CNPQ pelo apoio financeiro, essencial para o desenvolvimento deste projeto.

A todos meu agradecimento.

RESUMO

Este trabalho apresenta a fabricação e a caracterização de filmes nanoestruturados, obtidos através da técnica de automontagem camada por camada (do inglês *layer-by-layer*, LbL), utilizando a incorporação de extratos de *Aloe Vera* em lipossomos, no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos (*drug delivery*).

Foram confeccionados lipossomos a partir dos fosfolipídios DPPG (Dipalmitoil fosfatidil glicerol) e POPG (Palmitoil fosfatidil glicerol) na incorporação do extrato bruto de *Aloe Vera*, e de um de seus princípios ativos a Aloína. A escolha destes fosfolipídios baseou-se no fato de sua temperaturas de transição de fase serem próximas da temperatura do corpo humano, condição necessária para a construção do sistema de *drug-delivery*, especificamente como adesivo (*patch*). Filmes dos lipossomos confeccionados, juntamente com o polieletrólito poli(etileno imina), PEI, foram fabricados e caracterizados por espectroscopia Uv-vis. Através de espectroscopia de fluorescência, avaliou-se a eficácia do processo de incorporação dos extratos na estrutura do lipossomo, a imobilização destes em forma de filme, bem como a determinação da eficiência na liberação controlada destes extratos quando imobilizados.

Os filmes fabricados com os três sistemas, Aloína, Aloína em lipossomos DPPG e Aloína em lipossomo POPG apresentaram crescimento. A liberação foi avaliada nas soluções e nos filmes, onde as soluções apresentaram uma taxa de decaimento com tempo menor, enquanto que, quando imobilizados nos filmes a taxa foi maior, o que justifica o uso de filmes LbL para sistema de liberação modificada.

Palavras-chave: *Aloe Vera*, Aloína, *Drug delivery*, liberação modificada, filmes nanoestruturados, lipossomos.

ABSTRACT

Currently, thanks to the high due technological development, a new class of systems has been explored for drug delivery systems, or controlled release of drugs. These systems have great importance as a rare drug in an aqueous solution or in the conventional way can achieve the target concentrations appropriate to achieve the desired therapeutic efficacy, for this reason, in recent years a new pharmacological concept was developed through the preparation of biologically active systems with the use of molecular aggregates. Among the delivery systems most studied, we highlight the liposomes, micelles, polymeric nanoparticles, dendrimers and carbon nanotubes. In this work we immobilized Aloin (barbaloin), component present in *Aloe vera*, which has healing activity, in nanostructured films, using the technique of self-assembly layer by layer (LbL). To obtain the ultrathin films for the process Layer-by-Layer, Aloin (barbaloin) was incorporated into dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG) liposomes and self-assembled with polyelectrolytes to development of a drug controlled release system of the adhesive type (patches). The film growth and its ability to release the Aloin were monitored using UV-visible and fluorescence spectroscopy. The films showed linear growth, indicating that the same amount of material was absorbed in each deposition step. Aloin release from the LbL films made with DPPG liposomes showed constant for 12 hours. This possibility of release through a long time course is promising for medical applications using patches.

Keywords: drug delivery, liposome, Aloin, Layer-by-Layer film, patches.

Sumário

OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. ASPECTOS TEÓRICOS.....	6
2.1. Sistema de liberação controlada de fármaco (<i>drug delivery</i>).....	6
2.2. Lipossomos: bicamada lipídica.....	10
2.3. Filmes automontados (Layer- by- Layer).....	14
2.4. <i>Aloe vera</i>	18
2.5. Via de administração transdermal – <i>Patches</i>	23
CAPÍTULO II:.....	26
3. METODOLOGIA.....	26
3.1. Materiais.....	26
3.1.1. Fosfolipídios.....	26
3.1.2. Princípios ativos.....	27
3.1.3. Solventes e soluções.....	27
3.2. Solubilização do extrato de <i>Aloe vera</i>	27
3.3. Lipossomos e incorporação do extrato de <i>Aloe vera e Aloína</i>	28
3.4. Limpeza dos substratos.....	29
3.5. Preparação dos filmes automontados.....	30
3.6. Liberação <i>in vitro</i>	30
4. EQUIPAMENTOS.....	32
CAPÍTULO III.....	34
5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	34
5.1. Espectroscopia.....	34

5.2. Espectroscopia de absorção na região Uv-vis	35
5.3. Espectroscopia de fluorescência	35
CAPÍTULO IV	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1. Caracterização da <i>Aloe vera</i> e Aloína.....	38
6.2. Crescimento dos filmes de Aloína , DPPG + Aloína, POPG + Aloína.....	47
6.3.1. Liberação das soluções	58
6.3.2. Liberação controlada dos filmes	62
CAPÍTULO V	68
7. CONCLUSÃO	68
8. PERSPECTIVAS	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE ABREVIações

AFM - Microscopia de força atômica

CPP - Palmitoil oleil fosfatidil colina

DDS- Drug delivery system

DPPG- dipalmitoil fosfatidil glicerol

DSPE – PEG 2000 polietilenoglicol fosfatidil etanolamina

FDA - Food and Drug Administration

LbL- Layer by Layer

LB - Langmuir-Blodgett

LMV - Vesículas multilamelares gigantes

LYSO-PG - Lysosteryl fosfatidil glicerol

PAH - Cloreto de polialilamônio

PEG - Polietilenoglicol

PEI - Polietilenoimina

PGA - Políácido glutâmico

POPG - Palmitoil fosfatidil glicerol

SUV- Vesículas unilamelares pequenas

TC - Temperatura de transição

TDDS – Sistema de liberação controlada de medicamentos pela via transdérmica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da comparação do perfil de fármaco administrado de forma convencional e através de liberação controlada.....	8
Figura 2. Ilustração esquemática de um lipossomo.....	10
Figura 3. Mecanismo de incorporação de diferentes fármacos nos lipossomos ³	11
Figura 4. Representação esquemática da bicamada lipídica e dos lipossomos.....	12
Figura 5. (a) Representação esquemática de deposição de filme sobre um substrato sólido, (b) Representação das interações entre os polieletrólitos ²¹	16
Figura 6. a) Estrutura química da Aloína (barbalóina). .	22
Figura 7. Esquema da constituição da pele.	25
Figura 8. Estruturas químicas (a) DPPG, (b) POPG, (c) DPPC e (d)DPPE.....	27
Figura 9. Representação esquemática da preparação dos lipossomos.	29
Figura 10. Representação esquemática da interação eletrostática entre o filme e lipossomos.	30
Figura 11. Aparato para a análise da liberação de Aloína incorporada em lipossomos.	31
Figura 12. Esquema da liberação controlada a partir dos filmes LbL.	32
Figura 13. a) Espectro de absorção de UV da solução aquosa de <i>Aloe vera</i> na concentração de 0,010mg/mL; b) espectro de emissão de fluorescência da solução aquosa de <i>Aloe vera</i> na concentração de 0,010 mg/mL, $\lambda_{exc} = 280$ nm.	39
Figura 14. Espectro de absorção da solução aquosa de <i>Aloe vera</i> a 0,01 mg/mL, <i>Aloe vera</i> na presença do lipídio POPG 0,005 mg/mL e <i>Aloe vera</i> na presença do lipídio DPPG 0,01 mg/mL.....	41
Figura 15. Espectro de fluorescência dos lipossomos confeccionados com os lipídios DPPG e POPG $\lambda_{exc}=280$ nm.	42
Figura 16. Espectros de UV-vis da solução de Aloína $7,4 \cdot 10^{-4}$ M e Aloína em lipossomos DPPG e POPG	43
Figura 17. Espectros de emissão de fluorescência das soluções contendo Aloína..	46
Figura 18. Tabela 1. Relação da emissão das soluções de Aloína, DPPG + Aloína e POPG + Aloína nos comprimentos de onda de 270, 300 e 370 nm.	47
Figura 19. a) Espectros de absorção UV-vis do filme (PEI/Aloína) ₁₀ b) Absorbância versus número de bicamadas para o filme (PEI/Aloína) ₁₀ em $\lambda = 260$ nm.	48
Figura 20. Espectros de emissão de fluorescência do crescimento do filme PEI + Aloína, usando λ_{exc} 270 (a), 300 (b) e 370 (c) nm.	50
Figura 21. a) Espectros de absorção UV-vis para diferentes do filme LbL (PEI/ Aloína + DPPG) ₁₀ bic. b) Absorbância versus número de bicamadas para o filme PEI/ Aloína + DPPG) ₁₀ bic em $\lambda = 245$ nm.....	52

Figura 22. Espectros de emissão de fluorescência para crescimento do filme PEI /DPPG + Aloína, usando o comprimento de excitação de: 270 (a), 300 (b) e 370 (c) nm.....	54
Figura 23. a) Espectros de absorção UV-vis para diferentes do filme LbL (PEI/ Aloína + POPG) ₁₀ . b) Absorbância <i>versus</i> número de bicamadas para o filme PEI/ Aloína + POPG) ₁₀ em $\lambda = 266$ nm.	55
Figura 24. Espectros de emissão de fluorescência para o crescimento do filme PEI /POPG + Aloína, usando λ_{exc} 270 (a), 300 (b) e 370 (c) nm.	57
Figura 25. Espectros de emissão da liberação da Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C λ_{exc} 270nm.	59
Figura 26. Decréscimo da concentração de Aloína livre dentro da membrana de diálise.	60
Figura 27. Espectros de emissão da liberação da solução de DPPG + Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C. λ_{exc} 270nm.	60
Figura 28. Decréscimo da concentração da solução DPPG + Aloína dentro da membrana de diálise.	61
Figura 29. Espectros de emissão da liberação da solução de POPG + Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C λ_{exc} 270nm.	61
Figura 30. Decréscimo da concentração da solução POPG + Aloína dentro da membrana de diálise.	62
Figura 31. Espectros de emissão da liberação do filme de Aloína do tubo eppendorf, em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C. λ_{exc} 270nm.	63
Figura 32. Decréscimo da concentração da solução do filme de PEI + Aloína dentro do tubo eppendorf λ_{exc} 270nm.	64
Figura 33. Espectros de emissão para a solução do filme de PEI/ DPPG +Aloína interna ao tubo eppendorf, conforme liberação da Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C λ_{exc} 270nm.....	64
Figura 34. Decréscimo da concentração da solução do filme de PEI/ DPPG + Aloína dentro do tubo eppendorf λ_{exc} 270nm.	65
Figura 35. Espectros de emissão da liberação da solução do filme de PEI/ POPG + eppendorf em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C. λ_{exc} 270nm.	65
Figura 36. Decréscimo da concentração da solução do filme de PEI/ POPG + Aloína dentro do tubo eppendorf λ_{exc} 270nm.	66

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Atualmente, a nanotecnologia vem sendo amplamente empregada em diversas áreas como médica, biológica e tecnológica. Uma revolução vem ocorrendo na ciência e tecnologia, devido ao uso de materiais em escala nanométrica, os quais podem apresentar novos comportamentos e ou propriedades, diferentes daquelas dos materiais em escala macroscópica¹.

A nanotecnologia é uma área da ciência multidisciplinar, pois engloba diferentes materiais como polímeros, cerâmicas, semicondutores, compósitos e biomateriais, para diferentes fins como em eletrônica, óptica e ainda aplicações em biotecnologia. Em relação a esta última, pode-se citar o desenvolvimento de biossensores, sistemas de liberação modificada de fármacos.

Neste contexto, principalmente no que diz respeito ao uso de fármacos, despertou-se para a necessidade do desenvolvimento de medicamentos mais eficazes, ou seja, que atuem exatamente no tecido ou órgão lesado, levando a concepção do termo de liberação controlada. Esse tema ganhou notoriedade nos últimos tempos², uma vez que pode ser empregado em diversos campos da área médica.

Há várias vias de administração dos medicamentos por liberação controlada, como oral, transdermal e intravenosa. O uso de cada um desses deve se basear nas propriedades físico-químicas de cada princípio ativo, além do local de ação.

A via de administração transdermal utiliza a pele como uma rota alternativa de distribuição de fármacos, agindo de maneira sistêmica e/ ou localizada, possuindo várias vantagens em comparação com a administração oral de fármacos, principalmente pelo fato de um medicamento de liberação pela via transdérmica atingir níveis plasmáticos constantes, enquanto que, pela via oral, o nível é variável³.

O uso de sistemas que realizam complexas tarefas em regiões restritas e que possam ser manipulados e controlados é fundamental para o desenvolvimento destes medicamentos. As células dos organismos vivos exemplificam tais sistemas, pois elas são compostas por estruturas envoltas por uma membrana, que confere proteção e é responsável pelo transporte de substâncias entre o ambiente extra e intracelular.

Os lipídios são os principais componentes estruturais destas membranas que, associado a outras moléculas, permitem que efetuem suas funções com eficiência.

Os lipossomos são formados por uma bicamada lipídica, que delimita um núcleo aquoso central. A existência de regiões aquosas e lipídicas permite a associação de compostos de natureza hidrofílica, hidrofóbica e anfifílica, tanto no interior, como dentro e ao longo da bicamada^{4; 5}. Os lipossomos mimetizam as células em proteção, composição e funcionalidade, aumentando assim a eficiência de compostos biologicamente ativos incorporados, em comparação com sua forma livre^{6; 7}. Além disso, possuem biocompatibilidade e biodegradabilidade, condições fundamentais em sistemas *drug delivery*, pois se tratam de estruturas a serem administradas *in vivo*.

Com o aumento do interesse por medicamentos fitoterápicos⁸, optou-se pelo uso da *Aloe vera* e de um de seus extratos, a Aloína, como princípio ativo a ser incorporado nos lipossomos, devido a suas propriedades medicinais cicatrizantes, laxativas, entre outras.

Neste sentido, este trabalho aborda a fabricação e caracterização de filmes nanoestruturados de lipossomos, contendo *Aloe vera* e Aloína, no desenvolvimento de um sistema de *drug delivery*, a fim de avaliar o seu potencial deste para futuras aplicações como adesivos transdérmicos.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes automontados nanoestruturados, contendo um princípio ativo da *Aloe vera* a Aloína, como modelo de membrana, visando à aplicação em sistemas de liberação modificada de fármacos.

Dentre os objetivos específicos destacam-se:

- a) Incorporar a Aloe Vera e Aloína em lipossomos, utilizando os fosfolípidos DPPG e POPG;
- b) Avaliar a eficiência do processo de incorporação através de espectroscopia de fluorescência.
- c) Fabricar filmes nanoestruturados de lipossomos contendo as espécies incorporadas através da técnica LbL e caracterizar o crescimento destes por espectroscopia UV-vis.
- d) Monitorar a liberação controlada das espécies incorporadas em lipossomos livres e imobilizadas na forma de filme.

Estrutura do trabalho

Este trabalho está estruturado em cinco capítulos. O primeiro capítulo envolve uma revisão bibliográfica da literatura científica acerca dos principais conceitos envolvidos. O segundo descreve as etapas experimentais e materiais utilizados. A abordagem dos conceitos teóricos envolvidos nas técnicas de caracterização empregadas é exibida no terceiro capítulo. O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e a discussão destes. Por fim, as conclusões são apresentadas no quinto capítulo.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O principal objetivo de um fármaco, além da eficácia, é possuir pouco ou nenhum efeito colateral, porém, nem todos os medicamentos possuem estas características. Além disso, em seu percurso no organismo, o fármaco passa por diversas barreiras fisiológicas, como trato gastrointestinal, boca, faringe, estômago, onde há ação de diversas enzimas, ocasionando, eventualmente, uma diminuição na dosagem inicial até atingir o alvo específico^{8;9}.

Nas últimas décadas, vários mecanismos de sistemas transportadores de fármacos têm sido estudados, com a finalidade de reduzir efeitos colaterais e manter a concentração constante do fármaco no plasma sanguíneo, para que o efeito terapêutico seja ideal¹⁰. Uma proposta é a transmissão dos medicamentos através de um sistema de liberação modificada de fármacos.

Os sistemas de liberação modificada consistem, basicamente, de sistemas capazes de transportar um dado fármaco no interior do organismo até o órgão lesado, liberá-lo de forma controlada e eficaz, aumentando a eficiência do tratamento.

Estudos relacionados a esse tema iniciaram-se em 1906, quando o bacteriologista *Paul Ehrlich* propôs a ideia da “ZauberKugel”, traduzida para o inglês como *magic bullet*, ou seja, bala mágica^{11; 12}. Neste sistema o fármaco é ligado ao transportador direcionado e exibirá atividade farmacológica apenas no tecido alvo, aumentando a eficácia e reduzindo a dose administrada, bem como os efeitos colaterais^{8; 13}. A liberação do fármaco em seu alvo específico ocorre em resposta a diversos estímulos, que podem ser biológicos ou externos. Esses estímulos atuam

como verdadeiros gatilhos que disparam a “bala mágica”; exemplos de estímulos são variações de pH e temperatura. O pH extracelular e intracelular são afetados por diversas patologias, por exemplo, o pH extracelular de um tumor sólido tende a ser mais ácido (6,5) que o do sangue (7,4) a 37°C^{12; 14}.

Um grande passo nesta área ocorreu em 1965, com a publicação de *Alec Bangham*¹¹ sobre a difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais. Neste trabalho foi feita a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas, misturando-se diferentes fosfolipídios em água, sob agitação adequada, onde ocorria uma conformação espontânea na forma de vesículas, que após três anos recebeu o nome de lipossomos¹⁵. Após esse trabalho, os lipossomos tornaram-se um modelo simples para o estudo de membranas biológicas. O sucesso da incorporação de enzimas em lipossomos despertou interesse da comunidade médica e científica¹⁶, sendo que em 1971, *Gregoriadis* propôs pela primeira vez o uso de lipossomos como um sistema transportador de fármacos e, a partir disso, houve um grande desenvolvimento desta área¹⁷.

Desde então, a mesma finalidade tem sido estudada na aplicação de nanopartículas, emulsões, hormônios, peptídeos, dendrímeros e anticorpos. O objetivo destes carreadores é aumentar o potencial terapêutico de um fármaco, impedindo a difusão para outros órgãos, a fim de que diminuam os efeitos indesejados no organismo. Neste âmbito, o uso de sistemas que permitem controlar e estudar propriedades específicas dos materiais em nível molecular é de grande interesse¹⁸.

A construção de filmes ultrafinos permite a interpretação destas interações entre materiais, um nível nanométrico. Um dos métodos utilizados para a construção de filmes ultrafinos de materiais orgânicos e biológicos é a técnica de automontagem camada por camada (*do inglês, Layer-by-Layer, LbL*). Esta técnica foi desenvolvida por *Decher*¹ em 1997 e é baseada na interação eletrostática entre moléculas de cargas opostas, permitindo o controle das propriedades, como a arquitetura molecular e espessura do filme, podendo ser explorada para a liberação modificada de fármacos¹⁹.

Portanto, este trabalho apresenta a utilização de filmes nanoestruturados de lipossomos contendo *Aloe vera* e Aloína, incorporadas em sua estrutura, na confecção de um sistema *drug delivery*.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

A seguir, é descrita uma revisão teórica e bibliográfica referente aos métodos empregados no desenvolvimento do trabalho. Destacam-se o desenvolvimento de um sistema de *drug delivery* (liberação modificada), através da incorporação de princípio ativo em lipossomos e a imobilização destes em filmes automontados nanoestruturados do tipo LbL, sendo que o princípio ativo utilizado será a *Aloe vera* e a Aloína, devido as suas características terapêuticas.

2.1. Sistema de liberação controlada de fármaco (*drug delivery*)

Os sistemas de liberação modificada de fármacos possuem grande importância, uma vez que raramente um fármaco, numa solução aquosa ou na forma convencional, consegue chegar ao alvo nas concentrações adequadas, com o objetivo de atingir a eficácia terapêutica desejada. Isto pode ser atribuído às diversas barreiras fisiológicas de diferentes naturezas (anatômica, química e biológica) entre o local de administração do fármaco e o órgão alvo^{16;20}.

A maioria dos fármacos possui moléculas pequenas e vasta distribuição pelo organismo, principalmente após injeção intravenosa. O resultado é um baixo índice terapêutico e alta toxicidade em tecidos saudáveis^{17;21}, ou seja o fármaco deve ser administrado numa dose adequada para eliminar determinada patologia, porém até o fármaco atingir o órgão específico, passa por diversos tecidos, dentre eles os saudáveis. Neste caminho do fármaco até seu objetivo, a concentração plasmática do medicamento diminui consideravelmente, o que ocasiona o baixo índice terapêutico.

De maneira geral, um fármaco ideal deve realizar o efeito desejado e possuir especificidade de alvo, com a finalidade de diminuir efeitos colaterais, principalmente quando se trata de fármacos citotóxicos. Tais exigências são difíceis de conseguir apenas com uma mudança na estrutura do fármaco. Por essa razão, nos últimos anos um novo conceito farmacológico foi desenvolvido, através da preparação de sistemas biologicamente ativos com o uso de agregados moleculares²². Este é o

princípio envolvido em sistemas de liberação modificada de fármacos (*drug delivery*). A proposta de agregados moleculares que possam liberar o fármaco no local desejado é baseada na hipótese de que, diferentes funções podem ser atribuídas a diversas substâncias químicas que compõem esse agregado. Com o auxílio desses agregados, as moléculas biologicamente ativas podem ser sintetizadas, tendo em vista seu potencial farmacológico e sem considerar qualquer limitação imposta pela liberação incorreta, como os efeitos colaterais indesejados^{7; 23}.

Moléculas específicas de agregados assegurariam a liberação do composto dentro do organismo, além disso, moléculas que formam esses agregados podem proteger o fármaco da degradação⁷. Uma vantagem desses agregados, ao que podem ser formados por moléculas anfifílicas, é a incorporação de fármacos que sejam difíceis de usá-los como agente terapêutico, uma vez que apresentam baixa solubilidade em fluídos biológicos ou devido a sua degradação '*in vivo*'¹⁶. Tais agregados podem ser preparados utilizando compostos naturais e/ou sintéticos. Com isso, surgem possibilidades de estender o espectro de aplicações de fármacos através do uso de novas modificações tecnológicas¹⁵.

A Figura 1 ilustra a diferença entre um fármaco de liberação tradicional e outro do tipo de liberação controlada, onde nota-se que a concentração plasmática do fármaco de liberação controlada se mantém constante por um tempo maior, enquanto que com um fármaco tradicional ocorrem picos de alta e de baixa concentração, o que compromete a eficácia do tratamento, além de aumentar o risco de toxicidade.

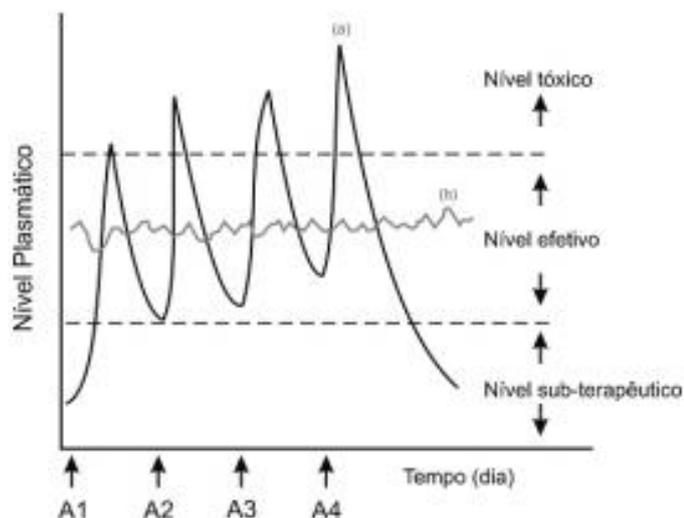


Figura 1. Esquema da comparação do perfil de fármaco administrado de forma convencional e através de liberação controlada.

