

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOEL TORIBIO ESPINOZA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS
CARREGADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE
VERDE**

PONTA GROSSA-PR

2017

JOEL TORIBIO ESPINOZA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS
CARREGADOS COM NANOPARTICULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE
VERDE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientadora: Prof. Dra. Josiane Padilha de Paula

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA-PR

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

T683 Toribio Espinoza, Joel
Desenvolvimento tecnológico e
caracterização de lipossomas carregados com
nanopartículas de prata obtidas por síntese
verde/ Joel Toribio Espinoza. Ponta
Grossa, 2017.
79f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Josiane Padilha
de Paula.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

1. Nanopartículas de Prata. 2. Lupeol.
3. Lipossomas. I. Paula, Josiane Padilha de.
II. Farago, Paulo Vitor. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 616.5

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 04/2017, DO MESTRANDO JOEL TORÍBIO
ESPINOZA, REALIZADO NO DIA 07 DE MARÇO DE 2017, NA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos sete dias de março de dois mil e dezessete, às 15h00min no Auditório do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bloco M, sala 115, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Doutora Josiane Padilha de Paula, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do mestrando Joel Toríbio Espinoza na linha de pesquisa: Desenvolvimento de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Priscileila Colerato Ferrari (UEPG/PR) e Yasmine Mendes Pupo (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CARREGADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE. Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se -

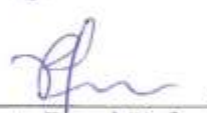
APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Josiane Padilha de Paula - (Defar - UEPG) - Presidente


Priscileila Colerato Ferrari (Defar - UEPG) - Titular


Yasmine Mendes Pupo - (UFPR) - Titular

Ponta Grossa, 07 de março de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais Victoriano e Hermenegilda, pelo amor incondicional e sabedoria de seus conselhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter saudável física e mentalmente, me amparando e abençoando a cada dia e cuidando das pessoas que eu amo, para eu me focar no trabalho.

A minha família, principalmente por suportar a distância, por todos os esforços, incentivos, orações, paciência, compreensão e pelo amor incondicional.

À minha orientadora, Prof. Dra. Josiane Padilha de Paula, por me proporcionar a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, foi com sua experiência que conseguimos a realização de este trabalho. Também pela amizade, confiança e conselhos, sempre alegre e confiante.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pelos ensinamentos, entusiasmo e confiança transmitidos, durante as aulas.

Às Prof. Dra. Priscileila Colerato Ferrari e Prof. Dra. Patrícia Mazureki Campos, por contribuírem com seus conhecimentos durante a qualificação.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos ensinamentos e exemplo profissional.

Aos meus amigos da comunidade de estudantes estrangeiros da UEPG, por ser minha segunda família em Ponta Grossa, e principalmente a Alejandra, por sua companhia, carinho e paciência.

Aos colegas de laboratório, em especial, a Angélica, Luciane, Melissa e Robson, pelo apoio no português, conhecimento compartilhado e colaboração.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

À Associação da OEA com o Grupo Coimbra de universidades brasileiras, pela oportunidade.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As nanopartículas de prata (AgNPs) são conhecidas por suas atividades antimicrobianas e antitumorais. Outro composto de grande interesse é o Lupeol, triterpeno pentacíclico, com atividades terapêuticas e quimiopreventivas para o tratamento de infecções e de câncer. Assim, os lipossomas de natureza biocompatível e biodegradável se apresentam como um veículo capaz de transportar estes dois compostos. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar lipossomas, carregadas com nanopartículas de prata, contendo colesterol (LAgNPs) ou lupeol (LUNP) em sua bicamada lipídica. As AgNPs foram preparadas pelo método de síntese verde com exposição à luz solar e os lipossomas foram preparados pelo método de fase reversa modificada. Foram avaliados o tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, assim como os aspectos morfológicos mediante microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG) e difração de raios X das AgNPs e dos lipossomas. Além disso, foi desenvolvido e validado um método analítico por espectroscopia de absorção atômica em chama para determinar a quantidade de prata que foi encapsulada em lipossomas. As AgNPs apresentaram-se como estruturas amorfas, polidispersas, com diâmetro médio entre 278,46 nm e potencial zeta de -18,3 mV. LAgNPs apresentaram um diâmetro médio de entre 321 e 373 nm, o índice de polidispersão próximo a 0,2 e um potencial zeta em torno de -40 mV, indicativo de baixa polidispersão e que concede maior estabilidade às AgNPs. Foi possível obter lipossomas contendo lupeol em sua bicamada lipídica, carregando nanopartículas de prata (LUNP) com diâmetro médio de 218,8 nm, potencial zeta de -36,5 mV e de tamanhos polidispersos. As imagens obtidas por FEG mostram estruturas semicirculares para AgNPs e esféricas para LAgNPs e LUNPs bem definidas. O método analítico para quantificar Nanopartículas de prata foi desenvolvido e validado, mostrando-se linear, preciso e exato, o que possibilitou determinar a porcentagem de encapsulação sendo entre 51,81 a 58,83 % para LAgNP e de 56,08 % para LUNP. Esses resultados mostraram que LAgNPs foram obtidos com características físico-químicas adequadas como sistema de liberação, com potencial ação antimicrobiana e/ou antitumoral, como alternativa aos tratamentos convencionais.

Palavras-chave: Nanopartículas de Prata, Lupeol, Lipossomas.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) are known for their antimicrobial and antitumor activities. Another compound of great interest is Lupeol, a pentacyclic triterpene, with therapeutic and chemopreventive activities for the treatment of infections and cancer. Thus, biocompatible and biodegradable liposomes are presented as a carrier capable of transporting these two compounds. The objective of this work was to develop and characterize liposomes, loaded with silver nanoparticles containing cholesterol (LAgNPs) or lupeol (LUNP) in their lipid bilayer. AgNPs were prepared by the green synthetic method with exposure to sunlight and the liposomes were prepared by the modified reverse phase method. Particle size, polydispersity index, zeta potential, as well as morphological aspects were determined by scanning electron microscopy (SEM-FEG) and X-ray diffraction of AgNPs and liposomes. In addition, an analytical method has been developed and validated by flame atomic absorption spectroscopy to determine the amount of silver that has been encapsulated in liposomes. The AgNPs presented as amorphous, polydisperse structures, with mean diameter between 278.46 nm and zeta potential of -18,3 mV . LAgNPs had a mean diameter between 321 and 373 nm, the polydispersity index close to 0.2 and a zeta potential around -40 mV, indicative of low polydispersity and which gives greater stability to AgNPs. It was possible to obtain liposomes containing lupeol in their lipid bilayer, loading silver nanoparticles (LUNP) with a mean diameter of 218.8 nm, zeta potential of -36.5 mV and polydisperse sizes. The images obtained by FEG show semicircular structures for AgNPs and spherical for well-defined LAgNPs and LUNPs. The analytical method to quantify silver nanoparticles was developed and validated, showing linear, precise and exact, which allowed to determine the percentage of encapsulation being between 51.81 to 58.83% for LAgNP and 56.08% for LUNP . These results showed that LAgNPs were obtained with adequate physicochemical characteristics as a release system, with potential antimicrobial and / or antitumor action, as an alternative to conventional treatments.

Keywords: Silver nanoparticles, Lupeol, Liposomes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografia de soluções de nanopartículas de prata sintetizadas com cores diferentes e espectros de extinção das AgNPs correspondentes às soluções.....	19
Figura 2 - Representação esquemática de um mecanismo proposto para a síntese de nanopartículas de metais mediada por plantas.....	20
Figura 3 - Possível mecanismo de biossíntese de Nanopartículas de Prata através do conteúdo de Quinonas em extratos frescos de <i>Aloe vera</i>	23
Figura 4 – Esquema de foto-preparação <i>in situ</i> de AgNPs.....	24
Figura 5 - Mecanismo de três etapas da microfabricação esférica de AgNPs por <i>P. glomerata</i>	25
Figura 6 - Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas como sistemas de liberação de fármacos.	27
Figura 7 - Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares (MLV), Vesículas unilamelares pequenas (SUV) e Vesículas unilamelares grandes (LUV).....	28
Figura 8 - Comportamentos de fase da membrana lipídica	29
Figura 9 - Estrutura química do Lupeol e do Colesterol.	31
Figura 10 - fluxograma das etapas experimentais do estudo.....	34
Figura 11- Esquema para o processo de preparação de vesículas lipossômicas pela evaporação em fase reversa.	36
Figura 12 - Reação de identificação de antraquinonas e derivados antracênicos. Em que (a) extrato filtrado reage com (b)NaOH 2N e (c) NH ₄ OH 25%.	43
Figura 13 - Colorações de soluções de AgNPs dependendo do tempo de exposição solar. (A) Sem exposição, (B) entre 5 segundos e 1 minuto, (C) entre 2 até 5 minutos e (D) mais de 5 minutos.....	44
Figura 14 - Tempos de exposição à luz solar das soluções de AgNO ₃ e Extrato de gel de Aloe vera. De esquerda à direita: 5s, 10 s, 15 s, 30 s, 1 minuto e 2 minutos.	45
Figura 15 - Espectros de absorção UV-Vis dos meios reacionais (AgNO ₃ e extrato de gel Aloe vera), em diferentes tempos de exposição à luz solar.	46
Figura 16 - Fotomicrografias obtidas por FEG das AgNPs sintetizadas durante A) 5 segundos, B) 10 segundos, C) 15 segundos, D) 30 segundos, E) 1 minuto e F) 2 minutos de exposição à luz solar.....	48

Figura 17 – Espectro no FTIR de Extrato de <i>Aloe vera</i> e AgNP30s.....	49
Figura 18 - Fotografia de soluções de AgNP e LAgNP. (A) solução de AgNO ₃ misturada com Extrato de <i>Aloe vera</i> sem exposição à luz solar, (B) Solução de AgNP30s e (C) Solução de LAgNPs.	50
Figura 19 - Fotomicrografias obtidas por FEG dos Lipossomas carregados com nanopartículas de Prata (LAgNP) em diferentes razões molares de PC:Col. A) 2:1, B) 4:1, C) 8:1 e D) 16:1.....	54
Figura 20 - Fotomicrografias obtidas por FEG dos LUNP.	55
Figura 21 - Espectros de absorção UV-Vis das soluções de AgNP30s, LAgNP8:1 e LUNP.....	56
Figura 22 – Espectros de IVTF do Lupeol e Colesterol.	57
Figura 23 - Espectros de IVTF do lipossoma (A) PC:COL 8:1, constituído por colesterol (COL) e Fosfatidilcolina (PC); e lipossoma (B) PCLU8:1, constituído por Lupeol e PC.	58
Figura 24 - Espectros de IVTF do lipossoma (A) LAgNP, constituído por AgNP e PC:COL; e Lipossoma (B) LUNP, constituído por AgNP e PC:Lu.....	59
Figura 25 – Difractogramas do Extrato de <i>Aloe vera</i> , AgNP, PC, Colesterol, Lipossoma (PC:COL) e LAgNP.	60
Figura 26 - Difractogramas do Extrato de <i>Aloe vera</i> , AgNP, PC, Lupeol , PC:Lu e LUNP.....	61
 GRÁFICO 1 – Representação gráfica da curva analítica média para determinação de nanopartículas de prata por absorção atômica de chama ($\lambda=328,1$ nm) em água.	 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais componentes do <i>Aloe vera</i>	22
Tabela 2 - Composições lipídicas empregadas na preparação dos lipossomas.	37
Tabela 3 - Distribuição de DM, PDI e PZ das AgNPs sintetizadas nos diferentes tempos de exposição à luz solar.	47
Tabela 4 - Distribuição de DM, PDI e PZ dos LAgNPs em diferentes razões molares de PC:COL após o preparo e logo de 60 dias.....	51
Tabela 5 - Distribuição de DM, PDI e PZ dos LUNPs após o preparo e após de 30 dias.....	53
Tabela 6 – Parâmetros lineares do método de absorção atômica de chama.	62
Tabela 7 – Resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.	63
Tabela 8 – Resultados obtidos nos ensaios de especificidade.	64
Tabela 9 – Resultados do ensaio de Exatidão.....	64
Tabela 10 – Resultados do ensaio de robustez.	65
Tabela 11 – Concentração de Prata e rendimento da reação.	66
Tabela 12 – Eficiência de encapsulação dos lipossomas.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO ₃	Nitrato de Prata
AgNP	Nanopartículas de Prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COL	Colesterol
CMD	Concentração média determinada
CV	Coeficiente de variação
DLS	Dynamic light scattering – espalhamento de luz dinâmica
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio padrão relativo
FAAS	Espectroscopia de Absorção atômica de chama
FEG	Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo
IVTF	Infravermelho com transformada de Fourier
LAgNP	Lipossomas carregados com nanopartículas de Prata
LU	Lupeol
LUNP	Lipossomas contendo Lupeol e carregado com nanopartículas de Prata
LUV	Lipossomas unilamelares grandes
MJ	Megajoules
MLV	Lipossomas multilamelares
MPC	Concentração de Prevenção da Mutação
mV	Milivolt
PC	Fosfatidilcolina
PC:COL	Lipossoma sem nanopartículas de Prata
PC:LU	Lipossoma contendo Lupeol, em substituição de colesterol.
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Revoluções por minuto
SPR	Superfície de plasmon ressonante
SUV	Lipossomas unilamelares pequenos
UV	Ultravioleta
XRD	Difratômetro de raios X

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3.	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1.	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	18
3.2.	SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	20
3.2.1.	Aloe vera.....	21
3.2.2.	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR FOTORREDUÇÃO	23
3.3.	LIPOSSOMAS	25
3.4.	LUPEOL.....	30
4.	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1.	EQUIPAMENTOS	32
4.2.	REAGENTES E SOLVENTES.....	32
4.3.	MATERIAIS	33
4.4.	DESENHO EXPERIMENTAL	34
4.5.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
4.5.1.	Obtenção do Extrato Aquoso de gel de Aloe vera	35
4.5.2.	Síntese de Nanopartículas de Prata (AgNP).....	35
4.5.3.	Síntese de Lipossomas.....	36
4.5.4.	Caracterização das nanopartículas de prata e dos lipossomas.....	38
4.5.4.1.	Determinação do diâmetro médio e potencial Zeta.....	38
4.5.4.2.	Microscopia Eletrônica de varredura com efeito de emissão do campo (SEM-FEG).....	38
4.5.4.3.	Análise por espectroscopia UV-Vis	38
4.5.4.4.	Análise por difração de raios X.....	39
4.5.4.5.	Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	39

4.5.5.	Validação do método analítico para a quantificação das nanopartículas de Prata	39
4.5.6.	Determinação de Prata por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS).....	41
4.5.7.	Determinação da eficiência de encapsulação de lipossomas.....	42
4.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1.	OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE GEL DE ALOE VERA	43
5.2.	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)	44
5.3.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	45
5.3.1.	Análise por espectroscopia UV-vis	45
5.3.2.	Determinação do diâmetro médio e potencial Zeta.....	47
5.3.3.	Microscopia Eletrônica de varredura com emissão do campo (FEG).....	48
5.3.4.	Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	49
5.4.	SÍNTESE DE LIPOSSOMAS	50
5.5.	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	51
5.5.1.	Determinação do diâmetro médio e potencial Zeta.....	51
5.5.2.	Microscopia Eletrônica de varredura com emissão do campo (FEG).....	54
5.5.3.	Análise por espectroscopia UV-vis	56
5.5.4.	Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	57
5.5.5.	Análise por difração de raios X.....	60
5.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	62
5.6.1.	Linearidade	62
5.6.2.	Limites de detecção e quantificação.....	63
5.6.3.	Repetibilidade e precisão intermediária.	63
5.6.4.	Especificidade	64
5.6.5.	Exatidão.....	64
5.6.6.	Robustez.....	65
5.7.	DETERMINAÇÃO DE PRATA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (FAAS).....	65
5.8.	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE LIPOSSOMAS	67

6.	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

Devido à citotoxicidade dos tratamentos quimioterápicos, atualmente o maior desafio é a liberação do agente terapêutico para as células neoplásicas, preservando a viabilidade de células normais. Em alguns casos, a eficácia dos agentes terapêuticos é grandemente reduzida devido à resistência adquirida por células cancerosas. Por tanto, terapias vetorizadas estão sendo desenvolvidas para enfrentar essa resistência e reduzir os efeitos colaterais indesejados. O uso de nanopartículas como transportadores de fármacos tem evoluído com o intuito de se concentrar na avaliação de segurança e eficácia de tais sistemas de liberação de fármacos (BUNJES, 2011).

Uma variedade de sistemas nanoparticulados, como dendrímeros, nanopartículas de ouro, lipossomas, micelas, e nanopartículas poliméricas têm sido descritas para melhorar a biodisponibilidade ou a eficácia terapêutica de fármacos antineoplásicos atualmente utilizados (LIU et al., 2009; WANG; SUI; FAN, 2010; ZHANG et al., 2011). A utilização de nanopartículas como agentes de administração de fármacos têm várias vantagens, incluindo a entrega ativa, através de mecanismos mediados pelos receptores, e a entrega passiva através do efeito de permeabilidade (WANG; SUI; FAN, 2010).

As nanopartículas de prata (AgNPs) tornaram-se os nanomateriais com o maior grau de comercialização devido às suas atividades antimicrobianas de amplo espectro (ALARCON et al., 2012; JOHNSTON et al., 2010; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). Apresentam, ainda, efeito anti-fúngico, antiviral, anti-biofilme, anti-inflamatório, anti-trombótico, além de melhorar a cicatrização de feridas (PANACEK et al., 2009; RAGASEEMA et al., 2012). As AgNPs também têm sido exploradas como nanosondas para a detecção e imagiologia de tumores, vetores para a liberação de fármacos, bem como inibidores, supressores da angiogênese e do crescimento do tumor (LIU et al., 2012).

As diversas técnicas de síntese de AgNPs geram interesse na pesquisa deste material, sobretudo a síntese verde, por suas vantagens sobre os métodos convencionais, os quais envolvem agentes químicos associados à toxicidade ambiental (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). Outra técnica de grande interesse para a obtenção de nanopartículas altamente estáveis, é a síntese verde, realizada por plantas ou extratos de plantas com a taxa elevada de produção. As plantas ou materiais derivados delas apresentam uma ampla variedade de metabólitos com potenciais redox, e que desempenham um papel importante como um agente de redução na síntese biogênica de prata (KEAT et al., 2015).

A fotoredução iniciada por radiação ultravioleta (UV), também considerada como síntese verde, é um método simples e efetivo para a produção de nanopartículas de prata e ouro. A irradiação permite às AgNPs se formar em tamanhos menores, além de uma distribuição homogênea estável e de tamanho uniforme (MAILLARD; HUANG; BRUS, 2003; PAREDES, 2011).

Outra substância que recebe atenção especial por suas propriedades relevantes é o Lupeol, triterpeno pentacíclico, encontrado em frutas, vegetais (por exemplo, azeitona, manga e figueira) e em várias plantas medicinais, que apresenta uma vasta gama de atividades farmacológicas, incluindo cicatrização de feridas e propriedades antimicrobianas (PETRONELLI; PANNITTERI; TESTA, 2009; SARATHA; PILLAI; SUBRAMANIAN, 2011). Estudos pré-clínicos conduzidos apresentaram a utilização do Lupeol como agente terapêutico e quimiopreventivo para o tratamento de inflamação e câncer. (SALEEM, 2009)

Os lipossomas são sistemas nanoparticulados que foram adotados por vários pesquisadores como o sistema de liberação de escolha para a administração de fármacos, vacinas e vetorização de agentes terapêuticos (GREGORIADIS, 1995; LI; AN, 2014). Devido à sua composição e estrutura únicas, os lipossomas têm uma série de características favoráveis, incluindo alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, elevada capacidade de transporte de fármacos e propriedades de manipulação facilmente ajustáveis. (ZHU et al., 2014)

Os triterpenos são componentes estruturais importantes das membranas das plantas, sendo que os triterpenos livres estabilizam as bicamadas dos fosfolipídios nas membranas das células vegetais, assim como o colesterol nas membranas celulares de animais (HAMED I et al., 2014; SALEEM, 2009). Além do que, o lupeol apresenta uma estrutura química similar ao colesterol.

Assim, considerando a importância da constante busca por novos sistemas com potencial ação antitumoral e/ou antimicrobiana, como alternativa aos tratamentos convencionais, este trabalho propõe o desenvolvimento de lipossomas contendo em sua bicamada lipídica colesterol ou lupeol e carregados com nanopartículas de prata, obtidas por método de síntese verde.

2. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e caracterizar lipossomas contendo colesterol ou lupeol em sua bicamada lipídica, carregados com nanopartículas de prata, obtidas por síntese verde.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e caracterizar nanopartículas de Prata pelo processo de síntese verde, com extrato de gel de *Aloe vera* com exposição à luz solar.
- Desenvolver e caracterizar lipossomas a partir de fosfatidilcolina e colesterol ou lupeol, pelo método de evaporação de fase reversa modificada.
- Encapsular nanopartículas de prata em lipossomas contendo colesterol ou lupeol na bicamada lipídica.
- Desenvolver e validar um método analítico por Espectrometria de Absorção Atômica de Chama para a quantificação das Nanopartículas de Prata em solução e nos lipossomas.
- Determinar a taxa de encapsulação das nanopartículas de prata nos lipossomas, por Espectrometria de Absorção Atômica de Chama.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido amplamente utilizadas em uma variedade de aplicações biológicas, tais como atividade antimicrobiana, anti-biofilme, anti-trombótica, anti-inflamatória, e na cicatrização de feridas. Recentemente, AgNPs têm mostrado grande potencial na área do tratamento do câncer porque estão seletivamente envolvidas no rompimento da cadeia respiratória mitocondrial, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e interrupção da síntese da adenosina trifosfato (ATP) (GUO et al., 2015).

