



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**



LUCIANA MARCIANO SERGIO

**TRANSPORTE DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA ATRAVÉS
DA BICAMADA LIPÍDICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MARINGÁ - PARANÁ
2017**

LUCIANA MARCIANO SERGIO

**TRANSPORTE DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA
ATRAVÉS DA BICAMADA LIPÍDICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas sob orientação da Prof^a Dr^a. Kellen Brunaldi.

MARINGÁ
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S484t Sergio, Luciana Marciano
Transporte dos glicosídeos da estévia através da bicamada lipídica / Luciana Marciano Sergio. -- Maringá, 2017.
64 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kellen Brunaldi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Fisiológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2017.

1. Bicamada lipídica. 2. Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni - Transporte de moléculas. 3. Sonda FPE. 4. Piranina. 5. Glicosídeo - Transporte. 6. Lipossomas - Transporte. I. Brunaldi, Kellen, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Ciências Fisiológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDD 23.ed.572.565

GVS-003782

LUCIANA MARCIANO SERGIO

**TRANSPORTE DOS GLICOSÍDEOS DA ESTÉVIA ATRAVÉS DA
BICAMADA LIPÍDICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na área de concentração em Fisiologia Integrativa, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em de de

Prof. Dr^a. Andréa Diniz

Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar

Prof^a. Dr^a. Kellen Brunaldi
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

To the fools who dream.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à todas as pessoas que passaram pela vida nesses últimos dois anos. Conheci seres humanos incríveis e fiz amigos que lembrarei com muito carinho ao longo da vida.

Um agradecimento especial precisa ser dado ao meu pai, Luciano. Cara, você é o cara! Obrigada por tudo, desde o primeiro momento que me viu até hoje! Te amo!

Outro ser humano excepcional da minha família é minha tia, Lucília. Obrigada por ter me criado como sua filha. Acredite, você é minha mãe. E ninguém pode discordar disso! Meus avós queridos, Luiza e Benedito, a vida é muito chata sem vocês! Aonde estiverem, não há um dia em que não penso em vocês!

Obrigada à minha orientadora, Prof^a. Kellen, pela paciência, carinho e pronto atendimento. Foi um privilégio ter tido a oportunidade de aprender o tanto que aprendi nesses dois últimos anos com você.

À minha co-orientadora não oficial, Prof^a. Maria Ida, gostaria de agradecer pelos seus conselhos, pelo carinho e pela ajuda sempre que necessária.

Aos mestrandos André, Camila e Yandara: obrigada pelos momentos de aprendizado que compartilhamos!

Aos meus colegas de mestrado: cadê nosso churrasco?

Aos meus colegas de laboratório: obrigada por sempre me ajudarem em todos os momentos que precisei.

Aos meus amigos: obrigada por estarem presentes nos momentos de felicidade e nos momentos de tristeza! Vocês me ajudaram imensamente nesses anos de mestrado. Obrigada por tudo!

SERGIO, Luciana Marciano. **Transporte dos glicosídeos da estévia através da bicamada lipídica**. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

RESUMO

Os glicosídeos da estévia apresentam potencial terapêutico anti-diabetogênico e anti-hipertensivo. Porém, não há um consenso na literatura quanto ao mecanismo de transporte dos glicosídeos da estévia e suas agluconas através de membranas celulares. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o transporte das agluconas esteviol, isoesteviol e do glicosídeo esteviolbiosídeo através da bicamada lipídica por meio de espectroscopia de fluorescência. Lipossomas (large unilamellar vesicles - LUVs) de egg-PC foram formados por extrusão. As sondas fluorescentes piranina (sensível a pH) e calceína foram encapsuladas nas LUVs, enquanto que a sonda FPE (sensível a cargas de superfície) foi inserida seletivamente na monocamada externa da bicamada lipídica. As soluções estoque dos produtos da estévia foram preparadas em DMSO ou em BSA (2 mol de produto:1mol de BSA). A ligação dos produtos da estévia a BSA foi caracterizada pela fluorescência intrínseca da BSA (resíduos de triptofano). O raio hidrodinâmico das LUVs foi medido pela técnica de DLS (Dynamic light scattering). A ligação dos produtos da estévia à BSA foi evidenciada pela supressão da fluorescência intrínseca da BSA. A constante de ligação à 37 °C, calculada a partir dos dados experimentais, indicaram uma maior afinidade do esteviolbiosídeo pela BSA. Entretanto, o esteviol e isoesteviol, promoveram um deslocamento hipsocrômico (*blue shift*) no espectro de emissão da BSA, indicativo do aumento na hidrofobicidade ao redor dos resíduos de triptofano. O esteviol e o isoesteviol promoveram uma rápida (em segundos) redução e recuperação da fluorescência do FPE, condizentes com a ligação da forma ionizada e carregada negativamente à monocamada externa seguida de sua difusão (flip-flop), respectivamente. Nos ensaios com piranina, o esteviol, isoesteviol e em menor extensão o esteviolbiosídeo, causaram uma rápida (em segundos) redução da fluorescência da piranina, um indicativo de acidificação do meio intravesicular. Esses dados refletem a difusão da forma protonada dos produtos da estévia através da bicamada lipídica, com o posicionamento dos grupamentos ionizáveis na interface água/membrana e entrega de prótons para interior das LUVs. Os produtos da estévia não afetaram o raio hidrodinâmico das LUVs e não induziram o vazamento de calceína encapsulada, ou seja, não alteraram a organização estrutural da bicamada lipídica que justificassem a difusão transmembrana dessas moléculas assim como o vazamento das sondas FPE e piranina. Portanto, os resultados apresentados, inéditos na literatura, indicam que as agluconas esteviol e isoesteviol são capazes de se ligarem e atravessarem membranas lipídicas por difusão simples e que a permeabilidade da bicamada lipídica ao esteviolbiosídeo é bastante reduzida.

Palavras-Chave: Bicamada lipídica. Estévia. FPE. Piranina. Transporte.

SERGIO, Luciana Marciano. **Transport of steviol glycosides across the lipid bilayer**. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

ABSTRACT

The stevia glycosides present anti-diabetogenic and antihypertensive actions. However, there is no consensus in the literature regarding the transport mechanism of glycosides and their aglucones across cell membranes. Thus, the objective of this work was to evaluate the transmembrane transport of the steviol, isoesteviol and steviolbioside by means of fluorescence spectroscopy. Liposomes (large unilamellar vesicles - LUVs) of egg-PC were prepared by extrusion. Pyranin (pH probe) and calcein were encapsulated in LUVs. FPE (charge surface probe) was selectively inserted into the outer monolayer of the lipid bilayer. Stock solutions of stevia products were prepared in DMSO or BSA (2 mol of product: 1 mol of BSA). The binding of stevia products to BSA was characterized by the BSA intrinsic fluorescence (tryptophan residues). The hydrodynamic radius was measured by DLS (Dynamic light scattering). The binding of the stevia products to BSA caused fluorescence suppression. The steviolbioside binding constant at 37 °C, calculated from the experimental data, was higher than those calculated for steviol and isoesteviol. Furthermore, the aglucones induced a blue shift in the BSA emission spectrum probably due to an increase in hydrophobicity around the tryptophan residues. In the FPE assay, steviol and isosteviol promoted a rapid (in seconds) reduction in FPE fluorescence followed by a recovery towards to the base line. These results are explained by the binding and flip-flop of the ionized molecules. In the piranine assay, steviol, isosteviol and, to a lesser extent, steviolbioside, caused a rapid (in seconds) reduction of the pyranin fluorescence without recovery when BSA was used as vehicle. These results reflect the binding and flip-flop of the protonated molecules, with delivery of protons to the LUVs interior. The stevia products did not affect the LUV hydrodynamic radius and did not induce calcein leakage. These results indicate that the structural organization of the lipid bilayer was not affected by the binding of stevia products. Therefore, this study indicate that steviol and isosteviol are able to bind and cross lipid membranes by simple diffusion and the permeability of lipid bilayer to steviolbioside is quite reduced.

Keywords: FPE. Lipid bilayer. Pyranin. Stevia. Transport.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da aglucona esteviol e seus glicosídeos presentes nas folhas da <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni.....	13
Figura 2 -	Estruturas das sondas fluorescentes utilizadas nos estudos de rastreamento de cargas (FPE), pH (piranina) e integridade da bicamada lipídica (calceína).....	15
Figura 3 -	Cromatograma do esteviol.....	18
Figura 4 -	Espectro de emissão da BSA na presença de isoesteviol, esteviol e esteviolbiosídeo a 27 °C.....	25
Figura 5 -	Espectro de emissão da BSA na presença de isoesteviol, esteviol e esteviolbiosídeo a 32 °C.....	26
Figura 6 -	Espectro de emissão da BSA na presença de isoesteviol, esteviol e esteviolbiosídeo a 37 °C.....	27
Figura 7 -	Gráficos de Stern-Volmer da interação da BSA com esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo.....	29
Figura 8 -	Gráficos de $\log [(F_0-F)/F]$ em função do \log das concentrações do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo em 27, 32 e 37 °C	31
Figura 9 -	Espectro de excitação (acima) e emissão (embaixo) da sonda FPE incorporada a monocamada externa da bicamada lipídica de LUVs de egg-PC.....	33
Figura 10 -	Efeito do esteviol e isoesteviol, solubilizados em DMSO, sobre a emissão do FPE inserido na monocamada externa de LUVs de egg-PC.....	34
Figura 11 -	Efeito da albumina sobre a emissão do FPE inserido na monocamada externa de LUVs de egg-PC.....	35
Figura 12 -	Efeito do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo, complexados a albumina, sobre a fluorescência da piranina encapsulada em LUVs de egg-PC.....	38
Figura 13 -	Efeito do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo solubilizados em DMSO sobre a fluorescência da piranina encapsulada em LUVs de egg-PC.....	39
Figura 14 -	Efeito do ácido oleico e do NH_4Cl sobre a emissão de fluorescência da piranina encapsulada em LUVs de egg-PC.....	40
Figura 15 -	Efeito dos produtos da estévia sobre o raio hidrodinâmico de LUVs de egg-PC.....	41
Figura 16 -	Efeito dos produtos da estévia sobre o índice de polidispersividade do raio hidrodinâmico de LUVs de egg-PC.....	42
Figura 17 -	Efeito do esteviol, isoesteviol, esteviosídeo e da albumina sobre a fluorescência da calceína encapsulada em LUVs de egg-PC.....	44

