

***“As doutrinas expressas neste trabalho
são da inteira responsabilidade do seu autor”***

Título: Avaliação da permeabilidade intestinal de constituintes do Aloe vera

Local de realização do estágio: Instituto de Tecnologia Química e Biológica

(ITQB) – Oeiras

Orientador Interno: Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Orientador externo: Ana Luísa Simplício

Índice

Índice de figuras.....	v
Índice de tabelas.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
1. Introdução.....	1
2. Materiais e métodos.....	4
2.1. Material Utilizado.....	4
2.2. Procedimento experimental.....	5
2.2.1. Método de HPLC.....	5
2.2.2. Ensaio de solubilidade e de estabilidade.....	6
2.2.3. Modelo Caco-2.....	6
2.2.3.1. Descongelamento e manutenção da linha celular.....	6
2.2.3.2. Criação de um banco celular.....	7
2.2.3.3. Teste de citotoxicidade.....	8
2.2.3.4. Ensaio de metabolismo.....	9
2.2.3.5. Ensaio de permeabilidade.....	10
2.2.3.6. Quantificação de aloína e aloe emodina em iogurte de <i>Aloe vera</i> ...12	
3. Resultados e discussão.....	13
3.1. Ensaio de estabilidade e solubilidade dos compostos.....	13
3.2. Ensaio de citotoxicidade.....	17
3.3. Ensaio de metabolismo.....	18
3.4. Ensaio de transporte.....	20
3.4.1. Aloína pura.....	20
3.4.2. Aloína impura.....	22
3.4.3. Aloe emodina.....	23

3.4.4. Aloína impura + aloe emodina.....	25
3.5. Cálculo de permeabilidades (Papp).....	27
3.6. Resultados da resistência eléctrica transepitelial	28
3.7. Resultados da quantificação da aloína e aloe emodina em iogurte de Aloe vera	30
4. Considerações finais	31
5. Referências bibliográficas	34
Agradecimentos	
Anexos	

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura química da aloe emodina (A) e da aloína (B)	2
Figura 2 – Aparelho de HPLC <i>Lachrom Elite</i> utilizado para a análise das amostras.....	5
Figura 3 – Representação da aplicação da suspensão celular em cada poço.....	9
Figura 4 – Placa Transwell® utilizada para os ensaios de permeabilidade.....	10
Figura 5 – Voltímetro, utilizado para medir a resistência das células Caco-2	11
Figura 6 – Esquematização da disposição dos compostos na placa Transwell® para os ensaios de transporte nos dois sentidos.....	12
Figura 7 – Cromatograma, onde se evidencia os picos da aloína B (1) e aloína A (2), a 360 nm.....	13
Figura 8 – Cromatograma que evidencia a degradação da aloína em aloe emodina, devido à temperatura, comprimento de onda 360 nm.....	14
Figura 9 – Cromatograma da aloína, comparando a amostra ao longo do tempo e a sua estabilidade, ao comprimento de onda de 360 nm.....	14
Figura 10 – cromatograma da aloína A e B com o tampão HBSS, a 360 nm.....	15
Figura 11 – Cromatograma da solução aloína pura a 360 nm: 1 - aloína A, 2 -aloína B	16
Figura 12 – Cromatograma da aloe emodina, com ACN, com comprimento de onda 440 nm.....	16
Figura 13 – Curva de viabilidade celular para a aloína pura aos 90 e 60 minutos de incubação com <i>MTS</i>	17
Figura 14 – Curva de viabilidade celular para a aloína impura aos 90 e 60 minutos de incubação com <i>MTS</i>	17
Figura 15 – Curva de viabilidade celular para a aloe emodina aos 90 e 60 minutos de incubação com <i>MTS</i>	18
Figura 16 – Comparação entre a solução inicial e a solução após 2 horas em contacto com as células Caco-2	19
Figura 17 – Comparação entre a dadora inicial e a amostra ao fim de 2 horas em contacto com as células Caco-2.....	19

Figura 18 – Comparação entre a dadora inicial e a amostra ao fim de 2 horas em contacto com as células Caco-2.....	20
Figura 19 – Quantidade de aloína A transportada ao longo do tempo (A), e quantidade de aloína B transportada ao longo do tempo (B), no sentido basolateral-apical	22
Figura 20 – Quantidade de aloína A transportada ao longo do tempo (A), e quantidade de aloína B transportada ao longo do tempo (B), no sentido basolateral-apical	23
Figura 21 – Quantidade de aloe emodina absorvida ao longo do tempo, no sentido apical-basolateral (A) e quantidade de aloe emodina absorvida ao longo do tempo, no sentido basolateral-apical (B).....	24
Figura 22 – Quantidade de aloína A transportada ao longo do tempo (A), quantidade de aloína B transportada ao longo do tempo (B), no sentido basolateral-apical	26
Figura 23 – Quantidade de aloe emodina transportada ao longo do tempo, no sentido apical-basolateral, (A), quantidade de aloe emodina transportada ao longo do tempo, no sentido basolateral-apical (B).....	27
Figura 24 - Medição da TEER no sentido apical-basolateral, antes do ensaio, depois do ensaio e 1 hora após o ensaio, para os 4 compostos.....	29
Figura 25 – Medição da TEER no sentido basolateral-apical, antes do ensaio e depois do ensaio, para os 4 compostos.....	30