Em baixas concentrações a prata é segura para o organismo humano (Concentração de Prevenção da Mutação de 0,05 mg/L), mas mostra uma ação destrutiva contra a maioria das bactérias e vírus, por isso há anos é ativamente usada para desinfetar a água e para o controle de infecção. O uso de prata na forma de nanopartículas pode reduzir a sua concentração de uso centenas de vezes em relação à forma iônica, mantendo todas as propriedades antimicrobianas. (MUKHA et al., 2013)

Há relatos que as AgNPs sintetizadas exibiram atividade antifúngica eficaz contra *Candida albicans*, *Candida non albicans* e *Candida tropicalis* (ANNADHASAN et al., 2012; MEDDA et al., 2014; PANACEK et al., 2009; REDDY et al., 2015), *Rhizopus sp.* e *Aspergillus sp.* (MEDDA et al., 2014).

Um fenômeno associado às partículas de prata de dimensões nanométricas é a interação com a luz visível, mais efetiva do que qualquer cromóforo conhecido orgânico ou inorgânico. Essa interação é uma consequência da grande densidade de elétrons condutores, do seu tamanho de dimensões de confinamento menores do que o percurso livre médio, e da dependência de frequência única das partes reais e imaginárias da função dielétrica no metal, coletivamente resultando na existência de superfície de ressonâncias de plasmon. (BHUI et al., 2009)

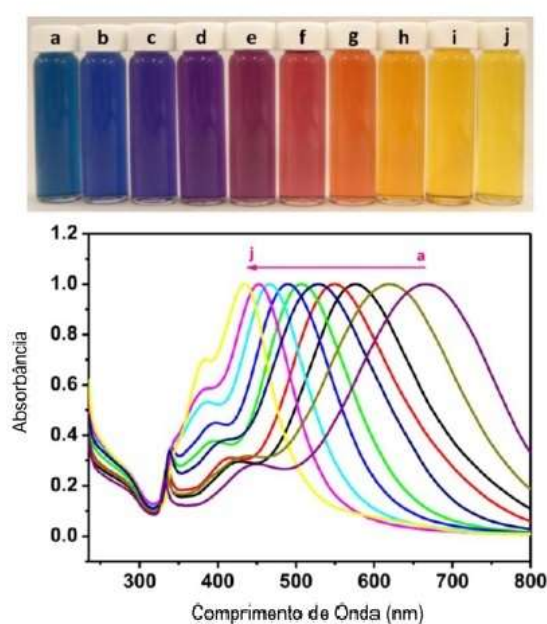
Estas nanopartículas metálicas têm uma absorção de ressonância de plasmon de superfície na região UV-Visível. A banda de plasmon de superfície surge da existência coerente de elétrons livres na banda de condução devido ao pequeno tamanho de partícula. O deslocamento da banda depende do tamanho da partícula, do ambiente químico, das espécies adsorvidas na superfície e da constante dielétrica. Uma característica destas partículas de

metal sintetizadas é que uma alteração na absorbância ou comprimento de onda define uma medida do tamanho, forma e propriedades da partícula (BHUI et al., 2009; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

O campo elétrico oscilante de luz incidente induz um dipolo elétrico na partícula deslocando uma porção de elétrons que se deslocam numa direção que se afasta do resto da partícula metálica, gerando deste modo uma carga negativa líquida de um lado da partícula. Como o resto dos núcleos e seus elétrons internos não mudam, eles são uma carga oposta positiva (rede catiônica). Esta separação de carga vai agir como uma força de restauração do equilíbrio. Em pequenas partículas se produz um dipolo, mas em partículas maiores (30 nm) ocorre um quadrupolo e geralmente multipolos, o que exige uma situação muito complexa. (CRUZ et al., 2012)

Na literatura é possível encontrar uma diversidade de espectros de ressonância plasmônica superficial (RPS) de nanopartículas de prata na região visível e as colorações das soluções vão de amarelo até azul (MARTINEZ; ZUÑIGA; SANCHEZ, 2013). Além disso, a cor das soluções das nanopartículas de metal nobre indica a sua forma e o tamanho (Figura 1), e ocorre devido à dependência morfológica da ressonância plasmônica de superfície localizada (TANG et al., 2013, 2014).

Figura 1 - Fotografia de soluções de nanopartículas de prata sintetizadas com cores diferentes e espectros de extinção das AgNPs correspondentes às soluções.



Fonte: (TANG et al., 2013)

Assim, são conhecidos como plasmon de superfície localizados nas oscilações coletivas de elétrons restritos em volumes pequenos de metal. Para este fenômeno acontecer, a partícula tem de ser muito menor do que o comprimento de onda da luz incidente.

2.2. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

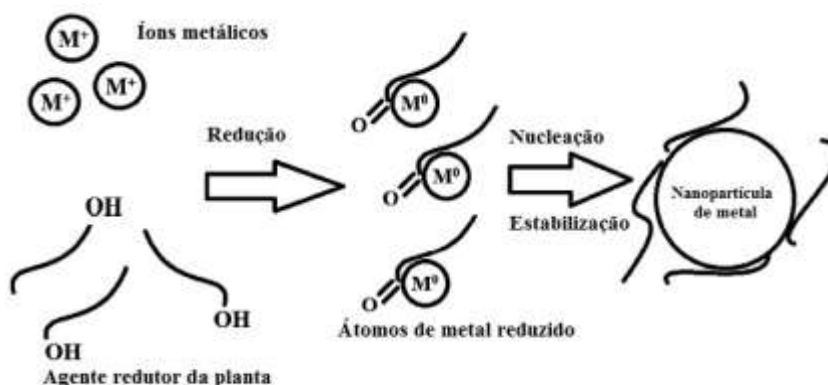
As nanopartículas metálicas têm sido reconhecidas por ter propriedades físicas e químicas únicas baseadas no seu tamanho quântico, o que leva a uma série de aplicações biomédicas interessantes. A prata e o ouro estão entre os íons mais importantes, flexíveis, confiáveis e proeminentes para a utilização da síntese verde de nanopartículas a partir de plantas medicinais e seus componentes (RAO et al., 2016).

Métodos biológicos de síntese de nanopartículas usando microrganismos, enzimas e plantas ou extratos de plantas oferecem inúmeros benefícios comparados com métodos químicos e físicos. Tem ótimo custo-benefício, são ambientalmente inofensivos, e de fácil transposição para a síntese em escala industrial (SULAIMAN et al., 2013).

As plantas ou materiais derivados delas apresentam uma ampla variedade de metabólitos com potenciais redox, e que desempenham um papel importante como um agente de redução na síntese biogênica de nanopartículas. Em comparação com a síntese microbiana de nanopartículas, nanopartículas altamente estáveis são sintetizadas por plantas ou extratos de plantas com a taxa mais elevada de produção (KEAT et al., 2015).

Assim, um diagrama esquemático de um mecanismo proposto para a fabricação de nanopartículas metálicas mediada por plantas está ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática de um mecanismo proposto para a síntese de nanopartículas de metais mediada por plantas



A síntese verde de AgNPs envolve três etapas principais, que devem ser avaliadas com base nas perspectivas da química verde, incluindo (1) seleção de meio solvente, (2) seleção de agente redutor ambientalmente benigno e (3) seleção de substâncias não tóxicas para a estabilidade (efeito “capping”) das nanopartículas de prata (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

2.2.1. *Aloe vera*

O gênero *Aloe* (*Asphodelaceae*) compreende mais de 500 espécies, mas apenas algumas delas são de importância médica. Dentre elas, o *Aloe vera* é a espécie mais importante. Suas folhas contêm mais de 200 constituintes bioativos, incluindo aminoácidos, antraquinonas, enzimas, minerais, vitaminas, ligninas, monossacarídeos, polissacarídeos, ácido salicílico, saponinas, e esteróis. (DINESH et al., 2015)

Aloe vera L. (syn. *Aloe barbadensis* Miller) é uma planta da família Xanthorrhoeaceae e sub-família asphodelaceae (angiospermas Filogenia Grupo III Sistema de 2009) que possui atividade antioxidante e propriedades terapêuticas. O gel parenquimatoso das folhas de *A. vera* L. é amplamente utilizado em bebidas de suplementos de saúde e produtos de cuidados da pele. Os principais componentes do gel de *A. vera* podem ser classificados em cinco grupos diferentes: fenóis, sacarídeos (manose, glucomanano, acemanano, etc), vitaminas, enzimas e substâncias de baixo peso molecular (CHOI; CHUNG, 2003; RAY; GUPTA; GHOSH, 2013).

A porção de látex da planta e o suco amarelo obtido a partir das células do periciclo sob o parênquima da planta são utilizados com maior frequência na indústria farmacêutica. O látex contém aloe-Emodina, uma antraquinona que é um irritante gastrointestinal e age como um catártico. O gel de aloe é obtido a partir de células mucilaginosas de parede fina da zona central interna da folha. A composição química da planta de *Aloe vera* varia de acordo com a espécie, o clima e as condições de crescimento, podendo conter gordura, proteína, fibra, 25,5% de açúcares (glucose e manose), 30% de mucilagem, 22,3% óleo bruto de aloína e resina (KLEIN; PENNEYS; MIAMI, 1988).

Principalmente o gel que é encontrado na parte central da planta é usado para extração dos compostos fitoquímicos. O gel colorido verde perto do parênquima contém aloína, que é considerado como o principal agente estabilizador e também emodina, que é um agente de redução fitoquímica. Este extrato vegetal já foi utilizado para sintetizar AgNPs estáveis. (SADHASIVAM; DURAIRAJ, 2014)

A Tabela 1 resume os componentes do *Aloe vera*.

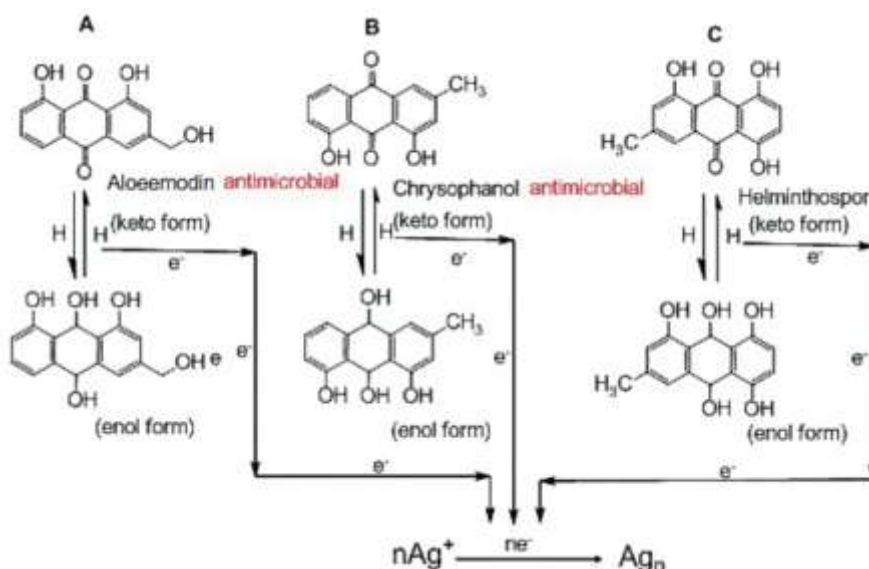
Tabela 1 - Principais componentes do *Aloe vera*

GRUPOS	COMPONENTES
ANTRAQUINONAS	aloe-emodin Acido aloetico Aloína Antranol Barbaloína Isobarbaloína Emodina Éster de ácido cinâmico
SACARÍDEOS	Celulose Glucose Manose Aldopentose Manano acetilado (acemannano) Glucomanano Glucomanano acetilado Galactogalacturano Glucogalactomanano Galactoglucarabinomanano
VITAMINAS	B1 B2 B6 C β -caroteno Colina Acido fólico α -tocoferol
ENZIMAS	Amilase Carboxipeptidase Catalase Ciclooxigenase Lipase Oxidase
SUBSTÂNCIAS COM BAIXO PESO MOLECULAR	Ácido araquidônico Colesterol Giberelina Substância semelhante a lectina Ligninas Ácido salicílico β -Sitosterol Esteroides Triglicerídeos Ácido úrico

Fonte: Adaptado de CHOI e CHUNG (2003)

Para Zhang, Y. et al (2010), algumas moléculas bioativas e benzoquinonas em extratos de plantas como o de *Aloe vera* poderiam atuar como agentes redutores para a formação de nanopartículas metálicas (Figura 3). Por tanto, a rica composição fitoquímica é essencial para a síntese verde de AgNPs.

Figura 3 - Possível mecanismo de biossíntese de Nanopartículas de Prata através do conteúdo de Quinonas em extratos frescos de *Aloe vera*.



Fonte: Zhang, Yixia et al. (2010)

2.2.2. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR FOTORREDUÇÃO

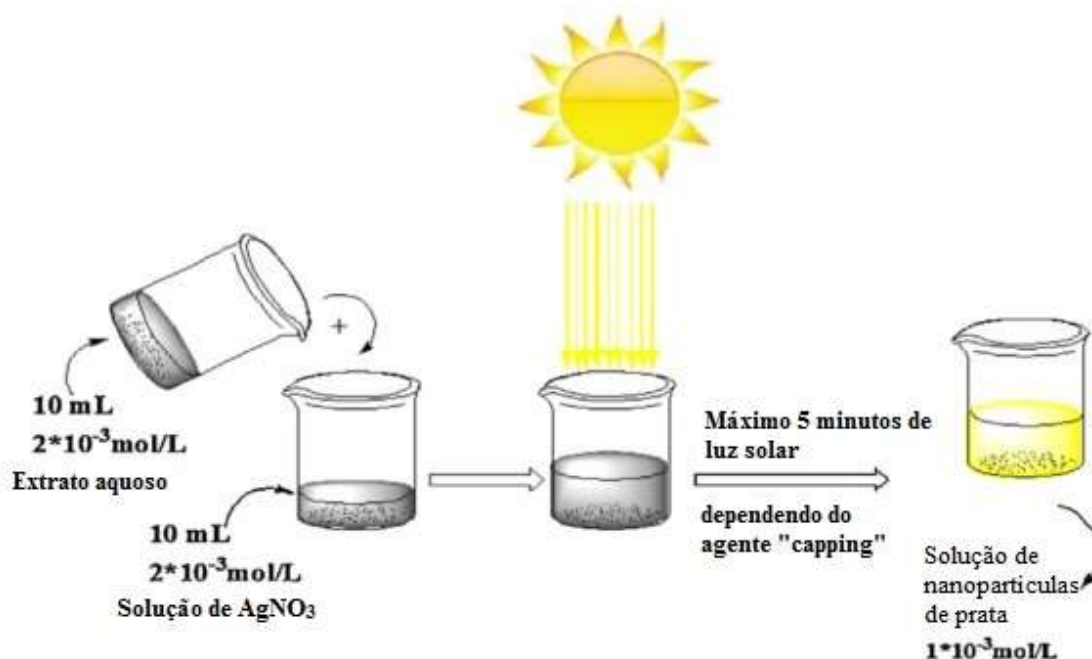
A fotoredução iniciada por radiação ultravioleta (UV) é um método simples e efetivo para a produção de AgNP e nanopartícula de ouro. A síntese já foi relatada na presença de citrato, polivinilpirrolidona (PVP), poli(ácido acrílico) (PAA), ou colágeno.

A irradiação permite às AgNPs se formar em tamanhos menores, além de uma distribuição homogênea estável e de tamanho uniforme. Ao desenvolver este tipo de síntese em presença de íons citrato, a formação de AgNPs depende fortemente do comprimento de onda de excitação que for aplicada sobre a superfície dos elétrons oscilantes das partículas metálicas (MAILLARD; HUANG; BRUS, 2003; PAREDES, 2011).

Shaban et al. (2015), utilizou luz solar para preparar AgNPs a partir de uma solução de nitrato de prata, o agente redutor foi a luz solar com a assistência de um preparado de

tensoativos catiônicos e depois de um curto tempo a coloração da solução mudou de transparente para amarelo (Figura 4).

Figura 4 – Esquema de foto-preparação *in situ* de AgNPs



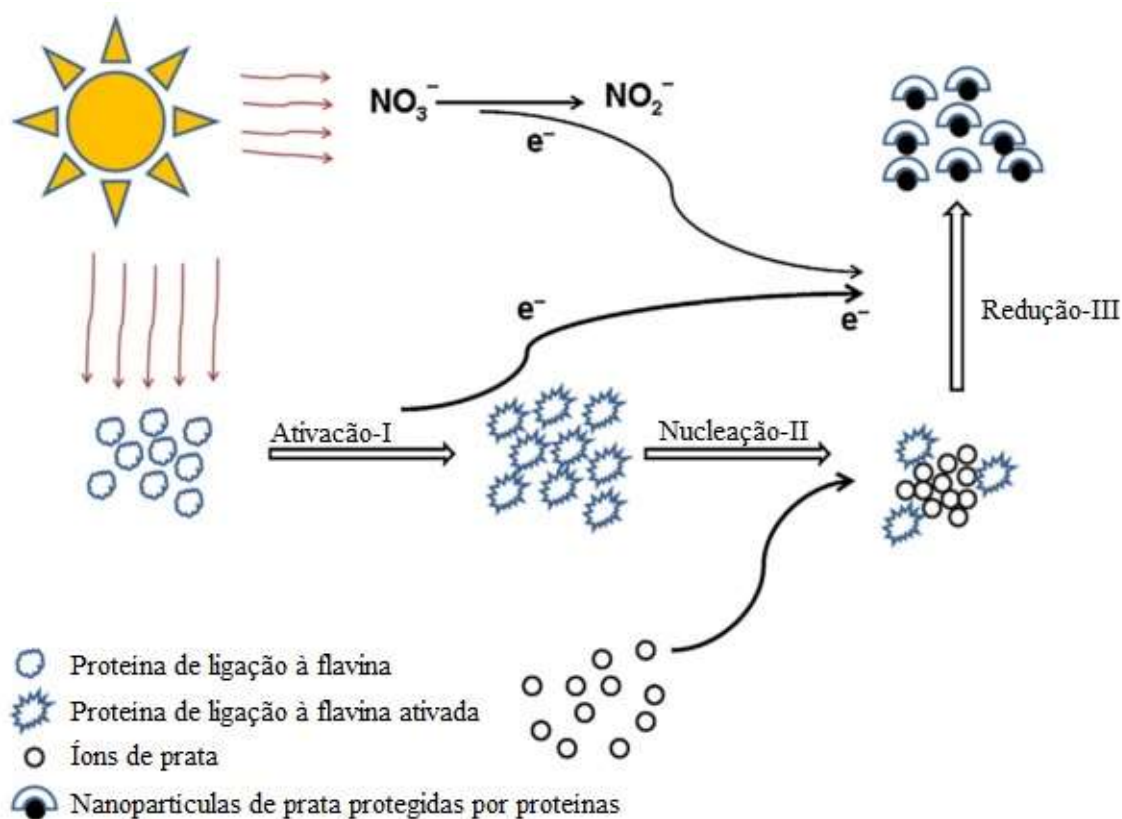
Fonte: adaptado de Shaban (2015)

Gade et al. (2014) propõem um mecanismo de três etapas para a síntese de AgNPs esféricas por o fungo *Phoma glomerata* (Figura 5). O primeiro passo é a ativação, que inclui a ativação por fotossensibilização de compostos aromáticos no filtrado fúngico na exposição à luz solar intensa. O segundo passo é a nucleação, que envolve o papel de compostos aromáticos fotossensibilizados ou proteínas para iniciar a síntese de AgNPs esféricas agindo como agente de cobertura, e a terceira etapa exibe a síntese real por redução de íons de prata para formar AgNPs.

Este passo inclui a doação de elétrons seja pelo nitrato inorgânico ou por compostos aromáticos fotossensibilizados a partir de filtrado fúngico, doando um elétron aos íons prata e conduzindo à sua redução para formar AgNPs esféricas.

Os nitratos metálicos podem ser decompostos devido ao calor gerado na exposição à luz solar forte, isto é, termicamente aos respectivos óxidos.

Figura 5 - Mecanismo de três etapas da microfabricação esférica de AgNPs por *P. glomerata*.



Fonte: adaptado de Gade et al. (2014)

2.3. LIPOSSOMAS

Descobertos em 1961 pelo hematologista britânico Bangham, as vesículas lipídicas ou lipossomas são vesículas esféricas constituídas por bicamadas fosfolipídicas envolvendo uma cavidade aquosa. De acordo com o seu tamanho, formato, morfologia e características físico-químicas, estas estruturas possuem a capacidade de encapsulamento de fármacos hidrofílicos em seu núcleo aquoso e/ou fármacos hidrofóbicos nas bicamadas lipídicas. Devido a esta propriedade, oferecem ampla aplicação em diversas áreas. E, existem vários produtos de liberação de fármaco mediados por lipossomas aprovados em ensaios clínicos. (LI; AN, 2014; MERTINS, 2004; ZHU et al., 2013).

