



ESTUDO DO EFEITO DOS PRODUTOS DA ESTÉVIA SOBRE A ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BICAMADA LIPÍDICA

Marcos Felipe Moura do Amaral (PIBIC/CNPq/Uem), Luciana Marciano (Mestranda/PFS/UEM), Cecília Edna Mareze da Costa (DFS/UEM), Sílvia Cláudio da Costa (DBI/UEM), Kellen Brunaldi (Orientadora) e-mail: kbrunaldi@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Fisiológicas, Maringá, PR.

Área CNPq: Ciências Biológicas, Fisiologia, Biofísica

Palavras-chave: bicamada lipídica, estévia, permeabilidade

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do glicosídeo isolado da estévia, esteviosídeo e sua aglicona isoesteviol sobre a organização estrutural da bicamada lipídica detectada como uma alteração inespecífica da permeabilidade. Para tal, LUVs (large unilamellar vesicles) de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC), com ou sem calceína encapsulada, foram preparadas por extrusão. A % de calceína liberada para o tampão externo foi calculada frente a adição dos produtos da estévia as LUVs e o raio hidrodinâmico foi medido por DLS (Dynamic Light Scattering). Isoesteviol e esteviosídeo (3 a 60 μ M) adicionados a LUVs (150 μ M, concentração em egg-PC) não causaram vazamento de calceína para o tampão externo. O tamanho das LUVs não foi alterado por esses produtos (10 a 100 μ M adicionados a 500 μ M de LUVs). Conclui-se que o isoesteviol e esteviosídeo não promovem alterações significativas na organização estrutural da bicamada lipídica.

Introdução

Glicosídeos isolados da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni além de serem uma fonte de adoçantes não-calóricos, apresentam ações hipoglicemiantes e hiperinsulinêmicas (JEPPESEN *et al.*, 2000), que podem ocorrer a nível de membrana celular, como a inibição dos canais para K^{+}_{ATP} de células beta pancreáticas (ABUDULA *et al.*, 2008). Por outro lado, os produtos da estévia





per se podem alterar as propriedades físico-químicas das membranas, o que explicaria parte dos seus efeitos biológicos e ou toxicidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto dos produtos derivados da estévia, esteviosídeo e isoesteviol sobre a organização estrutural da bicamada lipídica. Para tal, foi utilizada a sonda fluorescente calceína para a detecção de variações rápidas na permeabilidade de membranas lipossomais. Quando uma alta concentração de calceína é encapsulada no interior de lipossomas, a fluorescência medida é baixa devido a auto-extinção dada pela colisão entre as suas moléculas. Porém, se a permeabilidade da membrana é aumentada, moléculas de calceína se difundem para fora do lipossoma (vazamento) resultando em um aumento da fluorescência.

Materiais e métodos

LUVs (large unilamellar vesicles) de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC) foram formados por extrusão. Resumidamente, um filme lipídico (10 mg de egg-PC em clorofórmio, seguido de evaporação do solvente) foi hidratado com 5 ml de 50 mM KCl, 20 mM NaHPO₄ e 70 mM de calceína (pH 7,4), por 1 hora e a temperatura ambiente. A suspensão de egg-PC foi submetida a 5 ciclos de congelamento/descongelamento com N₂ líquido, seguida por extrusão (12 ciclos). A calceína não encapsulada foi removida por filtração com Sephadex G100, hidratado em 100 mM KCl e 20 mM NaHPO₄ (pH 7,4). Calceína foi excitada em 490 nm e a emissão coletada em 520 nm. A quantidade de calceína liberada para o tampão externo foi calculada como: % liberação = $(I_{est} - I_0) / (I_t - I_0)$, onde I é a intensidade da emissão da fluorescência antes (I_0) e após a adição dos produtos da estévia (I_{est}), e após a permeabilização completa das LUVs com tritonX-100 (I_t). O raio hidrodinâmico das LUVs foi medido por DSL (dynamic light scattering). Esteviosídeo e isoesteviol foram preparados em BSA (2mol de produto:1mol de BSA).

Resultados e Discussão

Como mostrado na **tabela 1**, esteviosídeo e isoesteviol complexados à BSA não causaram lise e nem mudanças significativas no tamanho das LUVs (500 µm). Em experimentos controle, BSA não promoveu alteração do tamanho das LUVs e nem vazamento de calceína (dados não mostrados). O índice de polidispersividade da amostra, o qual indica a distribuição média





do tamanho das nanopartículas, são menores que 0,2, indicando a presença de uma amostra homogênea (GAUMET et al, 2008).