Figura 18 - Representação do arcabouço proteico da albumina sérica bovina (BSA).....	53
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Constantes de Stern-Volmer obtidas para o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo a 27, 32 e 37°C.....	30
Tabela 2 -	Log de K_b , constantes de associação (K_b) e número de moléculas obtidas por sítio de ligação (n) para o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo em 27, 32 e 37°C.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt	Serina treonina quinase
BSA	Bovine serum albumin ou albumina sérica bovina
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGG-PC	Egg-phosphatidylcholine
F₀	Fluorescência Inicial
F	Fluorescência
FDA	Food and Drug Administration
FPE	Fluorescein phosphatidylethanolamine
GLUT	Glucose Transporter
hOAT	Human organic anion transporter
HAS	Human serum albumin ou albumina sérica humana
I₀	Intensidade de fluorescência inicial
I_{EST}	Intensidade de fluorescência após adição dos produtos da estévia
I_T	Intensidade de fluorescência total
K_b	Binding constant ou Constante de ligação
KCl	Cloreto de potássio
K_q	Constante de velocidade bimolecular
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
LUVs	Large unilamellar vesicles
N	Número de moléculas por sítio de ligação
P_{app}	Permeabilidade aparente
P.I.	Índice de polidispersividade
[Q]	Concentração do supressor ou <i>quencher</i>
R.H.	Raio hidrodinâmico
τ₀	Tempo de meia-vida do fluoróforo
Trp	Triptofano
u.a.	Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. MÉTODOS	18
3.1. Preparo das soluções estoque dos produtos da estévia	19
3.2. Caracterização espectrofotométrica da ligação dos produtos da estévia à BSA	19
3.3. Preparo das LUVs	20
3.4. Medidas de fluorescência	21
3.5. Determinação do raio hidrodinâmico	22
3.6. Análise dos dados	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Caracterização espectrofotométrica da ligação dos produtos da estévia à BSA	24
4.1.1. Supressão de fluorescência	24
4.1.2. Determinação do mecanismo de supressão da fluorescência	28
4.1.3. Determinação da constante de associação e número de sítios de ligação	30
4.2. Avaliação da ligação do esteviol e isoesteviol a bicamada lipídica pela sonda sensível a cargas de superfície FPE	32
4.3. Avaliação da difusão do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da bicamada lipídica pela sonda de pH piranina	35
4.4. Efeito dos produtos da estévia sobre o raio hidrodinâmico de LUVs	40
4.5. Efeito dos produtos da estévia sobre o vazamento de calceína	42
5. DISCUSSÃO	45
5.1. Transporte de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da bicamada lipídica	45
5.2. Ligação do esteviol e isoesteviol à bicamada lipídica	45
5.3. Flip-flop do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo	47
5.4. Efeito do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo sobre a organização estrutural da bicamada lipídica	51
5.5. Interação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo com a albumina bovina sérica (BSA)	52
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o avanço da obesidade e o do diabetes, houve um aumento na quantidade de alimentos e bebidas adoçados com edulcorantes sintéticos não calóricos (SARTORELLI; FRANCO, 2003; POPKIN; NIELSEN, 2003; MATTES; POPKIN, 2009; SYLVETSKY; ROTHER; BROWN, 2011). A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos aprova atualmente o uso de seis edulcorantes sintéticos, sendo eles: acesulfame de potássio, aspartame, sacarina, sucralose, neotame e o advantame (FDA, 2016).

Entretanto, os riscos associados ao consumo a longo prazo de edulcorantes sintéticos ainda são desconhecidos (WHITEHOUSE; BOULLATA; MCCAULEY, 2008; MATTES; POPKIN, 2009; HORIO et al., 2014). Em estudos mais recentes, há o relato de que o uso contínuo desses produtos pode levar à alteração da microbiota intestinal, impactando no metabolismo do hospedeiro (PAYNE; CHASSARD; LACROIX, 2012; SUEZ et al., 2014).

Devido à toxicidade associada aos edulcorantes sintéticos, a indústria alimentícia tem se dedicado ao desenvolvimento de edulcorantes de origem natural, supostamente mais seguros. Entre os poucos edulcorantes naturais disponíveis, os glicosídeos extraídos das folhas da *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni estão ganhando cada vez mais espaço devido a alta estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura (JOOKEN et al., 2012), doçura intensa (SOEJARTO; KINGHORN; FARNSWORTH, 1982), grandes quantidades nos extratos da planta (KOYAMA et al., 2003a) e efeitos sinérgicos com outros edulcorantes (KROYER, 2010).

Além da capacidade edulcorante, os glicosídeos da estévia possuem ações biológicas já conhecidas há alguns anos. Entre elas, destaca-se a ação anti-hiperglicêmica do esteviosídeo, rebaudiosídeo A e do esteviol por estímulo da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas (JEPPESEN et al., 2000) e modulação da translocação de GLUT2 via PI3K/Akt (ABUDULA et al., 2004; RIZZO et al., 2013). O esteviosídeo é capaz de reduzir a pressão sanguínea em indivíduos hipertensos (JEPPESEN et al., 2003; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009) e tem potencial como agente contraceptivo (MELIS, 1999). Ações anti-inflamatória, anticancerígena e imunomodulatória também são atribuídas aos glicosídeos da estévia (NAKAMURA; SAKIYAMA; TAKENAGA, 1995; SEHAR et al., 2008;

YASUKAWA; KITANAKA; SEO, 2009).

Como apresentado na FIG.1, os glicosídeos da estévia possuem em comum a aglucona esteviol, a qual glicosilada, dá origem aos diferentes glicosídeos da estévia (BRANDLE; TELMER, 2007). Entre os glicosídeos, o esteviosídeo e rebaudiosídeo A são os mais comumente empregados como edulcorantes, sendo o esteviosídeo encontrado em maior quantidade nas folhas da estévia (DE OLIVEIRA et al., 2007; GALLO et al., 2017).

Quando ingeridos, os glicosídeos da estévia não são absorvidos na forma intacta. A microbiota presente no trato gastrointestinal remove os resíduos de glicose (RENWICK; TARKA, 2008), sendo o esteviol a principal, senão a única espécie absorvida (GARDANA et al., 2003; KOYAMA et al., 2003b). No fígado, o esteviol é rapidamente metabolizado em esteviol glucoronídeo, que é excretado pelos rins (KOYAMA et al., 2003a. WHEELER et al., 2008). Embora não existam estudos que relatem o papel das β -glicosidases humanas presentes no trato gastrointestinal no processo de hidrólise dos glicosídeos da estévia, há relatos demonstrando a ação dessas enzimas na degradação de flavonoides glicosídicos, estruturalmente semelhantes aos glicosídeos da estévia (DAY et al., 1998; NÉMETH et al., 2003).

Os glicosídeos da estévia possuem regiões polares (resíduos de glicose) e apolares (conjuntos de anéis da aglucona esteviol) (TANAKA, 1982). A aglucona esteviol e seu isômero isoesteviol, produzido por hidrólise ácida (WOOD JR et al., 1955), são mais hidrofóbicos que os glicosídeos por serem desprovidos de moléculas de glicose, apesar do grupamento polar carboxila. Mesmo com moléculas de glicose na sua constituição, os glicosídeos da estévia são pouco solúveis em água. Por exemplo, a solubilidade do rebaudiosídeo A e do esteviosídeo, em meio aquoso e temperatura ambiente, é de 1,3 g/L e 8 g/L, respectivamente, enquanto que a solubilidade da glicose é de 830g/ L à temperatura de 17 °C (KINGHORN, 2003; CARAKOSTAS et al., 2012. MARTINS; LOPES; DE ANDRADE, 2013).

Portanto, presume-se que o particionamento dos glicosídeos da estévia em membranas biológicas, um meio altamente hidrofóbico, seria favorável. Embora esse parâmetro físico-químico não tenha sido diretamente medido, é possível inferi-lo por meio de softwares, como o ChemAxon (Budapeste, Húngria, 2017) e o ALOGPS 2.1 (Virtual Computational Chemistry Lab, 2005). Por exemplo, o $\text{LogP}_{\text{octanol/água}}$ (logaritmo na base 10 do coeficiente de partição octanol/água) do esteviol e

isoesteviol são de 3,65 e 4,13, respectivamente. Já o $\text{LogP}_{\text{octanol/água}}$ para o esteviolbiosídeo é de -0,05 (FOODB, 2017; CHEMSPIDER, 2017).