Demonstrou-se que os fosfolipídios impulsivamente formam estruturas fechadas quando são hidratados em soluções aquosas. Os lípidos são anfipáticos (tanto hidrófobos como hidrofílicos) em meio aquoso, as suas propriedades de fase termodinâmicas e as

características de automontagem influenciam a confiscação entropicamente focalizada das suas secções hidrofóbicas em bicamadas esféricas. Essas camadas são referidas como lamelas (AKBARZADEH et al., 2013)

Para a obtenção de lipossomas as proporções de cada fosfolipídio em uma mistura são variadas de acordo com as características físico-químicas pretendidas. Misturas de fosfolipídios neutros com fosfolipídios carregados negativamente ou positivamente (10 - 20% mol/mol) diminuem a auto-agregação das estruturas (MERTINS, 2004). Além disso, a escolha dos componentes das bicamadas determina a "rigidez" ou "fluidez" e a carga da bicamada. Por exemplo, espécies de fosfatidilcolina insaturada de fontes naturais (fosfatidilcolina de ovo ou de soja) fornecem bicamadas muito mais permeáveis e menos estáveis, enquanto que os fosfolipídios saturados com cadeias de acilo longas (por exemplo, dipalmitoilfosfatidilcolina) formam uma estrutura de bicamada rígida e não permeável (AKBARZADEH et al., 2013).

Outros componentes podem entrar na formulação visando a modificação de determinadas características ou o aumento da estabilidade relativa dos lipossomas. O uso do colesterol é bastante comum, estudos demonstraram que numa proporção de 30% (mol/mol) podem aumentar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* de lipossomas. (MERTINS, 2004)

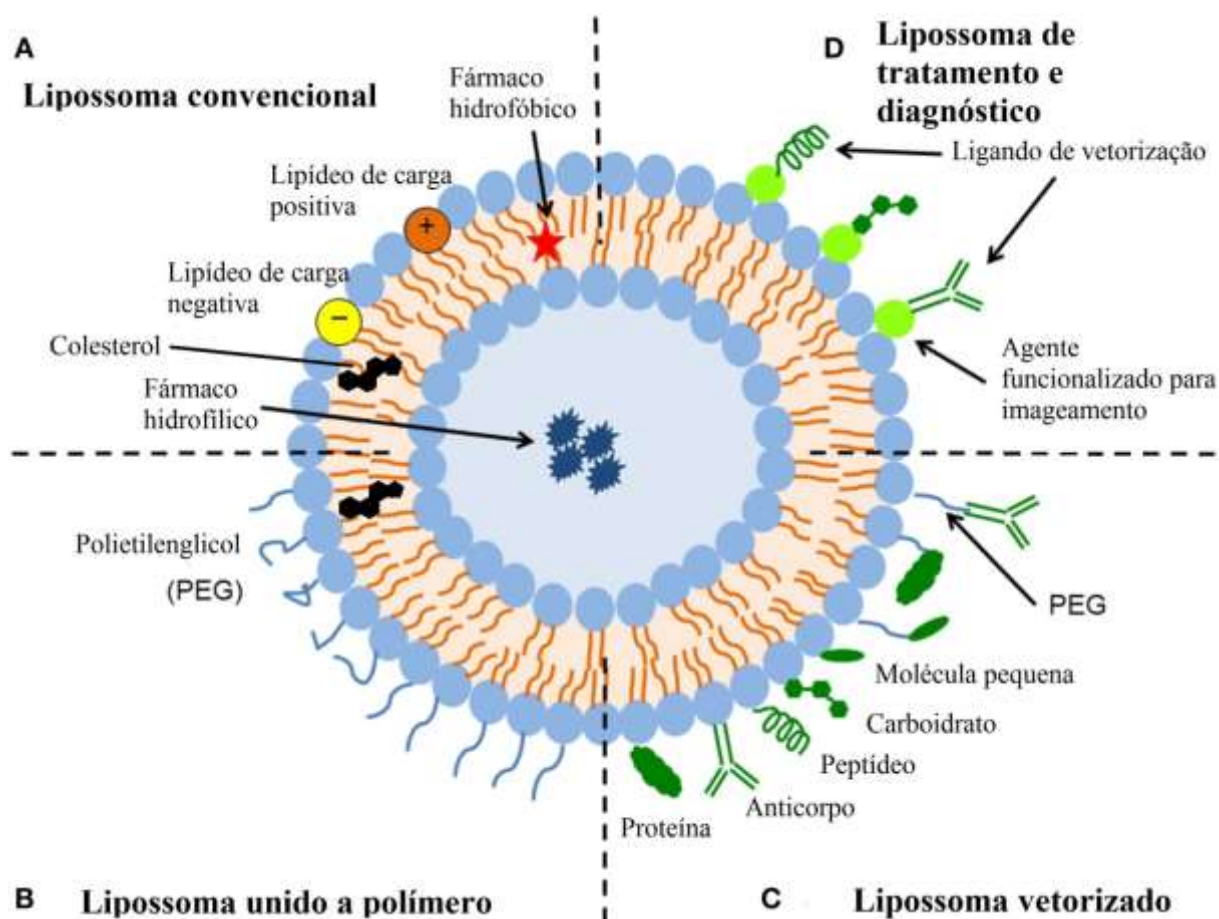
Agentes antioxidantes como o α -tocoferol, butilidroxitolueno, butilidroxianisol são utilizados para reduzir a oxidação das ligações insaturadas dos fosfolipídios. O meio polar em que os lipossomas são produzidos normalmente é água ou solução aquosa tamponada a pH= 7,4 (MERTINS, 2004; PARMENTIER et al., 2011).

A Figura 6 mostra uma representação esquemática de lipossomas como sistemas de liberação de fármacos (SERCOMBE et al., 2015). Os lipossomas convencionais (A) consistem numa bicamada lipídica que pode ser composta de fosfolipídios catiônicos, aniônicos ou neutros e colesterol, que encerra um núcleo aquoso. Tanto a bicamada lipídica como o espaço aquoso podem incorporar compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, respectivamente.

Em Lipossomas unidos a polímero (B), as características e o comportamento *in vivo* podem ser modificados por adição de um revestimento polimérico hidrofílico, como o polietilenoglicol (PEG), à superfície do lipossoma para conferir estabilização estérica. Os lipossomas vetorizados (C) estão unidos a um ligante específico, por exemplo, anticorpos,

peptídeos e carboidrato à superfície ou à extremidade terminal das cadeias PEG ligadas. E os lipossomas de tratamento e diagnóstico (D), se apresentam como um único sistema formado por uma nanopartícula, um elemento de vetorização, um agente funcionalizado para imageamento e um componente terapêutico.

Figura 6 - Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas como sistemas de liberação de fármacos.



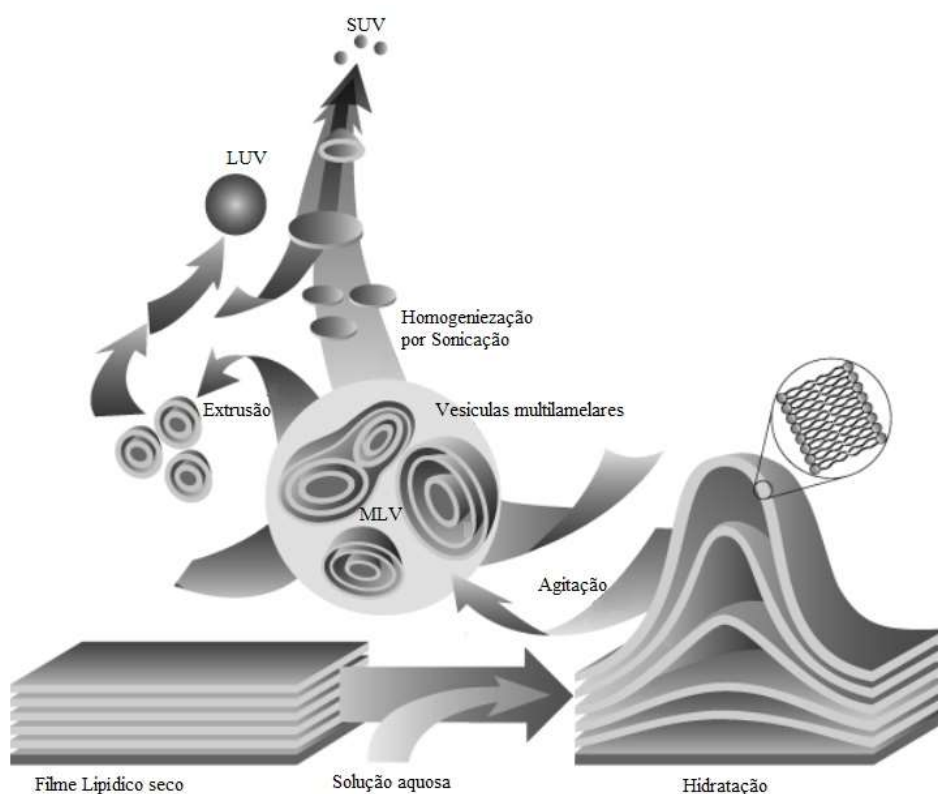
Fonte: Adaptado de Sercombe et al. (2015).

Dependendo da metodologia, do tamanho da vesícula, dos componentes lipídicos e do tipo de fármaco, os valores de encapsulação podem variar de menos de 1% a 100% do fármaco utilizado (GREGORIADIS, 1995).

Os tipos de lipossomas são classificados de acordo com o seu tamanho e o fato da sua estrutura ser formada por uma única lamela ou por mais de uma (Figura 7). Lipossomas multilamelares (MLV - *multilamellar vesicles*), também chamados de oligolamelares (OLV - *oligolamellar vesicles*), possuem um diâmetro médio que varia geralmente de 400 nm a alguns micrômetros. Lipossomas unilamelares são definidos em dois grupos: lipossomas unilamelares grandes (LUV - *large unilamellar vesicles*) com diâmetros entre 80 nm e 1 µm e

lipossomas unilamelares pequenos (SUV - *small unilamellar vesicles*) com diâmetros variando entre 20 e 80 nm ou 100 nm. Também existem os lipossomas gigantes unilamelares (GUV - *giant unilamellar vesicles*) ou oligolamelares (GOV - *giant oligolamellar vesicles*) com diâmetros superiores a 1 μm , podendo chegar a dezenas de micrômetros (GREGORIADIS, 1995; MERTINS, 2004; RODRIGUEZ, 2003).

Figura 7 - Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares (MLV), Vesículas unilamelares pequenas (SUV) e Vesículas unilamelares grandes (LUV).



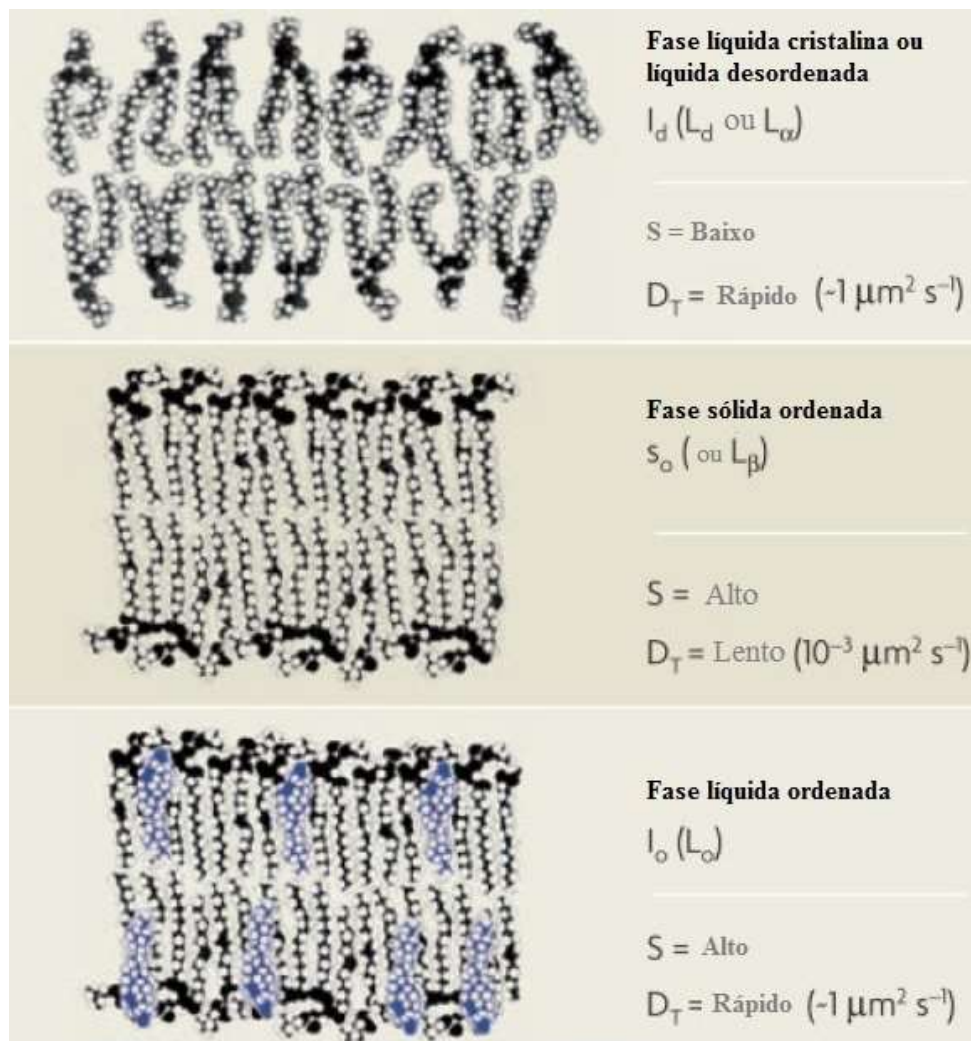
Fonte: Adaptado de Avanti (2016)

O colesterol é uma biomolécula importante para a função da membrana celular devido à sua capacidade de controlar a fluidez da membrana lipídica. O colesterol é frequentemente adicionado aos lipossomas de fosfolípidios para melhorar a estabilização. (ARAMAKI et al., 2016)

Em uma membrana celular o colesterol muda a fluidez e contribui para a estabilização e a regulação do transporte de material através da membrana celular. A mistura de colesterol nas membranas fosfolipídicas induz a transição de fase para a fase ordenada líquida (LO), que é uma fase intermédia entre a fase desordenada líquida (cristalina líquida) e a fase cristalina (ARAMAKI et al., 2016; MERTINS, 2004)

Devido a interações hidrófobas, os lipídeos podem ser encontrados em várias fases (Figura 8), as quais descrevem a ordem bidimensional de translação como a ordem conformacional da cadeia que ocorre nas fases: A fase de gel é referida como a fase solidificada (SO), onde "S" para o sólido, e "O" refere-se à ordem cristalina. De modo semelhante, na fase cristalina líquida a baixa concentração de colesterol é designada por desordem líquida (LD), enquanto que em concentração elevada de colesterol existe uma fase (LO) líquida ordenada (IPSEN et al., 1987).

Figura 8 - Comportamentos de fase da membrana lipídica



S: O parâmetro de ordem de um segmento de cadeia acilo e D_T : O coeficiente de difusão translacional

Fonte: Adaptado de VAN MEER; VOELKER; FEIGENSO, (2008)

Em presença de maior quantidade de colesterol, a bicamada de lipossoma torna-se completamente na fase líquida ordenada (LO), mesmo que o Colesterol seja uma molécula

não iônica levando a uma menor população de moléculas de ácido fosfatídico carregadas negativamente na camada externa de lipossomas, devido à difusão molecular do ácido fosfatídico. (ARAMAKI et al., 2016)

Em baixas concentrações de colesterol, ocorre um ligeiro alargamento da transição de fase principal, enquanto que em concentrações mais elevadas a fase líquida da bicamada pura é dramaticamente estabilizada. (IPSEN et al., 1987) A associação de fosfatidilcolina e colesterol pode adotar duas fases fluidas coexistentes: líquido-ordenado (LO) e líquido-desordenado (LD), como pode ser visualizado na Figura 8 (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

A importância do desenvolvimento de estruturas que contêm fosfolipídios, colesterol e triglicerídeos é que estas moléculas são transportadas por apolipoproteínas (WEST; TAYLOR, 1995), as quais são um potencial agente vetorizante para enfermidades cancerígenas, devido a estas células malignas terem uma super-expressão de receptores de para HDL ou LDL, por causa de seu elevado consumo de colesterol. (HO et al., 1978; KADER; PATER, 2002; PINHEIRO; GARCIA; MARANHÃO, 2005; RENSEN et al., 2001; RODRIGUES et al., 2002; TATIDIS et al., 2001; TIRADO et al., 2012)

Na natureza, as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) tem uma estrutura de núcleo-invólucro compreendendo um domínio do núcleo de ésteres de colesterol e ácidos graxos poli-insaturados dentro de uma camada bilipídica conformada de fosfolipídios, colesterol não esterificado e uma única apolipoproteína, B-100 (KIM et al., 2015). Assim, as nanopartículas de lipídeos concebidas para imitar a composição de LDLs poderiam proporcionar um sistema de liberação de fármaco em nanopartículas biocompatíveis voltada para células cancerígenas com receptores para LDL e HDL super expressos.

2.4. LUPEOL

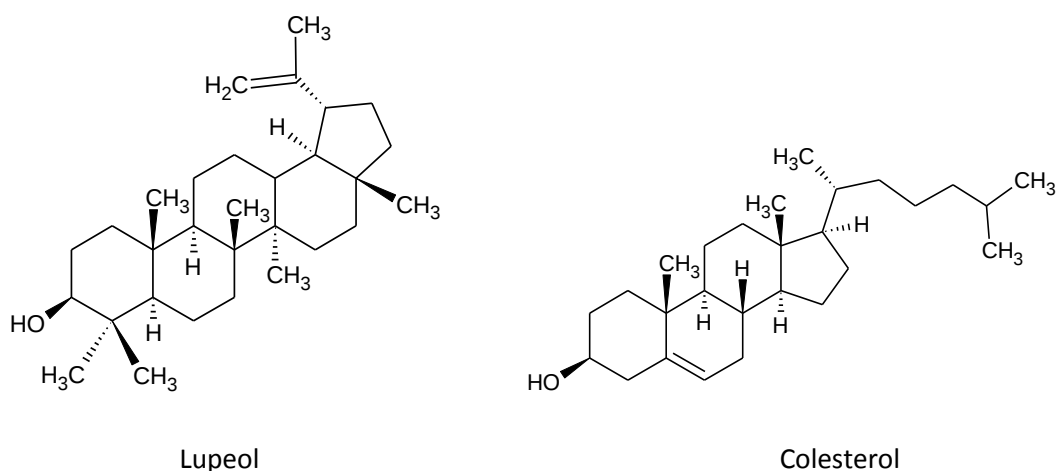
Existe um interesse crescente em triterpenóides naturais, também conhecidos como fitoesteróis, devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas. Os triperpenos são importantes componentes estruturais das membranas vegetais e triterpenos livres servem para estabilizar as bicamadas fosfolipídicas nas membranas das células vegetais, tal como o colesterol nas membranas celulares de animais (HAMED I et al., 2014; SALEEM, 2009).

O lupeol é um triterpeno pentacíclico de especial interesse, encontrado em frutas, em muitos vegetais (por exemplo, azeitona, manga e figueira) e em várias plantas medicinais,

além disso, apresenta uma vasta gama de atividades farmacológicas, incluindo cicatrização de feridas e propriedades antimicrobianas (PETRONELLI; PANNITTERI; TESTA, 2009; SARATHA; PILLAI; SUBRAMANIAN, 2011). Estudos pré-clínicos apresentaram a utilidade do Lupeol como um agente terapêutico e quimiopreventivo para o tratamento de inflamação e câncer (SALEEM, 2009). Além da viabilidade clínica da aplicação de lupeol para o tratamento da acne (KWON et al., 2015a).

A estrutura química do Lupeol é semelhante a do colesterol conforme é apresentado na Figura 9. A fórmula química de Lupeol é $C_{30}H_{50}O$ e seu ponto de fusão é 215-216 ° C, e o colesterol ($C_{27}H_{46}O$) tem um ponto de fusão de 148°C. As propriedades calculadas a partir da estrutura de Lupeol mostram que tem um peso molecular de 426,7174 g / mol. (SALEEM, 2009; SARATHA; PILLAI; SUBRAMANIAN, 2011)

Figura 9 - Estrutura química do Lupeol e do Colesterol.



Fonte: O autor (2017)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. EQUIPAMENTOS

- Balança semi-analítica de prato único (SHIMADZU. Modelo UX420H, Quioto, Japão);
- Rotaevaporador (QUIMIS, Diadema - SP - Brasil);
- Lavadora Ultrassônica (MAXICLEAN, modelo USC-1600^a, SP - Brasil);
- Ultraturrax (IKA. Modelo T18 Basic, Campinas (Cambuí) – SP - Brasil);
- Estufa (QUIMIS, modelo Q316M4, Diadema - SP - Brasil);
- pHmetro (HANNA, modelo HI 221, São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro de Absorção Atômica (VARIAN AA240FS, Mulgrave, Victoria 3170, Austrália);
- Difrátômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR PRESTIGE 21, Quioto, Japão);
- Espectrofotômetro UV-VIS (NIR VARIAN CARY 50, Estados Unidos);
- Ultrafreezer (NUAIRE, modelo GLACIER -86°C, Plymouth, USA);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo HIMAC CR21GII, Tóquio, Japão);
- Liofilizador (TERRONI, modelo LD1500A, São Paulo, Brasil);
- Sistema ultrapurificador de água (MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Sistema de Osmose reversa (QUIMIS, Diadema - SP - Brasil);
- Analisador de potencial zeta, peso molecular e tamanho de partícula ZETASIZER NANO SERIES (MALVERN, modelo NANO ZS90, Reino Unido);
- Metalizador (QUORUM TECHNOLOGIES, modelo SC7620 Mini Sputter Coater, , Londres, Reino Unido);
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo FEG-SEM (TESCAN, modelo MYRA3, República Tcheca).