Índice de tabelas

Tabela 1 – Descrição dos reagentes utilizados na preparação do tampão HBSS, bem como as respectivas concentrações.....	4
Tabela 2 – Gradiente de eluentes utilizado no método desenvolvido para análise de aloína e aloe emodina por HPLC.....	6
Tabela 3 – Preparação da solução-mãe para cada composto.....	8
Tabela 4 – Preparação das soluções de trabalho de cada composto, diluída em meio de crescimento.....	9
Tabela 5 – Preparação das soluções para o ensaio de metabolismo.....	10
Tabela 6 – Massa de aloína pura que foi detectada em cada uma das soluções ao fim de 2 horas, massa da solução dadora e cálculo da massa metabolizada ou retida (pela diferença).....	21
Tabela 7 – Massa de aloína impura que foi detectada em cada uma das soluções ao fim de 2 horas, massa da solução dadora e cálculo da massa metabolizada ou retida (pela diferença).....	22
Tabela 8 – Massa de aloe emodina que foi detectada em cada uma das soluções ao fim de 2 horas, massa da solução dadora e cálculo da massa metabolizada ou retida (pela diferença).....	24
Tabela 9 – Massa de aloína impura + aloe emodina que foi detectada em cada uma das soluções ao fim de 2 horas, massa da solução dadora e cálculo da massa metabolizada ou retida (pela diferença).....	25
Tabela 10 – Permeabilidade aparente dos compostos para o sentido apical-basolateral e basolateral-apical.....	28

Avaliação da permeabilidade intestinal de constituintes do *Aloe vera*

Vera Patrícia Duarte Vicente

Resumo

A *Aloe vera* é uma planta pertencente à família das Liliaceae, do género *Aloe* e neste trabalho foi estudada a espécie *Barbadencis* Miller, sendo utilizada para diversos fins medicinais há muitos anos. Esta é utilizada desde a antiguidade para fins terapêuticos e cosméticos e têm sido reportadas inúmeras propriedades benéficas para a saúde, no entanto, pouco se sabe sobre a permeabilidade dos seus constituintes.

Os compostos utilizados neste estudo, aloína e aloe emodina, são extraídos da planta *Aloe vera*. Estes compostos são as antraquinonas mais activas nas folhas e possuem propriedades laxantes, bactericidas e anti-inflamatórias.

Para testar a permeabilidade *in vitro* destes compostos foi utilizado o modelo Caco-2. Neste modelo são utilizadas células do adenocarcinoma do cólon humano, como membrana de permeação, visto que estas simulam as células do intestino humano. Este modelo tem sido frequentemente usado para a avaliação da permeabilidade intestinal de xenobióticos.

Os compostos aloína A e B não foram transportados no sentido apical-basolateral, no entanto, foram transportados no sentido oposto. No caso do composto aloe emodina foi transportado nos dois sentidos. Quando se misturou a solução de aloína e de aloe emodina, esta foi novamente transportada nos dois sentidos, enquanto que a aloína A e B apenas foi transportada no sentido basolateral-apical.

Palavras-chave: *Aloe vera*, aloína, aloe emodina, modelo Caco-2, absorção.

Evaluation of intestinal permeability of constituents of *Aloe vera*

Vera Patrícia Duarte Vicente

Abstract

The *Aloe vera* is a plant belonging to the family of Liliaceae, the *Aloe* genus and in this work, was study the species *Barbadencis* Miller which has been used for various medicinal purposes for many years. Namely it has been used since ancient times for therapeutic and cosmetic applications, and several properties beneficial to health have been reported, however little is known about the permeability of its constituents.

The compounds used in this study, aloin and aloe emodin, are extracted from the *Aloe vera* plant. These compounds are the most active anthraquinones in leaves and have laxative, bactericide and anti-inflammatory properties.

To test *in vitro* permeability of these compounds, the Caco-2 model was used. This model uses cells of the human colon adenocarcinoma, as the permeation membrane, that simulates the human intestine epithelium. This model has often been used to evaluate the permeability of oral administered xenobiotics.

The compounds aloin A and B did not permeate from the apical to the basolateral side, however, were transported in the opposite direction. Aoe emodin was transported in both directions. When a mixed solution of aloin and aloe emodin was administered, the same observations were made.

Keywords: *Aloe vera*, aloin, aloe emodin, model Caco-2, absorption.