Dentre os sistemas de liberação mais estudados, destacam-se os que utilizam lipossomos, micelas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros e nanotubos de carbono. Além desses materiais, o uso de materiais biodegradáveis como peptídeos, hormônios, anti-inflamatórios, agentes fitoterápicos e quimioterápicos^{15;7} também têm sido estudados.

Para que um material possa ser utilizado na liberação modificada, como carregador, ele deve ser quimicamente inativo e inerte, além de ser biodegradável. Uma grande variedade de fármacos foi incorporada em lipossomos, que apresentam vantagens em relação a outros sistemas, pois são biodegradáveis, não tóxicos e não imunogênicos^{16; 24}, como, por exemplo, DOXIL® (doxorubicina), Fungizone® (anfotericina-B), Novasome® (varíola) e nanopartículas magnéticas para tratamento de câncer.

Proteínas e peptídeos estão sendo cada vez mais reconhecidos como candidatos potenciais para o desenvolvimento de novas terapias. Devido ao seus modos relativamente específicos de ação, seus usos como medicamentos de liberação modificada e como agente terapêutico, são promissores pois podem ser usados em doses baixas.

Em relação ao nível celular, a liberação de proteínas e peptídeos grandes *in vivo* pode ser dificultada por sua estrutura tridimensional, devido a sua ocupação do espaço e da natureza hidrofílica / hidrofóbica. Assim, o transporte de difusão destas proteínas grandes é geralmente mais lento e há poucos transportadores específicos disponíveis²⁵.

Estas proteínas e peptídeos presentes são moléculas altamente vulneráveis, com curto tempo de meia-vida *in vivo*, devido à degradação por enzimas e proteases, quer no local de administração ou na rota para o local da ação farmacológica, resultando em baixa biodisponibilidade. Em certos casos, a administração frequente em doses elevadas pode ser necessária para obter efeitos terapêuticos, criando o risco de efeitos colaterais indesejados, tais como as respostas imunes.

Além disso, durante a preparação do fármaco de peptídeo de proteína, processos de fabricação e os fatores ambientais podem danificá-lo, reduzindo sua atividade biológica, induzindo agregação, processando as proteínas imunogênicas e levando à sua precipitação. Esses processos incluem pH, força iônica, temperatura, pressão, solventes não aquosos, íons metálicos, detergentes e agitação²⁵.

Um cenário ideal de proteínas e peptídeos administrados seria através do sistema de liberação modificada, o qual deve diminuir a taxa de depuração do fármaco no sistema, refletindo em menores volumes ou concentrações do fármaco a ser administrado

Os medicamentos de liberação controlada e/ou modificada (*drug delivery*) estão cada vez sendo mais pesquisados, devido aos seus benefícios, como diminuição do risco de toxicidade, maior eficácia e adesão ao tratamento. Com o avanço da nanotecnologia, tornaram-se possível o desenvolvimento desses sistemas, utilizando diferentes materiais como carregadores. Dentre eles, destacam-se os lipossomos, por serem extremamente versáteis, já que permitem a incorporação de moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas e anfífilas¹.

2.2. Lipossomos: bicamada lipídica

As membranas biológicas são caracterizadas por uma dupla camada lipídica, que atua como uma barreira para o transporte de determinadas moléculas, como por exemplo, fármacos, peptídeos e agentes hidrofílicos, além de proteger contra diversos micro-organismos.

As moléculas da bicamada lipídica não estão ligadas de forma covalente, o que permite flexibilidade, propiciando uma mudança na sua forma e movimento¹¹. Em geral, esta dupla camada é constituída, basicamente, por lipídios, proteínas e glicoproteínas, sendo que as proporções de lipídios e proteínas variam de acordo com o tipo de membrana e função. Mecanismos de interações entre lipídios e biomoléculas estão sendo estudados através de modelos simplificados denominados biomiméticos¹¹.

Um dos sistemas biomiméticos mais estudados são os lipossomos, que são esferas fosfolipídicas, compostas por uma bicamada lipídica e contendo um núcleo central aquoso^{11,7}. O termo lipossomo foi criado em 1968 e sugestões de sua utilização em um sistema de liberação de fármacos surgiram logo depois^{19,22,18}.

A Figura 2 ilustra estruturas vesiculares coloidais constituídas por bicamada lipídica. O arranjo esférico é formado em água através da agregação de moléculas anfifílicas que contêm um grupo polar e duas cadeias alifáticas em bicamadas, que se fecham, formando um compartimento interno aquoso.

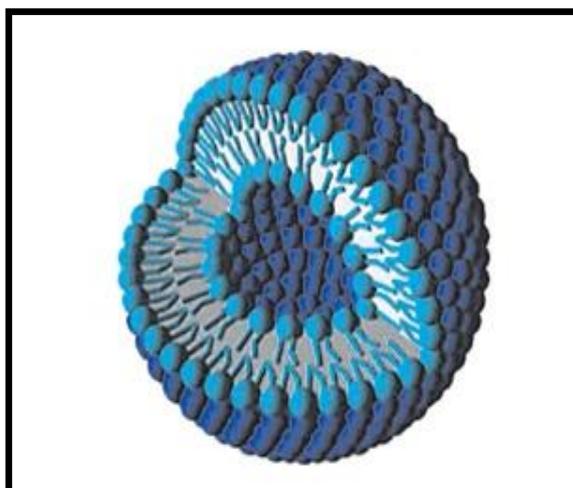


Figura 2. Ilustração esquemática de um lipossomo.

Nos últimos anos, os lipossomos estão têm sido estudados para a incorporação e liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), devido a sua versatilidade, capacidade de proteção, composição, elasticidade e, principalmente, ao fato de permitirem a incorporação de moléculas, independente de sua solubilidade²⁶.

Uma representação esquemática da incorporação de substâncias nos lipossomos está representada na Figura 3.

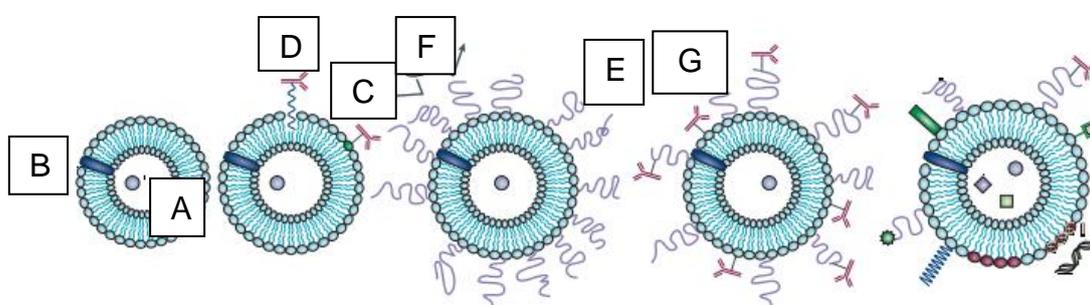


Figura 3. Mecanismo de incorporação de diferentes fármacos nos lipossomos³.

a) fármacos hidrossolúveis aprisionadas no interior aquoso, b) fármacos lipofílicos incorporadas na membrana lipossomal, c) anticorpo-alvo ligados covalentemente em d) modificação da membrana lipossomal com uma fração hidrofóbica, e) lipossomos revestidos com PEG (polietileno glicol), que tem como função proteger a superfície da interação com proteínas, f) polímero de proteção e anticorpos, que podem ser fixados à superfície, g) ou ainda na extremidade distal da cadeia polimérica.

Os lipossomos podem ser confeccionados através da dispersão de fosfolipídios em meio aquoso, podendo ser formados por uma ou mais bicamadas lipídicas. O número de bicamadas, assim como o tamanho, pode ser controlado através do método de preparação e composição do lipídio. Os lipossomos mais encontrados na literatura são os unilamelares (*small unilamellar vesicle*, SUV), multilamelares (*multilamellar vesicle*, MLV) e vesículas multilamelares gigantes (*large multilamellar vesicle*, LMV), como ilustra a Figura 4.²⁷.

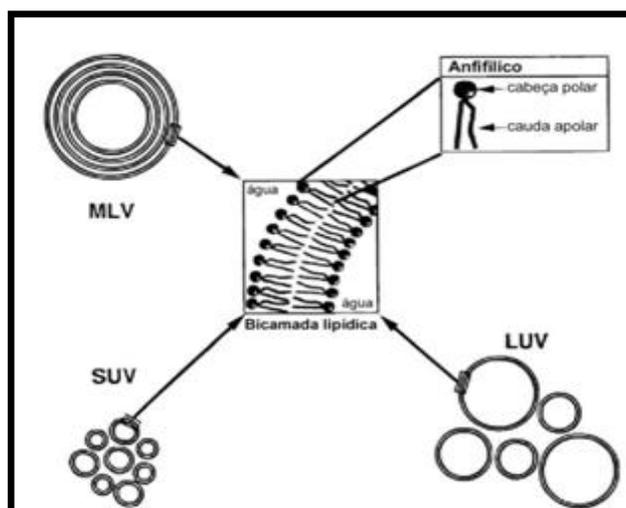


Figura 4. Representação esquemática da bicamada lipídica e dos lipossomos, LMV, SUV, MLV. Figura obtida da Avanti Polar Lipids, www.avantipolarlipids.com.br.

De acordo com a temperatura em que os lipídios se encontram, eles podem estar em diferentes estados, como gel ou estado líquido cristalino (fluido), sendo que à medida que a temperatura aumenta, o ponto desta transição é atingido. Ressalta-se que esse ponto é característico de cada lipídio⁷. Nesta transição, a membrana passa de uma fase gel ordenada para uma fase líquida cristalina, onde há uma maior liberdade de movimentação de moléculas. Essa mudança de fase, causada pela alteração de temperatura, é denominada de mudança termotrópica dos lipídios^{7;28}.

A temperatura de transição de fase e fluidez (TC) é muito importante para a confecção dos lipossomos, pois determina propriedades como permeabilidade, fusão, agregação e ligação de proteínas. Na temperatura de transição de fase de uma camada vesicular, observa-se um grande aumento de permeabilidade da membrana^{7;27}. A TC de cada fosfolipídio aumenta com comprimento da cadeia alquílica e também com o grau de saturação do grupo anfifílico⁷.

Quando fármacos são incorporados em lipossomos, ou ainda, co-administrados com lipossomos, a permeação através da pele é aumentada consideravelmente²⁹, devido à compatibilidade da pele humana com a membrana lipossomal.

Com a finalidade da aplicação mencionada, é importante que o lipossomo, como um carreador de fármaco, seja constituído de lipídios que possam interagir com a pele humana sem maiores danos, como alergia, irritação, dentre outros efeitos adversos²⁹. Outros parâmetros importantes são o grau de penetração, bem como a flexibilidade²⁹.

Uma grande variedade de lipídios e surfactantes pode ser utilizada para a preparação das vesículas, como por exemplo, DPPG (Dipalmitoil fosfatidil glicerol), DPPC (Dipalmitoil fosfatidil colina), POPG (Palmitoil oleil fosfatidil glicerol) e DPPE (Dipalmitoil fosfatidil etanolamina). Geralmente, utilizam-se fosfolipídios que podem ser catiônicos ou aniônicos. A composição destas vesículas influencia as características físico-químicas dos lipossomos que possuem um efeito significativo sobre o comportamento destas vesículas e, conseqüentemente, a sua eficácia como transportador de fármacos³⁰.

Os lipossomos estão sendo amplamente utilizados no meio científico, como um modelo de membrana celular, o que originou diversos artigos científicos publicados. Estes se mostraram de grande interesse na área físico-química de lipídios, formação de domínios lipídicos em membranas¹³, no entendimento de interações celulares¹³ e deformidade em sistemas lipídicos¹³. Dentre as aplicações na área biomédica, se destacam em testes diagnósticos, desintoxicação através de agentes quelantes, na cosmetologia e aplicações como transportador de fármacos antitumorais, os quais são extremamente citotóxicos³¹.

Os lipossomos podem ainda ser imobilizados sobre um substrato sólido com a finalidade de estudar interações entre membranas de interesse biológico, como proteínas, fármacos ou peptídeos. A imobilização e estabilização de lipossomos sobre superfícies sólidas são de grande interesse para a aplicação em biossensores¹, os quais podem ser baseados nas interações entre lipídeos imobilizados e proteínas específicas, e também como protótipo de sistemas de liberação controlada de fármacos como adesivos que necessitam da incorporação do fármaco ou proteína nos lipossomos^{15;32}.

Na literatura são descritos vários métodos para a construção de modelos de membrana em substratos sólidos, como os filmes camada por camada (*Layer –by– Layer*) e os filmes de Langmuir-Blodgett (LB)¹⁵.

2.3. Filmes automontados (Layer- by- Layer)

A necessidade de obtenção de estruturas com controle de espessura e propriedades em escala molecular impulsionou o desenvolvimento de técnicas de montagem de filmes ultrafinos. Os métodos mais utilizados são LB e LbL, pois permitem organizar as moléculas individuais em estruturas organizadas, favorecendo as propriedades finais desejadas³³.

Um método simples e versátil para preparar filmes foi desenvolvido por Sagiv e, anos mais tarde, aperfeiçoado por Decher, com diferentes materiais carregados e/ou poli-íons^{33;34}. Biomoléculas carregadas, como DNA, proteínas, fosfolipídios e partículas inorgânicas podem ser incluídos nestes filmes.

Este método surgiu como uma alternativa mais simples à técnica LB, que é mais onerosa, embora determinadas características, como a organização dos filmes produzidos pela técnica LB sejam superiores à técnica de automontagem LbL^{21; 35}.

A técnica *LbL* permite que o fosfolipídio seja montado com multicamadas de polieletrólitos que podem servir de matriz para a imobilização de biomoléculas, sem alterar seu ambiente aquoso nativo e sem contato direto com os polieletrólitos. Como as camadas internas e externas dos lipossomos são hidrofílicas, as interações com a superfície são basicamente forças eletrostáticas, hidratação e forças de van der Waals²¹.

Outro benefício obtido por essa técnica reside na capacidade de revestir peças de geometrias complexas mantendo, de maneira simples, a mesma estruturação de filmes depositados sobre superfícies planas. Os filmes LbL podem ser montados sobre superfícies de diferentes tamanho e forma. A versatilidade da técnica está na formação de novas arquiteturas moleculares, baseadas em ligações não-covalentes. As interações eletrostáticas entre os poli-íons em solução e a superfície são fundamentais para a estrutura final do filme. Ressalta-se que a estruturação do filme automontado também pode ocorrer por outros tipos de interação como quimiossorção, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, dentre outras. Esta diversidade de interações intermoleculares favorece o uso de diferentes biomoléculas e o efeito cooperativo de atração em multipontos exerce papel fundamental na imobilização^{18;33}.

A aplicação da técnica inicia com um pré-tratamento químico do substrato (vidro, quartzo) para gerar uma superfície carregada eletricamente. Isso permite ao substrato adsorver em sua superfície, por atração eletrostática, uma camada de moléculas com carga positiva (policátions) ou negativas (poliânions)³³.

A formação de uma monocamada molecular ocorre quando o substrato é imerso em solução com moléculas a serem adsorvidas ou depositadas. A maioria das moléculas adsorvidas permanece depositada mesmo após enxágue do substrato, que é necessário para retirar apenas as moléculas não aderidas³³. Após o enxágue da primeira camada, é possível depositar uma nova camada pela imersão do substrato em outra solução com moléculas de cargas opostas. As novas moléculas vão se aderir sobre as moléculas anteriormente depositadas e com isso, se obtém uma bicamada. Repetindo esse processo várias vezes obtêm-se filmes multicamadas. Inicialmente, acreditava-se que não havia limites para o número de bicamadas automontadas que um filme LbL podia conter¹. Entretanto, caso a densidade de cargas seja fraca, o filme pode atingir um limite máximo devido à dessorção das camadas subsequentes. Isso ocorre porque há uma densidade de cargas crítica, abaixo da qual não ocorre compensação suficiente de cargas na superfície. Sem uma compensação exagerada das cargas não é possível reverter o sinal da carga na superfície e, conseqüentemente, não há adsorção de uma nova camada^{1; 36}.

Essa técnica permite também uma variabilidade da arquitetura dos filmes, no que diz respeito à espessura, composição, conformação, grau de ligações iônicas e molhabilidade. O controle é realizado através de parâmetros como concentração química dos constituintes, pH, tempo de deposição, força iônica e temperatura²¹.

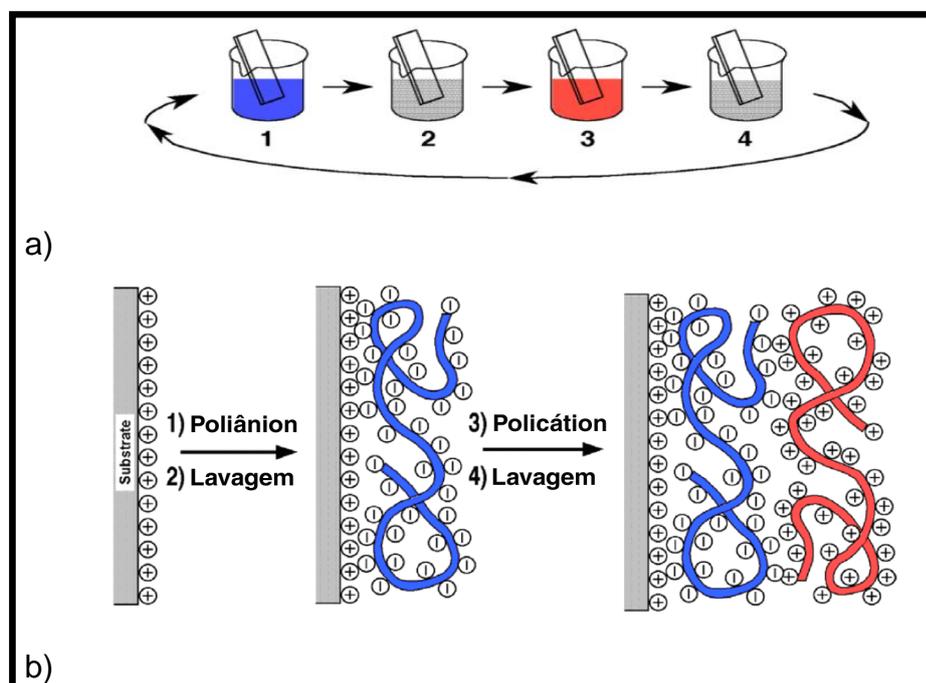


Figura 5. (a) Representação esquemática de deposição de filme sobre um substrato sólido, (b) Representação das interações entre os polieletrólitos ²¹.

A Figura 5 ilustra, de forma esquemática, a fabricação de filmes LbL, através de adsorção física, via atração eletrostática. Na etapa 1, o suporte sólido contendo cargas negativas em uma superfície é imerso numa solução contendo polieletrólito com cargas positivas (policátion), por um tempo previamente determinado. Após esse tempo de imersão, uma camada de material é adsorvida, através da atração eletrostática entre cargas do suporte e as cargas do policátion.

O uso da técnica de automontagem para a fabricação de filmes contendo materiais biológicos é bastante promissor pela possível aplicação em biotecnologia. A versatilidade permite que proteínas ou outras moléculas biológicas sejam imobilizadas neste tipo de filme, preservando a atividade biológica, como demonstrada por Lvov e colaboradores³⁴.

Alguns estudos sobre incorporação de vesículas de fosfolipídios (lipossomos) em filmes de multicamadas de polieletrólitos, construídos pela técnica de automontagem, foram realizados por Michel³⁷. Nestes estudos utilizaram-se os polieletrólitos poliácido glutâmico (PGA) e poli(cloreto de alilamina) PAH. Através de imagens de microscopia de força atômica (AFM), análises de microbalança de cristal de quartzo e elipsometria, demonstrou-se que os lipossomos permaneceram intactos

na superfície. Este trabalho foi importante para a construção de filmes contendo lipossomos em multicamadas, as quais podem funcionar como reservatórios de fármacos, como agentes terapêuticos, ou nanorreatores enzimáticos^{38,39}.

O estudo de filmes automontados para a liberação controlada de fármacos tem sido amplamente explorado. *Hammond* e colaboradores examinaram a incorporação de heparina, um agente anticoagulante, utilizado no tratamento de doenças como a trombose, em polímero biodegradável através da técnica de automontagem⁴⁰. Esse trabalho obteve resultados satisfatórios que indicam a possibilidade de direcionar o local de ação do medicamento, além de favorecer o uso de mais medicamentos liberados pela via transdérmica.

Na área da tecnologia farmacêutica, em específico na liberação controlada de fármacos, as multicamadas de polieletrólitos revestindo as nanopartículas de medicamento, aumentam o tempo de liberação do mesmo. A permeabilidade, ou seja, a taxa de liberação do fármaco, pode ser controlada de acordo com o número de camadas do filme LbL e com o tipo de polímero a ser utilizado².

Mais recentemente *Makky*⁴¹ incorporou a coenzima A e imobilizou-a em filmes multicamadas, com a finalidade de utilizá-la como agente terapêutico no tratamento de tumor na retina. A coenzima A tem uma manose específica para o tumor, com isso direciona-se o alvo, porém, o problema seria sua solubilidade, já que a coenzima A é pouco solúvel em água. Com a finalidade de resolver esta questão, solubilizou-se em lipossomos, e utilizou-se um sistema de liberação controlada de fármacos, sendo uma terapia fotodinâmica a especificidade e penetração no tumor a interação específica foi estudada por espectroscopia de fluorescência⁴¹.

Ainda com relação à utilização de filmes LbL em sistemas de lipossomos para a liberação controlada, *Geraldo* e colaboradores⁷ desenvolveram um sistema de *drug delivery* através da incorporação do ibuprofeno. O ibuprofeno é um agente anti-inflamatório não-esteroidal, pertencente à classe do ácido propiônico, e usado para redução da febre, dor e inflamação, indicado principalmente para alívio dos sintomas da artrite reumatóide, osteoartrite, reumatismo articular e ainda muito indicado no alívio da dor após procedimentos cirúrgicos em odontologia, ginecologia, ortopedia e traumatologia.

O ibuprofeno foi incorporado em lipossomos, imobilizados em filmes LbL e o crescimento dos filmes foi avaliado por espectroscopia de fluorescência, enquanto

que o sistema de liberação foi estudado utilizando um sistema de diálise⁷. Os resultados mostraram a eficiência na liberação do princípio ativo de interesse sendo que o tempo máximo de liberação foi atingido em algumas horas. Este trabalho contribuiu para nortear os estudos relacionados à incorporação de princípio ativos em lipossomos, e a imobilização destes em filmes LbL, além do tipo de avaliação do sistema de liberação controlada *in vitro*, através do sistema de diálise⁷.

No que diz respeito à utilização de nanoestruturas para sistemas *drug delivery* a partir de fitoterápicos, seu desenvolvimento vem se mostrando cada vez maior. Na formulação de fitoinvestigação, o desenvolvimento de nanotecnologia para formas farmacêuticas como nanopartículas, nanocápsulas, lipossomos, nanoemulsões dentre outras, tem uma ampla vantagem para desenvolvimento destes incluindo solubilidade, biodisponibilidade, proteção de toxicidade, estabilidade e distribuição⁸.

Sendo assim, novos medicamentos de tamanho nanométrico, com base em plantas, possuem um grande potencial para melhora da sua atividade, além de superar problemas associados às plantas medicinais. Os lipossomos, que são biodegradáveis e não tóxicos, podem encapsular fitoterápicos hidro e lipossolúveis. Neste contexto, a utilização de filmes nanoestruturados de lipossomos incorporados com *Aloe Vera* e Aloína, potenciais substâncias fitoterápicas, para o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de fármacos, se mostra muito interessante.