4.2. REAGENTES E SOLVENTES

- Nitrato de Prata 99,8% (BIOTEC, São Paulo, Brasil);
- Colesterol 94 % (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Clorofórmio P.A. ACS 99.8% (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Lupeol, obtido a partir de *Maytenus salicifolia* (Celastraceae), pela professora Cássia Magalhaes (Núcleo de Estudos de Plantas Medicinais NEPLAM do departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais), (MAGALHÃES et al., 2011);

- Água purificada Milli-Q (MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- L- α -Phosphatidylcoline $\geq 99\%$ de gema de ovo (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Brometo de potássio grau FTIR, $\geq 99\%$ (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos)

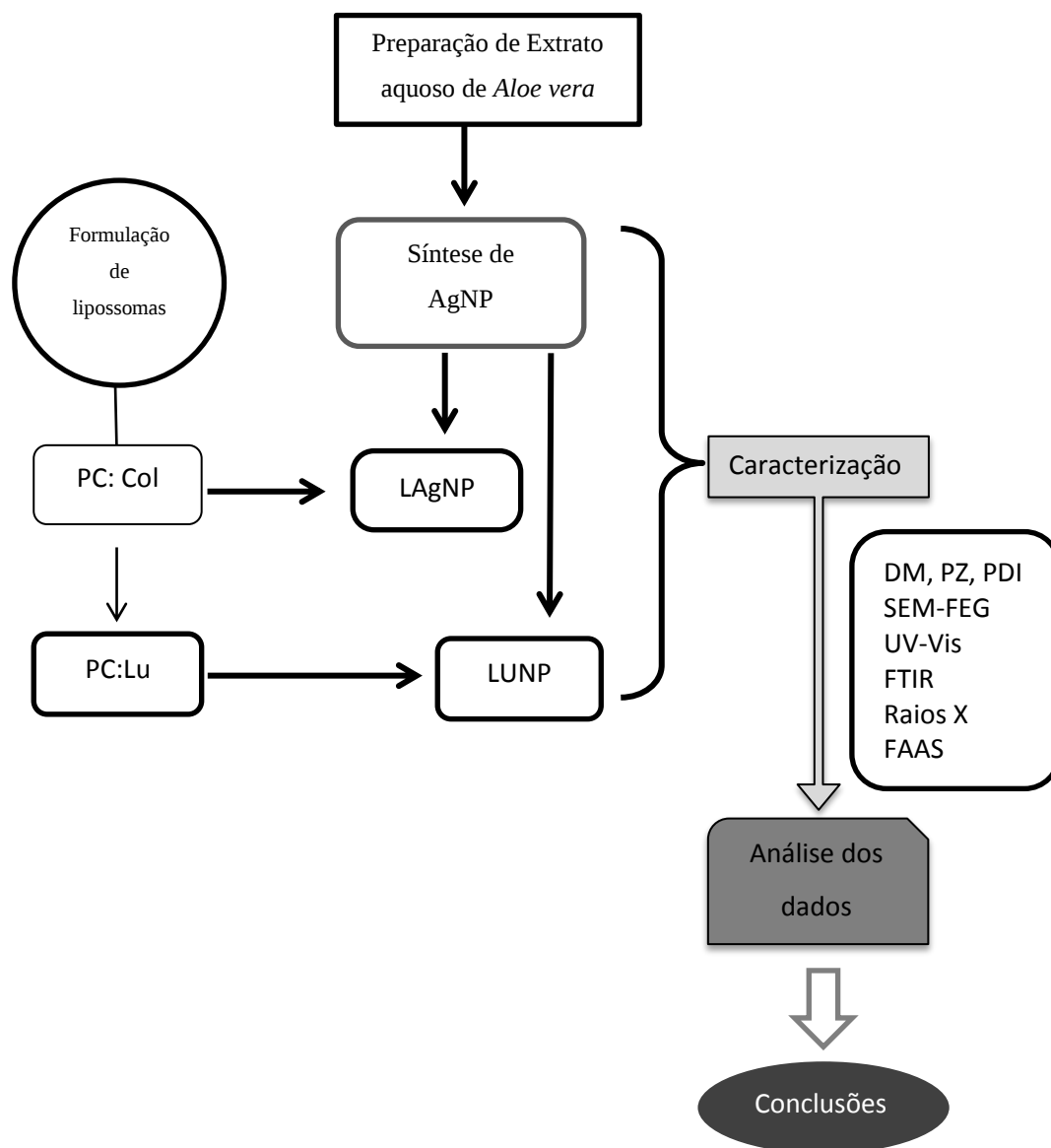
4.3. MATERIAIS

- Seringas 3, 10 e 20 mL;
- Agulha hipodérmica Gris 27G (0.4 mm) 5/8" (BD);
- Papel filtro qualitativo tamanho de poro 14 μ m (QUALY);
- Filtro de seringa tamanho de poro 0,22 μ m K18-230 (KASVI);
- Frasco coletor universal (J.PROLAB);
- Tubos FALCON de 15 e 50 mL;
- Tubos de EPPENDORF 2 mL.

4.4. DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas do trabalho foram resumidas no fluxograma ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - fluxograma das etapas experimentais do estudo



AgNP	: Nanopartículas de prata
LAgNP	: Lipossomas carregados com nanopartículas de prata
LUNP	: Lipossomas contendo lupeol e carregado com nanopartículas de prata
PC:Col	: Lipossoma sem nanopartículas de Prata
PC:Lu	: Lipossoma contendo Lupeol, em substituição de colesterol.
DM,PZ, PDI	: Diâmetro médio, Potencial Zeta, índice de polidispersão.
SEM-FEG	: Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
UV-Vis	: Espectroscopia de ultravioleta
FTIR	: Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
FAAS	: Espectroscopia de Absorção atômica de chama

4.5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.5.1. Obtenção do Extrato Aquoso de gel de *Aloe vera*

O extrato aquoso do gel de *Aloe vera* foi preparado de acordo com o relato de alguns autores (ASHRAF et al., 2016; SADHASIVAM; DURAIRAJ, 2014; ZHANG et al., 2013), com pequenas modificações. Folhas frescas e saudáveis foram recolhidas do horto da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e lavadas cuidadosamente com água da torneira seguida de água destilada para remover toda a poeira e partículas visíveis indesejáveis, depois foram secos à temperatura ambiente para remover a água da superfície das folhas, e o gel foi retirado cuidadosamente. Em seguida, 10 g deste gel foram transferidos para um béquer de 250 mL contendo 100 mL de água destilada, com homogeneização em ultraturrax e aquecimento a 80°C por 20 minutos. Deixou-se em esfriamento em temperatura ambiente, e em seguida o gel foi centrifugado a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C e foi filtrado em um filtro de seringa de 0,22 μm de poro. Os filtrados foram depois armazenados a 4°C a 8°C e utilizados como agentes de redução e agentes de estabilização na síntese de AgNPs.

Para avaliar a presença de antraquinonas e derivados antracênicos no extrato, foi feito um teste qualitativo, mediante a reação de 2 a 3 gotas da amostra adicionada de 5 a 6 gotas de NaOH 2N. A coloração amarela, vermelho ou roxo indica presença de antraquinonas, dependendo da concentração destes no extrato. A presença de antraquinonas também foi pesquisada por meio da reação de Borntränger, utilizando-se uma solução de NH_4OH 25%, que permite a identificação por complexação de cor amarela, âmbar ou vermelho, dependendo também da concentração de antraquinonas na amostra. (SAAVEDRA N. et al., 2010)

4.5.2. Síntese de Nanopartículas de Prata (AgNP)

Para a síntese das AgNPs, foi preparada uma solução aquosa de nitrato de prata 1mM (AgNO_3). Em seguida, 10 mL de extrato de gel de *Aloe vera* foram adicionados a 90 mL de solução aquosa de AgNO_3 1mM e a mistura foi exposta à luz solar do meio dia durante 30 segundos até um minuto, no horário em que apresenta maior radiação solar global, com aproximadamente 0,05 $\text{MJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ (PEREIRA; VRISMAN; GALVANI, 2002), segundo uma avaliação feita no município de Ponta Grossa, PR, Brasil (latitude 25°13' S, longitude 50°03' W, altitude 880 m).

A redução completa do AgNO_3 (íons Ag^+) foi confirmada pela mudança de cor de incolor para amarelo acastanhado coloidal (Ag^0). A solução foi, então, armazenada no escuro a uma temperatura de 4 a 8°C para posterior análise e incorporação em lipossomas. A formação de AgNPs foi ainda confirmada por análise no espectrofotômetro UV-Vis.

4.5.3. Síntese de Lipossomas

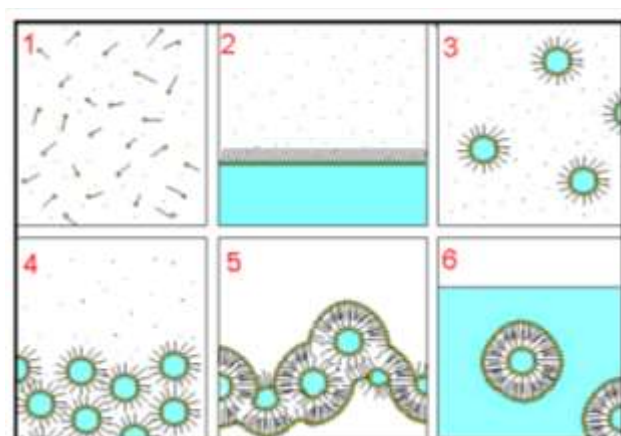
Neste trabalho, os lipossomas foram preparados pelo método da evaporação em fase reversa, método adaptado de Szoka e Papahadjopoulos (1978). Nesta etapa foi preciso avaliar a proporção de Fosfatidilcolina (PC) e o Colesterol (COL), para determinar em que concentração estes componentes apresentam maior estabilidade, adesão de AgNPs e em função de estabelecer a quantidade mínima de colesterol necessária, para posteriormente substituí-lo por Lupeol, sem perda de estabilidade.

A seguir, durante o processo de elaboração de lipossomas acontecem as seguintes etapas: (MERTINS, 2004)

1. Dissolução do fosfolipídio em clorofórmio.
2. Adição de água (formação de duas fases).
3. Sonicação (formação das micelas reversas (MR)).
4. Evaporação do solvente orgânico.
5. Formação de um organogel.
6. Formação das vesículas pela adição de água sob agitação manual.

Estas etapas estão representadas na Figura 11.

Figura 11- Esquema para o processo de preparação de vesículas lipossômicas pela evaporação em fase reversa.



As suspensões de lipossomas (0,9 mg/mL) foram preparadas utilizando fosfatidilcolina (PC) (780 g/mol (MERTINS, 2004)) e colesterol (COL) (386,65 g/mol) em razões molares diferentes (Tabela 2).

Tabela 2 - Composições lipídicas empregadas na preparação dos lipossomas.

Composição da solução de lipídeos em Clorofórmio	Razão molar
PC/COL	2:1
PC/COL	4:1
PC/COL	8:1
PC/COL	16:1

Fonte: O Autor (2016)

Foram utilizadas soluções dos lipídeos a 1×10^{-2} mol/L. Assim, os lipídeos pesados foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio. A solução orgânica foi adicionada lentamente com auxílio de uma seringa acoplada à agulha descartável 27 G 5/8" sobre a fase aquosa (FO 1: 10 FA, v/v, fase orgânica: fase aquosa) (LOW et al., 2013), enquanto a fase aquosa estava no banho de ultrassom (15 min) fornecendo dispersões opalescentes e homogêneas (Frequência Ultrassônica de 40 kHz e Potência Ultrassônica de 135 Watts). A fase aquosa foi constituída de água destilada estéril ou solução de AgNPs. O solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotativo a 55 °C e 25 rpm sob vácuo. (EID; AZZAZY, 2014). Quando foi utilizada a solução de AgNPs, todo o processo foi realizado no escuro

A emulsão lipídica foi reconstituída com água até o volume inicial e sonicada no banho de ultrassom por 15 minutos com aquecimento, formando as vesículas lipossômicas. Esta solução foi filtrada a 0,22 μ m para retirar AgNPs não associadas e agregados de lipídios. Em seguida, a solução foi centrifugada a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi reconstituído com água destilada até volume inicial e armazenada na geladeira a 4-8°C.

Para a síntese de Lipossomas com Lupeol (PC: LU) e Lipossomas contendo Lupeol e Nanopartículas de Prata (LUNP) foram seguidos os procedimentos mencionados anteriormente, substituindo o colesterol por Lupeol na quantidade decidida mediante avaliação das análises de estabilidade e caracterização.

4.5.4. Caracterização das nanopartículas de prata e dos lipossomas

4.5.4.1. Determinação do diâmetro médio e potencial Zeta

O tamanho e polidispersão foram determinados pela técnica do espalhamento dinâmico de luz (Dynamic light scattering - DLS), a qual analisa a distribuição de velocidades de movimento das partículas através da medição de flutuações dinâmicas de intensidade de dispersão da luz causada pelo movimento Browniano das partículas. Esta técnica promove um raio ou diâmetro hidrodinâmico, que é calculado utilizando a equação de Stokes-Einstein a partir das medidas acima mencionadas. (KUMAR et al., 2014). O tamanho das nanopartículas e índice de polidispersão (IPD) foram analisados utilizando um aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments) com ângulo de detecção de 90° a 25°C. As suspensões foram diluídas com água destilada (1:10) e analisadas em triplicata. As amostras foram diluídas também da mesma maneira para a análise do potencial zeta.

4.5.4.2. Microscopia Eletrônica de varredura com efeito de emissão do campo (SEM-FEG)

A avaliação morfológica e da superfície das nanopartículas e lipossomas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo MYRA 3 LMH (Tescan). Foram adicionadas 10 µL das suspensões de nanopartículas de prata e 10 µL da diluição 1:10 das suspensões de lipossomas carregados com nanopartículas (LAgNP ou LUNP) no suporte de amostras, e secas em estufa a 36°C por 24 horas. As amostras foram metalizadas com ouro no equipamento SC7620 mini sputter Coater e as micrografias foram obtidas após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração entre 10 e 25 kV. O registro das imagens ocorreu através do software do equipamento.

4.5.4.3. Análise por espectroscopia UV-Vis

A redução de íons de prata para a forma de nanopartículas foi monitorada observando o espectro de UV-Visível das soluções de nanopartículas de Prata. Os espectros de solução de AgNPs foram monitorados por um espectrofotômetro UV-VIS NIR VARIAN CARY 50 sem diluições na faixa de 200-800 nm. O branco foi calibrado com água destilada destinada para preparar as suspensões de nanopartículas e as amostras foram analisadas diretamente.

4.5.4.4. Análise por difração de raios X

As nanopartículas foram analisadas em difratômetro de raios X Ultima IV (Rigaku) utilizando scan de $2^\circ.\text{min}^{-1}$ e 2θ de 3° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$), corrente de 30 mA e voltagem de 40 kV, para observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade. As suspensões foram depositadas, por gotejamento, repetidas vezes sobre lamínulas de vidro e secas em estufa a 36°C até a formação de um filme para a análise.

4.5.4.5. Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As nanopartículas e lipossomas foram analisados por FTIR para avaliar os grupos funcionais que possam estar envolvidos na formação de nanopartículas ou interagindo nos lipossomas. Para cada amostra foram preparadas pastilhas por prensagem a frio, utilizando um pastilhador e uma prensa hidráulica manual. A pastilha com brometo de potássio foi misturada com liofilizados de extrato aquoso de gel de aloe vera, AgNP, LAgNP, LUNP, PC:Cho ou PC:Lu numa quantidade de 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% m/m), para realizar leitura no equipamento IRPrestige-21 (Shimadzu), com parâmetros de $64\text{ scans}.\text{min}^{-1}$ e resolução de 4 cm^{-1} , considerando a janela experimental de interesse de $4000\text{--}400\text{ ondas}.\text{cm}^{-1}$; e leitura de referência com pastilha de KBr puro, como linha de base.

4.5.5. Validação do método analítico para a quantificação das nanopartículas de Prata

A espectrometria de absorção atômica com chama é em método sensível para a quantificação de mais de sessenta metais ou elementos metaloides. A validação do método analítico por espectrometria de Absorção Atômica foi realizada segundo os critérios da Resolução R.E.899, de 17 de Maio de 2003 (ANVISA, 2003), com o objetivo de padronizar um método de quantificação para AgNPs nos lipossomas.

Os parâmetros analisados foram linearidade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez, sendo os ensaios efetuados em um Espectrofotômetro de Absorção Atômica de Chama no comprimento de onda de 328,1nm, característico da prata.

A especificidade foi avaliada por comparação dos resultados quantificados de soluções de nanopartículas de prata, soluções de água destilada e solução de extrato aquoso de gel de Aloe vera, assim como a comparação entre LAgNP e PC:COL (Lipossoma sem nanopartícula de Prata), para a verificação de interferentes.

Para o estudo de linearidade, foi realizada a curva analítica, que foi preparada a partir da solução padrão de prata (MEXICO, 2001). Para preparar o padrão dissolveu-se 0,1575 g de nitrato de prata (AgNO_3) em 100 mL de água, adicionaram-se 10 mL de ácido nítrico concentrado e completou-se para 1.000 mL com água (1 mL = 100 μg Ag). Através do software VARIAN SPECTRAA programou-se as condições, para isso uma solução de 10 ppm foi inserida no aparelho. A seguir, o aparelho fez as diluições com água ultrapura e elaborou a curva de calibração em cinco concentrações (2; 4; 6; 8 e 10 ppm) automaticamente, a análise foi feita em quintuplicata. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados e os dados foram analisados usando programa Excel.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados, por meio da relação entre o desvio padrão da curva analítica e a sua inclinação, usando os fatores multiplicadores (ANVISA, 2003), conforme demonstrado nas seguintes equações 1 e 2.

$$LD = \frac{3 \times DP}{IC} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo LD, o limite de detecção; LQ, o limite de Quantificação; DP, desvio padrão médio do intercepto com o eixo y; e IC, o coeficiente angular ou inclinação da curva analítica.

Para avaliar a repetibilidade ou precisão intra-dia, seis determinações a 100% da concentração do teste foram analisadas, sendo os resultados expressos em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intra-dia, segundo a equação 3,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A precisão intermediária foi avaliada por meio da comparação entre as determinações de uma mesma concentração (5 ppm), em triplicata, mas realizadas em três dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR ou CV% inter-dia.

A exatidão foi determinada pelo método de recuperação. Para isso, foi adicionada uma quantidade conhecida de nanopartículas de prata (5 ppm) à solução amostra (1; 2.5 e 5ppm), resultando em três concentrações novas. As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

Para avaliação da robustez, amostras em concentrações de 2,5; 5 e 7,5 ppm foram preparadas com diferentes solventes (água de osmose reversa e ultrapura), armazenadas em diferentes temperaturas (4-8°, 25° e 36°C) ou modificando o pH com HNO₃ ou NaOH (4, 5 e 7). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

4.5.6. Determinação de Prata por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS)

A concentração da prata nas soluções de nanopartículas sintetizadas foi determinada por espectrometria de absorção atômica, pelo método validado e anteriormente descrito. O comprimento de onda característico da prata é 328,1nm.

A seguir, para o preparo de amostras, as soluções de AgNP, LAgNP ou LUNP foram submetidas à eliminação da matriz através da digestão ácida para evitar interferentes na resposta final da análise (ABAD, 2013; DADFARNIA et al., 2015; FEICHTMEIER et al., 2015; GAGNÉ; TURCOTTE; GAGNON, 2012; LÓPEZ-SERRANO et al., 2014; SONGSILAWAT; SHIOWATANA; SIRIPINYANOND, 2011; TORRECILLA E., 2014), utilizou-se ácido nítrico 2% (ESCOBAR, 2015; PALURI, 2011; RAMÍREZ C., 2010). Assim, para 1 mL das soluções de AgNP, LAgNP ou LUNP foi adicionada 1 mL de ácido nítrico 2% e armazenadas por 24 horas, logo foi completado até 10 mL com água destilada para leitura no aparelho em triplicata.

4.5.7. Determinação da eficiência de encapsulação de lipossomas

A eficiência de encapsulação de lipossomas foi medida utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica pelo método validado, para isto 10 mL de uma solução diluída (10^{-1}) de LAgNPs foi injetado no sistema e a percentagem de AgNPs encapsulada foi calculado usando a Equação 5. (EID; AZZAZY, 2014)

$$EE\% = \frac{NT-NL}{NL} \times 100\% \text{ (Equação 5)}$$

Onde NT é o total de Nanopartículas de prata adicionada aos lipossomas, e NL é a porção de AgNPs livres ou que não foram encapsuladas e presentes no sobrenadante após centrifugação de LAgNP a 12 000 rpm, durante 15 minutos e 4 °C de temperatura.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística das diferenças de tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH e potencial Zeta das AgNP, LAgNPs, PC:LU e LUNP foi calculada por análise do Teste t de *Student* para amostras pareadas, Anova e Tuckey.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados através do *software* IBM SPSS STATISTICS 20 e BIOESTAT 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

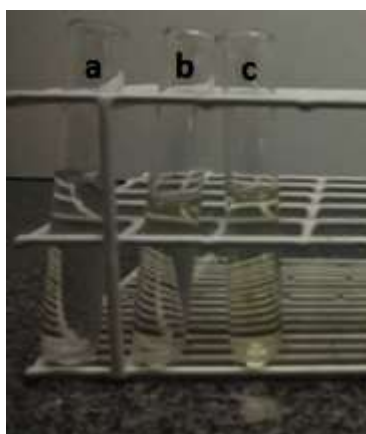
5.1. OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE GEL DE *Aloe vera*

O extrato aquoso de gel de *Aloe vera* obtido apresentou aspecto transparente e incolor.

