

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA SOBRE A FLUIDEZ DE MEMBRANA

Luiz Felipe Moraes Schwerz Bonadiman Blanco (PIBIC/CNPq/FA/Uem),
Luciana Marciano Sergio (DFS/UEM), Silvio Cláudio da Costa (DBQ/ UEM)
Kellen Brunaldi (Orientador), e-mail: kbrunaldi@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde/Maringá, PR

Ciências Biológicas, Fisiologia

Palavras-chave: membrana, fluidez, estévia

Resumo

Muitas das ações biológicas dos glicosídeos da estévia envolvem a interação com proteínas de membranas. Entretanto, não há estudos que abordem o impacto dessas moléculas sobre a fluidez de membrana. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do esteviolbiosídeo e das agluconas esteviol e isoesteviol sobre a fluidez da bicamada lipídica por meio da sonda fluorescente sensível a polaridade laurdan. Para tal, lipossomas (large unilamellar vesicles – LUVs) de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC) contendo laurdan (1 mol de laurdan: 200 mol de egg-PC) foram preparadas por extrusão. Mudanças na fluidez de membrana são acompanhadas por mudanças no teor de água (polaridade) da bicamada lipídica, levando ao deslocamento no espectro de emissão do Laurdan, o qual foi quantificado pelo cálculo da polarização generalizada (GP): $GP = (I_{430} - I_{475}) / (I_{430} + I_{475})$, onde I_{430} e I_{475} são as intensidades de emissão a 430 e 475 nm, respectivamente. A adição de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo (50 a 200 μ M) a LUVs (500 μ M) com laurdan não produziu mudanças significativas nos valores de GP (-0,52 a -0,35). Adicionalmente, como esperado, os valores negativos de GP indicaram a presença de membranas no estado fluido (T_m da Egg-PC ~ 0 °C). Conclui-se que a ligação do esteviolbiosídeo, esteviol e isoesteviol a bicamada lipídica não produz alterações de fluidez.

Introdução

Apesar das inúmeras ações biológicas atribuídas aos glicosídeos da estévia (BHASKER; CHINNAMMA; MADHAH, 2016), pouco se sabe se esses compostos atuam em nível de membrana celular ou citoplasma.

A natureza hidrofóbica dos glicosídeos da estévia, principalmente das agluconas (FOOD, 2017), indicam particionamento favorável na membrana celular. A interação com os fosfolípidos de membrana poderia, entre outros efeitos, alterar a fluidez, influenciando indiretamente o funcionamento de proteínas de membrana. Por sua vez, os resíduos de glicose podem conferir aos glicosídeos da estévia a capacidade de se ligar a proteínas de membrana, como por exemplo, transportadores de glicose.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do esteviolbiosídeo e das agluconas esteviol e isoesteviol sobre a fluidez da bicamada lipídica de lipossomas (LUVs - large unilamellar vesicles) de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC) por meio da sonda fluorescente sensível à polaridade laurdan.

Materiais e Métodos

LUVs de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC) foram formadas por extrusão. Resumidamente, um filme lipídico, preparado por adição de clorofórmio a 10 mg de egg-PC e seguido de evaporação do solvente, foi hidratado com 5 mL de tampão 25 mM Hepes (pH 7.4) por 1 hora e a temperatura ambiente. A suspensão de egg-PC foi submetida a 12 ciclos de extrusão utilizando um mini extrudor. LUVs (1 mL) foram incubadas por 20 minutos (escuro e temperatura ambiente) com a sonda fluorescente, lipossolúvel e sensível à polaridade Laurdan (1mol de Laurdan : 200 mols de egg-PC). Medidas de fluorescência foram realizadas com o fluorímetro Cary Eclipse (Varian), à temperatura ambiente e com agitação constante. Espectros de emissão do laurdan incorporado a LUVs (500 uM de egg-PC) foram obtidos na presença de concentrações crescentes de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo (0, 50, 100, 150 e 200 uM a partir de soluções estoque em DMSO). Com auxílio do software Origin, os espectros de emissão foram deconvoluídos para o cálculo da polarização generalizada (GP): $GP = (I_{435} - I_{490}) / (I_{435} + I_{490})$ (HARRIS; BEST; BELL, 2002), onde I_{435} e I_{490} são as intensidades de emissão a 453 and 490 nm, respectivamente.

Resultados e Discussão

Na Figura 1 é apresentado o espectro de emissão do Laurdan em dois meios de constantes dielétricas diferentes (polaridade). Como esperado, observou-se em metanol um deslocamento para direita da emissão do laurdan em relação ao ambiente mais hidrofóbico das LUVs (PARASASSI et al., 1991).

Para o cálculo do GP, os espectros de emissão do laurdan em LUVs (exemplificado na Figura 2 para uma única concentração de esteviol) foram

deconvoluídos para obtenção dos picos de emissão em 430 e 475 nm, os quais reportam a fase gel e fluida, respectivamente (SÁNCHEZ et al., 2007).

Os valores de GP de um experimento representativo estão apresentados na tabela 1 e foram calculados pela seguinte equação $GP = (I_{430} - I_{475}) / (I_{430} + I_{475})$, onde I_{430} e I_{475} são as intensidades de emissão a 430 e 475 nm, respectivamente.