2.4. Aloe vera

As plantas constituem uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, sendo que muitas delas são usadas em semi-síntese de grande número de fármacos. Pesquisas na área de produtos naturais mostram-se promissoras e têm revelado uma gama de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas.

A *Aloe vera* (*Aloe barbarensis* Miller), conhecida popularmente como babosa, é uma planta que, além de ser reconhecida por seu uso em cosméticos, tem efeito cicatrizante e atividade angiogênica. Devido às diversas propriedades terapêuticas,

a *Aloe vera* vem sendo utilizada em diversos produtos comerciais, dentre eles cosméticos, produtos de limpeza, medicamentos, géis cicatrizantes, além de diversos estudos sobre atividade anticancerígena.

A espécie *Aloe vera* é uma planta da família da Lilácea, que possui inúmeras propriedades, e entre as muitas espécies, a *Barbarensis* é considerada verdadeira, a qual cresce em ambientes quentes e climas úmidos. A planta possui folhas ensiformes, carnosas e laceoladas, medindo de 0,5 a 0,9 m de comprimento e 0,05 a 0,1m de largura em sua base e suas margens são serrilhadas e com espinhos. Tais folhas funcionam como reservatórios de água; portanto, o metabolismo ácido e a suculência são responsáveis pela sua natureza xerófita⁴².

Como exemplos do interesse comercial nas espécies da *Aloe barbarensis Miller*, destacam-se diversos estudos relacionados aos metabólitos primários e secundários desta espécie vegetal⁴³.

Há muitos estudos relacionados aos metabólitos primários da *Aloe vera*. Os polissacarídeos presentes no parênquima de reserva merecem atenção, pois possuem os efeitos terapêuticos responsáveis pelo grande uso da *Aloe vera* como medicamento. Aproximadamente mais de 60% do parênquima de reserva são constituídos de polissacarídeos, sendo a acemanana em maior quantidade⁴³. Outros compostos incluem enzimas, vitaminas A, C, D, do complexo B, saponinas, ácido salicílico e esteróides⁴⁴.

Um dos aspectos que despertam grande interesse é o fato de que os componentes da babosa, por apresentarem atividade regenerativa, podem atuar no processo de cicatrização como, por exemplo, uma pele bioativa.

Devido à variedade de aplicação na área terapêutica, os produtos a base de babosa têm apresentado forte expansão nos mercados nacional e internacional. Estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 20 bilhões/ano são originados de substâncias ativas derivadas de plantas⁴³. Esta demanda motivou estudos interdisciplinares relacionados à pesquisa técnica, econômica, financeira e mercadológica do processo de extração de insumo farmacêutico derivado da *Aloe barbadensis* Miller.

O gênero *Aloe* compreende mais de 300 espécies catalogadas, porém, a espécie *Aloe vera* é a mais estudada e utilizada na indústria cosmética e farmacêutica^{42; 45}. A origem desta planta é bastante discutida, porém, sua verdadeira

origem pode ter sido na África⁴⁵. A descrição mais antiga referente à babosa está no papiro egípcio de Ebers, 1500 a.C., na qual estão detalhados mais de 12 medicamentos com base na *Aloe barbadensis* Miller. Cópias originais deste papiro encontram-se na Universidade de Leipzig. No século I d.C., Dioscórides descreveu, em seu herbário grego, a *Aloe vera* para uso medicinal e cosmético, bem como algumas de suas propriedades. Neste contexto, outras evidências históricas que remontem ao ano de 400 a.C. indicam origem africana desta planta, especificamente no sudeste e leste africano, sendo introduzida no norte da África, península Arábica, China, países mediterrâneos, Índias e Américas⁴⁶.

A produção industrial da *Aloe vera* vem crescendo muito nos últimos anos devido aos seus efeitos terapêuticos, pois antes era apenas usada como “receita caseira” em diversas partes do mundo. As pesquisas científicas sobre atividades medicinais do gênero *Aloe* iniciaram-se por volta de 1930. Publicações de *Colins e Colins*⁴⁵, em 1935, relataram o uso do gel^a em queimaduras severas em pacientes da Flórida, enquanto que algumas pesquisas anteriores relatavam apenas o efeito purgativo e ignoravam o efeito do gel. Em pesquisas seguintes, através de análise com raios-X, relataram o uso do gel em pacientes com câncer.

Dados da literatura sugerem que o extrato do parênquima de reserva da *Aloe vera* promove a cura de doenças pela interação sinérgica de muitas substâncias, incluindo alcalóides, antraquinonas, saponinas, ácidos graxos, glicoproteínas, resinas, minerais, vitaminas (A, C, D), enzimas, dentre outras^{43; 45}.

Segundo *Chow* e colaboradores⁴⁷, o extrato do parênquima de reserva da *Aloe vera* tem sido associado a diversos efeitos benéficos para uma variedade de patologias, como ferimentos, queimaduras, aftas, artrite, gota, acne, dermatites, úlceras pépticas e redução do risco de infecções⁴⁷.

O extrato bruto da planta é utilizado como protetor de pele e mucosas, agente amaciante e suavizante em indústrias cosméticas e farmacêuticas, e ainda como suplemento dietético em muitas bebidas e alimentos. O uso oral do suco atua positivamente em problemas como úlcera e doenças renais, porém, poucos estudos testaram se o uso pela via oral pode influenciar na cicatrização de feridas⁴⁷.

^a O termo gel refere-se à semelhança do estado físico com os géis poliméricos, e não à sua estrutura química.

Evidências científicas afirmam que a ingestão do suco aumenta a força de contração cardíaca, diminui os índices de colesterol e de triglicérides, estimulam a regeneração das células das ilhas de Langerhans contribuindo, assim, para diminuição das taxas de glicose sanguínea^{48;49}.

A atividade anti-inflamatória do extrato da *Aloe vera* está associada à atividade inibitória das cicloxigenases, com inibição da síntese de prostaglandinas, principal mediador do processo inflamatório⁴⁹.

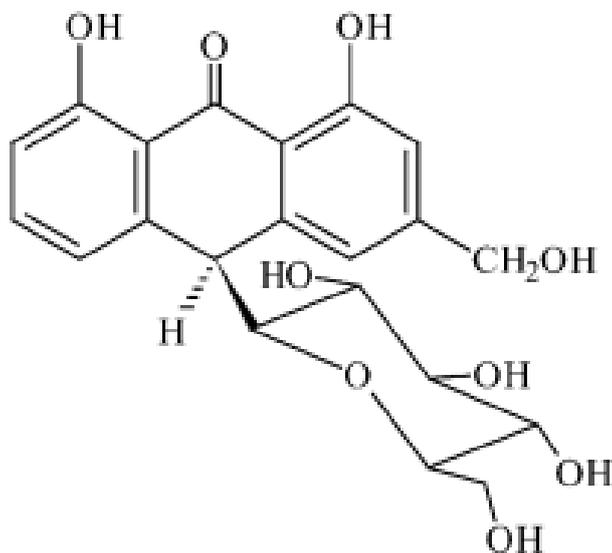
Muitas características medicinais são atribuídas ao polissacarídeo acemananas presente no gel da planta, tendo resposta positiva em inibir *Pseudomonas aeruginosa* do epitélio pulmonar em humanos⁵⁰, estímulo da formação de macrófagos⁴⁸, ausência de reações tóxicas e toxicidade em cobaias⁴⁸, necrose de células tumorais em cães e gatos, atividades antitumorais em cultura de células, tratamentos terapêuticos contra a AIDS, indução de citocinas⁵¹, cicatrização de úlceras e feridas⁵² e tratamento de queimaduras devido ao efeito da radiação⁴⁹ são alguns exemplos de aplicações do uso da *Aloe vera*.

Pesquisas apontam que os princípios ativos da planta encontram-se no gel mucilaginoso da folha e não na casca e, dentre os princípios ativos, estão a aloína (barbaloina), aloe emodin, aloferon e aloetina. Estes são responsáveis pelas propriedades medicinais da planta que, além de cicatrizante tem propriedades digestivas, laxativas e emagogas (aumentam o fluxo sanguíneo). Entretanto acredita-se que estes podem também apresentar efeitos antibactericidas, anti-inflamatórios e de proteção a radiação UV⁵³.

Além das propriedades citadas até aqui, o gel da planta promove estimulação e crescimento de fibroblastos, formação de tecido novo e possui substâncias que promovem a angiogênese, formação de vasos sanguíneos, fator essencial para reparação de tecidos lesados⁴³.

A Aloína, uma das substâncias presentes no extrato da *Aloe vera*, é constituída por um núcleo antraceno e formada a partir da oxidação de fenóis, tendo como característica físico-química solubilidade em água e metanol, cristalina de coloração amarela e sabor amargo; apresenta atividade terapêutica, pois se converte em hidroquinonas, pois é muito instável já que oxidam facilmente. Quando atinge a flora intestinal a Aloína sofre clivagem, resultando na formação da aloe emodin, o qual possui efeito laxativo^{54; 55}.

A Figura 6 ilustra a estrutura química de uma das substâncias puras presentes na planta, a Aloína.⁵⁴



(a)

Figura 6. a) Estrutura química da Aloína (barbaloina), retirada de www.sigmaaldrich.com.

Nos últimos anos, as antraquinonas têm atraído muita atenção, devido as suas atividades biológicas e aplicações na indústria farmacêutica. São conhecidas como uma família de fotossensibilizadores que têm a capacidade de gerar espécies reativas⁵⁶.

*Alves et al*⁵⁴ realizaram estudos nos quais prepararam-se lipossomos contendo a aloe emodin e a aloína. Através de medidas de fluorescência foi possível determinar as concentrações das substâncias incorporadas nas vesículas de fosfolípidios (lipossomos). Os autores observaram que a hidrofobicidade da aloe emodin e a Aloína (barbaloina) é importante para explicar a interação com as membranas biológicas e, conseqüentemente, suas atividades biológicas⁵⁴. A habilidade da aloe emodin e da Aloína (barbaloina) em interagir com bicamada lipídica foi determinada utilizando o coeficiente de partição (K_p) das substâncias, onde a intensidade de fluorescência destas antraquinonas na presença das

vesículas de fosfolipídios e em solução aquosa foi usada para quantificar o coeficiente de partição. Onde obteve-se como coeficiente de partição para a aloe emodin e Aloína os respectivos valores : $13,93 \times 10^3$ e $1,49 \times 10^3$, com este estudo, constatou-se que a Aloína (barbaloína) é menos hidrofóbica que a aloe emodin, relacionando-se a alta afinidade pelas membranas de fosfolipídios, sendo assim, a aloe emodin possui maior afinidade pela membrana celular⁵⁴.

Devido às diversas propriedades terapêuticas, a *Aloe vera* vem sendo utilizada em diversos produtos comerciais, dentre eles cosméticos, produtos de limpeza, medicamentos, géis cicatrizantes, além de diversos estudos sobre atividade anticancerígena. Sendo assim, no presente estudo optou-se por realizar um protótipo de medicamento com a finalidade de cicatrização de feridas, através da incorporação em lipossomos para um sistema de *drug delivery*, em filmes ultrafinos; o medicamento será do tipo adesivo (patches).

2.5. Via de administração transdermal – Patches

A pele humana é considerada o maior órgão do corpo humano. Com isso, o desenvolvimento de medicamentos para administração pela via transdérmica, torna-se de grande importância.

A administração de medicamentos pela via transdérmica utiliza a pele como uma rota eficaz, podendo estes medicamentos agirem de maneira sistêmica e/ ou localizada, além de apresentar várias vantagens em comparação com a administração por via oral, que possuem muitas variáveis, como a influência da absorção do trato gastrointestinal, pH, consumo de alimentos e metabolismo hepático. Um medicamento de liberação através da via transdérmica atinge níveis plasmáticos constantes, pois não sofre tantas influências quanto um medicamento administrado por via oral, levando a um nível plasmático muito variável³.

Atualmente, diversos medicamentos estão sendo desenvolvidos para liberação transdermal na forma de adesivos, como nitroglicerina, escopolamina, nicotina, clonidina, estradiol, fentanil, oxibutina, testosterona e, mais recentemente, o

metilfenidato (tratamento de hiperatividade e déficit de atenção), rivastigmina e rotigotina (ambos para tratamento de Mal de Parkinson)⁵⁷. No entanto, considerando-se as propriedades da barreira cutânea, propriedades físico-químicas específicas são necessárias para um fármaco ser candidato a administração transdermal passiva. Neste sentido, as moléculas devem ser pequenas, possuírem baixo ponto de fusão e bom coeficiente de permeabilidade, sendo a análise detalhada da farmacocinética do medicamento e sua correlação com as características físico-químicas da pele, importantes parâmetros para o desenvolvimento do medicamento⁵⁷.

A Figura 7 ilustra o esquema da seção transversal da pele. A estrutura do estrato córneo, camada superior da pele, possui muitas camadas de células achatadas mortas e atua como uma barreira para proteger os tecidos subjacentes contra lesões e infecções. A alta organização cristalina das lamelas lipídicas desempenha um papel essencial nas propriedades da barreira do estrato córneo; um dos métodos mais controversos é o uso de vesículas e/ou lipossomos em formulações para liberação transdérmica. As vesículas e/ou lipossomos possuem água em seu interior, e suas paredes consistem de moléculas anfífilas em uma conformação de bicamada³⁰. É importante a baixa permeabilidade do fármaco no estrato córneo em relação às camadas mais internas da pele, atuando assim como uma barreira, pois permite que o fármaco entre no organismo sem ser danificado³⁰.

Na camada basal, células da epiderme proliferam-se, e começam a sofrer diferenciação, migrando em direção à superfície. Na interface entre o estrato córneo ocorre a diferenciação final durante a qual células viáveis são transformadas em células de queratina (corneócitos), que estão nas regiões lamelares.

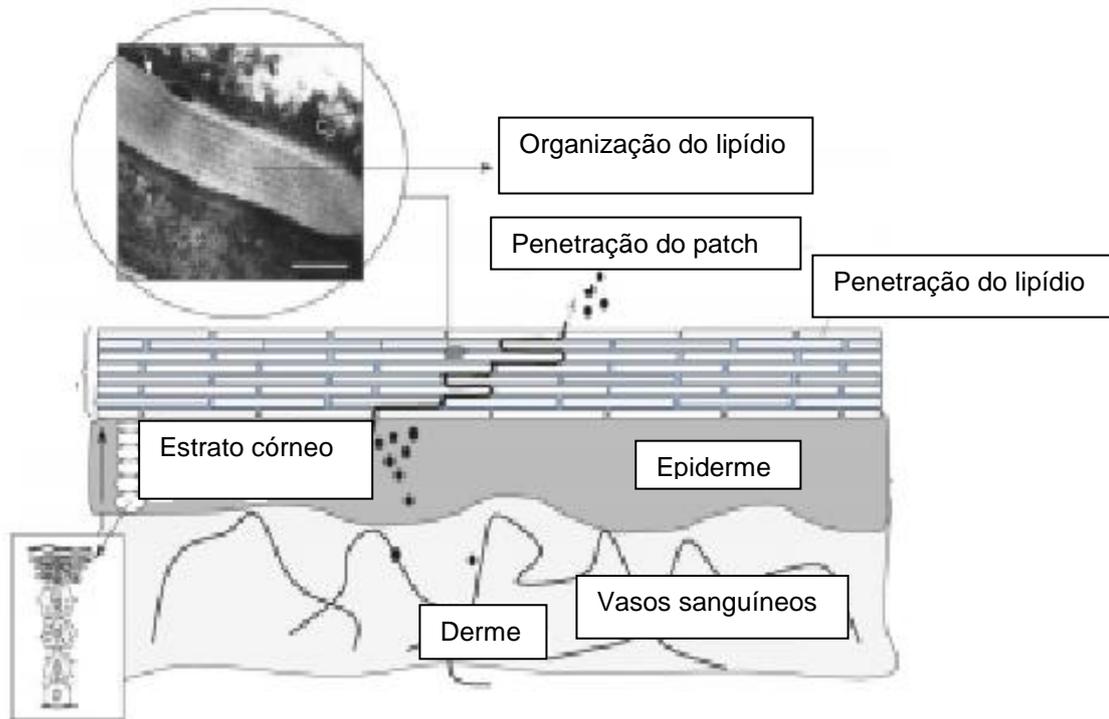


Figura 7. Esquema da constituição da pele.

Os sistemas de liberação controlada de medicamentos por via transdérmica, são denominados TDDS, patches, ou ainda *transdermal drug delivery*. Para o preparo deste tipo de medicamento, há necessidade de um suporte ou uma plataforma, onde a droga é adicionada, dissolvida ou dispersa. Essa plataforma deve aderir a uma determinada região da pele^{58; 59}.

CAPÍTULO II:

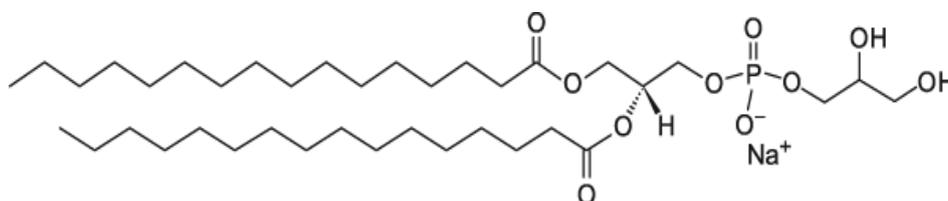
3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

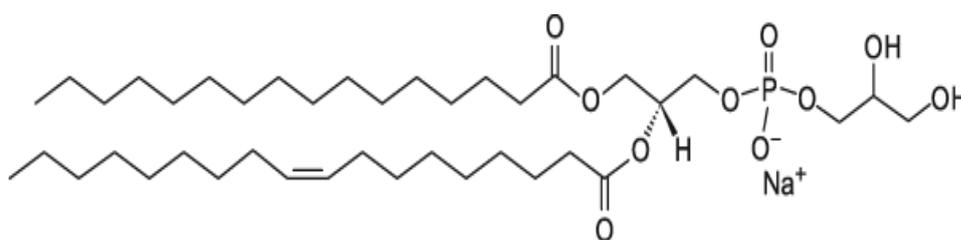
3.1.1. Fosfolipídios

Utilizaram-se os fosfolipídios, DPPG (Dipalmitoil fosfatidil glicerol) e POPG (Palmitoil oleil fosfatidil glicerol) adquiridos da Avanti Polar Lipids. Porém realizaram-se testes com os fosfolipídios DPPC (Dipalmitoil fosfatidil colina), e DPPE (Dipalmitoil fosfatidil etanolamina). Os fosfolipídios DPPG e POPG possuem carga negativa, enquanto que o DPPC e DPPE são neutros.

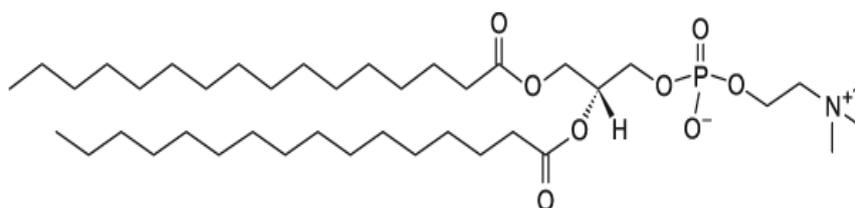
As Figuras 8a a 8d ilustram a estrutura química de cada um desses lipídios.



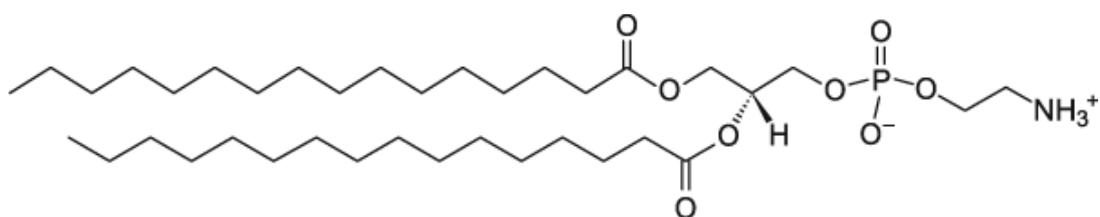
a)



b)



c)



d)

Figura 8. Estruturas químicas (a) DPPG, (b) POPG, (c) DPPC e (d)DPPE

3.1.2. Princípios ativos

Foram incorporados à estrutura de lipossomos, o extrato bruto de *Aloe vera*, adquirido junto à empresa Synthon (Brasil) na forma de pó liofilizado, e a Aloína tipo A (Sigma Aldrich).

3.1.3. Solventes e soluções

Utilizaram-se os solventes clorofórmio (Merck) e metanol (Qhemis) para a solubilização da Aloína e fabricação dos lipossomos.

A solução tampão fosfato salino (PBS), usada para hidratação para formação dos lipossomos, foi preparada utilizando uma mistura do sal fosfato bibásico de sódio (Na_2HPO_4) na concentração de 6 mmol/L e cloreto de sódio (NaCl) na concentração 150 mmol/L. O pH foi corrigido para 7,4, utilizando uma solução de fosfato de potássio 150 mmol/L.

3.2. Solubilização do extrato de *Aloe vera*

A *Aloe vera*, na forma de pó liofilizado, foi solubilizada em água ultrapura, fornecida por um sistema Milli-Q, a 0,010 mg/mL e, em seguida, colocada em banho ultrassônico por duas horas, com a temperatura controlada em 40°C. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação para retirada das fibras insolúveis, pois a solução apresentou-se muito viscosa.

3.3. Lipossomos e incorporação do extrato de *Aloe vera* e Aloína

A preparação de lipossomos seguiu o procedimento descrito por Lima e colaboradores⁶⁰. Foram dissolvidas quantidades suficientes de cada lipídeo (DPPG e POPG) na concentração de 1,0 mmol/L em clorofórmio/metanol (2:1 v/v). A *Aloe vera* (extrato bruto) e Aloína, foram preparadas em concentrações de 0,010 mg/mL, e $7,4 \cdot 10^{-4}$ mol/L, respectivamente. Posteriormente, cada solução foi colocada em tubo Falcon de 50 mL, sendo o solvente removido com vapor de N₂ para a obtenção de filmes lipídicos. Os filmes lipídicos foram hidratados com tampão fosfato, pH 7,4, e colocados em ultrassom por 4 horas para obtenção das vesículas.

Os filmes lipídicos preparados com o extrato bruto de *Aloe vera* foram hidratados com água Milli-Q, enquanto que os preparados com a solução de Aloína foram hidratados com tampão PBS. Todas as etapas foram realizadas a uma temperatura controlada de 40°C. Esta temperatura foi escolhida devido à temperatura de transição dos lipídeos. Nesta temperatura não ocorre degradação dos componentes da *Aloe vera* e, conseqüentemente, perda de atividade, pois os componentes da *Aloe vera* não suportam uma temperatura acima de 40°C. A temperatura de transição para os lipídeos DPPG e POPG são 41-60°C e 25-40°C, respectivamente.

A Figura 9 representa o esquema do preparo dos lipossomos sendo que numa primeira etapa, ocorre a adição de solventes orgânicos, clorofórmio e metanol e posteriormente, a adição das moléculas a serem incorporadas, bem como secagem com N₂ gasoso, seguida da hidratação e sonicação.