Foi possível identificar a presença de compostos redutores no gel de *Aloe vera*, evidenciados pela presença de uma leve coloração amarela nas duas reações de identificação de antraquinonas em geral (Figura 12). O primeiro tubo (a) corresponde ao extrato do gel filtrado e precipitado; o segundo tubo (b) corresponde à reação do extrato com solução de NaOH 2N e o terceiro tubo (c) corresponde à reação do extrato do gel com solução de NH_4OH 25% (ensaio de Borntränger). As reações, tubos (b) e (c) apresentaram leve coloração amarela, o que indica a presença de antraquinonas.

O gel do *Aloe vera* apresenta compostos majoritários com propriedades redutoras, como glucósidos antraquinônicos, aloína A, aloína B ou sua aglicona emodina. A detecção destes compostos no produto obtido é fundamental, uma vez que para a formação das nanopartículas de prata, a ação redutora destes produtos é essencial. (KLEIN; PENNEYS; MIAMI, 1988; VÉLEZ; VILLA, 2012).

Figura 12 - Reação de identificação de antraquinonas e derivados antracênicos. Em que (a) extrato filtrado reage com (b)NaOH 2N e (c) NH_4OH 25%.



Fonte: O autor (2016).

Em função da presença destes componentes no gel extraído do *Aloe vera*, vários estudos demonstraram a síntese de nanopartículas de prata com este extrato, que apresenta ainda, diversas propriedades medicinais. (ASHRAF et al., 2016; CHANDRAN et al., 2006; DINESH et al., 2015; LONG et al., 2013; MEDDA et al., 2014; SADHASIVAM; DURAIRAJ, 2014; ZHANG et al., 2010, 2013)

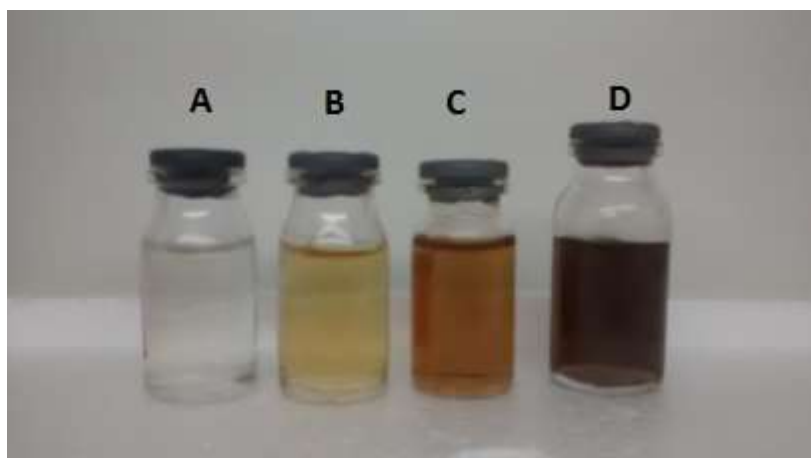
5.2. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

As nanopartículas de prata foram produzidas pelo método de síntese verde e fotorredução, através da redução da prata iônica pelo extrato de gel de *Aloe vera* associada à exposição solar em diferentes períodos de tempo.

Foi possível observar que surgiram diversas colorações em função do tempo de exposição solar (Figura 13), indicando a formação de nanopartículas de diferentes tamanhos (TANG, et al., 2013, 2014). A reação termina quando toda a prata aglomera e precipita (CRUZ, et al., 2012).

O aparecimento de cor no decorrer da reação ocorre devido à excitação de vibrações de plasmon de superfície e a absorção no comprimento de onda entre 400 e 500 nm representa a identificação espectroscópica da formação de AgNPs (ASHRAF et al., 2016; CRUZ et al., 2012).

Figura 13 - Colorações de soluções de AgNPs dependendo do tempo de exposição solar. (A) Sem exposição, (B) entre 5 segundos e 1 minuto, (C) entre 2 até 5 minutos e (D) mais de 5 minutos.



Fonte: O autor (2016).

Diversos autores descreveram a biossíntese de nanopartículas de prata por fotoindução, com extratos de diversas plantas e outros agentes redutores como: citrato trissódico e boro-hidreto de sódio (TANG et al., 2014), fitoproteínas (AHMED et al., 2015), aminoácidos (ANNADHASAN et al., 2012), tensoativos catiônicos (SHABAN et al., 2015), sulfato de dodecilo de sódio (BHADURI et al., 2013), quitosana (BOUFI et al., 2013; LONG et al., 2013), biomassa de animais e fungos (GADE et al., 2014; WEI et al., 2014), actinobacterias (MANIKPRABHU et al., 2016), matéria orgânica natural (HOU; STUART; ZEPP, 2013), extratos aquosos de plantas (KUMAR et al., 2016a, 2016b), extrato aquoso de

alho (RASTOGI; ARUNACHALAM, 2011), extrato de folhas de *Eucalyptus chapmaniana* (SULAIMAN et al., 2013). Todos estes estudos mostraram diminuição no tempo de reação.

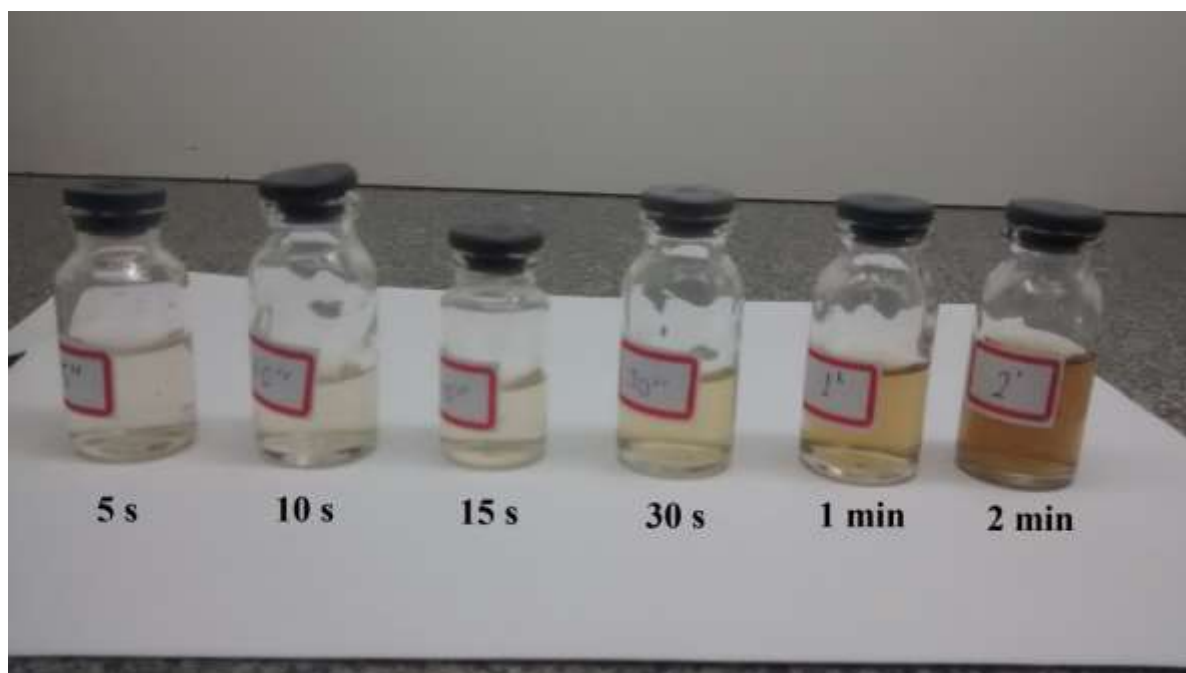
É importante salientar que este trabalho é o primeiro a sintetizar AgNPs em tempo reduzido com extrato de *Aloe vera* e luz solar. Neste método não há necessidade de usar alta pressão, energia, temperatura e substâncias químicas tóxicas, como o borohidreto de sódio, que podem ter efeitos adversos nas aplicações médicas (SULAIMAN et al., 2013), portanto sendo mais fácil sua aplicação e posteriormente uma possível produção em escalas aumentadas.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

5.3.1. Análise por espectroscopia UV-vis

A Figura 14 mostra a mudança de cor que ocorreu nos meios reacionais (AgNO_3 e extrato de gel *Aloe vera*), quando submetidos a diferentes tempos de exposição à luz solar, durante a formação das AgNPs.

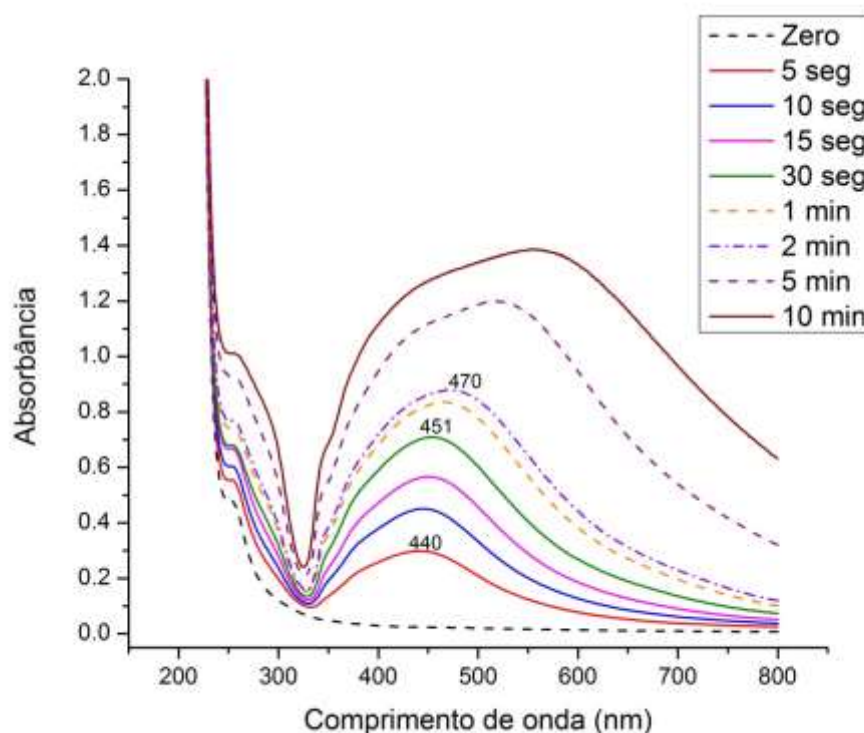
Figura 14 - Tempos de exposição à luz solar das soluções de AgNO_3 e Extrato de gel de *Aloe vera*. De esquerda à direita: 5s, 10 s, 15 s, 30 s, 1 minuto e 2 minutos.



Fonte: O autor (2016)

A influência do tempo de exposição à luz solar sobre a formação das AgNPs também foi avaliada através da análise nos meios reacionais (AgNO_3 e extrato de gel *Aloe vera*) por UV-Vis (Figura 15).

Figura 15 - Espectros de absorção UV-Vis dos meios reacionais (AgNO_3 e extrato de gel *Aloe vera*), em diferentes tempos de exposição à luz solar.



Fonte: O autor (2016).

Pode-se observar na Figura 15, a presença da banda de plasmon em torno de 450 nm, que ocorreu no intervalo de até 30 segundos, o que é indicativo da forma esférica dos AgNPs e de tamanho menor a 100 nm (CARDOSO et al., 2014). Após esse tempo as AgNPs começam a se aglomerar gerando partículas de maior tamanho e esse efeito é observável nos espectros de UV-Vis, onde as AgNPs expostas por mais de 2 minutos apresentam um deslocamento para comprimentos de onda maiores.

Uma síntese adequada de AgNPs ocorre no máximo 2 minutos de exposição solar. As AgNPs sintetizadas antes de dois minutos revelam um pico Gaussiano de absorção em aproximadamente 440-470 nm. Este comportamento indica que as amostras têm populações homogêneas de tamanho. (PAREDES, 2011)

De acordo com Paredes (2011) os espectros de 5 e 10 minutos indicaram AgNPs de grande tamanho e com diferentes formas, podendo ser triangulares ou quadradas. O aumento de absorbância no espectro sugere que houve uma agregação das AgNPs. Da mesma forma, neste trabalho observa-se que o pico se torna mais amplo conforme aumenta o tempo de exposição solar, revelando uma distribuição heterogênea de tamanhos (CRUZ, et al., 2012).

5.3.2. Determinação do diâmetro médio e potencial Zeta

A Tabela 3 sumariza os dados de diâmetro médio (DM) determinado por distribuição de intensidade, Índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ) das AgNPs desenvolvidas em relação ao tempo de exposição à luz solar.

Tabela 3 - Distribuição de DM, PDI e PZ das AgNPs sintetizadas nos diferentes tempos de exposição à luz solar.

Tempo de Exposição à luz solar	AgNPs		
	DM (nm) $\pm$ DP	PDI $\pm$ DP	PZ (mV) $\pm$ DP
5 segundos	129,12 $\pm$ 47,99	0,396 $\pm$ 0,02	-14.3 $\pm$ 5.63
10 segundos	182,43 $\pm$ 11,98	0,384 $\pm$ 0,02	-9.21 $\pm$ 4.6
15 segundos	194,63 $\pm$ 34,26	0,407 $\pm$ 0,01	-14.9 $\pm$ 6.10
30 segundos	278,46 $\pm$ 85,71	0,481 $\pm$ 0,13	-18.96 $\pm$ 10.0
1 minuto	339,03 $\pm$ 121,68	0,702 $\pm$ 0,25	-14.6 $\pm$ 11.4
2 minutos	344,06 $\pm$ 150,77	0,880 $\pm$ 0,09	-13.1 $\pm$ 12.0

Fonte: O autor (2016).

O PDI é uma medida da amplitude da distribuição de tamanho resultante da análise cumulativa de dados de dispersão dinâmica de luz (DLS), cujos valores se encontram entre 0 e 1. Um PDI igual a 1 indica grandes variações no tamanho da partícula, enquanto que um valor próximo de 0 indica uma população de partículas monodispersas (LACATUSU et al., 2012). Valores superiores a 0,7 indicam que a amostra tem uma distribuição de tamanhos muito ampla e provavelmente não é adequada para a técnica de DLS (MALVERN, 2016). Todas as AgNPs se mostraram polidispersas, com PDI acima de 0,39. Entretanto, as AgNPs sintetizadas com exposição solar acima de 1 minuto se apresentaram ainda mais polidispersos por ter um PDI superior a 0,7.

Os resultados de DM confirmaram a síntese de AgNPs, sendo que a medida por intensidade mostra que as nanopartículas formadas nos primeiros 30 segundos de exposição solar apresentam tamanhos entre 129,12 e 278,46 nm.

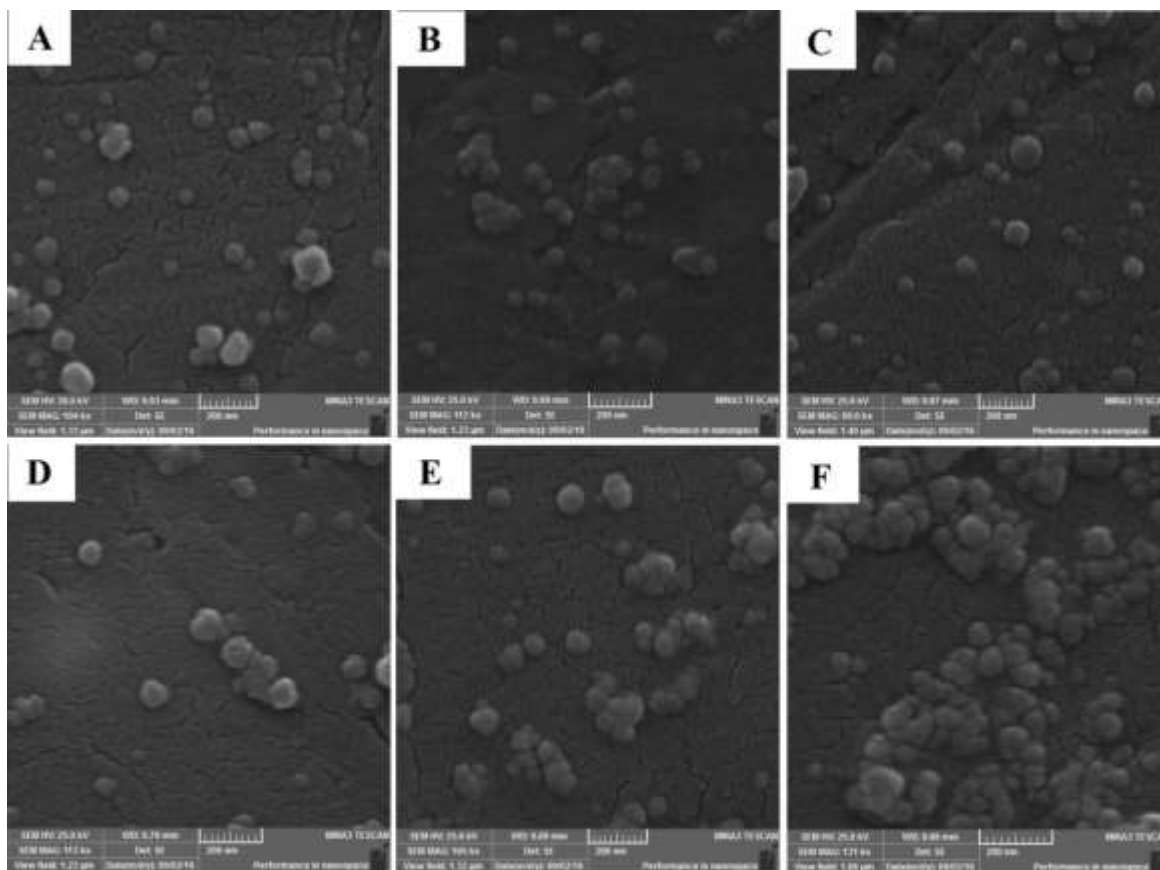
O potencial zeta é uma medida da carga líquida da superfície da partícula e indica o potencial necessário para penetrar na camada de íons em torno da partícula para desestabilizar. Portanto, o PZ, é a potência eletrostática entre a separação das camadas vizinhas da partícula (SANDOVAL et al., 2003).

O resultado do PZ das AgNPs sintetizadas com extrato de *Aloe vera* e 30 segundos de exposição solar foi de -18,96 mV. De acordo com Neves et al. (2013), as partículas podem ser consideradas estáveis quando o valor absoluto do PZ é próximo de $|30|$ mV, enquanto que PZ próximo a 0 e $|5|$ mV podem produzir o fenômeno de floculação mais facilmente. Contudo, Sadhasivam e Durairaj (2014), obtiveram AgNPs estáveis com PZ de -18,3 mV, semelhante ao obtido neste estudo.

5.3.3. Microscopia Eletrônica de varredura com emissão do campo (FEG)

A avaliação morfológica e de superfície das AgNPs sintetizadas em diversas quantidades de tempo de exposição solar estão indicados na Figura 16.

Figura 16 - Fotomicrografias obtidas por FEG das AgNPs sintetizadas durante A) 5 segundos, B) 10 segundos, C) 15 segundos, D) 30 segundos, E) 1 minuto e F) 2 minutos de exposição à luz solar



Fonte: O autor (2016).

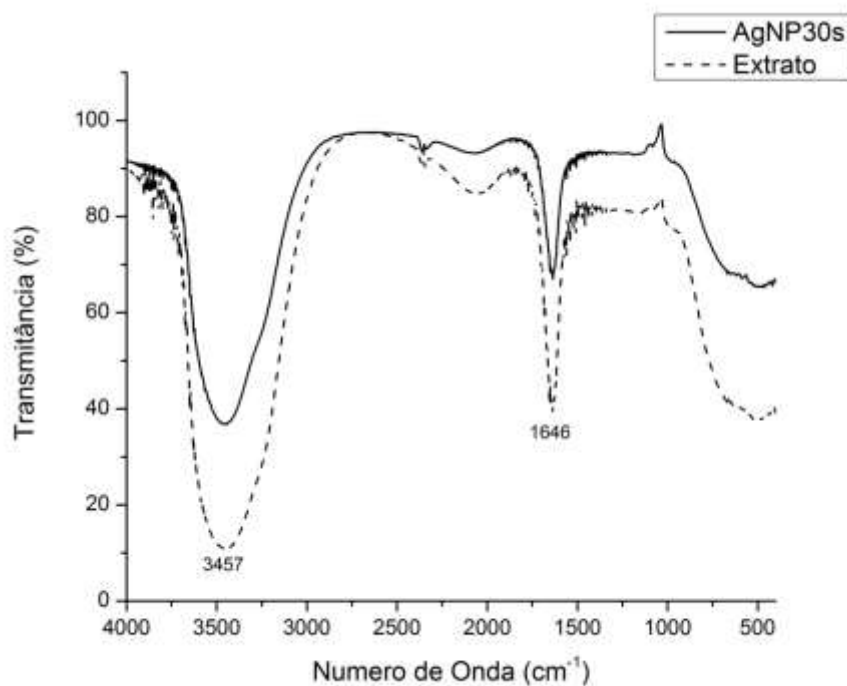
As imagens das fotomicrografias mostram que as AgNPs têm aspecto amorfo, quase esférico. Pode-se observar, ainda, que as AgNPs obtidas a partir de 1 minuto de exposição solar estão aglomeradas. Os tamanhos das AgNPs individuais medidas pelo software do equipamento indicaram tamanhos entre 40 e 70 nm.