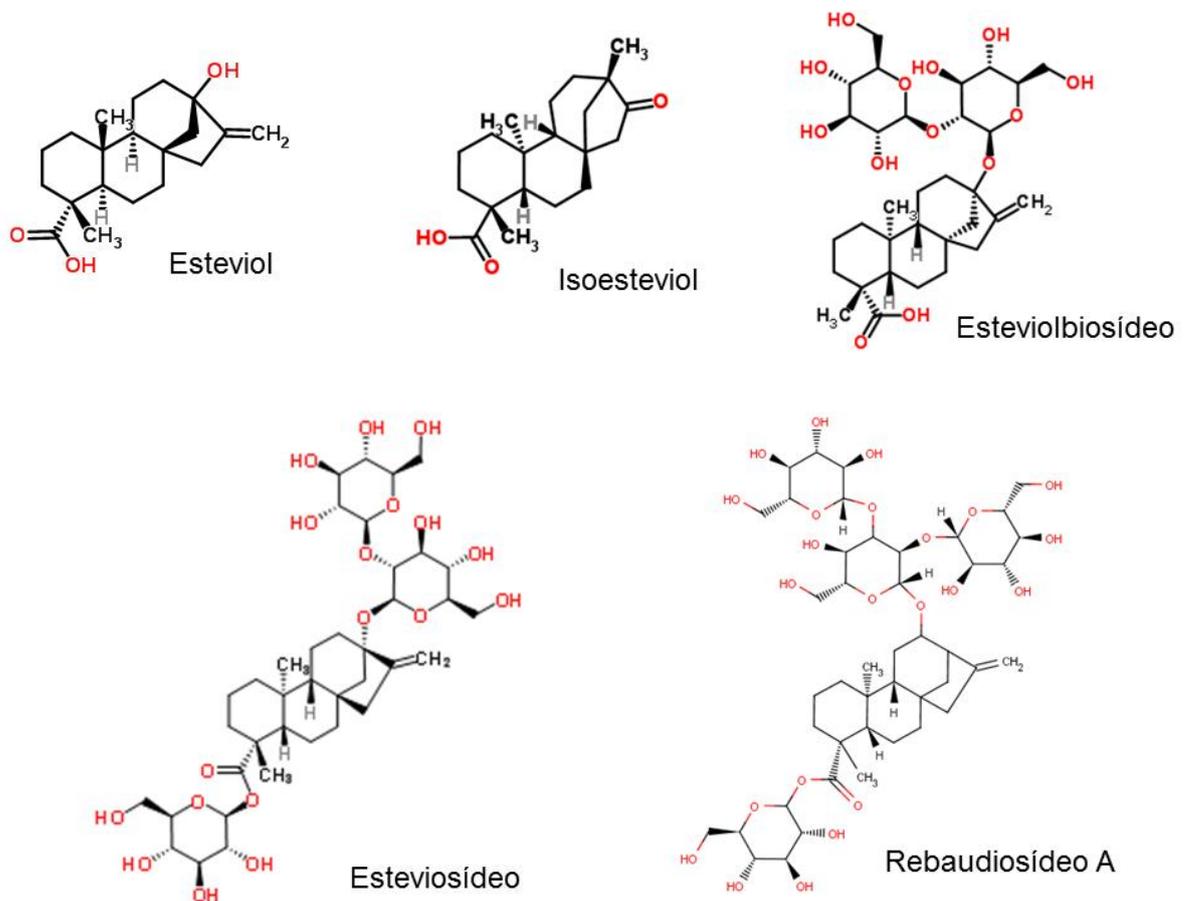


Figura 1 - Estrutura da aglucona esteviol e seus glicosídeos presentes nas folhas da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii. Em vermelho, são indicados os grupamentos OH⁻ e em cinza é possível observar os grupamentos H⁺.

FONTE: adaptado de ChemSpider (2017)

Entretanto, alguns dados na literatura indicam ausência de efeito biológico dos glicosídeos da estévia em relação a aglucona, fato esse explicado por diferenças de permeabilidade celular entre esses compostos. Por exemplo, a inibição da gliconeogênese e ativação da glicogenólise pelo isoesteviol e ausência de efeito pelo esteviosídeo (ISHII; SCHWAB; BRACHT, 1987), a não metabolização do esteviosídeo pelo tecido hepático (ISHII-IWAMOTO; BRACHT, 1995) e a baixa absorção dos glicosídeos pelo intestino de ratos em relação ao esteviol (KOYAMA et al., 2003a).

De fato, os poucos estudos que relatam medidas de permeabilidade apontam uma menor permeabilidade dos glicosídeos em relação à aglucona. Por exemplo,

em sacos evertidos do duodeno e ceco de ratos, demonstrou-se que o esteviol rapidamente atravessa a camada mucosa e atinge o fluido em contato com a camada serosa. Entretanto, a maior parte dos glicosídeos (93%) permaneciam em contato com a mucosa (KOYAMA et al., 2003a). Já em outro estudo com monocamadas de células Caco-2, o coeficiente de permeabilidade aparente no sentido absorptivo do esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram de $0,16 \times 10^{-6}$ e $0,11 \times 10^{-6}$ cm/s, respectivamente. Por outro lado, o valor reportado para o esteviol foi de $31,9 \times 10^{-6}$ cm/s, aproximadamente 200 vezes maior que a dos glicosídeos (GEUNS et al., 2003).

A permeabilidade das células Caco-2 aos glicosídeos da estévia são menores que os reportados para a glicose em eritrócitos humanos (2×10^{-4} cm/s), onde a glicose é transportada pelo GLUT 1, e em bicamadas lipídicas ($2,4 \times 10^{-10}$ cm/s), sistemas onde não há transportadores (MACHADO, 1998). Adicionalmente, a permeabilidade do esteviol é consideravelmente menor que ao ácido oléico (1,6 cm/s) (KAMP; HAMILTON, 2006), uma molécula com um elevado coeficiente de partição membrana/água.

Tem-se atribuído aos transportadores de ânions orgânicos renais hOAT (Human Organic Anion Transporter), mais especificamente a isoforma hOAT3, o transporte de esteviol glucoronídeo, metabólito hepático do esteviol (WANG et al. 2015). Adicionalmente, o esteviol, mas não o esteviosídeo, é capaz de inibir o transporte pelo hOAT1 e o hOAT3, o que poderia comprometer a depuração renal de medicamentos e seus metabólitos (SRIMAROENG et al., 2005a. SRIMAROENG et al., 2005b).

A compreensão do mecanismo de transporte transmembrana da aglucona esteviol e seus glicosídeos, assim como a interação dessas moléculas com as membranas celulares precisam ser esclarecidos para maior compreensão de mecanismos de ação biológicos e toxicológicos atribuídos aos glicosídeos da estévia. Algumas ações biológicas dos glicosídeos da estévia ocorrem na membrana celular em interações com transportadores de glicose (TOSKULKAO et al., 1995). Outras ações são atribuídas a interação com sítios intracelulares, como as ações anti-hiperglicêmicas (RIZZO et al., 2013).

Porém, o exato mecanismo de transporte transmembrana dos glicosídeos da estévia (caso ocorra) e da sua aglucona esteviol ainda é uma incógnita. Até a data não há estudos na literatura que abordem diretamente o mecanismo de transporte.

Hipóteses sugerindo a difusão simples (GEUNS et al., 2003) e um transporte mediado do metabólito esteviol glucoronídeo foram sugeridas (WANG et al., 2015). Entretanto, nenhum dos trabalhos citados mediu realmente o transporte transmembrana dos glicosídeos da estévia, mas sim a captação celular.

Neste estudo, a metodologia com sondas fluorescentes utilizada em estudos de transporte transmembrana de ácidos graxos (BRUNALDI et al., 2007) foi utilizada para “rastrear” a movimentação dos grupamentos ionizáveis ao longo da bicamada lipídica de lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC) do tipo LUVs (large unilamellar vesicles) (FIG.2).

O transporte de ácidos graxos de cadeia longa através de modelos de membrana ou membranas biológicas pode ocorrer por um processo de difusão passiva, sendo este dividido em três etapas: adsorção, movimento transmembrana e desorção. Entretanto, existem proteínas capazes de catalisar o transporte transmembrana de ácidos graxos, porém são necessários mais estudos que ilustrem até que ponto a presença/ausência dessas proteínas limita o transporte dessas moléculas em diferentes tipos celulares (HAMILTON et al., 2001).

A sonda sensível a cargas de superfície FPE, localizada especificamente na monocamada externa da bicamada lipídica, fornece informações sobre a ligação dos glicosídeos à membrana. Por sua vez, a sonda fluorescente sensível a pH piranina, encapsulada, reporta a chegada dos produtos da estévia à monocamada interna da bicamada lipídica, ou seja, a difusão transmembrana (flip-flop).

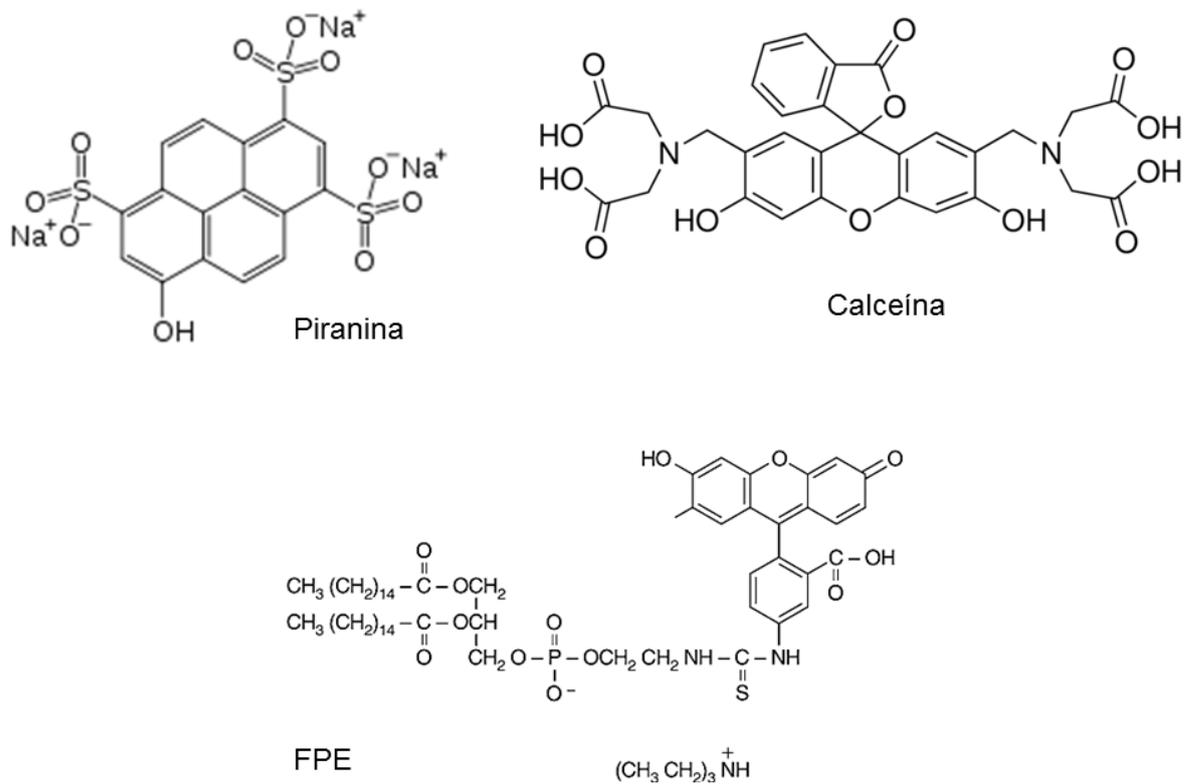


Figura 2 - Estruturas das sondas fluorescentes. Sondas utilizadas nos estudos de rastreamento de cargas (FPE), pH (piranina) e integridade de membrana (calceína).