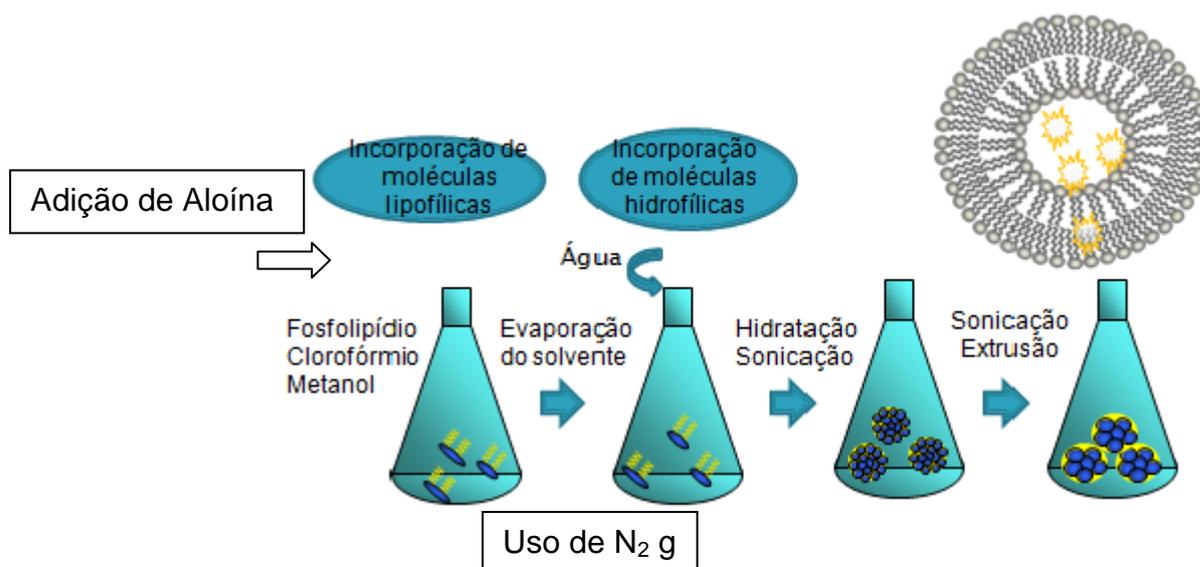


Figura 9. Representação esquemática da preparação dos lipossomos.

3.4. Limpeza dos substratos

As superfícies do substrato foram limpas através da técnica de hidrofilição^{7;}⁶¹, a qual se baseia na oxidação e dissolução de impurezas orgânicas e contaminantes metálicos. Neste método, os substratos de quartzo foram imersos numa solução de 1:1:5 (em volume) de hidróxido de amônio NH_4OH , peróxido de hidrogênio H_2O_2 , e de água ultrapura (Milli-Q) aquecida a uma temperatura de 75°C , permanecendo nesta solução por 10 / 15 minutos. Após este procedimento as lâminas foram retiradas e lavadas em abundância com água ultrapura.

Na segunda etapa da limpeza, foi preparada uma solução de 1:1:6 de ácido clorídrico HCl , peróxido de hidrogênio H_2O_2 , e água ultrapura, Milli-Q, respectivamente, foi aquecida até 75°C e as lâminas foram imergidas durante 10-15 minutos, em seguida foram lavadas em abundância com água ultrapura e secas com nitrogênio gasoso.

3.5. Preparação dos filmes automontados

Os filmes automontados foram confeccionados sobre um substrato de quartzo, previamente hidrofílicizado, como descrito no item 3.4. Inicialmente, um filme precursor, de duas bicamadas, dos polieletrólitos PEI (poli-etileno imina) e PVS (polivinil sulfonato) foi fabricado, a fim de diminuir os efeitos do substrato de quartzo na formação dos filmes de lipossomos. As concentrações dos polieletrólitos foram 1 mg/mL e os tempos de deposição foram de 10 min para o PEI, 30 s em água Milli-Q para lavagem, 10 min em PVS e novamente 30 s de lavagem.

Após a deposição do filme precursor, iniciou-se a deposição dos filmes de PEI/lipossomo contendo o material de interesse incorporado.

A Figura 10 ilustra a interação entre os lipossomos e os polieletrólitos para a formação do filme, enfatizando a atração entre os lipossomos e a camada de polieletrólito a repulsão entre os lipossomos.

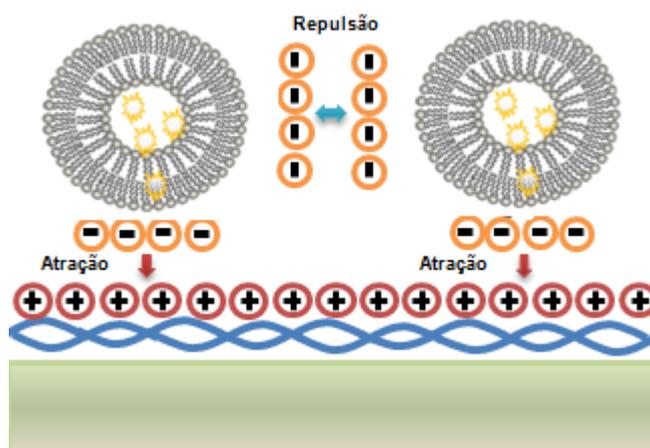


Figura 10. Representação esquemática da interação eletrostática entre o filme e lipossomos.

3.6. Liberação *in vitro*

A liberação dos lipossomos foi feita de duas maneiras. Na primeira delas foi utilizada uma solução contendo Aloína e o lipossomo DPPG. Na segunda, foi utilizada Aloína e o lipossomo POPG. O uso de lipossomos permite a incorporação

de moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas, além de favorecer a imobilização nos filmes, proteger o fármaco e a biocompatibilidade com a pele.

O processo de liberação das soluções de Aloína (extrato) e desta incorporada aos lipossomos foi feito colocando 2 mL de solução de tampão PBS na membrana de diálise com porosidade de 25Å (que permite a passagem apenas das moléculas de aloína) e, posteriormente, essa membrana foi imersa num béquer com 50 mL da solução tampão PBS em pH 7,4 em 36,5 °C sob agitação. A intensidade de emissão de Aloína foi monitorada nas partes interna e externa da membrana de diálise por espectroscopia de fluorescência, usando como comprimento de onda de excitação em 270 nm nos tempos de 2, 4, 8, 12, 24 e 48 h, com a finalidade de determinar o período de liberação do princípio ativo, Aloína e, conseqüentemente para determinação de uma posologia mais adequada. A solução tampão foi trocada após cada medida. A Figura 11 ilustra esse procedimento.



Figura 11. Aparato para a análise da liberação de Aloína incorporada em lipossomos.

A avaliação dos filmes foi feita utilizando-se tubos eppendorf com 2 mL da solução tampão, de que trocava-se o filme de tubo nos tempos determinados, utilizando-se as mesmas condições em que realizou-se a liberação dos lipossomos e, ao mesmo tempo, a liberação do fármaco foi verificada medindo-se a intensidade de emissão de fluorescência das soluções resultantes da adição do filme na solução tampão nos tempos pré determinados, dos tubos eppendorf, através de espectrofluorímetro. O esquema da liberação dos filmes está ilustrado na figura 12.



Figura 12. Esquema da liberação controlada a partir dos filmes LbL.

A liberação de fármaco '*in vitro*' serve para avaliar o perfil de liberação da quantidade de fármaco por unidade de tempo. Estudos *in vitro* permitem um controle qualitativo do material a ser liberado, e fornecem informações para posteriores testes *in vivo*, como em animais e, conseqüentemente, estudos clínicos²; ⁷. Os estudos *in vitro* reduzem o número de amostras para estudos *in vivo*; os métodos mais utilizados para estudos *in vitro* são:

- Células de difusão, consistindo de compartimentos de doadores e receptores separados por membranas artificiais ou biológicas;
- Difusão através de membrana de diálise;
- Diálise reversa;
- Ultracentrifugação;
- Ultrafiltração centrífuga.

Com a finalidade de o método ser bem sucedido, as condições experimentais devem simular ao máximo as condições *in vivo*, como temperatura próxima à temperatura fisiológica (36,5°C), meio de dissolução com pH adequado e isotonicidade. A metodologia preconiza que o fármaco não exceda em 10% a sua concentração de saturação⁷.

4. EQUIPAMENTOS

O crescimento dos filmes foi acompanhado por espectroscopia de UV-visível e fluorescência. Esses experimentos foram feitos utilizando um espectrofotômetro Termo Scientific, modelo Genesys 6, e um espectrofluorímetro da marca Hitachi, modelo FL 4500.

Na preparação dos lipossomos foi usado um ultrassom Unique Maxclean.

CAPÍTULO III

5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

5.1. Espectroscopia

A espectroscopia é um método analítico o qual se baseia na análise da interação eletromagnética com a matéria, tendo como finalidade a observação das transições entre níveis de energia de um determinado material, mediante a absorção, emissão ou espalhamento de radiação⁶².

Diferentes interações dependem da região do espectro de frequências da radiação incidente. Essa região utiliza como base os tipos de transições envolvidos que podem ser: vibracional, eletrônico e rotacional (este ocorre somente no estado gasoso). Em geral, as transições eletrônicas dos elétrons mais distantes do núcleo são encontradas na região que varia entre o ultravioleta e o visível, enquanto que as transições vibracionais são geralmente registradas na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas e infravermelho longínquo⁶³.

A investigação de cada uma dessas transições é dependente da técnica espectroscópica empregada mas, de um modo geral, pode-se dizer que os fenômenos mais relevantes de interação da luz com a matéria são a absorção e emissão de fótons. Neste sentido, foca-se especificamente nas técnicas de absorção eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-vis) e de fluorescência.

5.2. Espectroscopia de absorção na região Uv-vis

Neste tipo de espectroscopia, a radiação eletromagnética incidente pode chegar a uma variação no comprimento de onda de 400 nm até 750 nm abrangendo, assim, toda a região da luz ultravioleta e visível ⁶³.

As transições eletrônicas ocorrem devido à absorção da radiação incidente, através da excitação de elétrons encontrados no estado fundamental da camada de valência para estados de maior nível energético. Todavia, esse estágio de maior nível energético (estado excitado) é relativamente instável, e o elétron acaba liberando a energia absorvida em forma de fótons de luz retomando, assim, o seu estado fundamental ^{62;63}.

A ocorrência da absorbância nesse tipo de espectroscopia pode ser descrita pela lei de Beer – Lambert a qual propõe que a intensidade da luz incidente (I_0) é constante em cada comprimento de onda característico e, com isso, a intensidade da radiação transmitida diminui gradativamente com a deposição do material medido, aumentando, assim, a intensidade da luz absorvida pelo material (I_a). Essa lei pode ser representada pela seguinte equação, na qual a grandeza absorbância é representada pela letra A ⁶³:

$$A = \text{Log}_{10} (I_0/ I_t)$$

Devido ao fato de os materiais serem formados por diferentes arranjos e/ou elementos químicos, estes podem apresentar bandas de absorbância diferentes, pois estas diferenças citadas influenciam diretamente no comprimento de onda da radiação absorvida. Sendo assim, o método de espectroscopia de UV-vis mostra-se bastante útil na caracterização dos diferentes tipos de materiais ⁶².

5.3. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica amplamente utilizada para o estudo estrutural de macromoléculas como proteínas e polímeros. Esta técnica se baseia na propriedade de determinadas moléculas, chamadas fluoróforos, emitirem luz devido às transições eletrônicas de um estado excitado (alta energia) para um

estado de menor energia. A fluorescência é um processo relaxativo radiante muito rápido (10^{-6} a 10^{-9} s), a partir de moléculas no estado excitado. O tempo de vida relativamente pequeno, em torno de menos de 10^{-5} s, de uma molécula no estado excitado singlete se deve ao fato de o pareamento de spins ser favorável à sua desativação para o estado singlete fundamental. A transição de energias do estado excitado singlete para o fundamental é mostrada na forma do espectro de fluorescência⁵⁶.

As mudanças na conformação desses fluóroforos induzem resultados específicos no espectro de fluorescência, no deslocamento rápido de emissão ou no rendimento quântico. Além da mudança conformacional, outros fatores também interferem no espectro de fluorescência como concentração, pH, e solvente.

A linearidade e/ou não linearidade da intensidade de fluorescência podenser relacionada com a concentração, e explicada de acordo com a equação abaixo:

$$F=K'(I_0-I)$$

Onde a intensidade de emissão fluorescente F é proporcional à intensidade do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema, sendo I_0 e I as intensidades do feixe incidente, e após atravessar uma distância x do meio, respectivamente. O termo K' é uma constante dependente da eficiência quântica do processo de fluorescência. Relacionando-se F com a concentração da espécie fluorescente c tem-se aplicando a Lei de Beer:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon xc}$$

Onde ϵ é a absorvidade molar das moléculas fluorescentes e ϵxc é a absorbância.

Sendo assim, o espectro de emissão de fluorescência em função da concentração deveria ser linear para concentrações baixas e, quando a concentração torna-se maior suficiente para uma absorbância maior que 0,05, a linearidade é perdida. Outros fatores responsáveis pelo desvio da linearidade de

intensidade fluorescente com a concentração do fluoróforo são a autoabsorção e a autossupressão.

A autoabsorção ocorre quando o comprimento de onda de emissão se sobrepõe a um pico de absorção, em que a fluorescência diminui à medida que a emissão atravessa a solução e é reabsorvida por outras moléculas fluorescentes. A autossupressão, por sua vez é originada pelas colisões entre as moléculas excitadas, com transferência de energia, a qual pode ser aumentada com o aumento da concentração, devido à maior probabilidade de ocorrência de colisões ²⁷.

A fluorescência de um composto depende de sua estrutura molecular e está quase sempre associada ao sistema eletrônico π . Os elétrons envolvidos numa ligação σ estão fortemente ligados à molécula, sendo necessário fornecer mais energia para levar os elétrons a ocuparem um orbital vazio. Os elétrons π estão mais disponíveis que os elétrons σ .

Alguns fatores externos passíveis de influenciar a emissão de fluorescência são: a temperatura, efeitos dos substituintes e o solvente. Um aumento de temperatura se traduz num aumento da probabilidade de colisões no estado excitado aumentando as conversões internas e, conseqüentemente levando a uma diminuição na fluorescência.

Em relação aos substituintes, os grupos doadores de elétrons aumentam a eficácia de emissão de fluorescência, enquanto que os retiradores de elétrons reduzem a intensidade de fluorescência.

As interações soluto-solvente podem também afetar a intensidade de fluorescência, sendo que o grau de perturbação depende do pH, solvatação, possibilidade de formar ligações de hidrogênio, viscosidade, força iônica e polaridade dos solventes.

CAPÍTULO IV

O capítulo IV apresenta os resultados e discussão referentes ao desenvolvimento do trabalho.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização da *Aloe vera* e Aloína

A Figura 13 mostra os espectros de absorção UV e de emissão de fluorescência para a solução aquosa do extrato bruto de *Aloe vera* em pH 5,8 na concentração de 0,010 mg/mL. No espectro de absorção, é observada uma banda larga com máximo em 280 nm, que pode ser atribuída aos resíduos de triptofano e fenilalanina presentes nas proteínas constituintes do extrato bruto da *Aloe vera*^{64; 65}.

*Gu e colaboradores*⁶⁴ observaram que o perfil característico das bandas obtidas por espectroscopia de UV da *Aloe vera* é variável de acordo com a temperatura, pH e concentração dos componentes do extrato. Os autores constataram que a banda de absorção em pH neutro e em temperatura ambiente é bem definida e com o máximo em torno de 290 nm. Com a variação de pH na faixa entre 3,8-5,0 e em soluções tampão PBS, a banda de absorção tem o máximo ao redor de 420 nm, enquanto que, com o aumento do pH para 5,4, a banda tem o máximo em 530nm. Esse resultado pode ser explicado pela ionização de prótons existentes na fórmula química do princípio ativo da planta.

O espectro obtido para o extrato de *Aloe vera* com a banda alargada e com o máximo deslocado para 280 nm mostra que ele não se refere à uma substância pura e sim é característica de uma somatória de componentes presentes na planta. O extrato de *Aloe vera* possui muitos componentes como glicoproteínas, barbaloina ou aloína, emodim, acemanam, além de polissacarídeos. Sendo assim, devido à

diversidade de componentes, observam-se diversas variações em relação às bandas de absorvância que provocam esse deslocamento e alargamento da mesma.

O espectro de emissão de fluorescência para o extrato, também mostrado na Figura 13 fornece uma banda intensa com comprimento de onda característico em 345 nm, correspondente a transição do estado excitado para o estado fundamental. Outras bandas com menor intensidade podem ser observadas acima de 400 nm e foram atribuídas as demais substâncias presentes no extrato. A solução foi excitada em 280 nm, no mesmo comprimento de onda do máximo de absorção. De acordo com a literatura, os comprimentos de onda de emissão podem variar em torno de 312, 340, 380 e 440 nm ⁶⁴. Essa variação pode ser explicada pela mistura de diversos compostos existentes no extrato de *Aloe vera*.

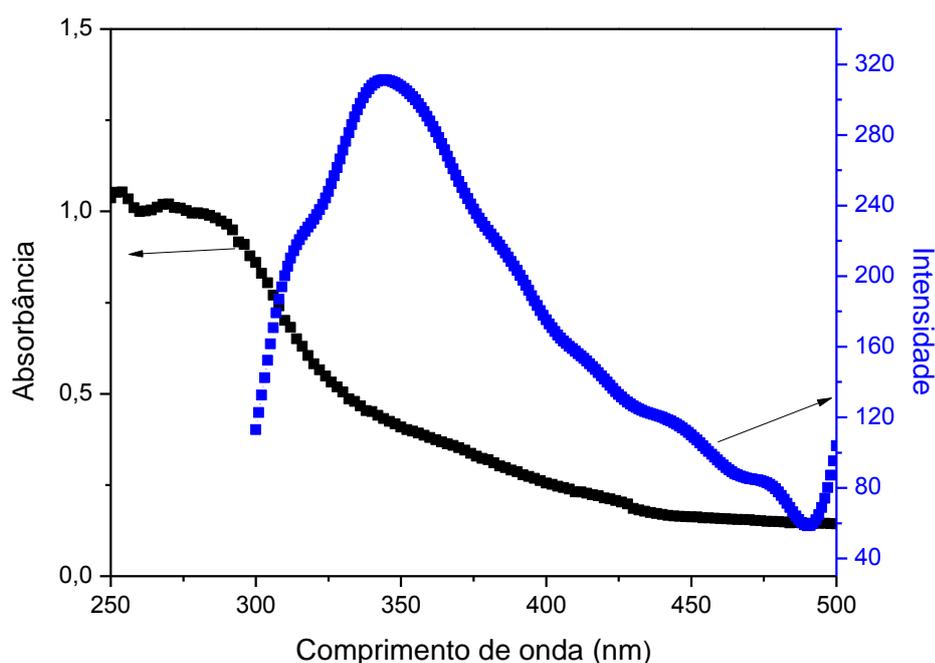


Figura 13. a) Espectro de absorção de UV da solução aquosa de *Aloe vera* na concentração de 0,010mg/mL; b) espectro de emissão de fluorescência da solução aquosa de *Aloe vera* na concentração de 0,010 mg/mL, $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Um estudo sistemático também foi feito com a finalidade de determinar o lipídio mais adequado para a confecção dos lipossomos e posterior incorporação do fármaco (*Aloe vera*). Para isso foram utilizados quatro tipos de lipídios que diferem nas suas estruturas, pela posição das duplas ligações e pela carga, conforme ilustrado nas Figuras 8a a 8d (página 26). Os lipídios testados foram DPPC e DPPE (neutros) e DPPG e o POPG (carregados negativamente). Os estudos foram feitos através da incorporação da *Aloe vera*, na presença e ausência dos lipídios e a caracterização foi feita através das medidas de espectroscopia de absorbância e fluorescência.

A Figura 14 mostra os espectros de absorção da solução aquosa de *Aloe vera* e dela incorporada nos lipossomos fabricados a partir de DPPG e POPG.

Os espectros obtidos com os lipossomos fabricados com DPPE e DPPC não mostraram resultados satisfatórios, uma vez que não foram observadas as bandas de absorção da *Aloe vera* e, por esse motivo, não estão apresentados aqui. Acredita-se que esses resultados negativos sejam devido à grande variedade de compostos presentes no extrato bruto, como aminoácidos, vitaminas, saponinas, resinas e antraquinonas, dentre outras substâncias. Outro fator relevante é a carga dos lipídios, uma vez que o DPPG e POPG possuem carga negativa, o que pode facilitar a interação da solução aquosa do extrato de *Aloe vera*.^{55; 65}.

Na figura 14 observa-se um aumento da intensidade de absorbância da *Aloe vera* na presença dos lipossomos, devido ao espalhamento da luz ocasionado pelos lipídios. A presença dos lipídios não ocasionou um deslocamento da banda de *Aloe vera* em relação à solução aquosa pura, sendo que a banda característica para a solução pura e na presença dos lipossomos está em 280 nm. Ressalta-se ainda que a solução contendo *Aloe vera* e o lipossomo fabricado com POPG foi diluída na proporção 1:2 v/v para que houvesse uma visualização mais adequada.

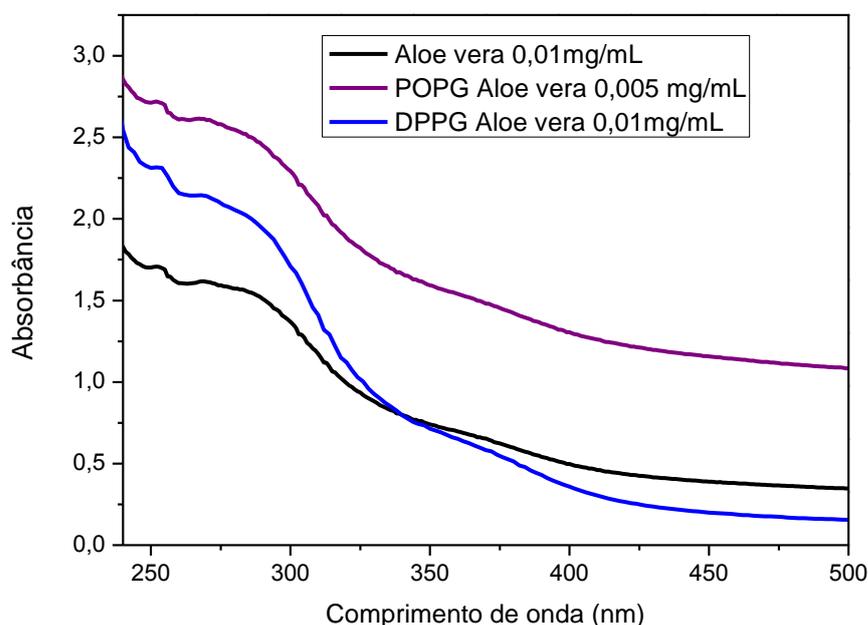


Figura 14. Espectro de absorção da solução aquosa de *Aloe vera* a 0,01 mg/mL, *Aloe vera* na presença do lipídio POPG 0,005 mg/mL e *Aloe vera* na presença do lipídio DPPG 0,01 mg/mL.

A Figura 15 mostra os espectros de emissão de fluorescência da solução aquosa de *Aloe vera* e dela incorporada nos lipossomos fabricados com os lipídios DPPG e POPG. A banda larga de emissão vista nos espectros é atribuída aos componentes do extrato de *Aloe vera* citados anteriormente. Após a incorporação do extrato nos lipossomos, ocorreu um aumento considerável na intensidade da banda de emissão em relação ao extrato bruto. Esse aumento pode ser explicado porque os lipossomos oferecem um microambiente mais protegido para o extrato, ou seja, desativam o processo de transferência de energia não radiativa entre as moléculas do extrato de *Aloe vera* por deixarem-nas mais distantes umas das outras. Com perda de energia, aumenta-se a probabilidade de o elétron decair de um estado excitado para o estado fundamental o que é refletido no aumento da intensidade de fluorescência⁷.