Considerando os resultados acima mencionados, foram escolhidos para serem encapsuladas em lipossomas, as AgNPs sintetizadas com tempo de exposição solar de 30 segundos, por apresentarem pico Gaussiano de absorção em 451 nm no UV-vis, PDI de 0,48 e PZ de $-18,96$ mV e que não mostraram aglomeração nas imagens de FEG. Essas nanopartículas passarão a ser denominadas AgNP30s

5.3.4. Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros obtidos por FTIR permite caracterizar os grupos funcionais que poderiam estar envolvidos na síntese de AgNP30s e estes são mostrados na Figura 17. Observam-se duas regiões em que a intensidade das bandas foram diminuídas em 1646 e 3457 cm^{-1} , correspondentes a ligações de tipo C=O e O-H respetivamente.

Figura 17 – Espectro no FTIR de Extrato de *Aloe vera* e AgNP30s.



Estes resultados foram similares aos encontrados por Sadhasivam e Durairaj (2014), em que a banda em $3454,91\text{ cm}^{-1}$ mostrou alongamento de ligação O-H e em $1643,78\text{ cm}^{-1}$ mostrou alongamento de ligação C=O. Os mencionados autores também trabalharam com *Aloe vera* como agente redutor.

A redução da intensidade nas bandas implica na participação destas ligações na formação de nanopartículas de prata. No trabalho de Cardoso (2014), a banda devido a C=O (amina I a $1652,84\text{ cm}^{-1}$) no espectro de AgNP30s mostrou uma baixa intensidade, indicando que este grupo estava possivelmente envolvido na redução e estabilização de AgNP30s.

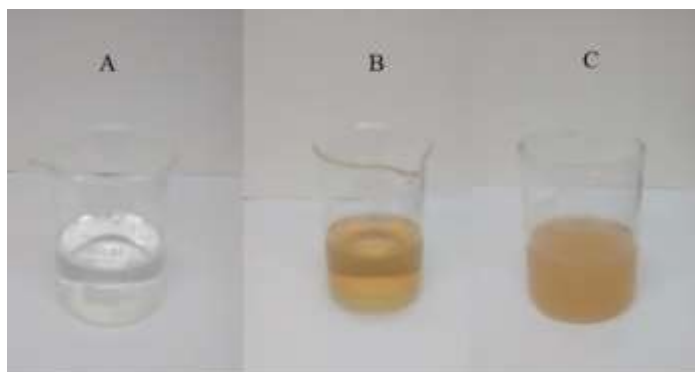
A existência de alguns componentes fenólicos, terpenoides ou proteínas que estão ligados às superfícies das AgNP30s se mantêm, embora o extrato tenha sido diluído muitas vezes. A estabilidade das AgNP30s pode ser justificada pela adesão dos grupos carboxílicos e amino livres na superfície das AgNP30s .

As bandas de grupos funcionais como -CO-C- ($1.720 - 1.700\text{ cm}^{-1}$), -C-O- ($\sim 1.200\text{ cm}^{-1}$) e -C=C- ($1.600, 1.580, 1.500$ e 1.450 cm^{-1}) são derivados de componentes heterocíclicos e as bandas de amidas derivam de proteínas presentes no extrato das folhas de *Aloe vera* e são os ligando de cobertura das nanopartículas (ZHANG Yogqiang, 2013).

5.4. SÍNTESE DE LIPOSSOMAS

A técnica de produção dos lipossomas e dos LAgNPs se mostrou de fácil execução, resultando em soluções homogêneas e sem precipitação após filtração (Figura 18). Esta homogeneidade indica que o colesterol, que é insolúvel em água, se encontra no interior da bicamada lipídica do lipossoma.

Figura 18 - Fotografia de soluções de AgNP e LAgNP. (A) solução de AgNO_3 misturada com Extrato de *Aloe vera* sem exposição à luz solar, (B) Solução de AgNP30s e (C) Solução de LAgNPs.



Eid e Azzazy (2014) desenvolveram um trabalho relatando a encapsulação de AgNPs em lipossomas, utilizando o método modificado de evaporação de fase reversa, que permitiu preparação de nanolipossomas sem necessidade de homogeneizador de alta pressão nem extrusor, de forma semelhante ao método utilizado nesse trabalho.

Um dos principais problemas na obtenção de AgNPs é a instabilidade das nanopartículas produzidas, devido à sua fácil oxidação (MUKHA et al., 2013). Entretanto, no presente estudo, observou-se que as AgNP30s foram estabilizadas quando encapsuladas nos lipossomas, resultando em uma distribuição mais estreita de tamanhos (Tabelas 3 e 4).

5.5. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

5.5.1. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial Zeta

A distribuição de DM, PDI e o PZ dos LAgNPs, logo após o preparo e depois de 2 meses de armazenamento, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição de DM, PDI e PZ dos LAgNPs em diferentes razões molares de PC:COL após o preparo e logo de 60 dias.

Amostras analisadas após o preparo					
Amostra	DM (nm) $\pm$ DP	PDI	PZ (mV) $\pm$ DP		
LAgNP(PC:COL, 2:1)	268,0 $\pm$ 32,7 ^{a1}	0,262 $\pm$ 0,02 ^{e2}	-36,9 $\pm$ 7,30 ⁱ³		
LAgNP(PC: COL, 4:1)	333,5 $\pm$ 14,8 ^{b1}	0,229 $\pm$ 0,01 ^{f2}	-44,2 $\pm$ 6,99 ^{k3}		
LAgNP(PC: COL, 8:1)	368,4 $\pm$ 16,7 ^{c1}	0,271 $\pm$ 0,02 ^{g2}	-42,8 $\pm$ 6,10 ^{m3}		
LAgNP(PC: COL, 16:1)	307,6 $\pm$ 26,4 ^{d1}	0,193 $\pm$ 0,01 ^{h2}	-42,9 $\pm$ 7,67 ⁿ³		
Amostras analisadas após 60 dias					
Amostra	DM (nm) $\pm$ DP	PDI	PZ (mV) $\pm$ DP		
LAgNP(PC: COL, 2:1)	321,2 $\pm$ 5,9 ^{a4}	0,246 $\pm$ 0,01 ^{e5}	-41,4 $\pm$ 5,54 ⁱ⁶		
LAgNP(PC: COL, 4:1)	326,7 $\pm$ 11,3 ^{b4}	0,258 $\pm$ 0,03 ^{f5}	-42,1 $\pm$ 7,28 ^{k6}		
LAgNP(PC: COL, 8:1)	373,2 $\pm$ 13,9 ^{c4}	0,315 $\pm$ 0,02 ^{g5}	-43,9 $\pm$ 8,01 ^{m6}		
LAgNP(PC: COL, 16:1)	321,7 $\pm$ 18,6 ^{d4}	0,263 $\pm$ 0,02 ^{h5}	-40,1 $\pm$ 6,95 ⁿ⁶		
¹ p=0.0056	² p=0.0016	³ p=0.6101	⁴ p=0.0040	⁵ p=0.0177	⁶ p=0.9240
^a p=0.075	^b p=0,078	^c p=0.097	^d p=0.089		
^e p=0.264	^f p=0.098	^g p=0.080	^h p=0.021		
ⁱ p=0.047	^k p=0.006	^m p=0.424	ⁿ p=0.394		

^{1,2,4,5} Estatisticamente diferentes (p<0,05)

^{3, 6} Não apresentaram diferença estatística significativa (p>0,05)

^{a,b,c,d,e,f,g,m,n} Não apresentaram diferença estatística significativa (p>0,05)

^{h,i,k} Apresentaram diferença estatística significativa (p<0,05)

Fonte: O autor (2016).

Observa-se que todas as formulações, avaliadas logo após o preparo e após 60 dias de armazenamento apresentaram valores de PDI adequados, indicando uma baixa polidispersão e homogeneidade de tamanho das amostras.

Também é possível observar um elevado PZ, em torno de -40 mV, o que diminui a possibilidade de auto-agregação e indica maior estabilidade de todos os LAgNPs. O valor de PZ das AgNP30s antes de sua incorporação aos lipossomas era de -18,6 mV, esse aumento considerável no valor do PZ é de importância fundamental para garantir maior estabilidade às AgNP30s.

Este valor de PZ negativo foi também encontrado por Aramaki et al. (2016) em lipossomas preparados com lecitina de soja e sem surfactantes catiônicos. Valores de potencial zeta negativo de lipossomas também foi visto nos trabalhos de Barani et al. (2010), Eid e Azzazy (2014) e Katagiri et al. (2010).

A análise estatística, realizada utilizando-se o Teste Tukey de ANOVA ($p > 0,05$) mostrou que, quando comparadas nas diferentes razões molares, os LAgNPs recém preparadas apresentaram DM e PDI estatisticamente diferentes, entretanto o PZ não apresentou diferença significativa. O mesmo resultado foi obtido na comparação das LAgNPs após 2 meses de armazenamento.

Para avaliar a estabilidade das amostras após 2 meses de armazenamento foi aplicada a análise t de Student para amostras pareadas. Os resultados indicaram que as formulações LAgNP8:1 são estáveis, uma vez que não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) após 2 meses de armazenamento nos parâmetros DM, PDI e PZ.

Neste estudo foi realizada, ainda, a substituição do colesterol pelo Lupeol no preparo dos lipossomas, devido a sua similaridade estrutural com o colesterol (Figura 9), e, também, devido às suas propriedades farmacológicas como agente antitumoral. Assim, a formulação LAgNP8:1 foi escolhida para proceder à substituição do colesterol pelo Lupeol. Esta formulação foi denominada como LUNP.

As formulações LAgNP 8:1, PC:LU e LUNP formaram soluções homogêneas e sem precipitados, indicando que os compostos hidrofóbicos Lupeol ou colesterol foram capazes de gerar lipossomas com a Fosfatidilcolina.

Os parâmetros DM, PDI e PZ dos LUNPs foram avaliados imediatamente após o preparo e após um mês de armazenamento (Tabela 5).

A utilização do Lupeol em substituição ao colesterol na formação de lipossomas se mostrou viável. As vesículas formadas apresentaram PZ negativo e alto, embora inferior ao obtido nos lipossomas produzidos com colesterol. Entretanto os LUNPs mostraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) no DM, PDI em apenas um mês de armazenamento, só o valor do PZ não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Distribuição de DM, PDI e PZ dos LUNPs após o preparo e após de 30 dias.

Amostras analisadas após o preparo			
Amostra	DM (nm) $\pm$ DP	PDI	PZ (mV) $\pm$ DP
LUNP (PC:LU, 8:1)	218,8 $\pm$ 9,5 ^a	0,435 $\pm$ 0,02 ^b	-36,5 $\pm$ 9,99 ^c
Amostras analisadas após 30 dias			
Amostra	DM (nm) $\pm$ DP	PDI	PZ (mV) $\pm$ DP
LUNP (PC:LU, 8:1)	272,7 $\pm$ 14,6 ^a	0,634 $\pm$ 0,08 ^b	-34,7 $\pm$ 8,13 ^c

^a $p=0.003$ ^b $p=0.017$ ^c $p=0.236$

^{a,b} Estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

^c Não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$)

Fonte: O autor (2016).

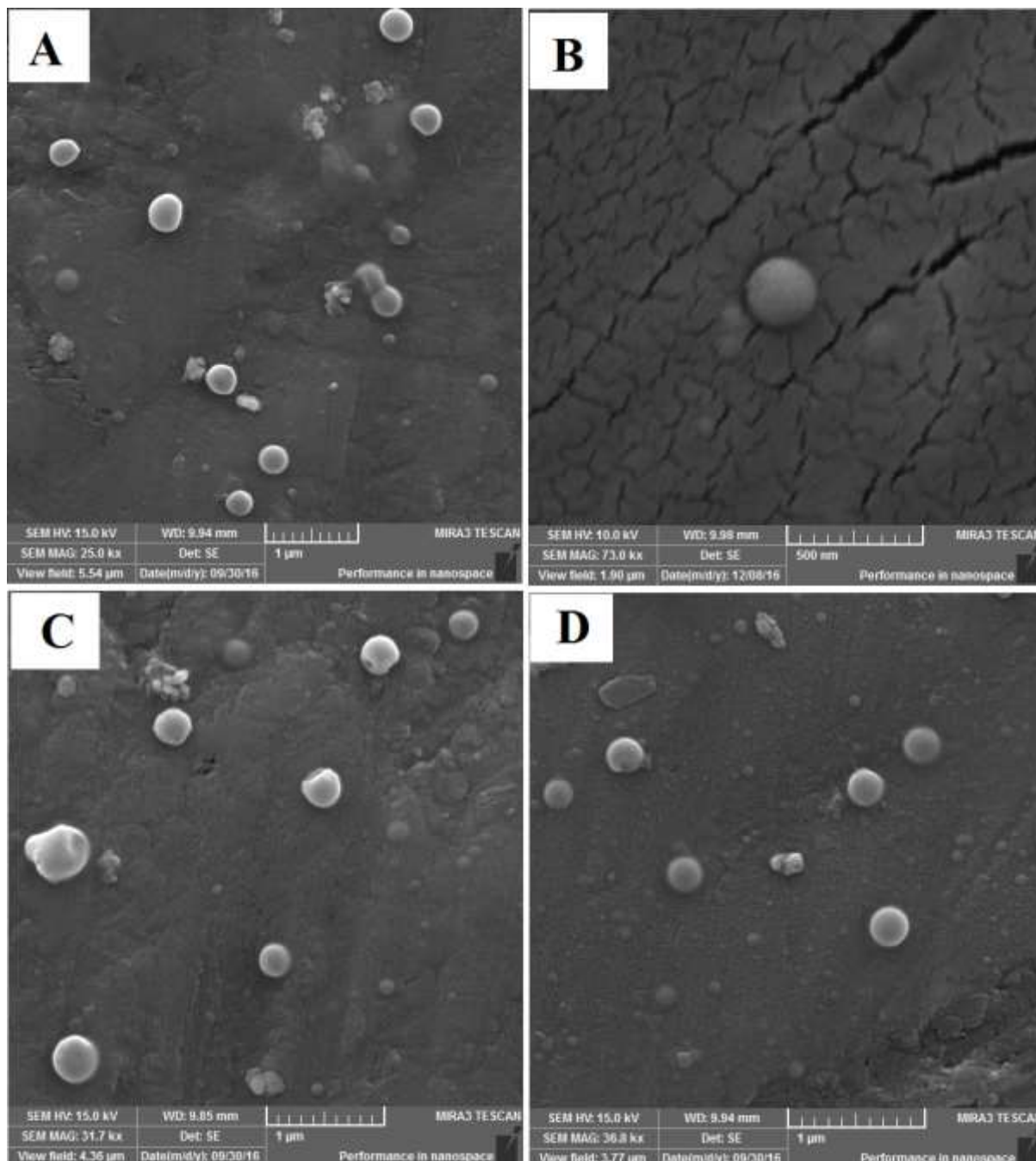
É interessante salientar que a presença de colesterol estabiliza o lipossoma e a quantidade do colesterol determina a ordem conformacional das cadeias do fosfatidilcolina na bicamada lipídica, o que tem influência no potencial zeta (ARAMAKI et al., 2016; IPSEN et al., 1987; VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

As características físico-químicas do LUNP foram próximas a todos os LAgNPs. No presente trabalho o uso de Lupeol demonstrou ser um bom substituto do colesterol.

5.5.2. Microscopia Eletrônica de varredura com emissão do campo (FEG)

Os resultados obtidos por FEG para os LAgNPs estão ilustrados na Figura 19.

Figura 19 - Fotomicrografias obtidas por FEG dos Lipossomas carregados com nanopartículas de Prata (LAgNP) em diferentes razões molares de PC:Col. A) 2:1, B) 4:1, C) 8:1 e D) 16:1.



Fonte: O Autor (2016).

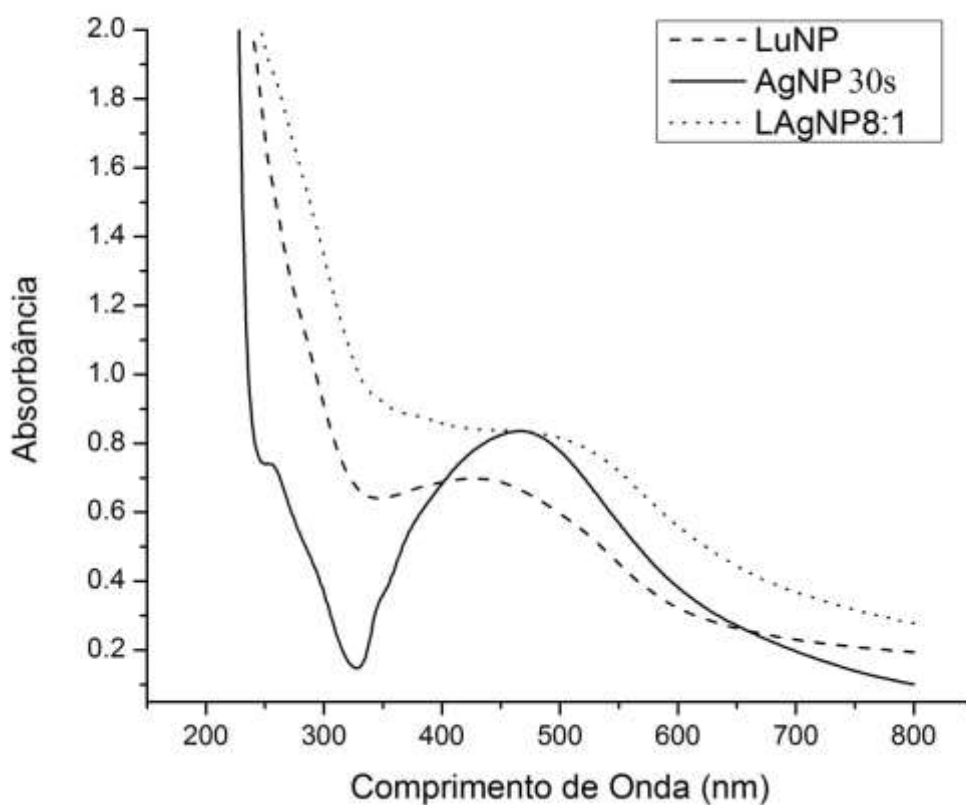
Os lipossomas se apresentaram como estruturas esféricas e uniformes, em todas as formulações. O tamanho dos lipossomas observado nas imagens, de 156 nm até 400 nm é maior do que as AgNPs (entre 40 e 70 nm), indicadas na Figura 16.

5.5.3. Análise por espectroscopia UV-vis

Alterar o tamanho das partículas esféricas pode induzir pequenas mudanças na posição do pico de absorção no UV-vis (BARANI et al., 2010, 2011). Assim, o carregamento de AgNPs em lipossomas oferece um efeito estabilizante, mas modifica a banda de absorção da superfície do plasmon ressonante (Figura 20).

As AgNP30s apresentavam absorbância em 451. A incorporação em lipossoma com Lupeol (LUNP) provocou um leve deslocamento no espectro de absorção e o LAgNP8:1 obteve menor absorção.

Figura 21 - Espectros de absorção UV-Vis das soluções de AgNP30s, LAgNP8:1 e LUNP.

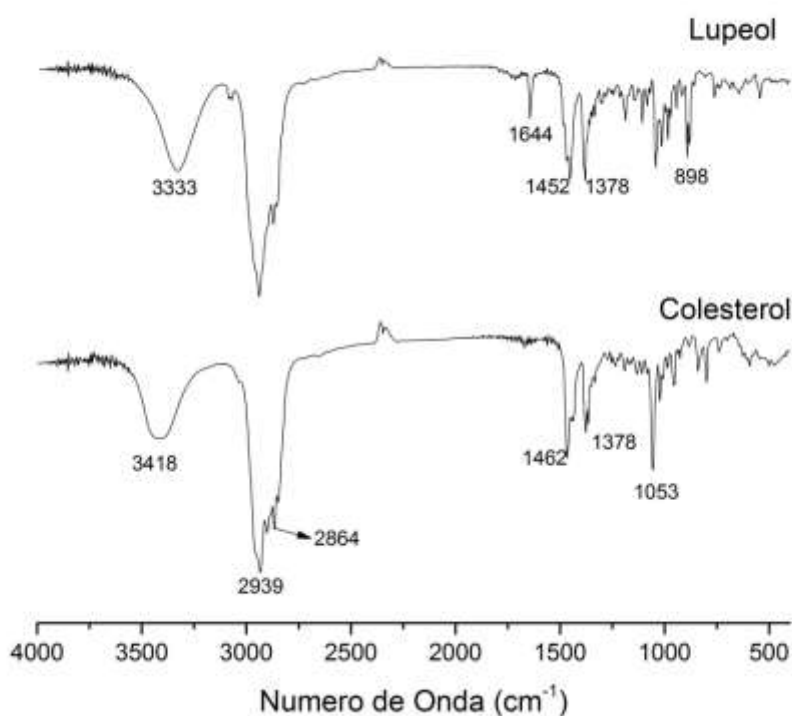


Fonte: O autor (2016)

5.5.4. Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 22 mostra o espectro de FTIR do Colesterol e do Lupeol. As bandas observadas no espectro do Colesterol são similares ao padrão de referência do *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2016). Observa-se uma banda intensa e larga em 3418 cm^{-1} característico do grupamento O-H de álcool. As bandas em 2939 e 2864 cm^{-1} são referentes ao estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo metila- CH_3 . As bandas em 1462 e 1378 cm^{-1} são características da ligação $-\text{CH}_2$ e finalmente a banda em 1053 cm^{-1} corresponde à ligação C-O.