Aparentemente, o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo não induziram mudanças no GP, ou seja, não promoveram alterações de fluidez, as quais são acompanhadas por mudanças no teor de água (polaridade) na membrana (HARRIS; BEST; BELL, 2002). Os valores negativos de GP indicaram que na temperatura ambiente e acima da temperatura de transição de fase da egg-PC ($T_m = 0^\circ\text{C}$), as LUVs encontravam-se

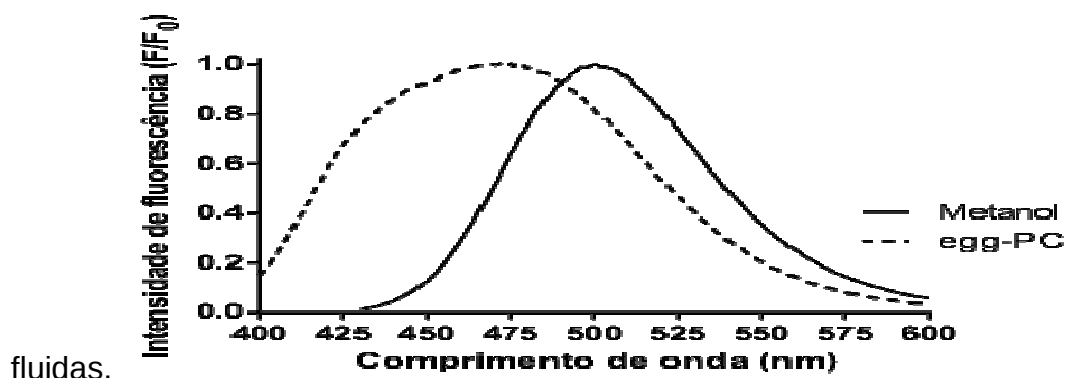


Figura 1 - Espectro de emissão do laurdan em LUVs de egg-PC e em metanol. As concentrações de laurdan foram 345 μM em metanol e 1 mol para 200 mol de egg-PC. Excitação a 352 nm e emissão a 451 nm.

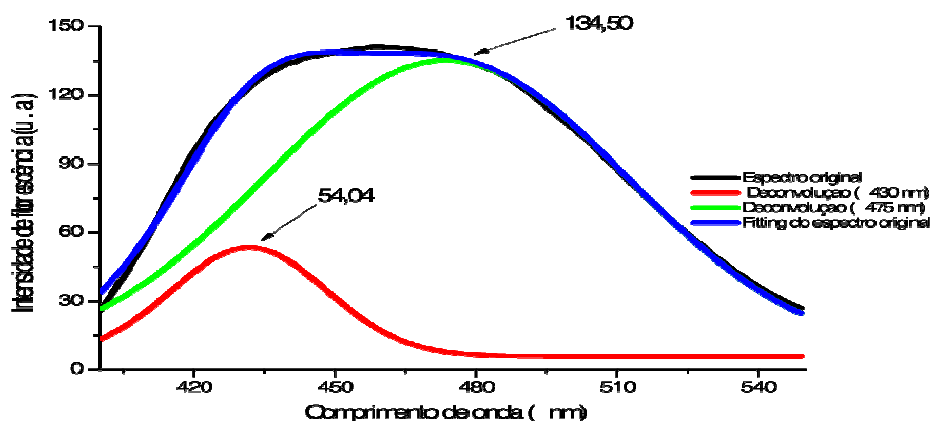


Figura 2 – Espectro de emissão do laurdan em LUVs de egg-PC. Dado experimental (preto) e a sua regressão (azul). Espectro deconvoluído para 430 nm (vermelho) e 475 nm (verde). As intensidades dos picos de emissão estão indicadas. Concentração de LUVs de 500 μM

(1 mol de laurdan : 200 mols de egg-PC). Excitação a 352 nm e emissão a 451 nm. Fendas de excitação e emissão de 2,5 e 5 nm, respectivamente.

Molécula	Polarização generalizada $(I_{430}-I_{475})/(I_{430}+I_{475})$				
	0 μ M	50 μ M	100 μ M	150 μ M	200 μ M
Esteviol	-0,41	-0,37	-0,40	-0,39	-0,37
Isoesteviol	-0,36	-0,37	-0,36	-0,36	-0,35
Esteviolbiosídeo	-0,44	-0,52	-0,49	-0,47	-0,45

Tabela 1: Valores de GP de laurdan em LUVs de egg-PC para um experimento representativo.

Conclusões

Conclui-se que a ligação do esteviolbiosídeo, esteviol e isoesteviol a bicamada lipídica não produz alterações de fluidez.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e FA pelo apoio e ao PPG/PIC-UEM.

Referências

BHASKER, S.; CHINNAMMA, M.; MADHAV, H.. Molecular evidence of insulinomimetic property exhibited by steviol and stevioside in diabetes induced L6 and 3T3L1 cells. **Phytomed.**, v. 22, n. 11, p. 1037-1044, 2015

HARRIS, F.M.; BEST, K.B.; BELL, J.D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1565, n.1, p. 123-128, 2002.

SANCHEZ, S.A; Tricerri M.A.; Gunther G.; Gratton E. Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope. **J Lipid Res.**, v.48, p.1689-1700, 2007

FOODB. Showing Compound Steviol. Disponível em: <http://foodb.ca/compounds/F_DB015642> Acesso em: 01 de junho de 2017.