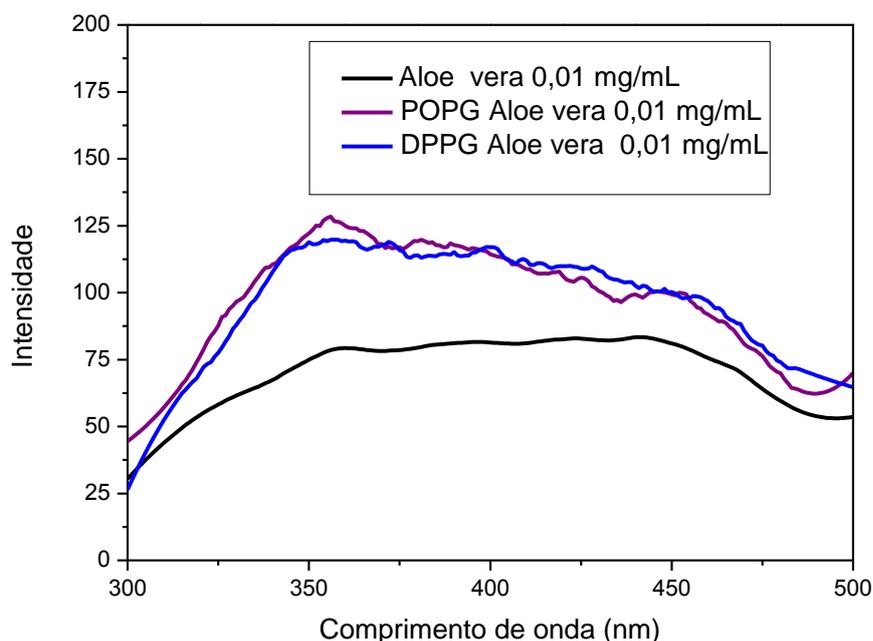


Figura 15. Espectro de fluorescência dos lipossomos confeccionados com os lipídios DPPG e POPG $\lambda_{exc}=280$ nm.

Relacionado com a incorporação do extrato aquoso de *Aloe vera* em lipossomos. Após esse estudo, a fase seguinte consistiu em preparar os filmes automontados do extrato, bem como da inclusão dele nos lipossomos. Porém, os resultados não foram satisfatórios uma vez que os espectros mostraram um crescimento desordenado das bicamadas e, por esse motivo, não serão apresentados. Esse fato pode ser explicado uma vez que o extrato de bruto contém muitas substâncias diferentes, como mencionado na página 39. As diferentes substâncias presentes dificultam o crescimento do filme devido às diferentes interações que podem ocorrer simultaneamente. Assim, optou-se por utilizar uma substância pura existente no extrato, a Aloína, obtida comercialmente e de alta pureza. A partir daqui, todos os resultados são referentes a esse composto.

A Figura 16 mostra o espectro de absorção da solução aquosa de Aloína na concentração de $7,5 \cdot 10^{-4}$ M e também da Aloína, nesta mesma concentração, incorporada nos lipossomos fabricados com DPPG e POPG. O espectro fornece bandas com comprimentos de onda máximos em 270 nm, 300 nm e 370 nm. As

bandas foram atribuídas da seguinte maneira: 269 nm referentes aos grupos OH (hidroxilas) e C= O (cetonas), 296nm grupos CH₂OH (metanol), enquanto que em 354nm devido à presença de glicose.^{64; 65}.

Após a inclusão da Aloína nos lipossomos, ocorreu um aumento considerável na banda de absorção em relação à Aloína em solução aquosa. Esse aumento pode ser explicado pelo fato de os lipossomos oferecem um microambiente mais protegido para o fármaco, ou seja, desativam o processo de transferência de energia não radiativa entre as moléculas da Aloína por deixarem-nas mais distantes umas das outras.

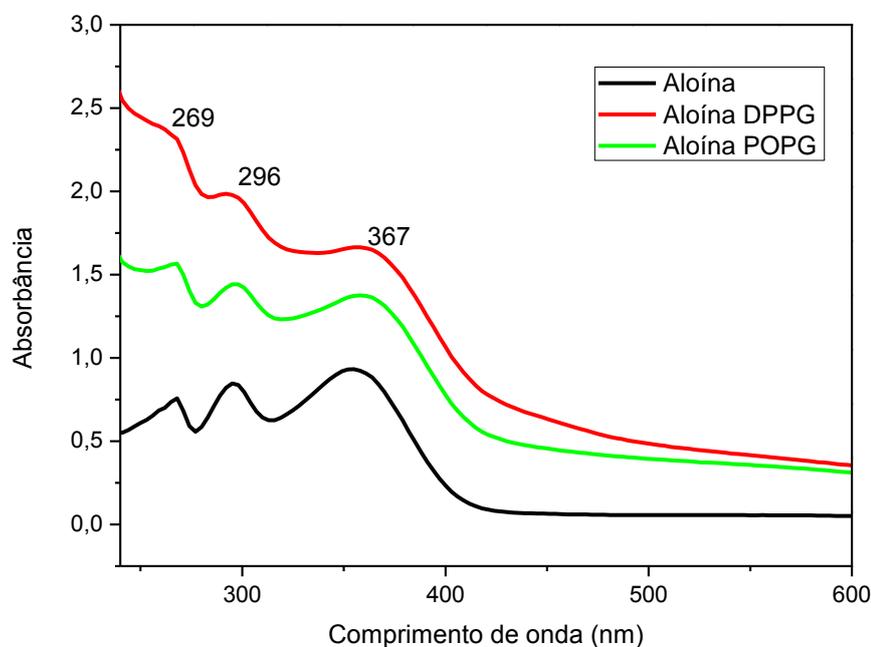
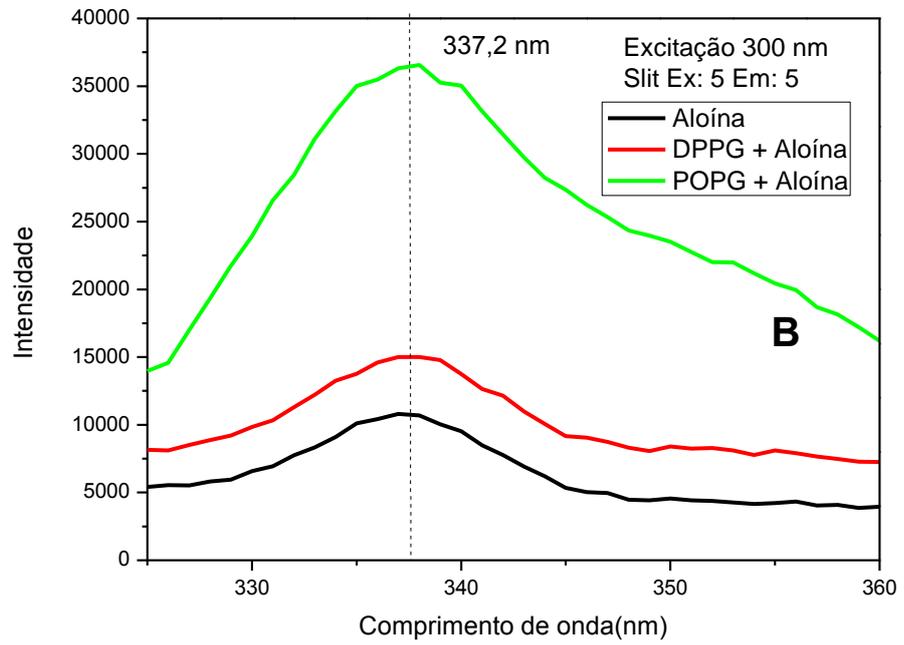
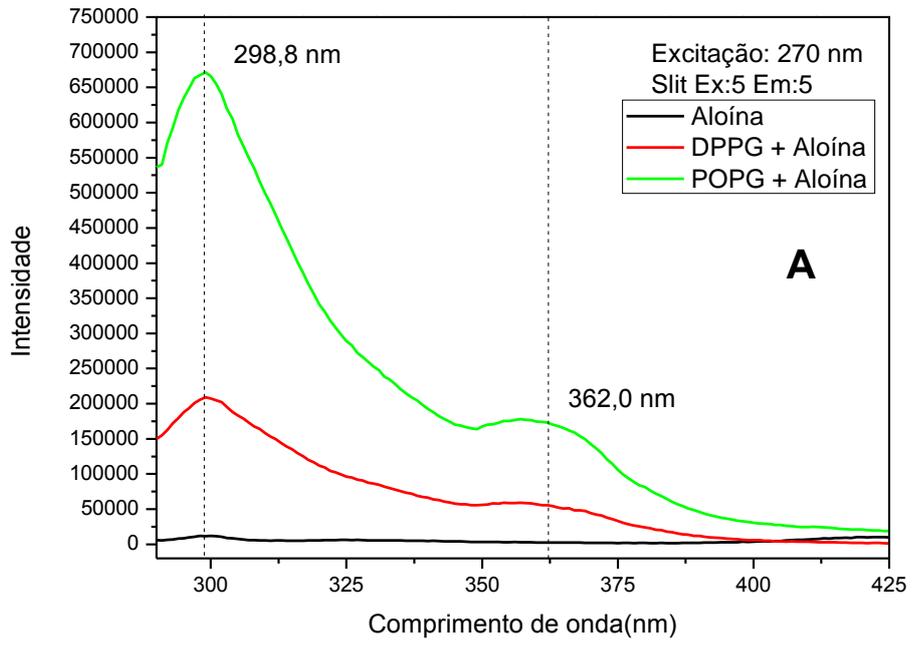


Figura 16. Espectros de UV-vis da solução aquosa de Aloína $7,4 \cdot 10^{-4}$ M e Aloína em lipossomos DPPG e POPG .

Os espectros de fluorescência para a Aloína pura em solução tampão e incorporada nos lipossomos estão mostrados nas Figuras 17 a, b e c. As soluções foram excitadas nos comprimentos de onda de 270, 300 e 370 nm. Esses valores foram escolhidos por serem os máximos de absorção (ver Figura 16).

O espectro de emissão, com excitação em 270 nm, para a Aloína pura fornece uma banda pouco intensa com máximo comprimento de onda em 300 nm, correspondente à transição do estado excitado para o estado fundamental. Quando a excitação foi feita em 300 nm o espectro de emissão para a Aloína pura apresenta uma banda mais intensa e definida em 337 nm, também devido à transição do estado excitado para o fundamental. Duas bandas também aparecem quando as soluções foram excitadas em 370 nm.

Os estudos de fluorescência para observar a inclusão da Aloína nos lipossomos DPPG e POPG mostraram uma alteração significativa na emissão do fármaco após sua incorporação. Os espectros do fármaco incorporado nos lipossomos, em solução tampão, no comprimento de onda de excitação de 270 nm mostram para o espectro de Aloína pura em solução uma banda com pouca intensidade quando comparada às bandas na presença do lipossomo. Isso pode ser explicado pelo fato de a Aloína, quando incorporada em lipossomos, estar menos agregada e, por isso, emitir com maior intensidade. Quando livre em solução ela pode estar agregada, ou seja, o ambiente aquoso não é um ambiente favorável para a Aloína livre, sendo que os lipossomos favorecem um ambiente melhor. Na presença dos lipossomos, aparece uma nova banda em 362 nm que é atribuída à emissão dos lipídios puros, de acordo com os estudos de *Geraldo*⁷. Ressalta-se que os fosfolipídios não emitem, pois não apresentam grupos cromóforos; porém, essa emissão observada deve estar associada a algum material fluorescente que provém da sílica usada para purificar os fosfolipídios. Os espectros obtidos com a excitação em 300 nm e em 370 nm também mostram o aumento da emissão na presença dos lipídios. Os espectros de emissão, com excitação em 370 nm, também mostram a presença de uma nova banda, porém, nenhum estudo foi feito para saber se ela é devida à presença dos lipídios, como discutido para os espectros excitados em 270 nm.



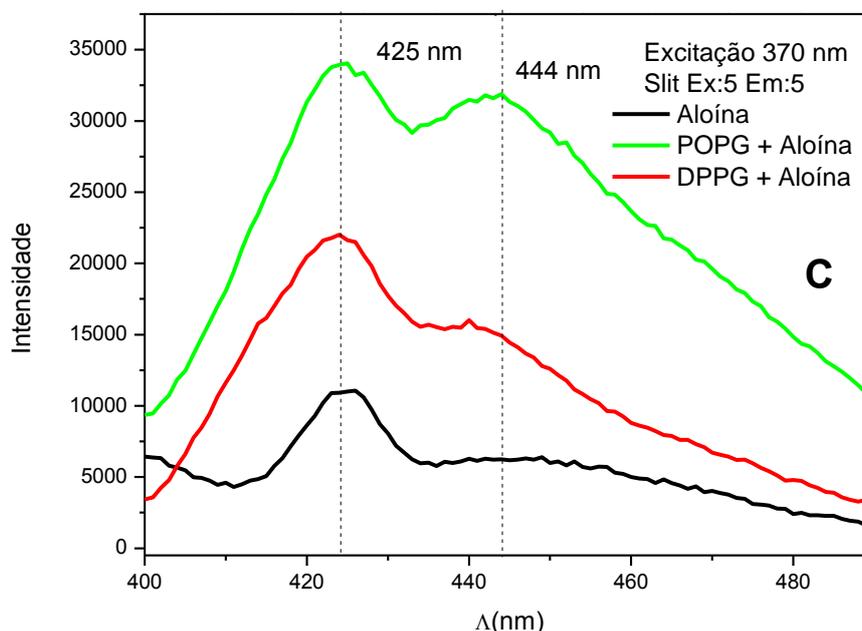


Figura 17. Espectros de emissão de fluorescência das soluções contendo Aloína, com λ_{exc} de: 270nm (a), 300 nm (b) e 370 nm (c).

Efeito similar foi observado por Alves e colaboradores⁵⁴ que analisaram o comportamento da Aloína e Aloe emodim em vesículas de fosfolípidios. Eles utilizaram a fluorescência para avaliar a inclusão destes analitos nas vesículas. A intensidade de emissão de fluorescência após a incorporação da Aloína também aumentou, mostrando que essas estruturas, as vesículas e os lipossomos, desativam o processo de transferência de energia entre as moléculas da Aloína⁵⁴. Geraldo observou efeito semelhante, em que a incorporação de ibuprofeno nos lipossomos favoreceu o aumento da intensidade de fluorescência de maneira significativa⁷.

A Figura 18 mostra uma tabela em que se relaciona a intensidade de emissão das soluções nos diferentes comprimentos de onda de excitação, 270, 300 e 370 nm. As intensidades máximas foram utilizadas para calcular a liberação controlada das soluções e filmes, para determinar o tempo de decaimento de cada experimento realizado para a liberação, as quais serão discutidas nos itens 6.3.1 e 6.3.2, com a finalidade de utilizá-las

Intensidade	Excitação 270nm Intensidade	Excitação 300nm Intensidade	Excitação 370nm Intensidade
Solução Aloína	33063	49988	27020
DPPG + Aloína	28681	95397	15917
POPG + Aloína	46011	190909	22179

Figura 18. Tabela 1. Relação da emissão das soluções de Aloína, DPPG + Aloína e POPG + Aloína nos comprimentos de onda de 270, 300 e 370 nm.

6.2. Crescimento dos filmes de Aloína , DPPG + Aloína, POPG + Aloína

As Figuras 19 a e 19 b ilustram o crescimento do filme de Aloína, juntamente com o polieletrólito PEI sobre o substrato de quartzo, utilizando tampão PBS em pH de 7,4. O tampão neste pH foi utilizado para simular a membrana celular. Da figura, pode-se concluir que as bandas de absorção para a Aloína no filme não estão bem definidas, como para o espectro de solução. Isso se deve à baixa absorção das bicamadas em virtude da espessura. Cada bicamada tem uma espessura da ordem de 1 nm^{-1} . As bandas são alargadas e com máximo de absorção em 260 nm, 310 nm e 460 nm. Esses valores estão deslocados em relação ao espectro da Aloína em solução apresentado na Figura 16, fato que ocorre devido à presença de agregados nos filmes LbL³⁶.

A Figura 19 b mostra o crescimento do filme, monitorado por UV-vis, fixando o comprimento de onda em 260 nm. Observa-se grande dispersão nos pontos referentes ao crescimento, que pode ser justificada pelas propriedades da molécula de Aloína, ou seja, possui três anéis aromáticos, o que lhe confere caráter instável e propriedades anfífilas. Estas propriedades favorecem o crescimento desordenado, pois o crescimento de filmes LbL se baseia, principalmente, em interações eletrostáticas entre polieletrólito e molécula a ser imobilizada. Sendo assim, a Aloína, por ser anfífila, pode interagir eletrostaticamente com o polieletrólito ou não, ou seja, pode ocorrer ou não adsorção nas camadas, o que implica crescimento irregular.

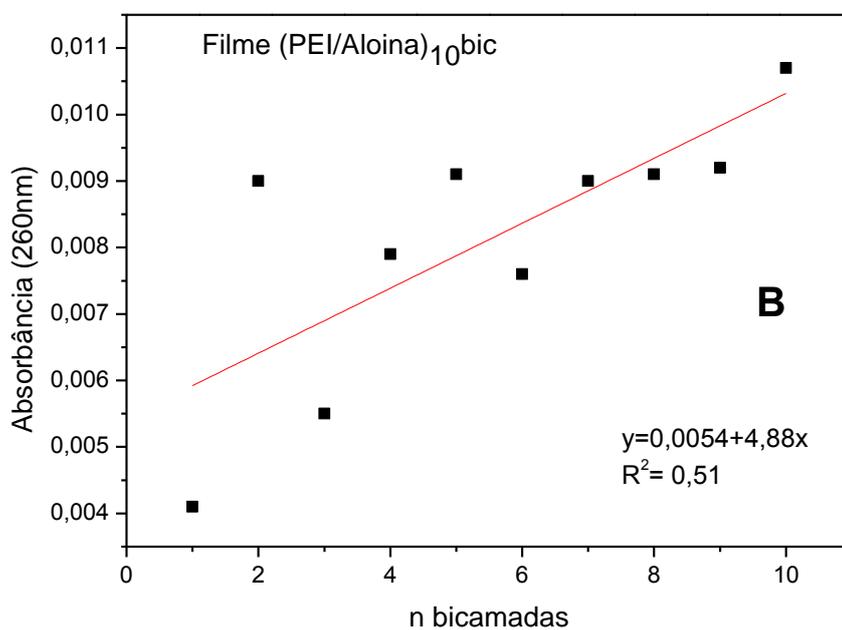
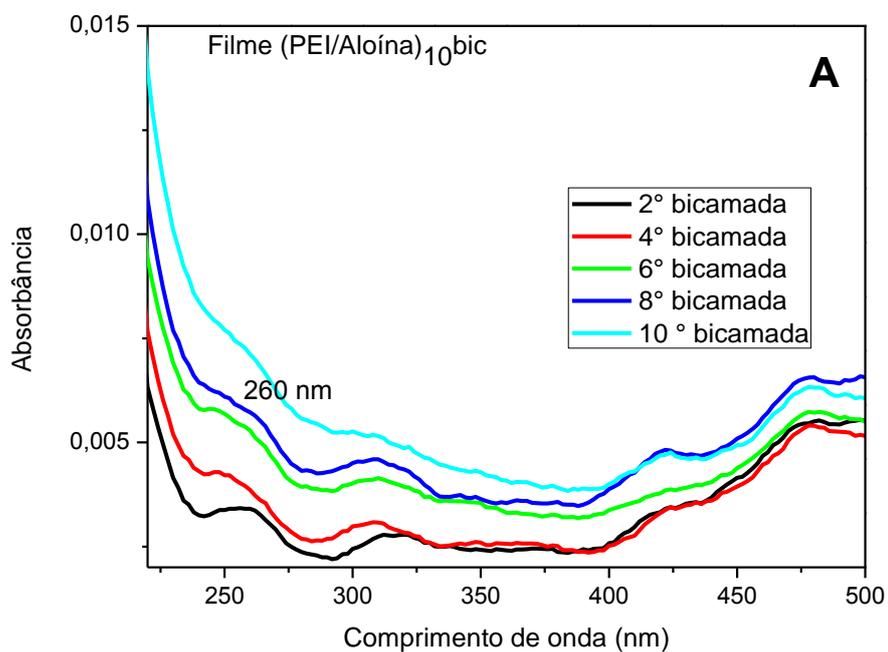
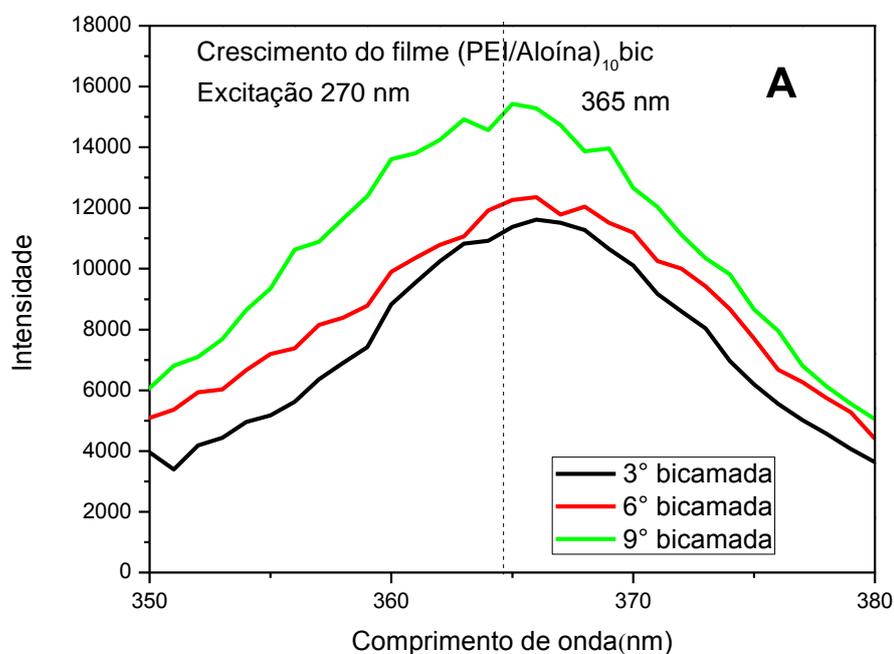


Figura 19. a) Espectros de absorção UV-vis para diferentes números de bicamadas para o filme (PEI/Alóina)₁₀ b) Absorbância *versus* número de bicamadas para o filme (PEI/Alóina)₁₀ em $\lambda= 260$ nm.

As Figuras 20 a, b e c mostram os espectros de fluorescência para o crescimento do filme LbL, cujas camadas são formadas por PEI e Aloína. O crescimento foi acompanhado nos comprimentos de onda de excitação em 270, 300 e 370 nm.

O crescimento observado, utilizando a excitação em 270 nm mostrou a banda referente à Aloína com um deslocamento de 362 para 365 nm. A intensidade de emissão é praticamente constante após a adição de mais bicamadas, enquanto que quando se usou excitação em 300 nm ocorreu um deslocamento de 337,2 para 334 nm e apareceu uma banda em 362 nm a qual é referente à emissão da Aloína. O crescimento analisado usando excitação em 370 nm mostrou bandas alargadas e não tão intensas, ocorrendo um deslocamento de 425 para 426; e a banda em 444 nm, que aparece na solução da figura 17 c, não foi observada.

De modo geral, os espectros de fluorescência nas diferentes excitações mostraram o crescimento do filme de Aloína e PEI, a partir dos quais se observou que a intensidade de emissão é constante, mesmo com a adição de mais bicamadas, mostrando que ocorreu imobilização da Aloína no filme LbL.