FONTE: elaborada pela autora (2017)

Adicionalmente, a sonda calceína, também encapsulada, foi utilizada para avaliar a ocorrência de alterações na organização da membrana (SIMARD; KAMP; HAMILTON, 2008), uma vez que muitas substâncias possuem a capacidade de causar “perturbações” na bicamada lipídica, levando, por exemplo, à transição de fase lipídica e formação de poros (CIEŚLIK-BOCZULA et al., 2014; TOLEDO-FUENTES; LIS; CECCHET, 2016), alterações de permeabilidade, perda da função de barreira a até mesmo ruptura da membrana celular (CRISTIANI et al., 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o transporte do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da bicamada lipídica de lipossomas (large unilamellar vesicles- LUVs) de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC) e possíveis alterações na organização estrutural da bicamada lipídica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar espectrofotometricamente a ligação entre a albumina sérica bovina e o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo por meio da fluorescência intrínseca da BSA;
- Determinar a cinética de ligação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo à bicamada lipídica por meio da sonda sensível à cargas de superfície FPE;
- Determinar a cinética de translocação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da bicamada lipídica por meio da sonda sensível à pH piranina;
- Determinar o efeito do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo sobre a permeabilidade da bicamada lipídica por meio do vazamento de calceína;
- Determinar o efeito do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo sobre o tamanho (raio hidrodinâmico) de LUVs de egg-PC.

3. MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Ciências Fisiológicas (DFS), no Complexo Central de Apoio à Pesquisa (COMCAP) e no Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) alocado no Departamento de Química (DQI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os produtos da estévia (esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr^o. Sílvio Cláudio da Costa, que faz parte do Departamento de Bioquímica da UEM (COSTA et al., 2005). Na FIG. 3 é possível observar o cromatograma do esteviol obtido após a extração das folhas, indicando 99,9 % de pureza. Assim como o esteviol, o isoesteviol e o esteviolbiosídeo foram obtidos com o mesmo grau de pureza do esteviol (cromatogramas não mostrados). A albumina sérica bovina defatada (Bovine Serum Albumin- BSA), fosfatidilcolina de ovo (egg-PC), o Sephadex- G25, ácido oleico (ácido octadec-9-enóico) e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma (Brasil). O miniextrusor, a membrana de policarbonato de 100 nm e os suportes para membrana foram obtidos da Avanti Polar Lipids (USA).

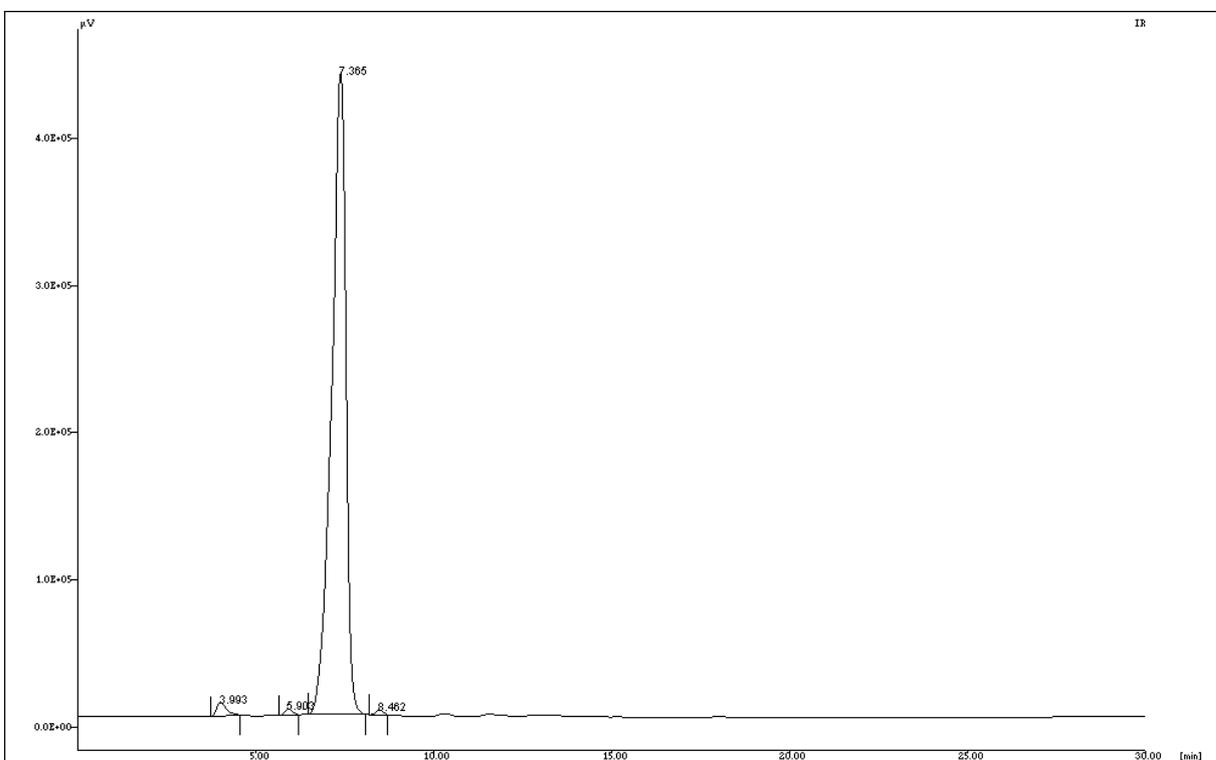


Figura 3 – Cromatograma do esteviol. Concentração de esteviol: 1 mg/mL. Grau de pureza: 99,9%

3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DOS PRODUTOS DA ESTÉVIA

Para garantir a adequada solubilização dos produtos da estévia no meio aquoso, a albumina bovina defatada (Bovine serum albumin - BSA) foi utilizada como veículo, pois a presença de agregados ou precipitados no tampão gera artefatos, comprometendo as medidas de fluorescência e de espalhamento de luz.

Soluções estoques a 10 mM de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo em 5 mM de BSA em água foram preparadas da seguinte forma: uma alíquota de 25 μ L de uma solução estoque dos produtos da estévia a 0,4M em DMSO foi adicionada a 1 ml da solução de BSA a 5 mM em água deionizada. No final, as soluções estoques apresentaram uma razão de 2 mols de produtos da estévia para 1 mol de BSA, sendo armazenadas à 4°C.

3.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA LIGAÇÃO DOS PRODUTOS DA ESTÉVIA À BSA

A ligação dos produtos da estévia à BSA foi monitorada pela emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano presentes na BSA. Alíquotas consecutivas de 5 μ L das soluções estoques dos produtos da estévia em DMSO (1, 2, 4, 8, 16 e 40 mM) foram adicionadas a 2 ml de BSA a 10 μ M em PBS (pH 7,4). As concentrações finais dos produtos da estévia foram 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 100 e 200 μ M. BSA foi excitada a 295 nm e a emissão foi coletada a 340 nm por meio de um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian) no modo Scan. Os ensaios foram realizados a 27, 32 e 37 °C.

A constante de supressão da fluorescência, também denominada de constante de Stern-Volmer, foi determinada pela Equação de Stern-Volmer (Equação 1), onde F_0 e F representam a fluorescência do fluoróforo (BSA) na ausência e na presença do supressor Q (“quencher”, ou seja, dos produtos da estévia), respectivamente. K_{SV} é a constante de Stern-Volmer. K_q é a constante de extinção bimolecular, que reflete a eficiência do processo de supressão ou a acessibilidade dos fluoróforos aos supressores de fluorescência. Q é a concentração do supressor e τ_0 é o tempo de meia-vida do fluoróforo (BSA) (LAKOWICZ, 2006).

$$(F_0/F) = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Equação 1})$$

De acordo com a Equação 1, o valor de K_{SV} corresponde ao coeficiente angular obtido da regressão linear dos dados de F_0/F versus concentração dos produtos da estévia.

A constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) da BSA ocupados pelos produtos da estévia foram determinados pela Equação 2, na qual K_b é a constante de ligação, n é o número de sítios de ligação ocupados e $[Q]$ é a concentração do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo:

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_b + n \log [Q] \quad (\text{Equação 2})$$

Os valores de K_b e n foram obtidos como os coeficientes linear e angular de $\log[(F_0 - F)/F]$ em função do log da concentração dos produtos da estévia, respectivamente.

3.3 PREPARO DAS LUVs

LUVs (large unilamellar vesicles) de egg-PC (fosfatidilcolina de ovo), com diâmetro médio de aproximadamente 130 nm, foram formadas por extrusão, como descrito previamente (BRUNALDI et al., 2007). De modo sucinto, um filme lipídico foi preparado pela adição de clorofórmio (2-4 mL) à 10-20 mg de egg-PC foram pesados com uma balança analítica (Shimadzu – BR), seguido de evaporação do solvente por meio de um evaporador rotativo (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda) e hidratação com 5 mL de um tampão de hidratação (pH 7,4) por 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C, no escuro. Nos ensaios com calceína e piranina, o filme lipídico foi hidratado com um tampão de hidratação acrescido de 70 mM e 0,1 mM de cada sonda, respectivamente. Para a calceína, o tampão de hidratação utilizado foi 50 mM KCl e 20 mM NaH_2PO_4 enquanto que para a piranina foi utilizado Hepes à 25 mM. A etapa de hidratação nos ensaios com FPE, Laurdan e raio hidrodinâmico foi realizada com Hepes 25 mM sem a adição de sondas fluorescentes. Como descrito adiante, FPE foi adicionado às LUVs já formadas.

Para melhor assegurar o encapsulamento da piranina e calceína, a

suspensão de egg-PC foi submetida a um ciclo de 5 congelamentos/descongelamentos com nitrogênio líquido. Essa etapa não foi realizada no preparo de LUVs com FPE. Em seguida, foram realizados 15 ciclos de extrusão (membrana de policarbonato de 100 nm) por meio de um minieextrusor (Avanti Polar Lipids). A remoção das sondas não encapsuladas foi realizada por meio de filtração em gel com Sephadex G100 (calceína) ou G25 (piranina), hidratados previamente no mesmo tampão de hidratação.