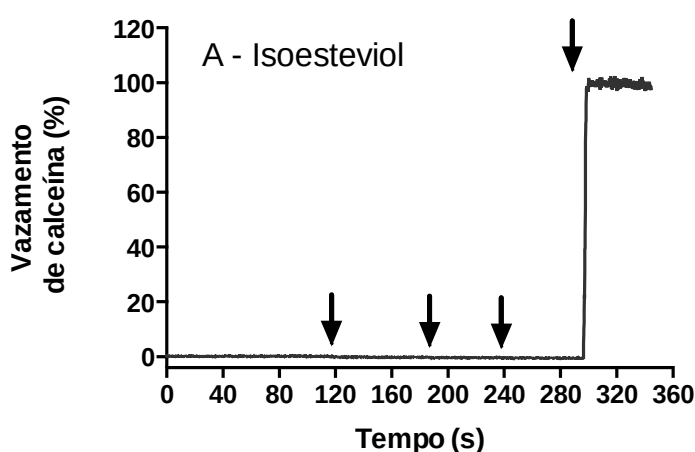
Tab.1. Efeito do esteviosídeo e isoesteviol sobre o raio hidrodinâmico e índice de polidispersividade de LUVs de egg-PC.

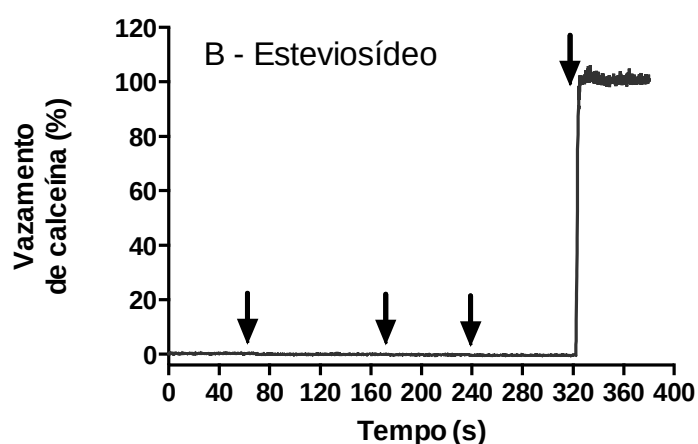
	Concentração (µM)	Raio hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersividade
Esteviosídeo	0	154,1	0,149
	10	155,4	0,154
	50	154,7	0,161
	100	158,7	0,106
Isoesteviol	0	154,1	0,156
	10	154,8	0,163
	50	155,0	0,147
	100	155,2	0,153

Os valores correspondem a média de 3 medidas realizadas na mesma amostra. Concentração de LUVs de 500 µM. Produtos complexado a BSA.

Como mostrado na **figura 1**, isoesteviol (A) e esteviosídeo (B) (20 µM de produto e 10 µM de BSA por adição) adicionados a 150 µM de LUVs não promoveram

vazamento de calceína para o tampão externo, ou seja, não aumentaram a permeabilidade da bicamada. A lise das LUVs com triton X causou um aumento da fluorescência, indicativo de 100% de permeabilização.





Conclusão

Conclui-se que os produtos isolados da *Stevia rebaudiana* (Bert), isosteviol e esteviosídeo não promovem alterações na estrutura organizacional da bicamada lipídica.

Figura 1 - Efeito do isoesteviol (A) e esteviosídeo (B) sobre o vazamento de calceína encapsulada em LUVs de egg-PC (150 μ M). Adição de alíquotas de 20 μ M de cada produto em 10 μ M BSA (setas). Permeabilização total alcançada pela adição, ao final do experimento, de 10 μ L de de triton X a 20%.

Agradecimentos

CNPq

Referências

ABUDULA, R.; MATCHKOV, V.V.; JEPPESEN, P. B.; NILSSON, H.; AALKJÆR, C.; HERMANSEN, K. Rebaudioside A directly stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: a glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K⁺-channels. **Diabetes Obes Metab**, v. 10, n. 11, p. 1074–1085, 2008.

GAUMET, M; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 69, n.1, p. 1-9, 2008.

JEPPESEN, P. B.; GREGERSEN, S.; POULSEN, C. R.; HERMANSEN, K. Stevioside acts directly on pancreatic β cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel 7 activity. **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 208–214, 2000.