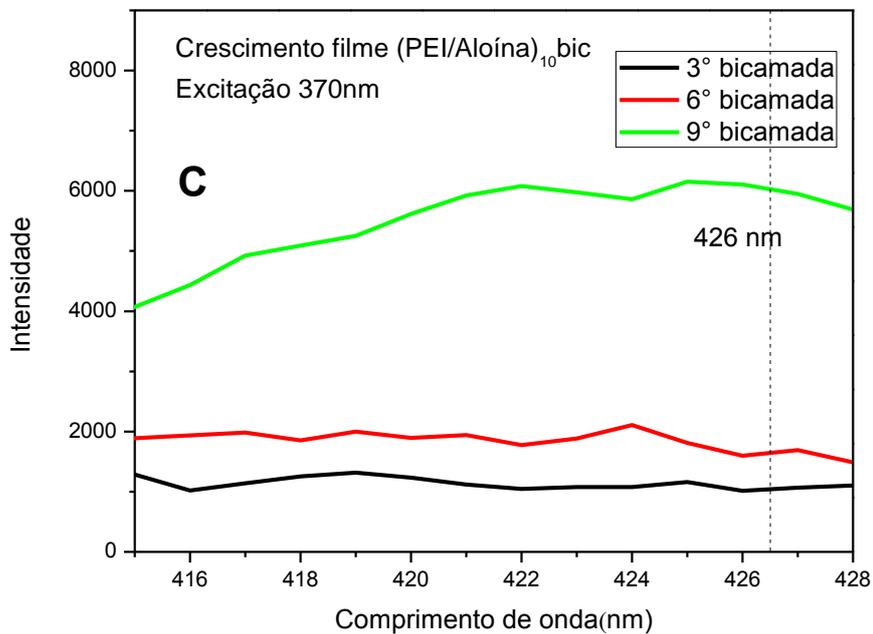
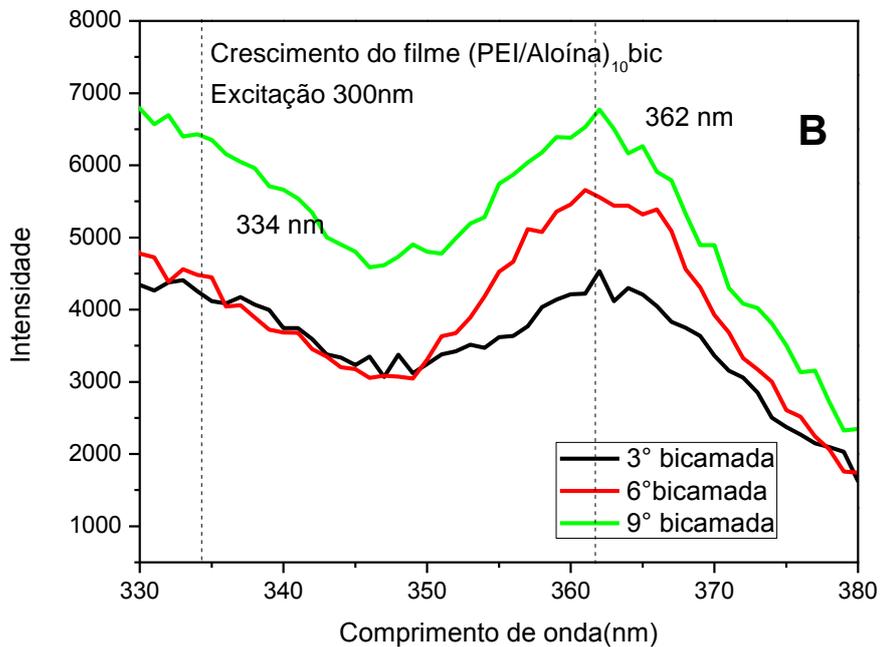
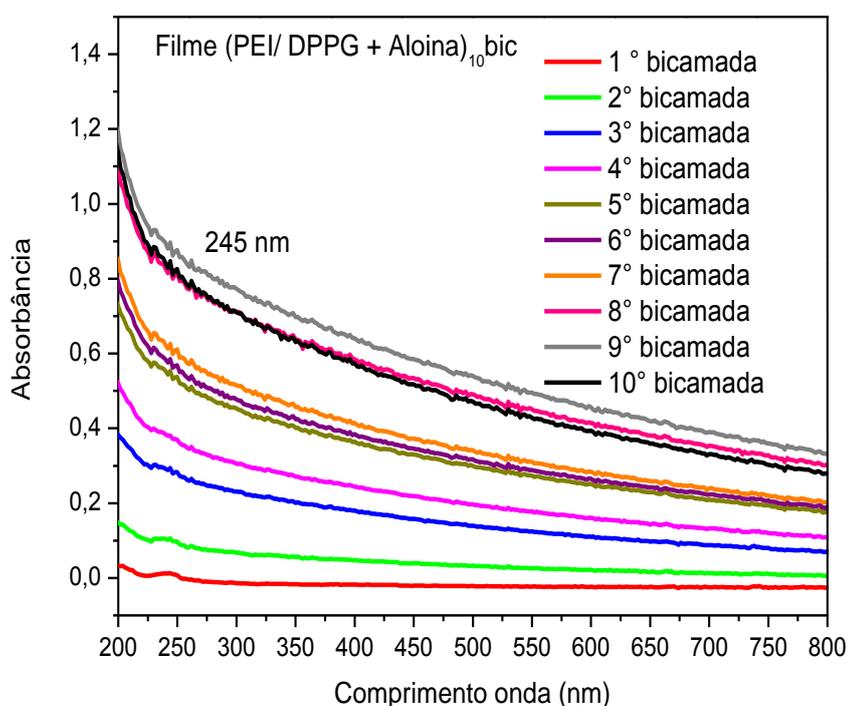


Figura 20. Espectros de emissão de fluorescência do crescimento do filme PEI + Aloína, usando λ_{exc} 270 (a), 300 (b) e 370 (c) nm.

As Figuras 21 a e 21 b ilustram o crescimento do filme através de espectroscopia de fluorescência usando o sistema PEI/DPPG + Aloína. Na figura 21 b, observa-se que houve um crescimento linear, satisfatório para filmes do tipo LbL. O coeficiente de correlação foi de 0,963, indicando que os lipossomos foram imobilizados com sucesso no filme na presença da Aloína. A banda observada para Aloína incorporada nos lipossomos foi em torno de 245 nm, visível apenas nas bicamadas iniciais, enquanto que a banda observada no filme apenas com a substância pura foi em torno de 266 nm. Esse fato pode ser explicado pelo espalhamento de luz que ocorre quando a Aloína está incorporada nos lipossomos, fato que favorece a diminuição da absorção ⁷.



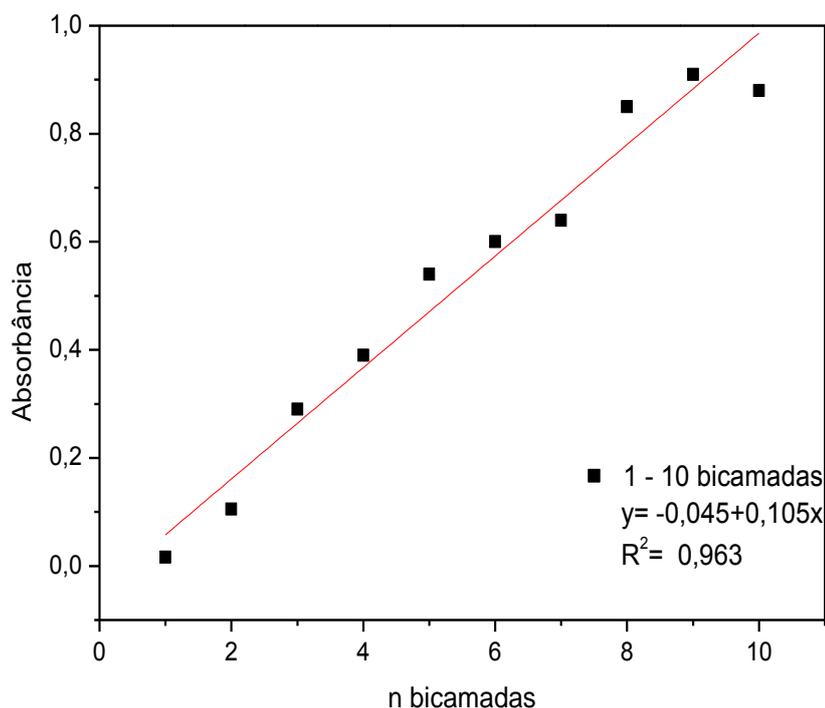
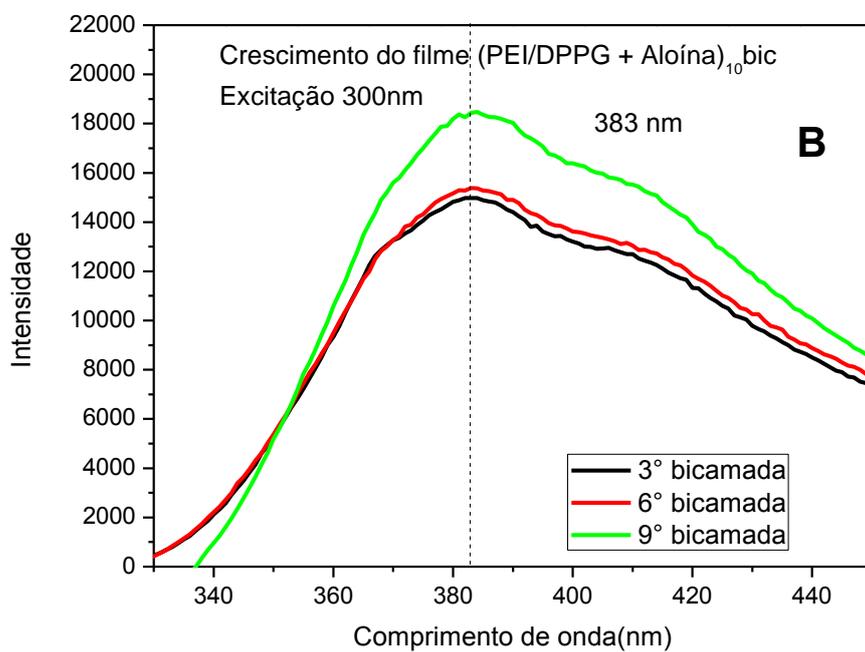
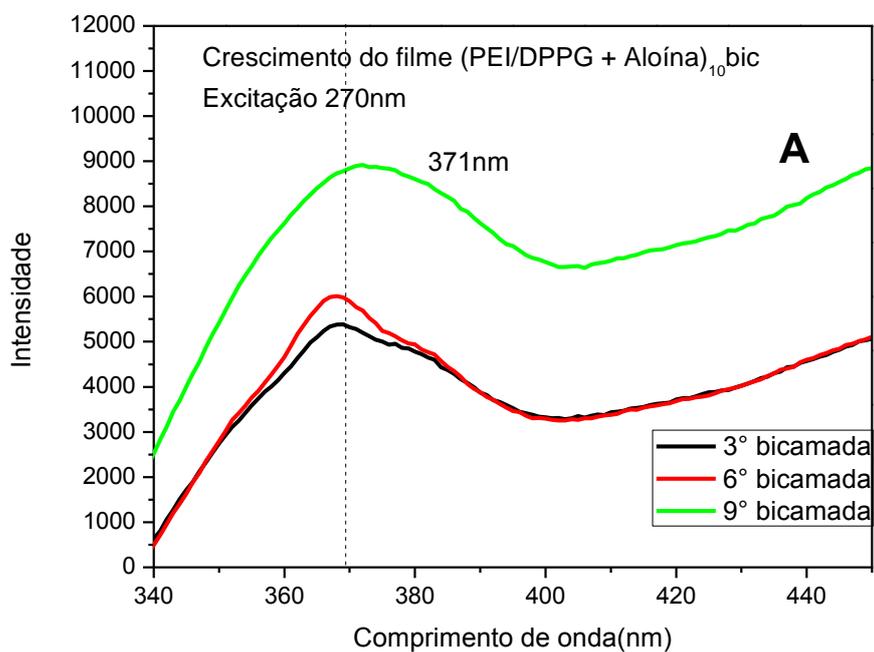


Figura 21. a) Espectros de absorção UV-vis para diferentes números de bicamadas para o filme LbL (PEI/ Aloína + DPPG)₁₀bic. b) Absorbância *versus* número de bicamadas para o filme PEI/ Aloína + DPPG)₁₀bic em $\lambda = 245$ nm.

As Figuras 22 a, b e c ilustram os espectros de emissão de fluorescência para o crescimento dos filmes cujas bicamadas foram formadas por PEI e DPPG + Aloína, nas excitações de 270, 300 e 370 nm respectivamente. Comparando-se a solução de lipossomo DPPG + Aloína com os filmes, houve para excitação em 270 nm, um deslocamento da banda de 367 nm para 371 nm, enquanto que para excitação em 300 nm houve um deslocamento de 337 para 383 nm. Finalmente, para a excitação em 370 nm observou-se um deslocamento de 444 para 514 nm, quando comparam-se os espectros da solução em relação aos filmes.



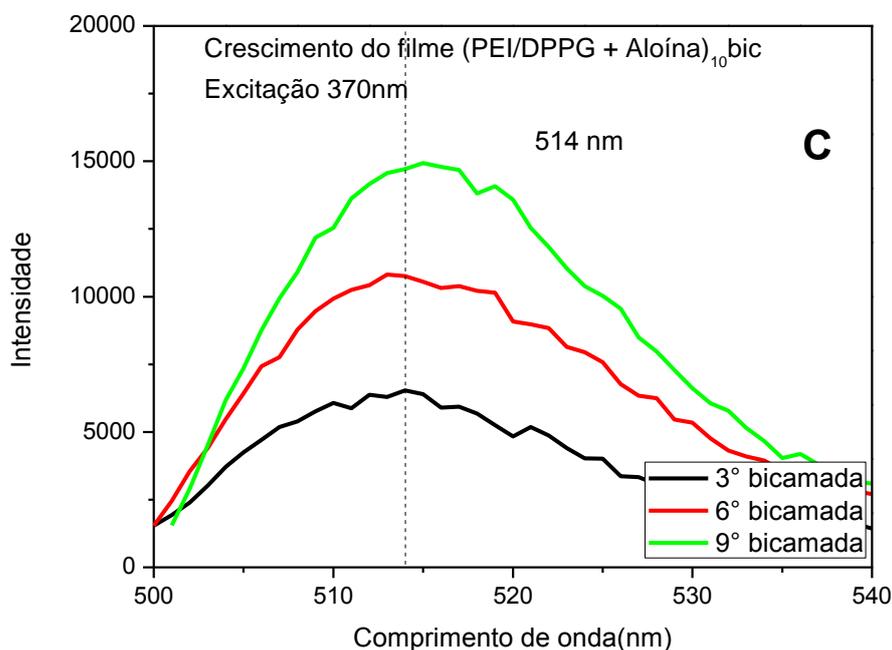
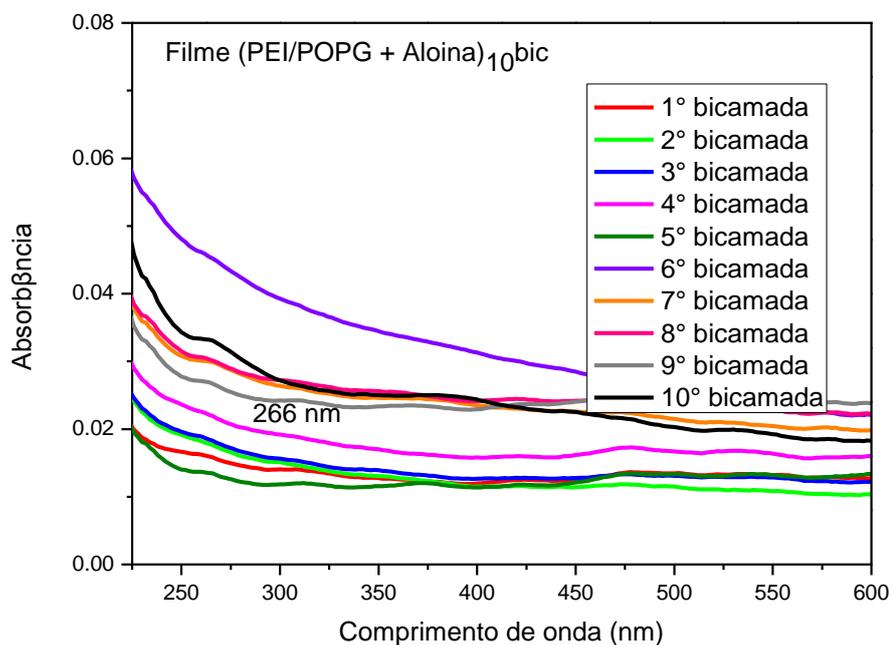
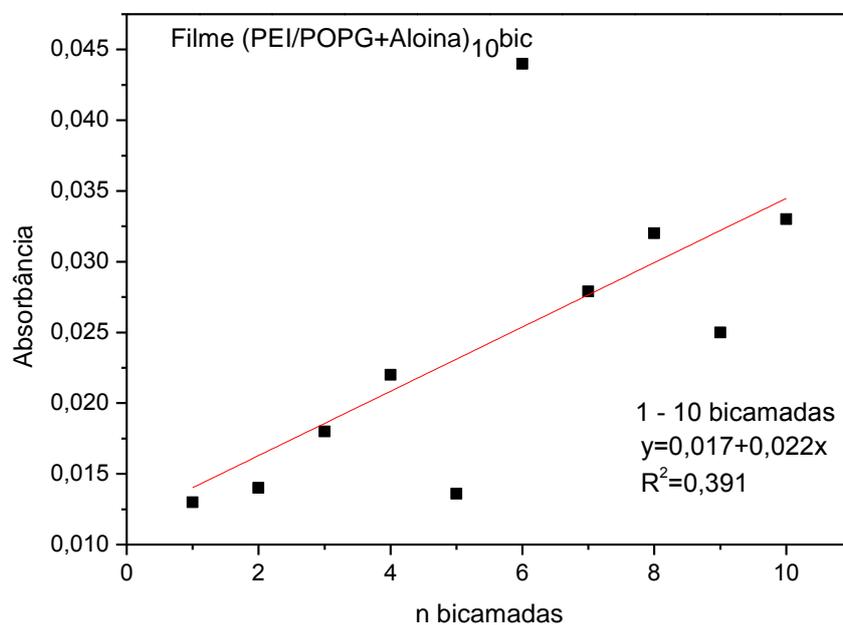


Figura 22. Espectros de emissão de fluorescência para crescimento do filme PEI /DPPG + Aloína, usando o comprimento de excitação de: 270 (a), 300 (b) e 370 (c) nm.

As Figuras 23 a e 23 b mostram o crescimento do filme por meio de espectroscopia de UV-vis, usando o sistema PEI/POPG + Aloína. Como de observa crescimento do filme, neste caso, foi muito irregular. Tal irregularidade pode ser explicada pelos efeitos viscolásticos dos lipossomos, pois são estruturas maiores e menos compactas e, portanto, sujeitas a maiores deformações⁷. Nota-se que a quantidade adsorvida de material aumenta nas primeiras camadas e, após a 5ª camada, o filme praticamente não cresce mais. Essa variação sugere um possível rearranjo estrutural nas camadas e relaxação dos lipossomos após adsorção. Embora seja difícil definir todas as mudanças que estão acontecendo, a adição de uma camada sobre lipossomos já aderidos provoca deformações de lipossomos previamente depositados, ou seja, as camadas externas influenciam as internas^{1; 7}.



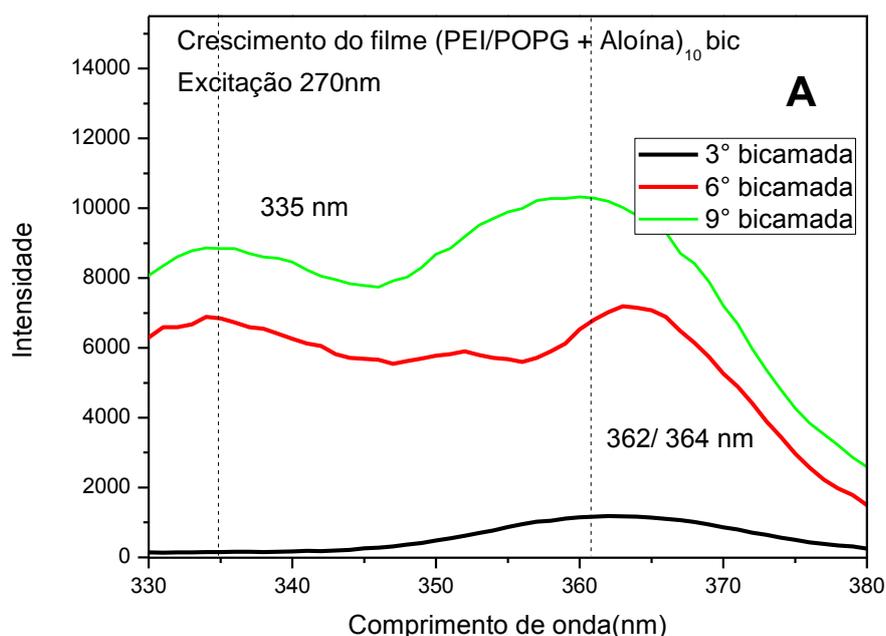
a)



b)

Figura 23. a) Espectros de absorção UV-vis para diferentes números de bicamadas para o filme LbL (PEI/ Aloína + POPG)₁₀. b) Absorbância versus número de bicamadas para o filme PEI/ Aloína + POPG)₁₀ em $\lambda = 266$ nm.

As Figuras 24 a, b e c mostram os espectros de emissão para o crescimento do filme PEI/POPG + Aloína. Observa-se, na Figura 24 a, que as bandas de emissão ocorreram em 361 e 364 nm; em relação à solução, essa banda foi em 362 nm, o que representa uma pequena variação nas bandas de emissão de uma bicamada para outra. Na Figura 24 b, observa-se o deslocamento de 337 nm para 335 nm, e na Figura 24 c, o deslocamento ocorreu de 444 para 513 nm. Esses deslocamentos são atribuídos à incorporação da Aloína nos lipossomos e sua imobilização no substrato de quartzo. Mesmo ocorrendo os deslocamentos, verificou-se que houve o crescimento dos filmes, pois a intensidade de emissão aumenta com a adição de mais bicamadas.