Para o preparo de LUVs com FPE, inicialmente uma alíquota da solução estoque de FPE em clorofórmio e metanol (5:1 v:v) foi evaporada com gás nitrogênio. A quantidade de FPE obtida era de 0.5 mol% em relação à egg-PC. Em seguida, o FPE foi ressuspensão em 10 a 20 µL de DMSO e adicionado a 1 mL de LUVs. A incubação foi realizada por 1 hora, à temperatura ambiente e no escuro.

Não foi necessário separar o FPE não incorporado, pois trata-se de uma molécula altamente hidrofóbica que se particiona preferencialmente na bicamada lipídica. Devido a difusão transmembrana do FPE ser lenta ($t_{1/2}$ de dias), na escala temporal do experimento, o FPE ficou restrito à monocamada externa da bicamada lipídica (BRUNALDI et al., 2007).

Nos ensaios com calceína e piranina, a concentração de egg-PC em mM foi estimada como:

$$[\text{Egg-PC}] = \left(\frac{M_{\text{EggPC}}}{M.W.} \right) \frac{V_{\text{hidratação}}}{V_{\text{coluna}}} \times V_{\text{coletado}} \times 1000$$

Onde:

M_{EggPC} : massa em mg de egg-PC (10 mg)

M.W.: massa molar de egg-PC (760)

$V_{\text{hidratação}}$: volume do tampão de hidratação em mL (5 mL)

V_{coluna} : volume de LUVs adicionado à coluna (1 mL)

V_{coletado} : volume de LUVs coletado após a filtração (2 mL)

3.4 MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência foram realizadas com espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). Para tal, 2 mL de LUVs (0,5 mM em egg-PC) foram adicionadas a uma cubeta de poliestireno, sob agitação e à temperatura ambiente. Espectros de

emissão e excitação foram registrados no início de cada experimento. Em seguida, alíquotas dos produtos da estévia, em DMSO ou em BSA, foram adicionadas às LUVs e a intensidade da fluorescência foi monitorada por 10 a 20 minutos no modo Kinetics. O FPE foi excitado a 490 nm e a sua emissão coletada a 520 nm. A piranina foi excitada a 455 nm e a sua emissão coletada a 509 nm. A calceína foi excitada a 490 nm e sua emissão foi coletada a 520 nm.

Como controle das sondas FPE e piranina, ácido oleico na concentração de 200 μM (20 μL de uma solução estoque em DMSO para os ensaios com a piranina e 8 μL de uma solução estoque em álcool etílico absoluto para os ensaios com o FPE) foi adicionado à 2 mL de LUVs. A intensidade de fluorescência do FPE e da piranina são reduzidas mediante a ligação e translocação de ácidos graxos através da bicamada lipídica, respectivamente (BRUNALDI et al., 2007).

Nos ensaios de vazamento de calceína, a quantidade de calceína liberada para o tampão externo foi calculada por meio da Equação 3, onde 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 triton-X 20% (I_T):

$$\% \text{ liberação} = (I_{\text{est}} - I_0) / (I_T - I_0) \quad (\text{Equação 3})$$

Para a permeabilização das LUVs, foram adicionadas alíquotas de 20 μL de triton-X 20% ao final de cada ensaio realizado.

A alta concentração de calceína presente no interior das LUVs leva a uma supressão da sua fluorescência. Se uma via de permeabilidade é gerada na bicamada lipídica, calceína é liberada ("vazamento") para o tampão externo. Neste caso, a concentração de calceína no meio aquoso é reduzida, levando a um aumento da fluorescência (*dequenching*) (MAHERANI et al., 2013).

3.5 DETERMINAÇÃO DO RAIOS HIDRODINÂMICO

O tamanho das LUVs, também conhecido como raio hidrodinâmico, foi determinado pela técnica de Dynamic Light Scattering (DLS) por meio de um analisador de nanopartículas e potencial zeta (NanoPlus[®]). Os registros foram obtidos após a adição de alíquotas consecutivas de uma solução estoque de produtos da estévia em BSA (10 mM produtos da estévia em 5 mM BSA) a 1 mL de

LUVs (0.5 mM em egg-PC) contidos em uma cubeta de quartzo. Como controle, foi adicionado apenas BSA as LUVs. Três preparações lipossomais em tampão Hepes (pH 7,4), em três dias diferentes, foram utilizadas nesses ensaios. Para cada alíquota adicionada, o raio hidrodinâmico dos lipossomas foi medido três vezes.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram plotados com a utilização dos softwares GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Regressões lineares foram realizadas no GraphPad Prism para obtenção dos parâmetros associados à ligação dos produtos da estévia com a BSA.

Os resultados de raio hidrodinâmico e índice de polidispersividade foram apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes e submetidos à análise estatística ANOVA one-way.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DOS COMPLEXOS DE PRODUTOS DA ESTÉVIA COM A ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

4.1.1 SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

As FIG. 4, 5 e 6 mostram o espectro de emissão da BSA frente a concentrações crescentes de produtos da estévia. A fluorescência da BSA foi reduzida pelo esteviol e isoesteviol a 27, 32 e 37 °C, com deslocamento hipsocrômico (*blue shift*) dos espectros de emissão. Contudo, a supressão foi mais intensa pelo isoesteviol do que pelo esteviol em todas as temperaturas experimentais, um indicativo de uma maior afinidade do isoesteviol pela BSA. Já, o esteviolbiosídeo reduziu muito pouco a fluorescência da BSA a 27°C, não tendo efeito a 32 °C (FIG. 4 e 5). Entretanto, a 37 °C (FIG. 6), o esteviolbiosídeo promoveu uma supressão significativa da fluorescência da BSA sem deslocamento do pico de emissão. DMSO, no volume utilizado ao final de cada ensaio (40 µL), não afetou a fluorescência da BSA (dados não mostrados).

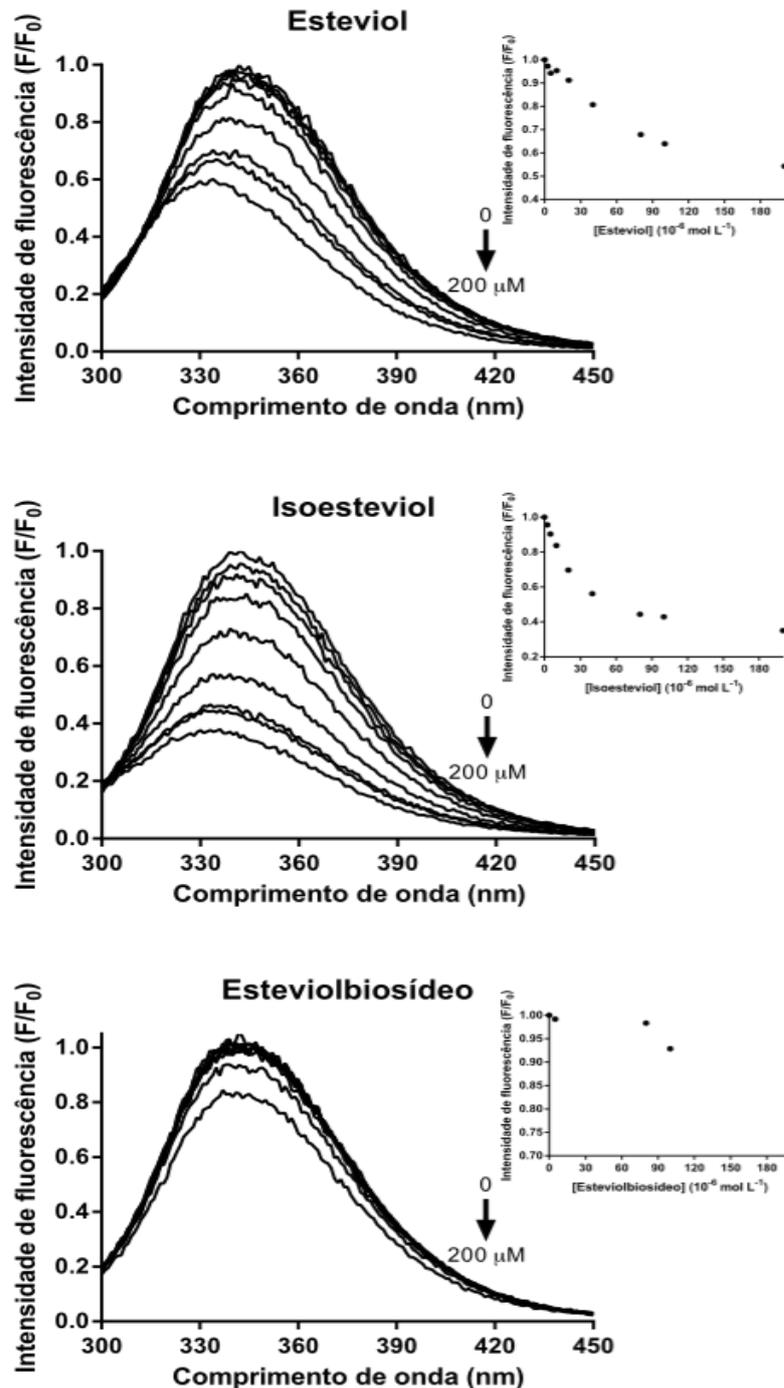


Figura 4 - Espectro de emissão da BSA na presença de isoesteviol, esteviol e esteviolbiosídeo a 27 °C. Aliquotas consecutivas de 5 μ L dos produtos da estévia em DMSO (soluções estoques a 1, 2, 4, 8, 16 e 40 mM) foram adicionadas a 2 mL de BSA à 10 μ M (tampão PBS, pH 7.4). As concentrações finais dos produtos foram 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 100 e 200 μ M. Como controle, foi realizado o registro na presença de 40 μ L de DMSO (volume máximo adicionado na concentração de 200 μ M de produtos da estévia, gráfico não mostrado). BSA foi excitada em 295 nm e os slits de excitação e emissão foram 2,5 e 5 nm, respectivamente. Na parte superior está representado o gráfico da concentração de produtos da estévia em relação a intensidade da fluorescência medida em 340 nm (pico de emissão).