Figura 22 – Espectros de IVTF do Lupeol e Colesterol.

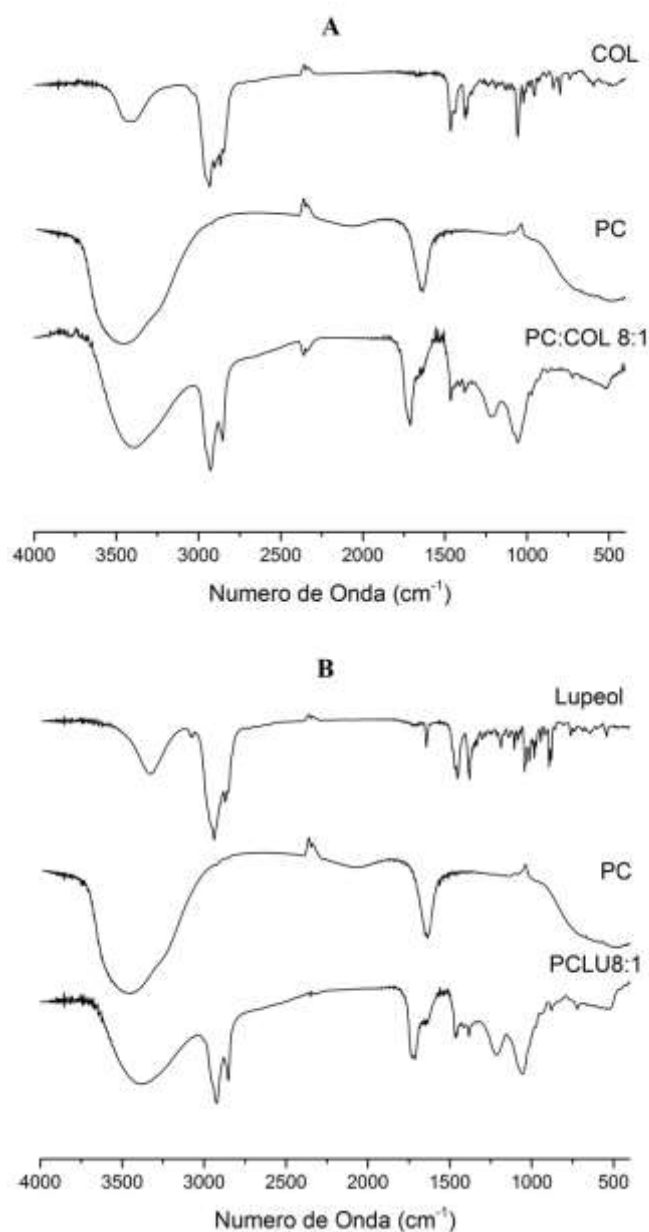


Fonte: o autor (2016)

Em relação ao Lupeol, o espectro obtido foi comparado com os resultados de autores que purificaram ou isolaram este composto (ABDULLAHI et al., 2013; KWON et al., 2015b; SARATHA; PILLAI; SUBRAMANIAN, 2011), demonstrando as bandas características em 3333 cm^{-1} (O-H), 898 cm^{-1} (vibração fora do plano C-H), 1452 cm^{-1} (correspondente à vibração de grupos metila), 2939 cm^{-1} (grupos metila), e as correspondentes vibrações C=C foram mostradas em torno de 1644 cm^{-1} .

Na Figura 23, as bandas no espectro do colesterol se mantêm quando este composto está unido à fosfatidilcolina na formação de lipossomas, indicando assim que não houve interação química com a fosfatidilcolina, fenômeno que acontece também com o Lupeol na formação de lipossomas, no entanto não existem deslocamentos consideráveis nas bandas dos lipossomas formados, efeito que acontece ao adicionar colesterol nos lipossomas, afetando a banda de $-\text{CH}_3$. (MAHMOUD et al., 2008)

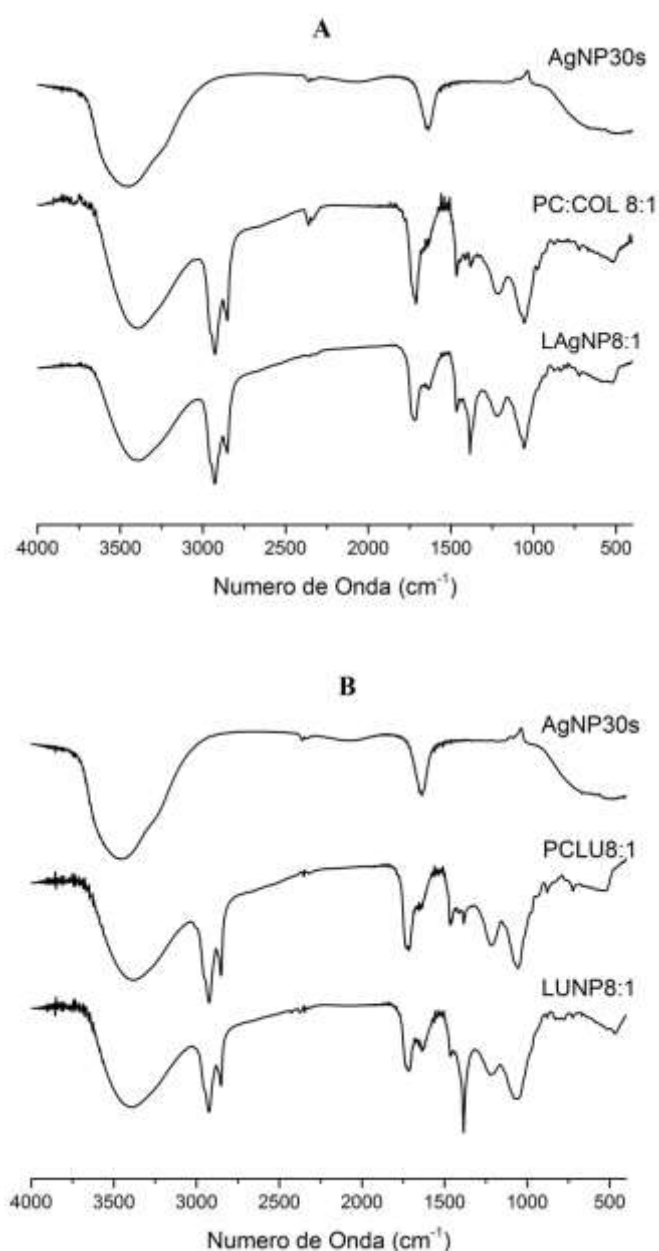
Figura 23 - Espectros de IVTF do lipossoma (A) PC:COL 8:1, constituído por colesterol (COL) e Fosfatidilcolina (PC); e lipossoma (B) PCLU8:1, constituído por Lupeol e PC.



Fonte: O autor (2016)

Para representar os espectros de LAgNPs, comparou-se na, Figura 24, os espectros de AgNPs e Lipossomas sem prata (PC:COL 8:1). Os espectros obtidos apresentaram bandas de absorção nas mesmas faixas de número de ondas observados para as respectivas amostras. Portanto, é possível estabelecer que nenhuma ligação química entre lipossomas e AgNPs foi formada durante os processos de síntese.

Figura 24 - Espectros de IVTF do lipossoma (A) LAgNP, constituído por AgNP e PC:COL; e Lipossoma (B) LUNP, constituído por AgNP e PC:Lu.



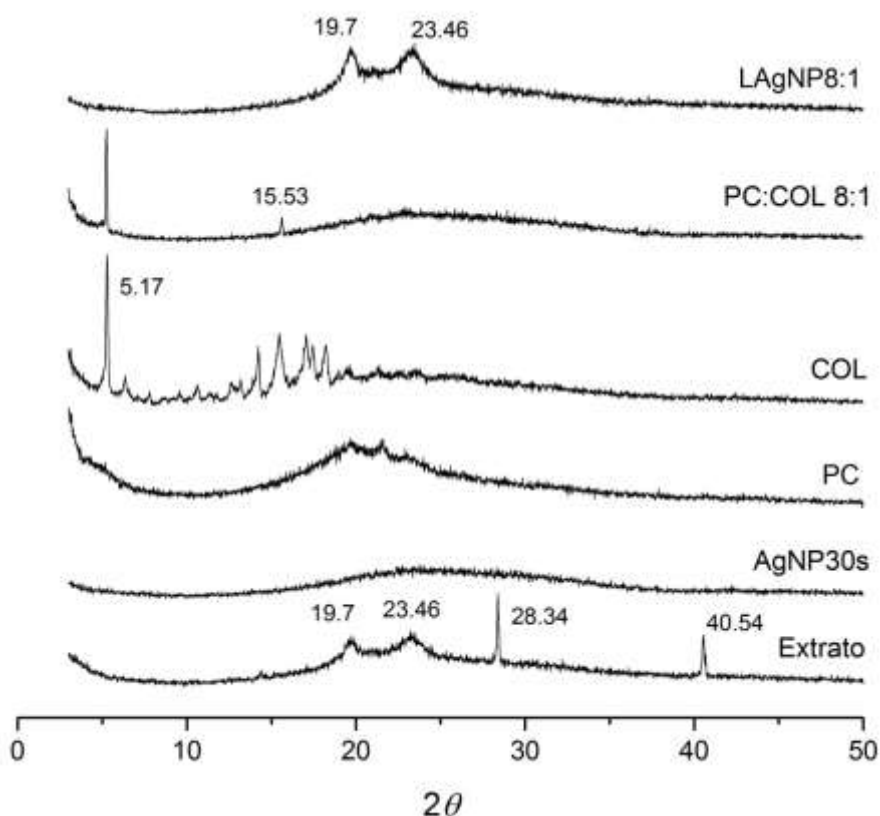
Fonte: O autor (2016)

5.5.5. Análise por difração de raios X

A difração de raios X permite distinguir materiais entre estados cristalinos e amorfos, sendo que substâncias cristalinas possuem picos bem definidos enquanto os compostos amorfos não apresentam os mesmos planos nítidos característicos dos cristais (DHIRENDRA et al, 2009).

A Figura 25 sumariza os resultados de difração de raios X para as etapas na formação de LAgNP, assim começa com o difratograma do extrato e a formação de AgNP, posteriormente a mistura de Fosfatidilcolina (PC) e Colesterol (COL), gerando o Lipossoma PC:COL(8:1), para finalmente formar LAgNP8:1. Só o colesterol apresentou picos cristalinos em $2\theta = 5,17^\circ$, e se mantém no lipossoma PC:COL, mas não aparece em o LAgNP, no entanto este ultimo mantém picos do Extrato em $2\theta = 19,7^\circ$ e $23,46^\circ$.

Figura 25 – Difratogramas do Extrato de Aloe vera, AgNP, PC, Colesterol, Lipossoma (PC:COL) e LAgNP.

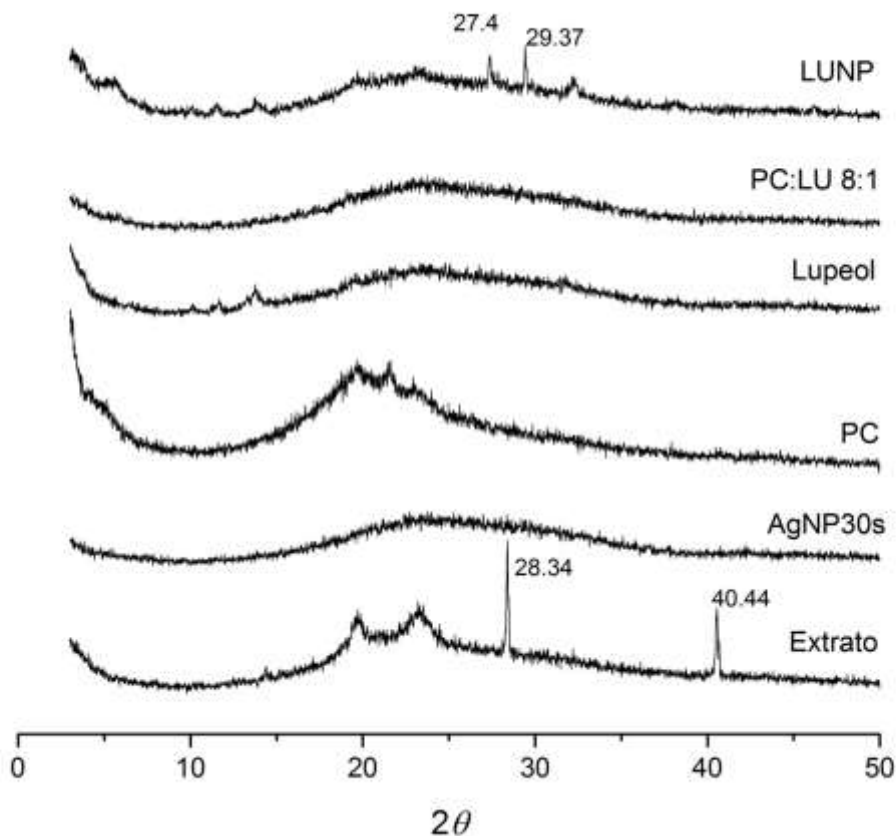


Fonte: O autor (2016).

A Figura 26 sumariza os resultados por difração de raios X para as etapas na formação de LUNP, mas em comparação com o difratograma anterior, o lupeol não apresenta picos cristalinos e o LUNP mostra picos em $2\theta = 27,4^\circ$ e $29,37^\circ$.

As AgNP30s seriam substâncias amorfas, porque não apresentam picos bem definidos no difratogramas como as cristalinas e são mais solúveis devido à disposição aleatória de suas moléculas, precisando de menos energia para separá-las. Logo, a dissolução tende a ser mais rápida no estado amorfo (RIEKES et al., 2011).

Figura 26 - Difratogramas do Extrato de Aloe vera, AgNP, PC, Lupeol , PC:Lu e LUNP.



Fonte: O autor (2016).

As AgNP30s não mostraram picos cristalinos, indicando o estado amorfo, dados coincidentes com as imagens do FEG. Embora diversos estudos (GURUNATHAN et al., 2009; LOGESWARI; SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2012; ZHANG et al., 2013) apresentem resultados de AgNP cristalinas, a maioria de trabalhos com AgNPs não utilizam luz solar. As AgNPs apresentam ausência dos picos cristalinos, sugerindo amorfização da prata durante a interação dos compostos redutores do extrato e o nitrato de prata.

Estes resultados sugerem que o processo de síntese de lipossomas promove uma diminuição dos picos de cristalinidade do colesterol e do extrato, gerando um material amorfo e com uma maior solubilidade (MARTINEZ, 2016; RIEKES et al., 2011).

5.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

5.6.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico em apresentar resposta diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (ANVISA, 2003).

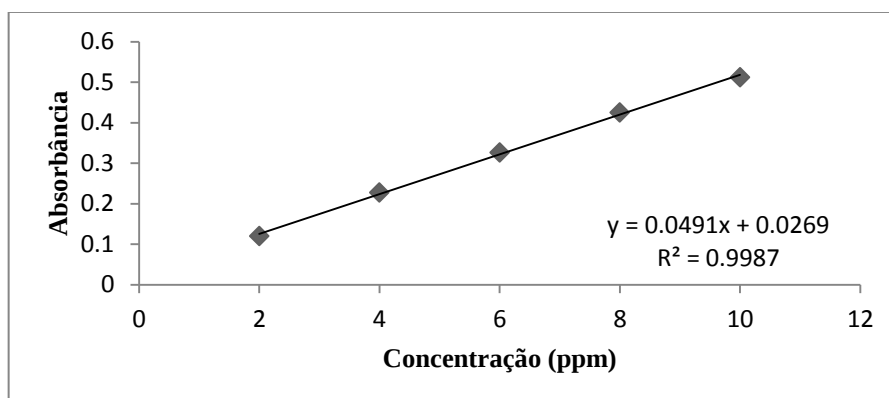
O estudo de linearidade do método de quantificação de nanopartículas de prata por espectrometria de absorção atômica em chama foi determinada por meio da construção da curva analítica em quintuplicata e utilizou-se cinco níveis de concentração 2, 4, 6, 8 e 10 ppm, assim a equação de regressão linear e o coeficiente de correlação (r), pelo método dos mínimos quadrados, gerou um $r^2 = 0,9987$, indicando uma regressão linear significativa. O gráfico 1 ilustra a curva analítica média obtida para quantificação de prata, apresentando a equação da reta e o valor de (r) médio encontrado e os parâmetros de linearidade estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros lineares do método de absorção atômica de chama.

Parâmetros	Resultados
Intervalo de linearidade	0 – 10 ppm.
Equação linear ($y = ax + b$)	$y = 0.0491x + 0.0269$
Inclinação da curva $\pm$ DP	$0.0491 \pm 0,0026$
Intercepto com o eixo $y \pm$ DP	$0.0269 \pm 0,0071$
Coeficiente de correlação (r)	0,9987

Fonte: O autor (2016).

GRÁFICO 1 – Representação gráfica da curva analítica média para determinação de nanopartículas de prata por absorção atômica de chama ($\lambda=328,1$ nm) em água.



Fonte: O autor (2016).

5.6.2. Limites de detecção e quantificação

Com os dados provenientes da avaliação da linearidade, foram calculados os limites de detecção e quantificação, por meio das equações 1 e 2 respectivamente, mencionadas no procedimento experimental. Os valores obtidos foram 1.18 ppm para o limite de detecção e 3.92 ppm para o limite de quantificação. O LD é definido como a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, enquanto o LQ representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

5.6.3. Repetibilidade e precisão intermediária.

A precisão é uma medida do erro relativo do método, expressa como coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR), em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Mas também, a precisão, é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A Tabela 7 indica que o método adotado mostrou ser preciso nos dois níveis avaliados, porque os valores de DPR foram inferiores a 5% (ANVISA, 2003).

Tabela 7 – Resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

Solução padrão (ppm)	Concentração de Ag $\pm$ DP (ppm)	CV (%)
Análise de repetibilidade (n=6)		
5	4,90 $\pm$ 0,0942	1,9198
Precisão intermediária (n=6)		
Dia 1		
5	4,76 $\pm$ 0,0942	2.0425
Dia 2		
5	4.94 $\pm$ 0.0750	1.5204
Dia 3		
5	4.35 $\pm$ 0.2091	4.3596

Fonte: O autor (2016)

5.6.4. Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). Estes resultados podem ser vistos na Tabela 8, indicando que amostras vazias apresentam leituras menores a 0,09 ppm, este valor é menor que o limite de detecção, e uma possível presença de prata na água.

Tabela 8 – Resultados obtidos nos ensaios de especificidade.

Amostra	Concentração $\pm$ DP (ppm)
Ag 10ppm	9.85 ± 0.10
Água	0.05 ± 0.01
LAgNP (Ag 5ppm)	4.76 ± 0.21
PC:COL	0.09 ± 0.06
Extrato Aloe vera	0.03 ± 0.007

Fonte: O autor (2016).

5.6.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Foi averiguada por meio de da análise de três concentrações distintas. Os resultados na Tabela 9 mostraram uma adequada recuperação do método, resultando em porcentagens de recuperação acima de 96,06%, encontrando-se dentro dos limites especificados pela ANVISA (2003), é dizer uma recuperação maior a 95%.

Tabela 9 – Resultados do ensaio de Exatidão.

Amostra (ppm)	Solução padrão (ppm)	Concentração final teórica (ppm)	Concentração quantificada $\pm$ DP (ppm)	Recuperação (%)
1	5	6	$5,77 \pm 0,24$	96,22
2,5	5	7,5	$7,41 \pm 0,06$	98,84
5	5	10	$9,60 \pm 0,54$	96,06

Fonte: O autor (2016).

5.6.6. Robustez

A robustez de um método analítico indica a capacidade do método desenvolvido em resistir às variações dos parâmetros analíticos, bem como sua confiabilidade durante o uso (ANVISA, 2003). As variações nos parâmetros de análise estabelecidos, diferentes solventes (água de osmose reversa e ultrapura), temperatura e pH, apresentaram um DPR inferior a 5%. Os resultados para o ensaio de robustez estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados do ensaio de robustez.

Concentrações (ppm)	Parâmetros variados										
	Temperatura (°C)				pH				Tipo de água		
	4-8	25	36	DPR(%)	5	6	7	DPR(%)	OR*	UP**	DPR(%)
2,5	2,36	2,32	2,41	1,77	2,32	2,39	2,53	4,34	2,38	2,29	2,72
5	4,84	4,95	4,97	1,45	4,74	4,86	4,95	2,18	4,95	4,87	1,12
7,5	7,20	7,51	7,68	3,25	7,23	7,24	6,88	2,85	6,97	7,28	3,02

* Água de destilada por osmose reversa filtradas em membrana de 5µm.

** Água ultrapura filtrada em membrana de 0,22µm.

Fonte: O autor (2016).

5.7. DETERMINAÇÃO DE PRATA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (FAAS)

As AgNP30s obtidas foram diluídas (1:10) para análise. As leituras foram realizadas em triplicata e foi realizado o cálculo de rendimento das reações. Estes cálculos foram efetuados em relação à quantidade de prata produzida por redução de 1 mol de AgNO₃ (ESCOBAR, 2015).