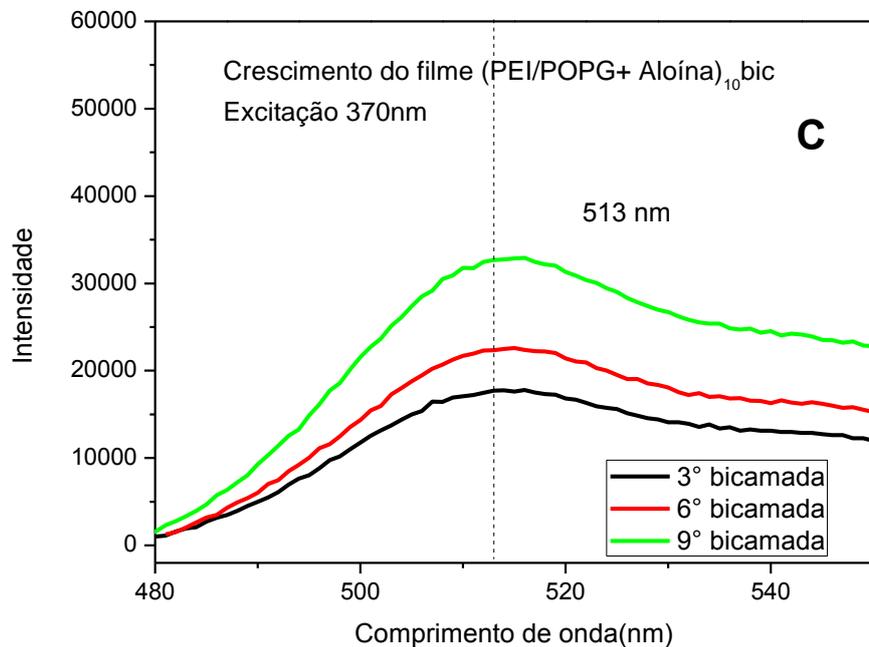
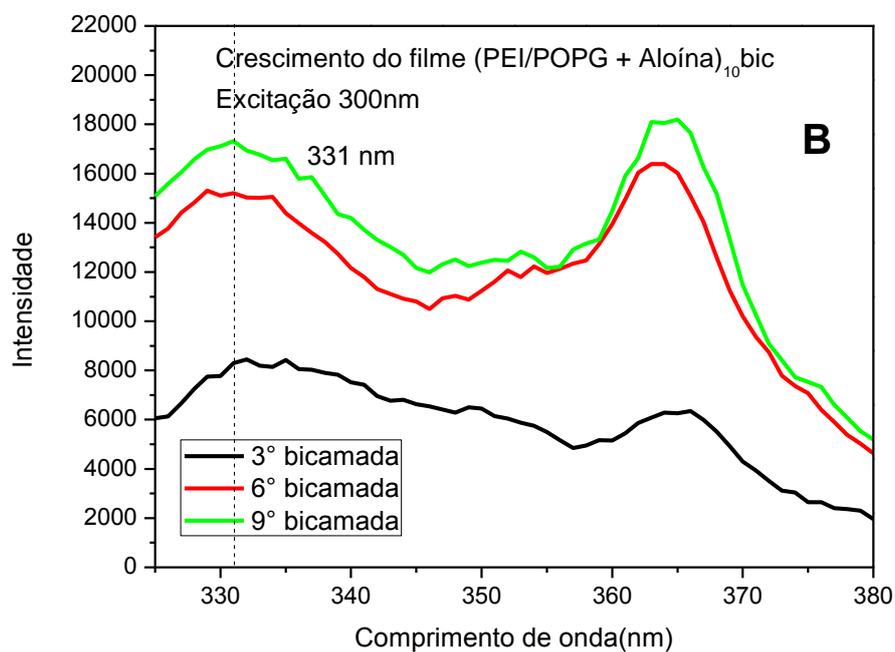


Figura 24. Espectros de emissão de fluorescência para o crescimento do filme PEI /POPG + Aloína, usando λ_{exc} 270 (a), 300 (b) e 370 (c) nm.

6.3.1. Liberação das soluções

Para o estudo da liberação de princípios ativos *in vitro*, o método de diálise é o mais utilizado. As variações nesse método estão associadas ao meio para o qual o fármaco é liberada, podendo ser desde uma simples solução tampão até soluções mais complexas que possuem aminoácidos, vitaminas e diversos tipos de sais, como por exemplo, o RPMI, que é um meio de cultura muito usado para crescimento de células; recebe este nome, pois foi desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial, a fim de tentar simular as liberações *in vivo*. Também se costuma diminuir ou aumentar o pH dessas soluções simulando o ambiente gástrico ou intestinal, respectivamente, os quais são responsáveis pela absorção da maioria dos princípios ativos.

Conforme descrito no item 3.6, para os testes de liberação *in vitro* foram realizados experimentos com os sistemas: Aloína , DPPG + Aloína e POPG + Aloína monitorando-se a alteração da intensidade na excitação em 270 nm. Realizou-se comparação do fármaco livre com os sistemas DPPG + Aloína e POPG + Aloína.

A concentração de Aloína dentro da membrana de diálise seguiu um decaimento exponencial de segunda ordem segundo a equação:

$$y = y_0 + A_1 \cdot \exp(-(x-x_0)/t_1) + A_2 \cdot \exp(-(x-x_0)/t_2)$$

onde A1 é a amplitude e t1 é o tempo de decaimento.

Excitação em 270 nm

Os resultados foram comparados com o perfil do fármaco livre, como mostram as Figuras 25 e 26. Nas figuras 26, 28 e 30 observa-se um pequeno decréscimo na liberação do fármaco quando incorporado em lipossomos DPPG, enquanto que quando incorporado em lipossomos POPG, pois o tempo de decaimento foi muito menor.

A liberação da Aloína obteve um tempo de decaimento de 8,50 hs, enquanto que a Aloína encapsulada em lipossomos DPPG o tempo observado foi de 7,44 hs, muito próximo a Aloína livre, indicando que o lipossomo DPPG foi pouco eficaz na liberação controlada, em comparação com a Aloína livre. Isso ocorre porque o DPPG é um lipídio que tem uma temperatura de transição por volta de 41 °C, assim na temperatura em que foram feitas as medidas o lipídio estava em sua forma cristalina (rígido) dificultando a liberação da Aloína. Isso faz com que o tempo de liberação esteja próximo ao da Aloína livre que é instável em solução e agrega facilmente. O POPG tem uma dupla ligação na cadeia carbônica e, conseqüentemente, uma temperatura de transição baixa 25 °C. Assim, o lipídio estava abaixo da transição vítrea facilitando a liberação, uma vez que o tempo de decaimento foi de 0,60 hs.

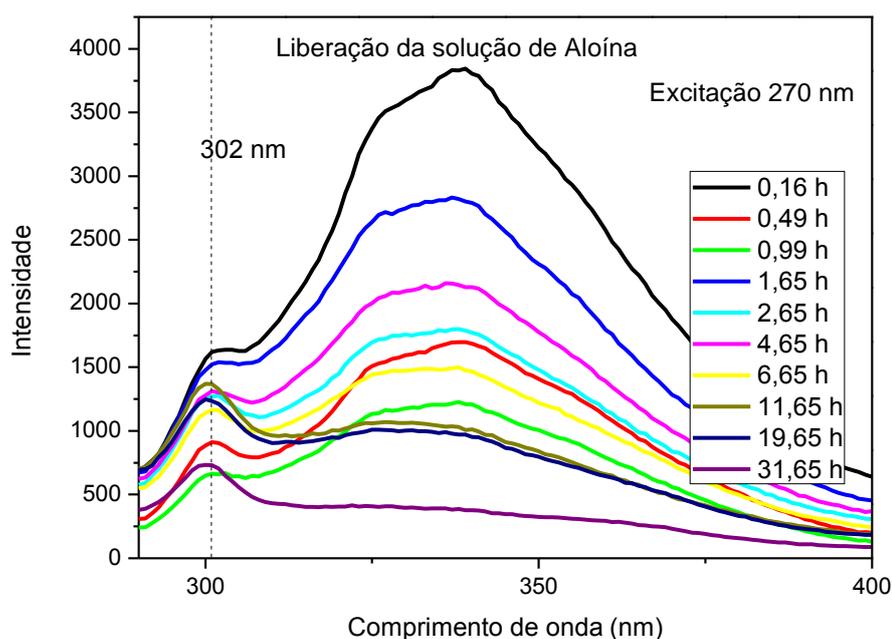


Figura 25. Espectros de emissão para a solução de Aloína livre interna à membrana de diálise conforme liberação da Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C λ_{exc} 270nm.

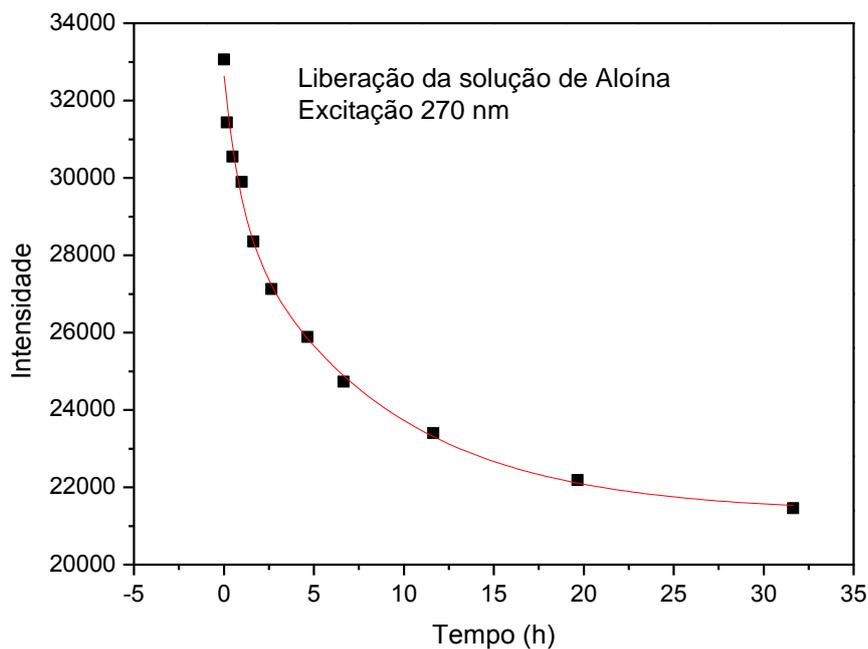


Figura 26. Decréscimo da concentração de Aloína livre dentro da membrana de diálise.

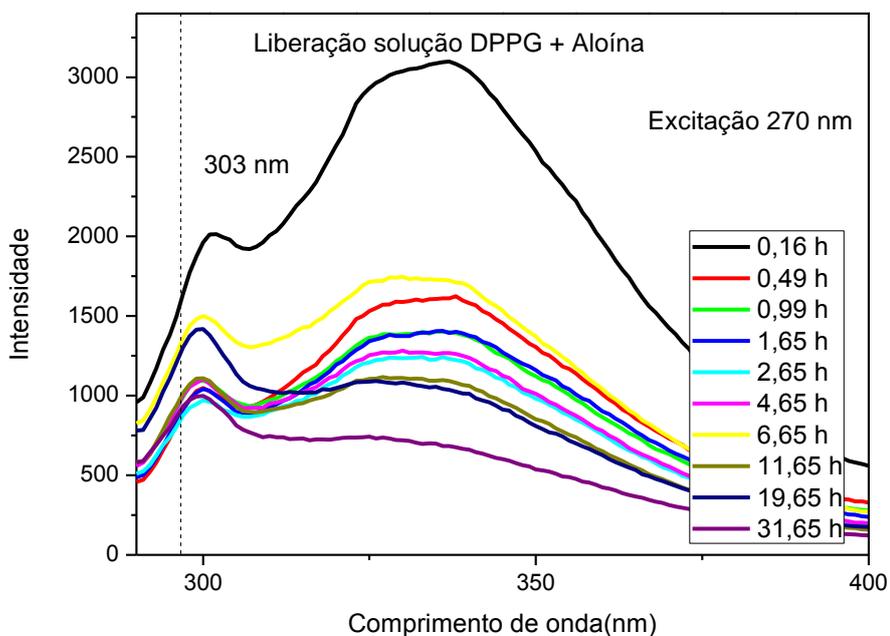


Figura 27. Espectros de emissão para a solução de DPPG + Aloína interna à membrana de diálise conforme liberação da Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C. λ_{exc} 270nm.

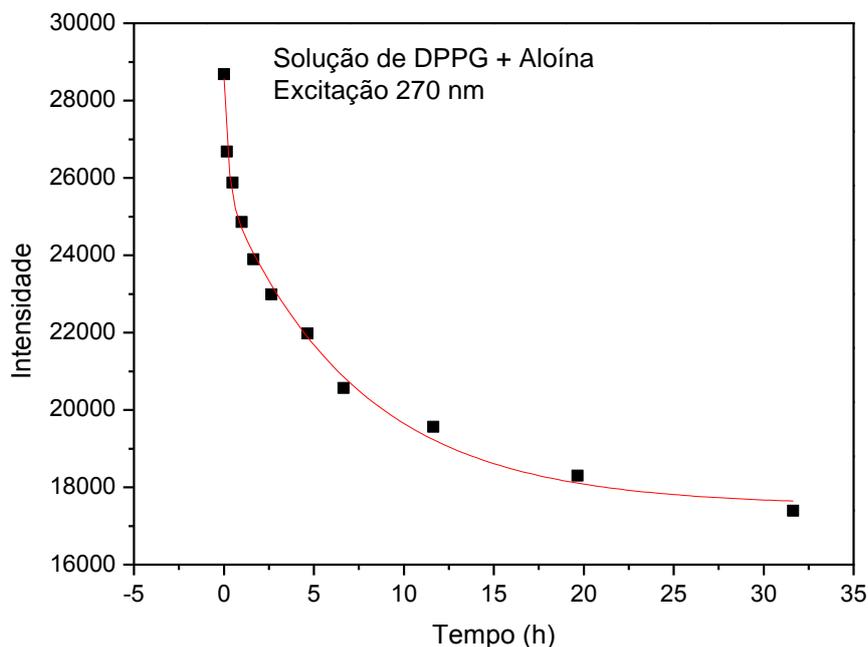


Figura 28. Decréscimo da concentração da solução DPPG + Aloína dentro da membrana de diálise.

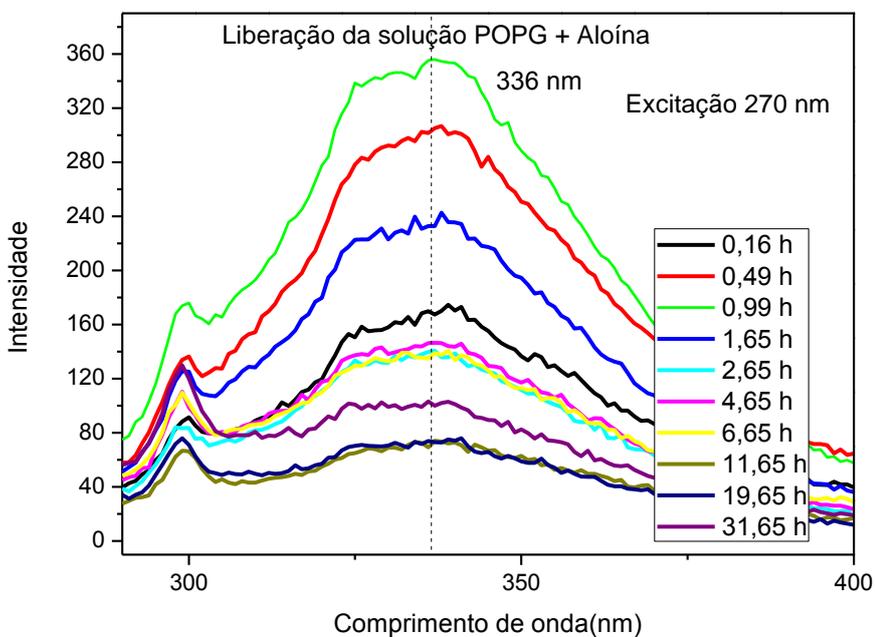


Figura 29. Espectros de emissão para a solução de POPG + Aloína interna à membrana de diálise conforme liberação da Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C lexc 270nm.

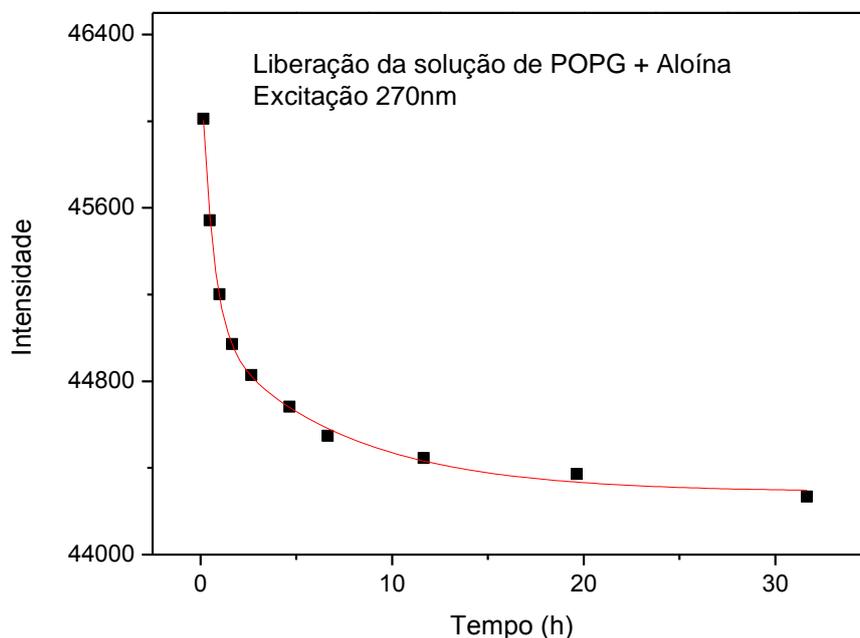


Figura 30. Decréscimo da concentração da solução POPG + Aloína dentro da membrana de diálise.

6.3.2. Liberação controlada dos filmes

Para investigar a liberação da Aloína dos filmes automontados, repetiram-se os procedimentos empregados para as soluções, porém colocando-se os filmes em tubos eppendorf com a solução tampão e trocando-se a solução nos tempos pré determinados para o experimento, monitorando-se a alteração na intensidade de fluorescência para 270 nm no decorrer do tempo. Os resultados foram comparados com o perfil do fármaco livre, como mostram as Figuras 31 e 32.

Excitação 270nm

O perfil de decaimento para o fármaco livre foi de 16,2 h, para os filmes de DPPG+ Aloína e POPG + Aloína foram 16,64h e 9,58 h, respectivamente, de acordo

com as Figuras 32, 34 e 36. Esses valores mostram que também é possível a liberação do fármaco nos filmes, porém o tempo é maior do que em solução.

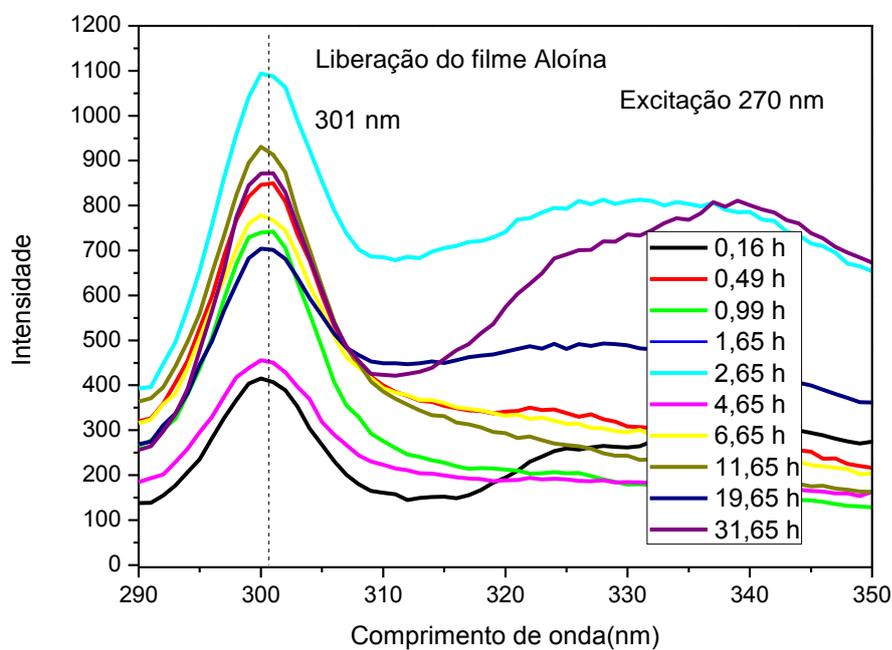


Figura 31. Espectros de emissão para a solução do filme de Aloína interna à membrana do tubo eppendorf, conforme liberação da Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C. λ_{exc} 270nm.

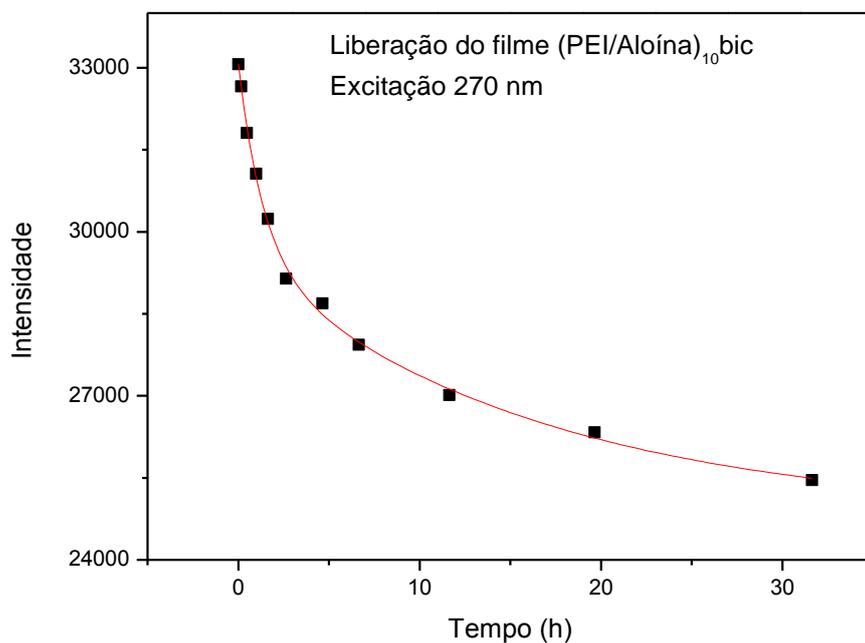


Figura 32. Decréscimo da concentração da solução do filme de PEI + Aloína dentro do tubo eppendorf lex 270nm.

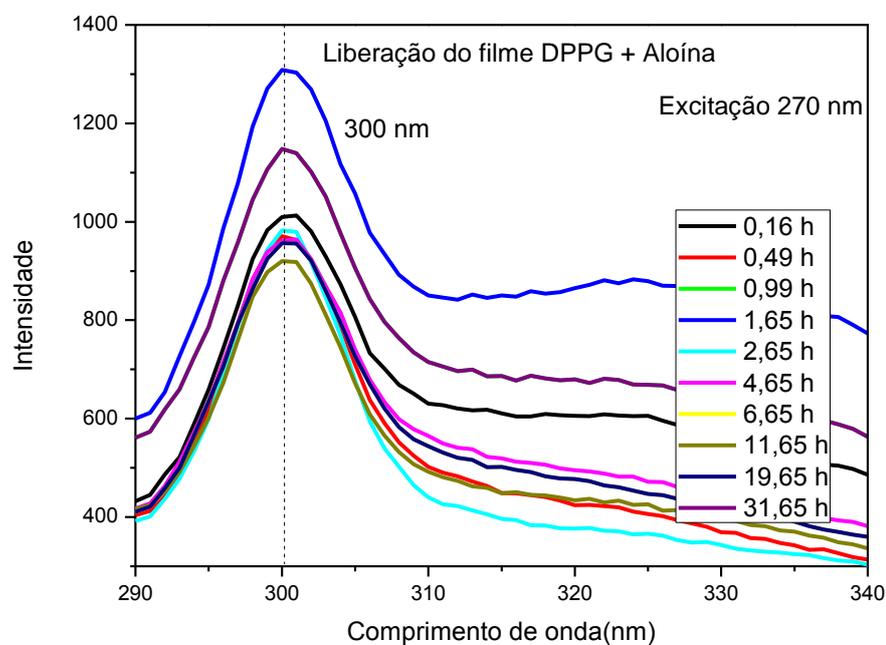


Figura 33. Espectros de emissão para a solução do filme de PEI/ DPPG +Aloína interna ao tubo eppendorf, conforme liberação da Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C lex 270nm.