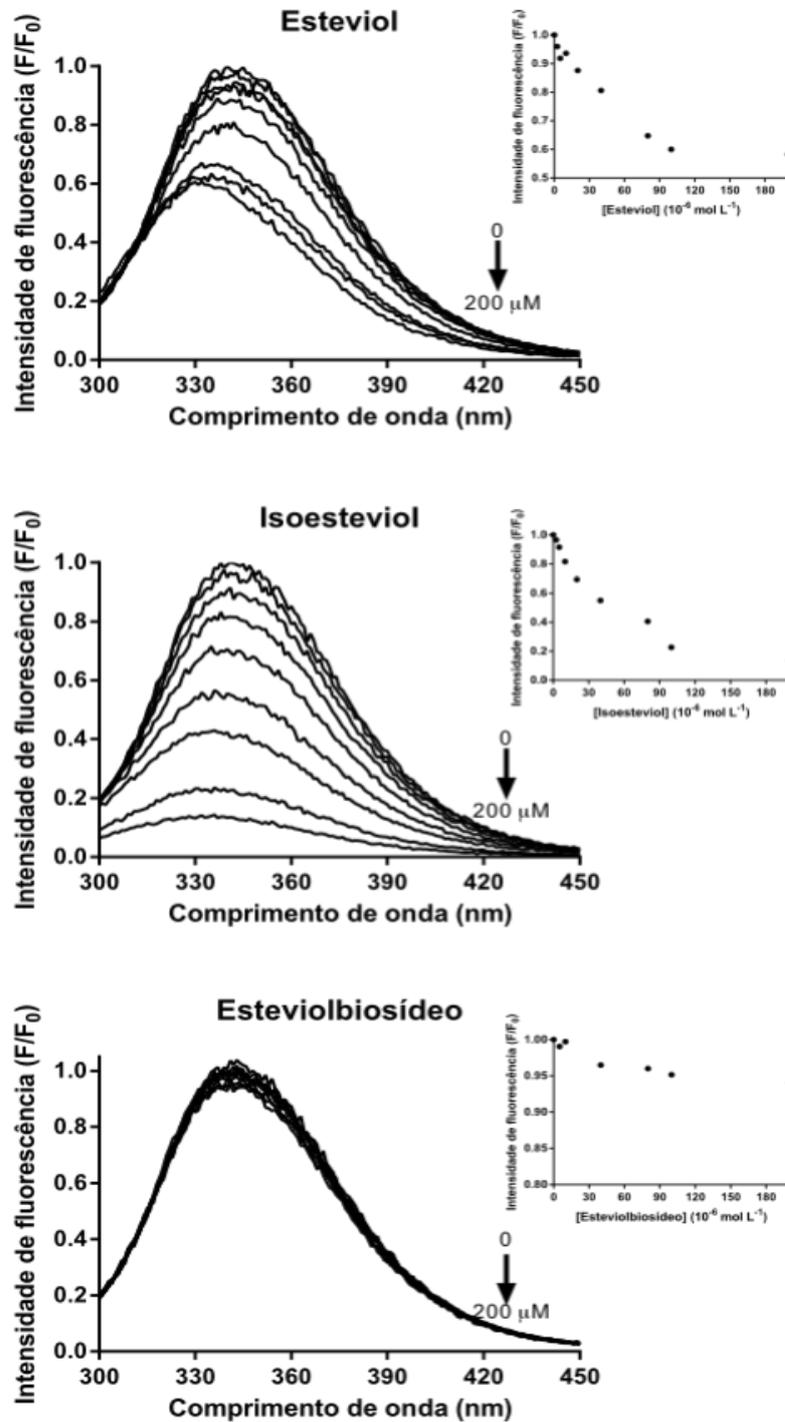


Figura 5 - Espectro de emissão da BSA na presença de isoesteviol, esteviol e esteviolbiosídeo a 32 °C. Aliquotas consecutivas de 5 μ L dos produtos da estêvia em DMSO (soluções estoques a 1, 2, 4, 8, 16 e 40 mM) foram adicionadas a 2 mL de BSA a 10 μ M (tampão PBS, pH 7.4). As concentrações finais dos produtos foram 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 100 e 200 μ M. Como controle, foi realizado o registro na presença de 40 μ L de DMSO (volume máximo adicionado na concentração de 200 μ M de produtos da estêvia, gráfico não mostrado). BSA foi excitada em 295 nm e os slits de excitação e emissão foram 2,5 e 5 nm, respectivamente. Na parte superior dos espectros da BSA está representado o gráfico da concentração de produtos da estêvia em relação a intensidade da fluorescência medida, em aproximadamente, 340 nm (pico de emissão).

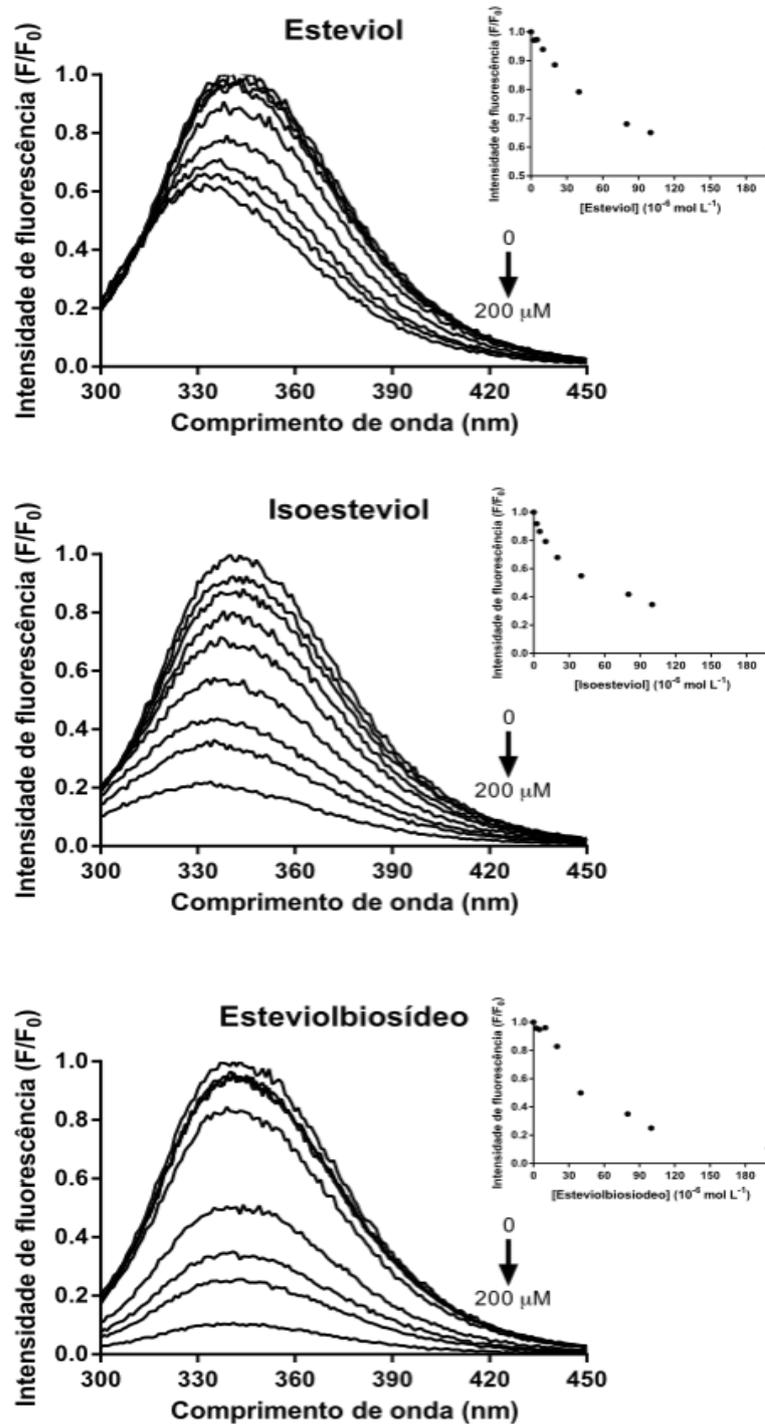


Figura 6 - Espectro de emissão da BSA na presença de isoesteviol, esteviol e esteviolbiosídeo a 37 °C. Alíquotas consecutivas de 5 μL dos produtos da estévia em DMSO (soluções estoques a 1, 2, 4, 8, 16 e 40 mM) foram adicionadas a 2 mL de BSA a 10 μM (tampão PBS, pH 7.4). As concentrações finais dos produtos foram 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 100 e 200 μM . Como controle, foi realizado o registro na presença de 40 μL de DMSO (volume máximo adicionado na concentração de 200 μM de produtos da estévia, gráfico não mostrado). BSA foi excitada em 295 nm e os slits de excitação e emissão foram 2,5 e 5 nm, respectivamente. Na parte superior dos espectros da BSA está representado o gráfico da concentração de produtos da estévia em relação a intensidade da fluorescência medida em 340 nm (pico de emissão).

4.1.2 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA

Para determinar o mecanismo de supressão da fluorescência da BSA pelo esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo, as constantes de supressão ou de Stern-Volmer foram obtidas pela equação de Stern-Volmer (Equação 1), onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência da BSA na ausência e presença do supressor (produtos da estévia), respectivamente. K_q é a constante de velocidade bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo de meia-vida do fluoróforo (triptofanos da BSA) na ausência de supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor (produtos da estévia). O produto $K_q\tau_0$ corresponde a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) (LAKOWICZ, 2006):

$$(F_0/F) = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Equação 1})$$

Como observado na FIG. 7, a relação entre F_0/F e a concentração das moléculas estudadas foi linear, sendo o K_{SV} determinado pelo coeficiente angular.

Na TAB.1, os valores de K_{SV} para o esteviol foram muito próximos em todas as temperaturas testadas. Já, para o isoesteviol foi observado um aumento de 10 vezes nos valores de K_{SV} quando a temperatura era elevada de 27 para 32 ou 37 °C, sendo que nestas temperaturas os valores de K_{SV} não diferiram consideravelmente. A K_{SV} para o esteviolbiosídeo foi apenas determinada na temperatura de 37 °C, pois não foi observada supressão da fluorescência nas temperaturas de 27 e 32 °C.