Assim, para preparar uma solução de prata de 100 ppm (100 mg/L = 0.1g/L), foi feito a partir de AgNO₃ (169.87 g/mol), sendo 107.87 g/mol a massa molar da prata:

$$107.87 \text{ g de Ag} \rightarrow 169.87 \text{ g de AgNO}_3$$

$$0.1 \text{ g} \rightarrow X \quad X = 0.1575 \text{ g de AgNO}_3$$

$$0,1575 \text{ g AgNO}_3/1000 \text{ mL} = 0.0009 \text{ mol de AgNO}_3 = 0,9 \text{ mM}$$

As proporções de AgNO₃ e Extrato de gel de *Aloe vera* foram de 9:1, com volume final de 10 mL.

$$9 \text{ mL de AgNO}_3 \text{ } 0,9 \text{ mM} = 0.0014175 \text{ g de AgNO}_3$$

$$169.87 \text{ g AgNO}_3 \rightarrow 107.87 \text{ g Ag}$$

$$0.0014175 \text{ g AgNO}_3 \rightarrow X \quad X = 0.0009 \text{ g Ag}$$

Foi adicionado 1 mL de extrato de Aloe vera, porém $9+1=10$ mL volume total.

10 mL sol. $\rightarrow$ 0.0009 g Ag

1000 mL $\rightarrow$ X

$$X = 0.090013 \text{ g Ag/L} = 90.0134 \text{ mg/L} = 90.0134 \text{ ppm (CONC. TEÓRICA)}.$$

A leitura obtida pelo método de absorção atômica foi de 84,89 ppm.

90.0134 ppm $\rightarrow$ 100 %

84,89 ppm $\rightarrow$ X

$$X = 94.32\% \text{ (RENDIMENTO)}$$

A Tabela 11 amostra a concentração de prata e rendimento da reação. Teoricamente, a partir de 9 mL de uma solução 0,9 mM é produzido 90,013 ppm. A média das leituras da concentração de Prata foi de 84,9 ppm e a porcentagem de rendimento foi de 94,32%.

Tabela 11 – Concentração de Prata e rendimento da reação.

Concentração Ag (ppm) $\pm$ DP	Fator de diluição	Concentração final de Ag (ppm) $\pm$ DP	Rendimento (%)
8,49 $\pm$ 0,03	10	84.89 $\pm$ 0.27	94.32

Fonte: O autor (2016).

Considerando os resultados acima, o método de síntese verde com extrato de gel de *Aloe vera* e exposição solar, mostrou ser um método eficiente para a obtenção de AgNPs.

5.8. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE LIPOSSOMAS

A eficiência de encapsulação de nanopartículas de prata em lipossomas foi avaliada utilizando o método analítico desenvolvido e validado. Os resultados estão indicados na Tabela 12.

Tabela 12 – Eficiência de encapsulação dos lipossomas

Lipossoma	Eficiência de encapsulação (%) $\pm$ DP
LAgNP(PC:COL, 2:1)	58,83 $\pm$ 29,69
LAgNP(PC:COL, 4:1)	54,90 $\pm$ 14,56
LAgNP(PC:COL, 8:1)	53,35 $\pm$ 9,34
LAgNP(PC:COL, 16:1)	51,81 $\pm$ 19,31
LUNP	56,08 $\pm$ 3,27

Fonte: O autor (2016).

A literatura aponta como uma das principais desvantagens nos métodos tradicionais de preparação de lipossomas a sua baixa taxa de encapsulação (LI; AN, 2014). Entretanto, a técnica utilizada para encapsular as AgNP30s em lipossomas foi eficaz, com taxas de encapsulação variando de 51,81 a 58,83%. Pôde-se observar, também, que a substituição do colesterol pelo Lupeol não teve interferência na eficiência de encapsulação, já que obteve-se uma taxa de 56,08%, muito semelhante aos LAgNPs.

6. CONCLUSÕES

O método de síntese verde com extrato de gel de *Aloe vera* e luz solar demonstrou ser viável, de baixo impacto ao meio ambiente e de fácil execução.

O tempo de 30 segundos de exposição solar foi o mais adequado para a obtenção das AgNPs, com tamanhos apropriados entre 40 e 70 nm observados no SEM-FEG, polidispersas e com potencial zeta de -18,96 mV e com rendimento de síntese de 94,32%.

A caracterização por espectroscopia de UV Vis demonstrou a banda de plasmon, característico da formação de nanopartículas de prata, e a espectroscopia de FTIR apontou a presença de possíveis grupos funcionais envolvidos na redução da prata iônica.

Os lipossomas desenvolvidos pelo método de evaporação de fase reversa modificada apresentaram diâmetro médio de entre 321 e 373nm, um potencial zeta em torno de -40 mV, e o índice de polidispersão próximo a 0.2, indicando homogeneidade de tamanhos. Foi possível a utilização do Lupeol para a formação de lipossomas em substituição ao colesterol. Esta troca promoveu redução discreta do potencial zeta para -36,5mV, aumento do índice de polidispersão e diâmetro médio de 218,8 nm.

As AgNPs foram encapsuladas tanto nos lipossomas produzidos com colesterol quanto nos preparados com Lupeol, com boa taxa de encapsulação e maior estabilidade.

O método analítico desenvolvido e validado para quantificar as nanopartículas de prata, se mostrou linear, preciso, exato e robusto.

Desta forma, pode-se concluir que os objetivos propostos no presente trabalho de desenvolvimento tecnológico de nanopartículas de prata encapsuladas em lipossomas foram atingidos com sucesso.

REFERÊNCIAS

- ABAD, I. **Detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas de Plata en muestras medioambientales y biológicas.** [s.l.] Universidad de Zaragoza, 2013.
- ABDULLAHI, S. M. et al. Isolation of Lupeol from the Stem-bark of *Lonchocarpus sericeus* (Papilionaceae). **Scholars academic journal of Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 18–19, 2013.
- AHMED, K. B. A. et al. Sunlight mediated synthesis of silver nanoparticles using redox phytoprotein and their application in catalysis and colorimetric mercury sensing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 39–45, 2015.
- AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 102, 2013.
- ALARCON, E. I. et al. The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4947–4956, 2012.
- ANNADHASAN, M. et al. A sunlight-induced rapid synthesis of silver nanoparticles using sodium salt of N-cholyl amino acids and its antimicrobial applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 96, p. 14–21, 2012.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. Resolução R.E. 899 de 29 de Maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República do Brasil. 2003.
- ARAMAKI, K. et al. Charge boosting effect of cholesterol on cationic liposomes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 732–738, 2016.
- ASHRAF, J. M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 20414, 2016.
- AVANTI, Liposome preparation. Disponível em: <<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>>. Acesso em: 01 Oct. 2016.
- BARANI, H. et al. Synthesis of Ag-liposome nano composites. **Journal of liposome research**, v. 20, n. 4, p. 323–9, 2010.

BARANI, H. et al. Nano silver entrapped in phospholipids membrane: synthesis, characteristics and antibacterial kinetics. **Molecular membrane biology**, v. 28, n. 4, p. 206–15, 2011.

BHADURI, G. A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using sunlight. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 258, p. 1–9, 2013.

BHUI, D. K. et al. Synthesis and UV-vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 145, n. 1, p. 33–37, 2009.

BOUFI, S. et al. In situ photochemical generation of silver and gold nanoparticles on chitosan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 151–158, 2013.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405–411, 2011.

CARDOSO, V. S. et al. Collagen-based silver nanoparticles for biological applications: synthesis and characterization. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 36, 2014.

CHANDRAN, S. P. et al. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 2, p. 577–583, 2006.

CHOI, S.; CHUNG, M.-H. A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects. **Seminars in integrative medicine**, v. 1, n. 1, p. 53–62, 2003.

CRUZ, D. A. et al. Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: Una relación profunda. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, v. 3, n. 2, p. 67–78, 2012.

DADFARNIA, S. et al. Synthesis of Nano-Pore Size Ag(I)-Imprinted Polymer for the Extraction and Preconcentration of Silver Ions Followed by Its Determination with Flame Atomic Absorption Spectrometry and Spectrophotometry Using Localized Surface Plasmon Resonance Peak of Silv. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1180–1190, 2015.

DINESH, D. et al. Mosquitocidal and antibacterial activity of green-synthesized silver nanoparticles from Aloe vera extracts: towards an effective tool against the malaria vector *Anopheles stephensi*? **Parasitology Research**, v. 114, n. 4, p. 1519–1529, 2015.

DHIRENDRA, K. et al. Solid Dispersions: A review. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, v. 22, p. 234-246, 2009.

DOS SANTOS, Deize B., Obtenção de dispersões ultrafinas de partículas de prata em matriz de poli(álcool vinílico) utilizando moagem de alta energia. 2015, 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

EID, K. A.; AZZAZY, H. M. Sustained broad-spectrum antibacterial effects of nanoliposomes loaded with silver nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 9, n. 9, p. 1301–1310, 2014.

ESCOBAR, V. E. **Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM).** [s.l.] PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, 2015.

FEICHTMEIER, N. S. et al. A direct solid sampling analysis method for the detection of silver nanoparticles in biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, p. 295–305, 2015.

GADE, A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles by *Phoma glomerata*. *Micron*, v. 59, p. 52–59, 2014.

GAGNÉ, F.; TURCOTTE, P.; GAGNON, C. Screening test of silver nanoparticles in biological samples by graphite furnace-atomic absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 404, n. 6–7, p. 2067–2072, 2012.

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in Biotechnology*, v. 13, n. 12, p. 527–537, 1995.

GUO, D. et al. Colloidal silver nanoparticles improve anti-leukemic drug efficacy via amplification of oxidative stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 126, p. 198–203, 2015.

GURUNATHAN, S. et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 74, n. 1, p. 328–335, 2009.

HAMEDI, A. et al. Effects of B-sitosterol oral administration on the proliferation and differentiation of neural stem cells. **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. 1, p. 252–258, 2014.

HO, Y. K. et al. Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Human Acute Myelogenous Leukemia Activity Cells in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. **Blood Journal**, v. 52, n. 6, 1978.

HOU, W.; STUART, B.; ZEPP, R. G. Sunlight drive reduction of silver ion by natural organic matter: Formation and transformation of silver nanoparticles. **Environment Science & Technology**, v. 47, p. 7713–7721, 2013.

IPSEN, J. H. et al. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. **Biochimica et biophysica acta. Protein structure and molecular enzymology**, v. 905, n. 1, p. 162–172, 1987.

JOHNSTON, H. J. et al. A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. **Nanotoxicology**, v. 4, n. June, p. 207–246, 2010.

KADER, A.; PATER, A. Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little affect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma cells. **Journal of Controlled Release**, v. 80, p. 29–44, 2002.

KEAT, C. L. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles and silver nanoparticles. **Bioresources and Bioprocessing**, 2015.

KIM, J. et al. Tumor-Targeted Delivery of Paclitaxel Using Low Density Lipoprotein-Mimetic Solid Lipid Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, 2015.

KLEIN, A. D.; PENNEYS, N. S.; MIAMI, P. D. Therapy Aloe vera. **J Am Acad Dermatol**, v. 18, n. 7, p. 714–720, 1988.

KUMAR, T. V. C. et al. Novel synthesis of nanosilver particles using plant active principle aloin and evaluation of their cytotoxic effect against Staphylococcus aureus. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. S1, p. 2–6, 2014.

KUMAR, V. et al. Sunlight-induced green synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of Polyalthia longifolia and its antioxidant activity. **Materials Letters**, v. 181, p. 371–

377, 2016a.

KUMAR, V. et al. Photo-induced rapid biosynthesis of silver nanoparticle using aqueous extract of *Xanthium strumarium* and its antibacterial and antileishmanial activity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 37, p. 224–236, 2016b.

KWON, H. H. et al. Activity-Guided Purification Identifies Lupeol, a Pentacyclic Triterpene, As a Therapeutic Agent Multiple Pathogenic Factors of Acne. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 6, p. 1491–1500, 2015a.

KWON, H. H. et al. Activity-Guided Purification Identifies Lupeol, a Pentacyclic Triterpene, As a Therapeutic Agent Multiple Pathogenic Factors of Acne. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 6, p. 1491–1500, 2015b.

LACATUSU, I. et al. Novel bio-active lipid nanocarriers for the stabilization and sustained release of sitosterol. **Nanotechnology**, v. 23, n. 45, p. 455702, 2012.

LI, J.; AN, X. Photoinduced drug release from complexes of liposome and fluorescent silver nanoparticles. **RSC Advances**, p. 9476–9479, 2014.

LIU, J. et al. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 33, p. 95–106, 2012.

LIU, Z. et al. Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. **Nano Research**, v. 2, n. 2, p. 85–120, 2009.

LOGESWARI, P.; SILAMBARASAN, S.; ABRAHAM, J. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 311–317, 2012.

LONG, Y. et al. A method for the preparation of silver nanoparticles using commercially available carboxymethyl chitosan and sunlight. **Materials Letters**, v. 112, p. 101–104, 2013.

LÓPEZ-SERRANO, A. et al. Comparison of bioconcentration of ionic silver and silver nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. **Environmental Pollution**, v. 191, p. 207–214, 2014.

LOW, W. L. et al. Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Letters in**

Applied Microbiology, v. 57, n. 1, p. 33–39, 2013.

MAGALHÃES, C. G. et al. Maytenus salicifolia: Triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 415–419, 2011.

MAHMOUD, S. S. et al. Liposomal Phospholipid Preparations of Chloramphenicol for Ophthalmic Applications. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 7, p. 2691–2701, 2008.

MAILLARD, M.; HUANG, P.; BRUS, L. Silver Nanodisk Growth by Surface Plasmon Enhanced Photoreduction of Absorbed Ag. **Nano Letters**, v. 3, p. 1611–1615, 2003.

MALVERN, Material Talks. Disponível em: <<http://www.materials-talks.com/blog/2014/01/23/intensity-volume-number-which-size-is-correct/>>. Acesso em: 01 nov. 2016.

MANIKPRABHU, D. et al. Sunlight mediated synthesis of silver nanoparticles by a novel actinobacterium (Sinomonas mesophila MPKL 26) and its antimicrobial activity against multi drug resistant Staphylococcus aureus. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 202–205, 2016.

MARTINEZ, A. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação invivo de sistemas de liberação microparticulados contendo efavirenz**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, 2016.

MARTINEZ, F.; ZUÑIGA, E.; SANCHEZ, A. K. Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. **Mundo Nano**, v. 6, n. 10, p. 101–108, 2013.

MEDDA, S. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and antifungal activity against Rhizopus sp. and Aspergillus sp. **Applied Nanoscience**, n. 2015, p. 1–16, 2014.

MERTINS, O. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2004.

MEXICO, S. DE E. **Análisis de Agua - Determinación de Metales por Absorción Atómica**

en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - Método de Prueba. México D.F.: [s.n.]. Disponível em: <ftp://ftp.conagua.gob.mx/Mapas/nom_cna/nom-002/nmx-aa-051-scfi-2001.pdf>.

MUKHA, I. P. et al. Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 199–206, 2013.

NIST, Cholesterol. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C57885&Type=IR-SPEC&Index=1#Refs>>. Acesso em: 02 nov. 2016.

PALURI, S. L. A. **Synthesis , Characterization and Manipulation of Creighton Silver Nanoparticles for Future Cytotoxicity Studies**. [s.l.] Wright State University, 2011.

PANACEK, A. et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials**, v. 30, n. 31, p. 6333–6340, 2009.

PAREDES, D. J. **Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre Escherichia coli Y Staphylococcus aureus**. [s.l.] Universidad Industrial de Santander, 2011.

PARMENTIER, J. et al. Stability of liposomes containing bio-enhancers and tetraether lipids in simulated gastro-intestinal fluids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, n. 1–2, p. 210–217, 2011.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G., M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. Ed. São Paulo: Cengage learning, 2012.

PEREIRA, A. B.; VRISMAN, A. L.; GALVANI, E. Estimativa da radiação solar global diária em função do potencial de energia solar na superfície do solo. **Engenharia Agrícola**, p. 211–216, 2002.

PETRONELLI, A.; PANNITTERI, G.; TESTA, U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, n. 10, p. 880–892, 2009.

PINHEIRO, R.; GARCIA, D.; MARANHÃO, R. C. Uptake of high density lipoprotein (HDL) cholesteryl esters by human acute leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 29, p. 955–959, 2005.

RAGASEEMA, V. M. et al. The antithrombotic and antimicrobial properties of PEG-

protected silver nanoparticle coated surfaces. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3083–3092, 2012.

RAMÍREZ C., M. A. **Evaluación de la cinética de Distribución y Toxicidad de las Nanopartículas de Plata**. [s.l.] Universidad Autónoma de Neuvo León, 2010.

RAO, P. V. et al. Phytochemicals and Biogenic Metallic Nanoparticles as Anticancer Agents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

RASTOGI, L.; ARUNACHALAM, J. Sunlight based irradiation strategy for rapid green synthesis of highly stable silver nanoparticles using aqueous garlic (*Allium sativum*) extract and their antibacterial potential. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1–2, p. 558–563, 2011.

RAY, A.; GUPTA, S. D.; GHOSH, S. Evaluation of anti-oxidative activity and UV absorption potential of the extracts of Aloe vera L. gel from different growth periods of plants. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 712–719, 2013.

REDDY, V. et al. Biogenic silver nanoparticles : efficient and effective antifungal agents. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 4, p. 475–484, 2015.

RENSSEN, P. C. N. et al. Recombinant lipoproteins : lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 251–276, 2001.

RIEKES, M. K. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 5, p. 962–968, 2011.

RODRIGUES, D. G. et al. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low- density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 765–772, 2002.

RODRIGUEZ, O. **Produção de Lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando agentes tuberculostáticos e avaliação do potencial de escalonamento do processo**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SAAVEDRA N., F. et al. Análisis por espectroscopía UV y FTIR de macerados acuosos y alcohólicos de Aloe vera L. y Aloe barbadensis Miller. Interacción con sales inorgánicas. **Rev. Soc. Quím. Perú**, v. 3, n. 3, p. 242–260, 2010.

SADHASIVAM, L.; DURAIRAJ, J. R. Evaluation profile of silver nanoparticle synthesized by aloe vera extract. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 9, p. 4379–4385, 2014.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 109–115, 2009.

SANDOVAL, L. Y. et al. **Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las nanopartículas en la reducción del volumen del lodo a disponer.** México: [s.n.]. Disponible em: <www.bvsde.paho.org/bvsaidis/tratagua/mexicon/R-0150.pdf>.

SARATHA, V.; PILLAI, S. I.; SUBRAMANIAN, S. Isolation and Characterization of Lupeol, a Triterpenoid From Calotropis Gigantea Latex. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 10, n. 2, p. 54–57, 2011.

SERCOMBE, L. et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. DEC, p. 1–13, 2015.

SHABAN, S. M. et al. Preparation of capped silver nanoparticles using sunlight and cationic surfactants and their biological activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 11, p. 1415–1420, 2015.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1–2, p. 83–96, 2009.

SONGSILAWAT, K.; SHIOWATANA, J.; SIRIPINYANOND, A. Flow field-flow fractionation with off-line electrothermal atomic absorption spectrometry for size characterization of silver nanoparticles. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 27, p. 4213–4218, 2011.

SULAIMAN, G. M. et al. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using Eucalyptus chapmaniana leaves extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 58–63, 2013.

TANG, B. et al. Colorful and antibacterial silk fiber from anisotropic silver nanoparticles. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 12, p. 4556–4563, 2013.

TANG, B. et al. Sunlight-driven synthesis of anisotropic silver nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 99–106, 2014.

TATIDIS, L. et al. Cholesterol catabolism in patients with acute myelogenous leukemia and hypocholesterolemia: suppressed levels of a circulating marker for bile acid synthesis. **Cancer Letters**, v. 170, p. 169–175, 2001.

TIRADO, J. M. et al. Low-density lipoprotein cholesterol suppresses apoptosis in human multiple myeloma cells. **Ann Hematol**, v. 91, p. 83–88, 2012.

TORRECILLA E., A. **Determinación del contenido de plata en nanomateriales de plata inorgánicos y poliméricos mediante digestión asistida por microondas y espectroscopía de absorción atómica de llama**. [s.l.] Universidad de la Rioja, 2014.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112, 2008.

VÉLEZ, M.; VILLA, N. **Identificación y cuantificación de antraquinonas y cromonas en plantas de Aloe vera cultivadas en municipios de Risaralda por cromatografía líquida de alta eficiencia**. [s.l.] Universidad Tecnológica de Pereira, 2012.

WANG, J.; SUI, M.; FAN, W. Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics. **Current drug metabolism**, v. 11, n. 2, p. 129–141, 2010.

WEI, X. et al. Sunlight-induced biosynthesis of silver nanoparticles by animal and fungus biomass and their characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 305–311, 2014.

WEST, J.B. e TAYLOR. 1995. Bases fisiológicas de la práctica médica. Ed. Médica Panamericana. 12ª edición. Buenos Aires. 343-358.

ZHANG, H. et al. A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1906–1914, 2011.

ZHANG, Y. et al. Synergetic Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles @ Aloe Vera Prepared via a Green Method. **Nano Biomed. Eng.**, v. 2, n. 4, p. 252–257, 2010.

ZHANG, Y. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles at room temperature using aqueous aloe leaf extract and antibacterial properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and**

Engineering Aspects, v. 423, p. 63–68, 2013.

ZHU, D. et al. **Liposome-silver Nanoparticles Hybrid as a SERS Traceable Drug Nanocarrier**. JSAP-OSA Joint Symposia. **Anais...**2013

ZHU, D. et al. Ag@4ATP-coated liposomes: SERS traceable delivery vehicles for living cells. **Nanoscale**, v. 6, n. 14, p. 8155–61, 2014.