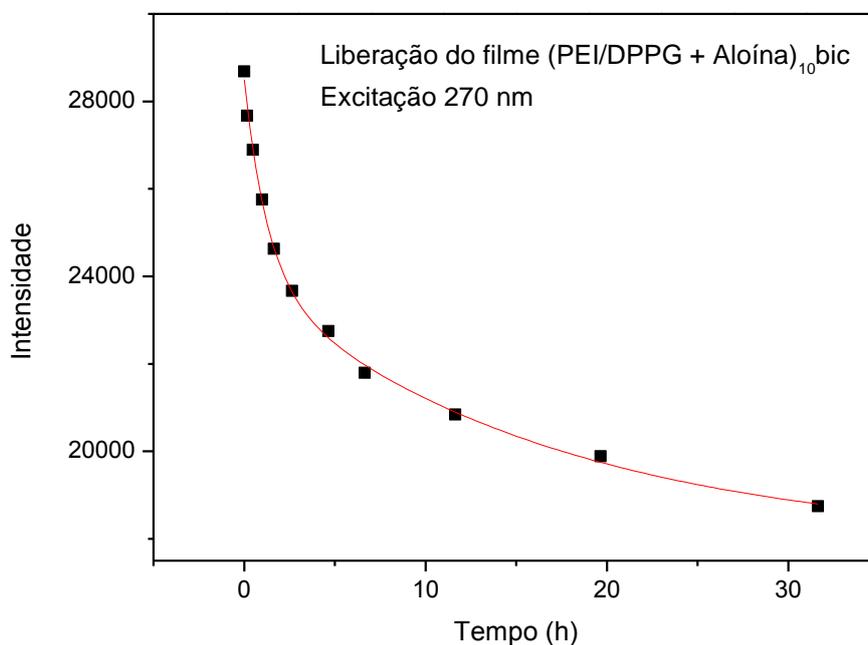


Figura 34. Decréscimo da concentração da solução do filme de PEI/ DPPG + Aloína dentro do tubo eppendorf lexco 270nm.

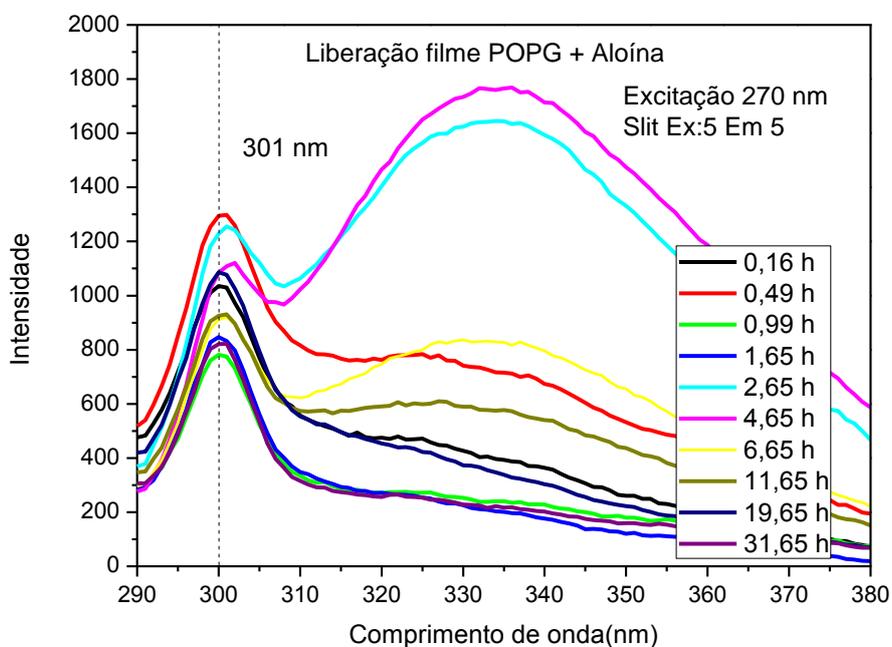


Figura 35. Espectros de emissão para a solução do filme de PEI/ POPG + Aloína interna ao tubo eppendorf conforme liberação da Aloína em tampão fosfato, pH 7,4 e 36,5°C. lexco 270nm.

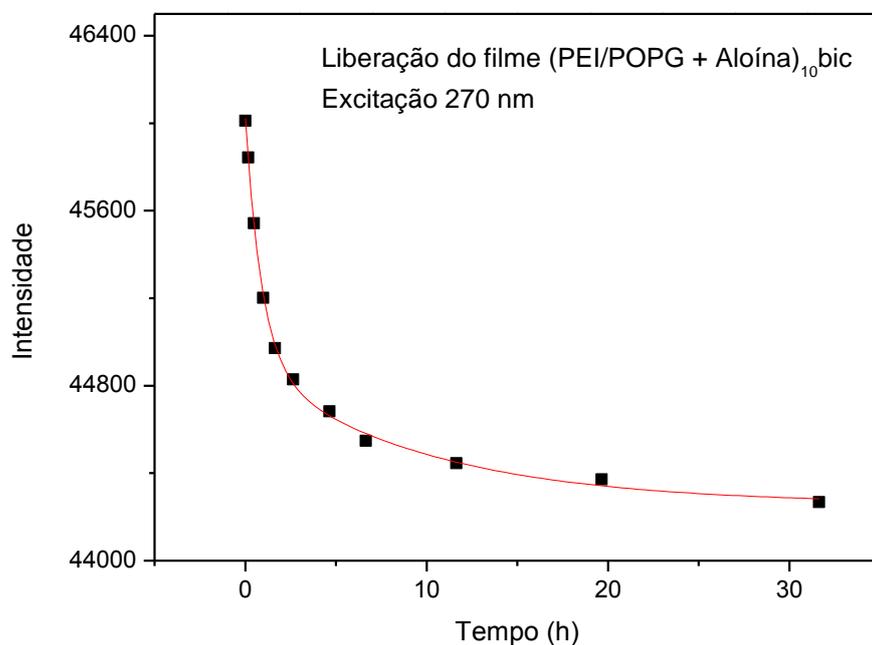


Figura 36. Decréscimo da concentração da solução do filme de PEI/ POPG + Aloína dentro do tubo eppendorf lex 270nm.

Para todos os sistemas testados, filme DPPG + Aloína, filme POPG + Aloína e filme de Aloína, observou-se que o decréscimo da fluorescência não é constante com o tempo, provavelmente porque a quantidade de Aloína liberada é pequena e as medidas eram feitas em partes diferentes do filme. Porém fica claro que a liberação da Aloína leva de 10 min a até 24hs, mas não é possível determinar precisamente a taxa de liberação. Não se observou um decréscimo na velocidade de liberação da Aloína ligada aos lipossomos em relação ao fármaco livre, indicando que o uso de lipossomos neste caso não alterou a cinética de liberação do fármaco através da membrana de diálise.

O tempo de decaimento do fármaco livre foi muito próximo ao fármaco encapsulado. Esta dificuldade pode ser otimizada utilizando diferentes arquiteturas para os filmes, e também diferentes fosfolipídios para a confecção dos lipossomos.

Os lipossomos com a Aloína incorporada e mesmo a Aloína livre quando imobilizadas em filme, apresentaram um aumento na taxa de decaimento, alterando este tempo para 8,50 h, 7,44 h e 0,60 h, para 16,2 h, 16,64 h e 9,58 h, para os filmes de Aloína, Aloína+ DPPG e Aloína + POPG respectivamente, o que comprova a viabilidade da construção de filmes automontados com a finalidade de fabricação de medicamentos de liberação modificada.

Sendo assim é possível utilizar a Aloína com um adesivo para cicatrização de feridas, onde haverá uma liberação localizada e prolongada.

De acordo com *Alves*⁵⁴, a aloe emodin possui maior afinidade pela membrana lipídica, sendo assim pode-se utilizá-la com o intuito de aperfeiçoar o experimento. O uso da aloe emodin estava previsto, porém, por razões de tempo não foi possível testá-la para estabelecer uma comparação com a Aloína.

CAPÍTULO V

7. CONCLUSÃO

A incorporação do extrato bruto de *Aloe vera* e imobilização em filmes LbL tornou-se inviável, uma vez que possui inúmeras substâncias, dentre as quais açúcares, vitaminas, polissacarídeos, saponinas, antraquinonas, aminoácidos.

Os filmes usados são de escala nanométrica e com isso é necessário o uso de substâncias puras para o sucesso dos experimentos. Diante deste problema, optou-se pelo uso de uma substância pura, no caso, a Aloína, presente no extrato bruto da planta.

Após a inclusão da Aloína nos lipossomos observou-se um aumento na intensidade de fluorescência em 270, 300 e 370 nm, mostrando que essas estruturas atuam como espaçadores, desativando o processo de transferência de energia entre as moléculas de Aloína. Quanto menor a perda de energia, maior a probabilidade de o elétron decair de um estado excitado para o estado fundamental, fato que é refletido no aumento da intensidade de fluorescência.

Os lipossomos de DPPG e POPG contendo Aloína foram imobilizados em filmes automontados, usando PEI, observou-se um crescimento linear, porém, sem regularidade.

As medidas de espectroscopia de fluorescência para a liberação das soluções mostraram que houve liberação, comparando-se com a liberação do fármaco livre, ou seja, as vesículas favorecem a liberação do fármaco, mas não tão prolongada quanto nos filmes.

Comparando-se a liberação dos filmes nos quais as vesículas foram imobilizadas contendo o princípio ativo, a diferença no tempo de decaimento em solução de lipossomos foi em torno de 8h (Aloína livre e incorporada em lipossomos DPPG), enquanto que quando imobilizadas em filme o tempo aumenta para mais de 13h.

A liberação do fármaco a partir de filmes nanoestruturados do tipo LbL foi possível. Portanto, a fabricação de patches se torna viável, pois a liberação pela via transdérmica é vantajosa, já que não há efeitos colaterais.

O objetivo do trabalho foi atingido, pois a proposta era realizar a liberação de um fármaco a partir de filme LbL, o que foi verificado pela espectroscopia de fluorescência das soluções usadas para a liberação do fármaco.

8. PERSPECTIVAS

Esta pesquisa mostrou a eficácia da técnica de automontagem por adsorção física para a obtenção de biomembranas suportadas para a liberação da Aloína.

Foram preparados lipossomos de DPPG e POPG nas quais se incorporou o fármaco.

Não foi possível acompanhar o crescimento dos filmes automontados por medidas de absorção óptica, devido ao espalhamento de luz causado pelos lipídios. Quando se utilizou espectroscopia de fluorescência, a intensidade de emissão da Aloína aumentava exponencialmente, de acordo com o número de camadas depositadas. Isto pode indicar um aumento na quantidade de Aloína, à medida que o filme ficava mais espesso, ou seja, aumentava-se o número de camadas.

Observou-se a liberação espontânea do fármaco a partir dos filmes contendo lipossomos DPPG e POPG, que aparentemente seguiu uma cinética de primeira ordem.

Medidas de fluorescência revelaram que, tanto os lipossomos de DPPG como os de POPG foram liberados a partir dos filmes LbL.

As perspectivas para um trabalho futuro serão imobilizar os lipossomos com Aloína e também a aloe emodin, já que esta possui maior afinidade pela bicamada lipídica, em filmes biocompatíveis como, por exemplo, filmes de quitosana, além de realizar um teste de toxicidade usando cultura celular, pois seria possível assim avaliar a aplicação dos patches na área farmacêutica.

Pretende-se estudar a interação do fármaco com modelos de membrana utilizando-se as técnicas de Langmuir e Langmuir-Blodgett e verificar uma possível liberação da Aloína e aloe emodin a partir de filmes LB.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 DURAN, N., MATTOSO, L.H.C., MORAIS, P.C. **Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicações.** 2006.
- 2 PRISTA N.L., A. A. C., MORGADO R.,. **Tecnologia Farmecêutica.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.
- 3 TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145-160, Feb 2005. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://000226721500020 >.
- 4 BANGHAM, A. D. LIPOSOMES - THE BABRAHAM CONNECTION. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, n. 1-3, p. 275-285, 1993. ISSN 0009-3084. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993MA21700020 >.
- 5 MASEK, J. et al. Immobilization of histidine-tagged proteins on monodisperse metallochelation liposomes: Preparation and study of their structure. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 1, p. 95-104, 2011. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283886600013 >.
- 6 MORAES, M. L. et al. Polymeric scaffolds for enhanced stability of melanin incorporated in liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, n. 1, p. 268-274, 2010. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281048300038 >.
- 7 GERALDO, V. P. N. **Filmes nanoestruturados contendo lipossomos para liberação controlada do ibuprofeno.** OLIVEIRA JR, O. N. Tese de Mestrado, Instituto de Física de São Carlos, USP. 2008.
- 8 AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680-689, 2010. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282864800002 >.
- 9 DRULIS-KAWA, Z.; DOROTKIEWICZ-JACH, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1-2, p. 187-198, 2010. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275436800026 >.
- 10 LANGER, R. Selected advances in drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 62, n. 1-2, p. 7-11, 1999. ISSN 0168-3659. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083383000004 >.
- 11 SCHWARTZ, R. S. Paul Ehrlich's magic bullets. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 11, p. 1079-1080, 2004. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220110100004 >.

- 12 STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 6, p. 473-480, 2008. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256108800018 >.
- 13 LANGER, R. Drug delivery and targeting. **Nature**, v. 392, n. 6679, p. 5-10, 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073360100003 >.
- 14 GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: Progress and problems. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 12, p. 527-537, 1995. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TP34800005 >.
- 15 HOLTZ, R. D. et al. Development of nanostructured silver vanadates decorated with silver nanoparticles as a novel antibacterial agent. **Nanotechnology**, v. 21, n. 18, 2010. ISSN 0957-4484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276672100003 >.
- 16 LANGNER, M.; UGORSKI, M. The macromolecular aggregate as a drug carrier. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 5, n. 4, p. 433-440, 2000. ISSN 1425-8153. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166365900003 >.
- 17 SESSA, G.; WEISSMAN, G. INCORPORATION OF LYSOZYME INTO LIPOSOMES - A MODEL FOR STRUCTURE-LINKED LATENCY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 13, p. 3295-&, 1970. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1970G850900005 >.
- 18 BARENHOLZ, Y. Liposome application: problems and prospects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, n. 1, p. 66-77, 2001. ISSN 1359-0294. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167964100012 >.
- 19 LANGER, R. Biomaterials and biomedical engineering. **Chemical Engineering Science**, v. 50, n. 24, p. 4109-4121, 1995. ISSN 0009-2509. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TP49700032 >.
- 20 DRUMMOND, D. C. et al. Development of a highly stable and targetable nanoliposomal formulation of topotecan. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 1, p. 13-21, 2010. ISSN 0168-3659. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274104200003 >.
- 21 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XT82700032 >.
- 22 LAVAN, D. A.; MCGUIRE, T.; LANGER, R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1184-1191, 2003. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185647200030 >.

- 23 FERRARA, K. W.; BORDEN, M. A.; ZHANG, H. Lipid-Shelled Vehicles: Engineering for Ultrasound Molecular Imaging and Drug Delivery. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 7, p. 881-892, 2009. ISSN 0001-4842. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268665100008 >.
- 24 FANCIULLINO, R.; CICCOLINI, J. Liposome-Encapsulated Anticancer Drugs: Still Waiting for the Magic Bullet? **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 33, p. 4361-4373, 2009. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271382700002 >.
- 25 TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C. R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 184-193, 2010. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274375500027 >.
- 26 GREGORIADIS, G. CARRIER POTENTIAL OF LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE .1. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 13, p. 704-710, 1976. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976CE05500005 >.
- 27 MORAES, M. L. et al. Phytase immobilization on modified electrodes for amperometric biosensing. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 131, n. 1, p. 210-215, 2008. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255426800031 >.
- 28 BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. DIFFUSION OF UNIVALENT IONS ACROSS LAMELLAE OF SWOLLEN PHOSPHOLIPIDS. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-&, 1965. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19656769500019 >.
- 29 SHIM, J. et al. Morphological effect of lipid carriers on permeation of lidocaine hydrochloride through lipid membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1-2, p. 251-256, 2010. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275526100033 >.
- 30 HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GROENINK, H. W. W.; BOUWSTRA, J. A. Elastic vesicles as a tool for dermal and transdermal delivery. **Journal of Liposome Research**, v. 16, n. 3, p. 273-280, 2006. ISSN 0898-2104. Disponível em: < <Go to ISI>://000240234900013 >.
- 31 DELLIAN, M. et al. DEVELOPMENT OF CATIONIC LIPOSOMES FOR VASCULAR TARGETING OF SOLID TUMORS. **Anticancer Research**, v. 24, n. 5D, p. 110, 2004. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000205415300111 >.
- 32 JIAO, Y. H. et al. Layer-by-Layer Assembly of Poly(lactic acid) Nanoparticles: A Facile Way to Fabricate Films for Model Drug Delivery. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8270-8273, 2010. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277928100083 >.

- 33 DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. BUILDUP OF ULTRATHIN MULTILAYER FILMS BY A SELF-ASSEMBLY PROCESS .3. CONSECUTIVELY ALTERNATING ADSORPTION OF ANIONIC AND CATIONIC POLYELECTROLYTES ON CHARGED SURFACES. **Thin Solid Films**, v. 210, n. 1-2, p. 831-835, 1992. ISSN 0040-6090. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HV02500118 >.
- 34 LVOV, Y.; DECHER, G.; SUKHORUKOV, G. ASSEMBLY OF THIN-FILMS BY MEANS OF SUCCESSIVE DEPOSITION OF ALTERNATE LAYERS OF DNA AND POLY(ALLYLAMINE). **Macromolecules**, v. 26, n. 20, p. 5396-5399, 1993. ISSN 0024-9297. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LZ50500016 >.
- 35 NAKANE, Y.; KUBO, I. Layer-by-layer of liposomes and membrane protein as a recognition element of biosensor. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 2, p. 678-681, 2009. ISSN 0040-6090. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271776300061 >.
- 36 PATERNO, L. G.; MATTOSO, H. L. C.; DE OLIVEIRA, O. N. Ultrathin polymer films produced by the self-assembly technique: Preparation, properties and applications. **Quimica Nova**, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167572000013 >.
- 37 MICHEL, M. et al. Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles. **Langmuir**, v. 20, n. 12, p. 4835-4839, 2004. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221846000011 >.
- 38 MICHEL, A. et al. Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles obtained by spraying: Integrity of the vesicles. **Langmuir**, v. 21, n. 17, p. 7854-7859, 2005. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231389200034 >.
- 39 MICHEL, M. et al. Layer-by-layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded liposomes: Immobilized submicronic reactors for mineralization. **Langmuir**, v. 22, n. 5, p. 2358-2364, 2006. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235744500061 >.
- 40 WOOD, K. C. et al. Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films. **Langmuir**, v. 21, n. 4, p. 1603-1609, 2005. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226962100066 >.
- 41 MAKKY, A. et al. Evaluation of the Specific Interactions between Glycodendrimeric Porphyrins, Free or Incorporated into Liposomes, and Concanavaline A by Fluorescence Spectroscopy, Surface Pressure, and QCM-D Measurements. **Langmuir**, v. 26, n. 15, p. 12761-12768, 2010. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280353800043 >.

- 42 TAKAHASHI, M. et al. Liposomes Encapsulating Aloe vera Leaf Gel Extract Significantly Enhance Proliferation and Collagen Synthesis in Human Skin Cell Lines. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 12, p. 643-650, 2009. ISSN 1345-8957. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272265900007 >.
- 43 FEMENIA, A. et al. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, n. 2, p. 109-117, 1999. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080005900002 >.
- 44 YAGI, A.; TAKEO, S. Anti-inflammatory constituents, aloesin and aloemannan in Aloe species and effects of tanshinon VI in Salvia miltiorrhiza on heart. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 123, n. 7, p. 517-532, 2003. ISSN 0031-6903. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183949800003 >.
- 45 REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. Aloe vera leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 3-37, 1999. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083704900002 >.
- 46 TUDOSE, A. et al. REGENERATIVE PROPERTIES OF ALOE VERA JUICE ON HUMAN KERATINOCYTE CELL CULTURE. **Farmacia**, v. 57, n. 5, p. 590-597, 2009. ISSN 0014-8237. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271146000008 >.
- 47 CHOW, J. T. N. et al. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 6, p. 1131-1142, 2005. ISSN 0008-6215. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228430900007 >.
- 48 FOGLEMAN, R. W. et al. TOXICOLOGIC EVALUATION OF INJECTABLE ACEMANNAN IN THE MOUSE, RAT AND DOG. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 201-205, 1992. ISSN 0145-6296. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HV91100001 >.
- 49 CHOI, S. W. et al. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 535-545, 2001. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171693600003 >.
- 50 EGGER, S. F. et al. Studies on optimal dose and administration schedule of a hematopoietic stimulatory beta-(1,4)-linked mannan. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 113-126, 1996. ISSN 0192-0561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UQ57100003 >.
- 51 MCDANIEL, H. R.; PERKINS, S.; MCANALLEY, B. H. A CLINICAL PILOT-STUDY USING CARRISYN IN THE TREATMENT OF ACQUIRED-IMMUNODEFICIENCY-SYNDROME (AIDS). **American Journal of Clinical**

- Pathology**, v. 88, n. 4, p. 534-534, 1987. ISSN 0002-9173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987K388100064 >.
- 52 ROBERTS, D. B.; TRAVIS, E. L. ACEMANNAN-CONTAINING WOUND DRESSING GEL REDUCES RADIATION-INDUCED SKIN REACTIONS IN C3H MICE. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 32, n. 4, p. 1047-1052, 1995. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RL55500017 >.
- 53 NI, Y. et al. Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 14, p. 1745-1755, 2004. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225316500005 >.
- 54 ALVES, D. S. et al. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 3, p. 549-561, 2004. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222881600016 >.
- 55 WAMER, W. G.; VATH, P.; FALVEY, D. E. In vitro studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloin A. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 233-242, 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180296000009 >.
- 56 SHEN, L.; JI, H. F.; ZHANG, H. Y. Photophysical and photochemical properties of anthraquinones: A DFT study. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, v. 851, n. 1-3, p. 220-224, 2008. ISSN 0166-1280. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253785000027 >.
- 57 FARAHMAND, S.; MAIBACH, H. I. Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1-2, p. 1-15, Feb 2009. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <Go to ISI>://000263458600001 >.
- 58 WOKOVICH, A. M. et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 1-8, 2006. ISSN 0939-6411. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240372100001 >.
- 59 AMIDI, M. et al. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 59-82, 2010. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275134500006 >.
- 60 LIMA, E. M.; OLIVEIRA, A. G. Tissue tolerance of diclofenac sodium encapsulated in liposomes after intramuscular administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 673-680, 2002. ISSN 0363-9045. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000176824400006 >.

- 61 HULBERT, A. J.; ELSE, P. L. Membranes as possible pacemakers of metabolism. **Journal of Theoretical Biology**, v. 199, n. 3, p. 257-274, 1999. ISSN 0022-5193. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081735300003 >.
- 62 SKOOG, D. A. FLETCHER,FJ - INSTRUMENTAL METHODS. **Science**, v. 154, n. 3745, p. 141-&, 1966. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19668300500020 >.
- 63 EWING, G. W. LABORATORY INTEGRATORS. **Journal of Chemical Education**, v. 49, n. 6, p. A333-&, 1972. ISSN 0021-9584. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1972M715100001 >.
- 64 GU, W. X. et al. Binding interaction between aloe polysaccharide and alizarin red by spectrophotometry and its analytical application. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 115-122, 2010. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275080600015 >.
- 65 GUTTERMAN, Y.; CHAUSER-VOLFSON, E. The distribution of the phenolic metabolites barbaloin, aloeresin and aloenin as a peripheral defense strategy in the succulent leaf parts of *Aloe arborescens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 9, p. 825-838, Nov 2000. ISSN 0305-1978. Disponível em: < <Go to ISI>://000089170000002 >.