Ao se comparar as agluconas, os valores de K_{SV} a 32 e 37 °C obtidos com isoesteviol foram 10 vezes maiores do que os valores obtidos para o esteviol, indicando uma maior acessibilidade do isoesteviol pela BSA.

Como não foi possível estabelecer uma relação entre K_{SV} e temperatura, não se pode concluir o mecanismo de supressão da fluorescência da BSA pelos produtos da estévia: dinâmico (K_{SV} aumenta com a temperatura) ou estático (K_{SV} diminui com o aumento da temperatura).

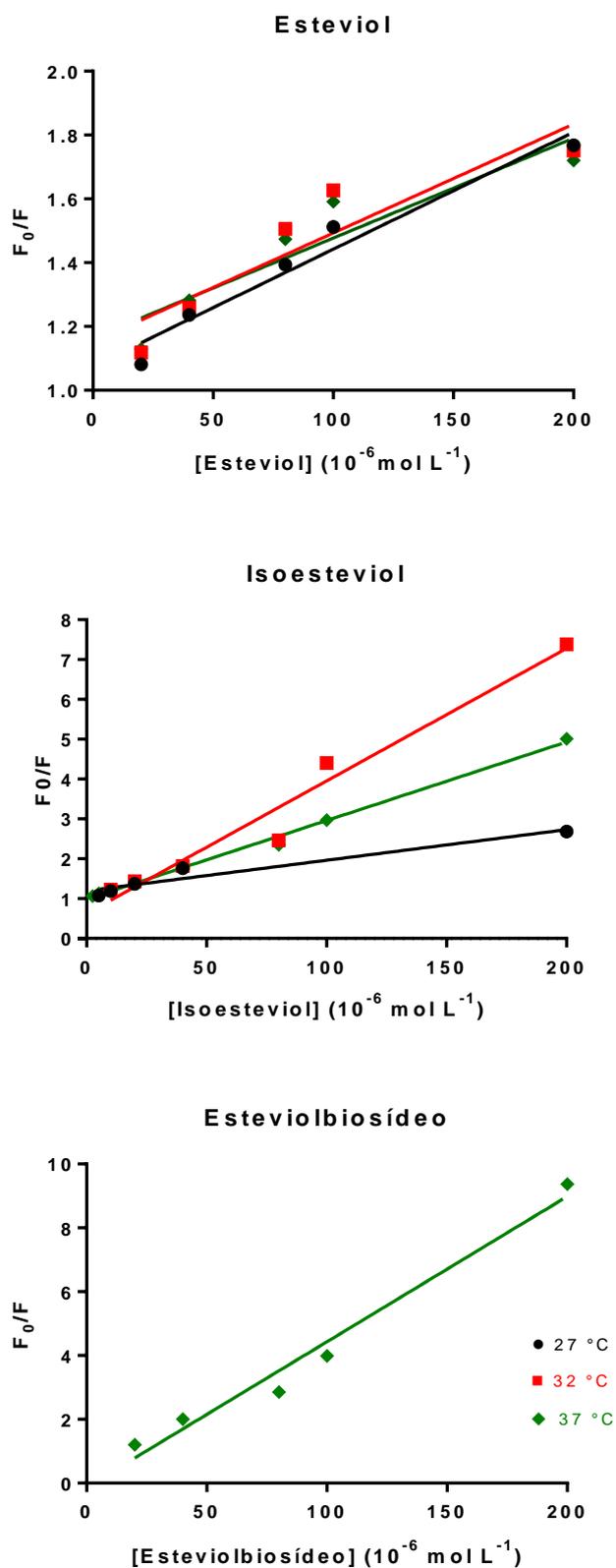


Figura 7 - Gráficos de Stern-Volmer da interação da BSA com esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo. BSA (10 μM) em tampão PBS, pH 7,4.

Tabela 1 - Constantes de Stern-Volmer obtidas para o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo a 27, 32 e 37°C

Molécula	K_{sv} (mol ⁻¹ L) (27 °C)	K_{sv} (mol ⁻¹ L) (32 °C)	K_{sv} (mol ⁻¹ L) (37 °C)
Esteviol	$3,66 \times 10^{-3}$	$3,41 \times 10^{-3}$	$3,13 \times 10^{-3}$
Isoesteviol	$7,68 \times 10^{-3}$	$3,33 \times 10^{-2}$	$1,97 \times 10^{-2}$
Esteviolbiosídeo	*	*	$4,5 \times 10^{-2}$

NOTA: *não houve supressão da fluorescência.

4.1.3 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO E NÚMERO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO

A constante de associação (K_b) do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo com a BSA foi calculada pela Equação 2 onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência da BSA na ausência e presença do supressor (produtos da estévia), respectivamente. K_b é a constante de associação, n é o número de moléculas por sítio de ligação e $[Q]$ é a concentração dos produtos da estévia (LAKOWICZ, 2006).

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_b + n \log [Q] \quad (\text{Equação 2})$$

Como ilustrado na FIG. 8, as relações entre $\log(F_0 - F)/F$ e \log das concentrações do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo para cada temperatura foram lineares, sendo os coeficientes linear e angular correspondentes ao K_b e n , respectivamente. Os valores de K_b e n são apresentados na TAB. 2.

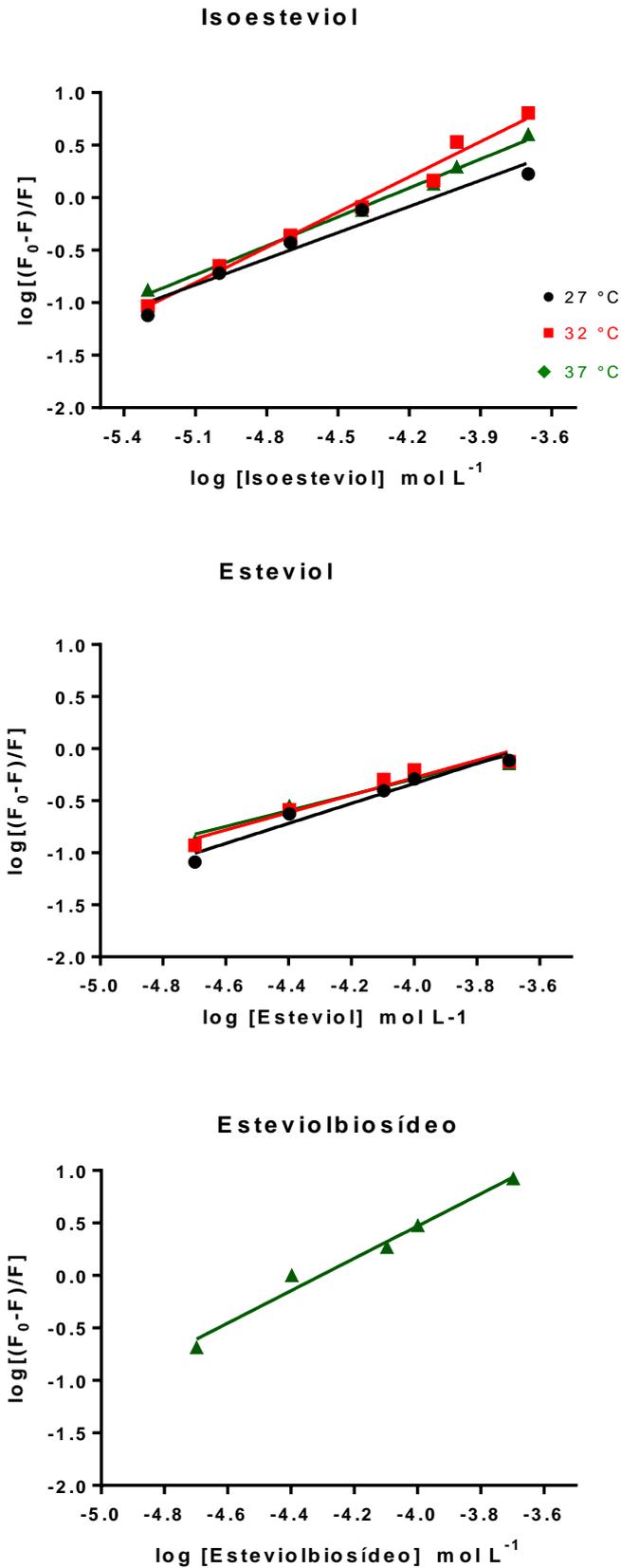


Figura 8 - Gráficos de $\log [(F_0-F)/F]$ em função do \log das concentrações do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo em 27, 32 e 37 °C. BSA (10 μM) em tampão PBS, pH 7,4.

A K_b e o n do esteviol diminuíram com a temperatura. Já, a K_b do isoesteviol a 27 e 37 °C foram equivalentes, sendo que a 37 °C foi verificado um aumento no n . Entretanto, a K_b do isoesteviol a 32 °C foi 10 vezes maior em relação às outras temperaturas. Entre as agluconas, para as temperaturas de 32 e 37 °C, a K_b do isoesteviol foi aproximadamente 10 vezes maior do que a do esteviol, corroborando os dados de supressão de fluorescência que indicam uma maior acessibilidade do isoesteviol pela BSA do que o esteviol.

Por outro lado, o esteviolbiosídeo, comparado às agluconas, apresentou um K_b consideravelmente elevado (1000 e 10000 vezes maior em relação ao esteviol e isoesteviol, respectivamente), assim como um maior número de moléculas por sítio de ligação (TAB. 2).

Tabela 2- Log de K_b , constantes de associação (K_b) e número de moléculas obtidas por sítio de ligação (n) para o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo em 27, 32 e 37°C

Molécula	27 °C			32 °C			37 °C		
	Log K_b	K_b ($\text{mol}^{-1} \text{L}$)	n	Log K_b	K_b ($\text{mol}^{-1} \text{L}$)	n	Log K_b	K_b ($\text{mol}^{-1} \text{L}$)	N
Esteviol	3,50	$3,18 \times 10^3$	0,96	3,07	$1,17 \times 10^3$	0,84	2,75	$5,5 \times 10^2$	0,76
Isoesteviol	3,39	$2,49 \times 10^3$	0,83	4,89	$7,87 \times 10^4$	1,12	3,95	$9,27 \times 10^3$	0,92
Esteviolbiosídeo	*	*	*	*	*	*	6,63	$4,29 \times 10^6$	1,32

NOTA: * não houve supressão da fluorescência

4.2 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DO ESTEVIOL E ISOESTEVIOL A BICAMADA LIPÍDICA PELA SONDA SENSÍVEL A CARGAS DE SUPERFÍCIE FPE

A sonda fluorescente FPE é um fosfolípídeo com uma fluoresceína ligada ao grupamento polar. Por se tratar de uma molécula grande e altamente hidrofóbica, se particiona seletivamente na monocamada externa da bicamada lipídica com a fluoresceína posicionada na interface água/membrana (BRUNALDI et al., 2007). A inserção de cargas negativas ou positivas na membrana leva a uma redução ou aumento da fluorescência do FPE, respectivamente (BRUNALDI et al., 2007; WALL et al., 1995; O'TOOLE; MORRISON; CHERRY, 2000). A FIG. 9 representa o espectro de emissão e excitação do FPE incorporado a LUVs de egg-PC. O pico de

excitação e de emissão foram 490 e 520 nm, respectivamente, de acordo com o reportado na literatura (BRUNALDI et al., 2007).

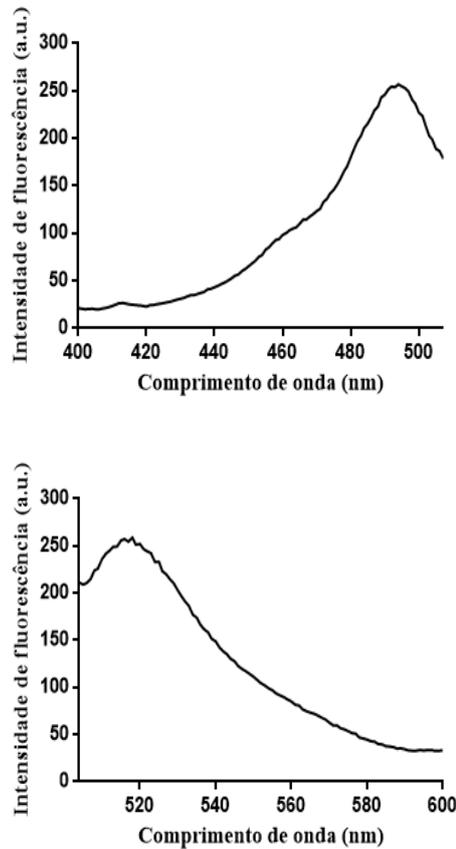


Figura 9 - Espectro de excitação (em cima) e emissão (embaixo) da sonda FPE incorporada a monocamada externa da bicamada lipídica de LUVs de egg-PC. A concentração de egg-PC foi de 0,5 mM e a concentração de FPE foi de 0.5 mmol% em relação a quantidade de egg-PC. A excitação foi realizada à 490 nm e emissão do FPE foi coletada à 520 nm e as fendas de excitação e emissão foram de 5 nm.

Em um experimento representativo ilustrado na FIG. 10, a adição de esteviol e isoesteviol a LUVs com FPE promoveu uma redução imediata, em segundos, da fluorescência do FPE ($t_{1/2} < 1$ s), seguida de uma recuperação da fluorescência também em segundos. Estes dados indicam a inserção de cargas negativas na monocamada externa da bicamada lipídica (redução da fluorescência) seguida pelo “desaparecimento” dessas cargas (retorno à linha de base).

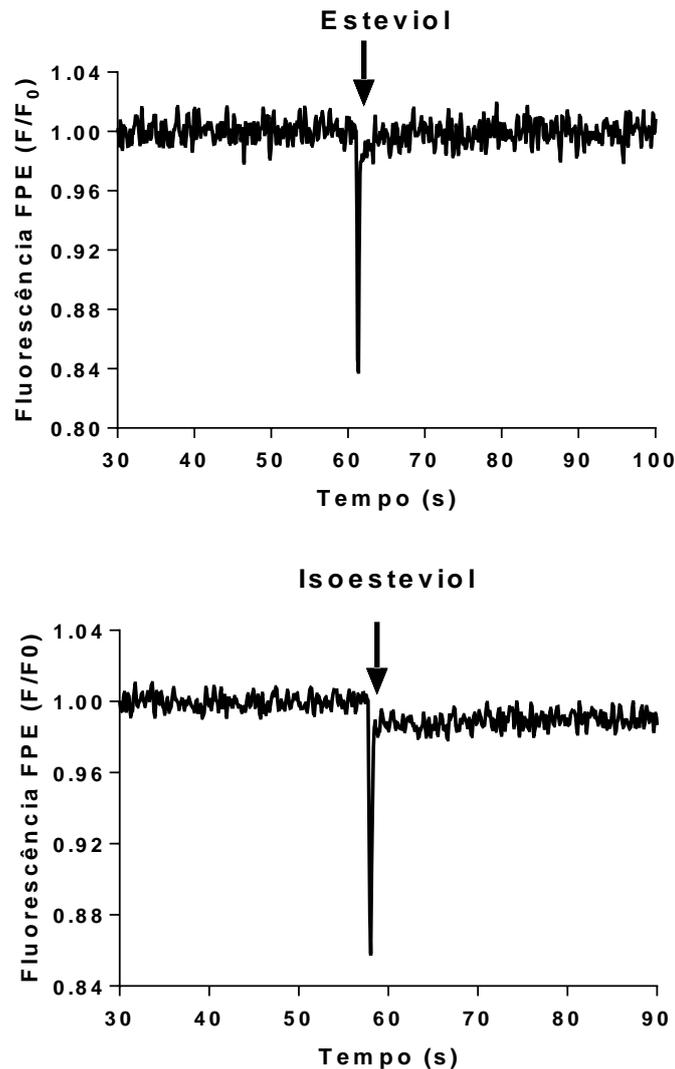


Figura 10. Efeito do esteviol e isoesteviol, solubilizados em DMSO, sobre a emissão do FPE inserido na monocamada externa de LUVs de egg-PC. Adição (setas) de 50 μM esteviol e isoesteviol (2 μL de uma solução estoque a 0,4 M em DMSO) a 2 mL de LUVs com FPE (500 μM de egg-PC e 0,5 mol% de FPE em relação à egg-PC) em tampão Hepes 25 mM, pH 7,4. FPE foi excitado a 494 nm e a emissão coletada em 517 nm. Fendas de excitação e emissão de 5 nm.

Nos ensaios com FPE, BSA não foi empregada como veículo pois, como mostrado na FIG.11, as cargas negativas da BSA interferem na fluorescência do FPE. Ainda, o volume da alíquota da solução estoque em DMSO de esteviol e isoesteviol foi fixado em 2 μL . Testes controles mostraram que até 10 μL de DMSO não era observada alteração da fluorescência do FPE (dados não mostrados).

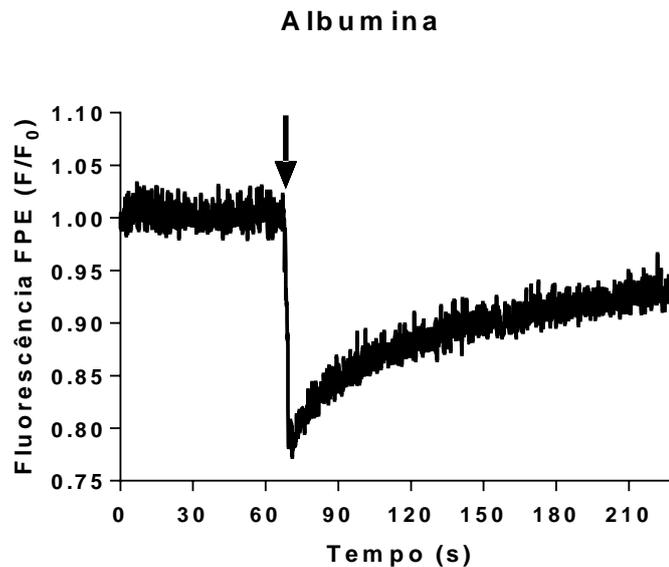


Figura 11 - Efeito da albumina sobre a emissão do FPE inserido na monocamada externa de LUVs de egg-PC. Adição (seta) de 10 μ L de uma solução estoque de BSA à 5 mM levando ao incremento de 25 μ M de BSA à LUVs de egg-PC (500 μ M) suspensas em 2 mL de tampão HEPES 25 mM, pH 7,4 com 0,5 mol % de FPE, em relação à quantidade de egg-PC, inserido na monocamada externa. FPE foi excitado a 494 nm e a emissão coletada em 517 nm. Fendas de excitação e emissão de 5 nm.

4.3 AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO DO ESTEVIOL, ISOESTEVIOL E ESTEVIOLBIOSÍDEO ATRAVÉS DA BICAMADA LIPÍDICA PELA SONDA DE pH PIRANINA

No experimento representativo ilustrado na FIG. 12, a adição dos produtos da estévia, complexados à BSA, promoveram uma redução em segundos da fluorescência da piranina ($t_{1/2} < 1$ segundo) encapsulada em LUVs de egg-PC. Esses resultados indicam a entrega de prótons ao interior das LUVs pelos grupamentos ionizáveis do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo. A cinética da redução da fluorescência equivale às etapas combinadas de dissociação dos produtos da estévia da BSA, ligação à monocamada externa da bicamada lipídica, difusão através da bicamada lipídica (flip-flop) e eventualmente dissociação (desorção) em direção ao compartimento intravesicular.

A segunda adição de esteviol produziu uma redução da fluorescência da piranina menor em magnitude, quando comparada à primeira adição (resultados

semelhantes encontrados para as outras moléculas) provavelmente, devido ao fato do interior das vesículas já estarem acidificadas pela adição prévia.

Finalmente, os resultados apresentados na FIG. 12 indicam uma menor permeabilidade da bicamada lipídica ao esteviolbiosídeo, um glicosídeo do esteviol. Para uma mesma concentração de produtos da estévia e de LUVs, o esteviolbiosídeo promoveu uma redução menos intensa da fluorescência, quando comparado às agluconas esteviol e isoesteviol. Por sua vez, apenas com o esteviolbiosídeo observou-se uma recuperação parcial e mais lenta da fluorescência em direção à linha de base.

Inicialmente, os ensaios com piranina foram realizados com os produtos da estévia dissolvidos em DMSO. Entretanto, precipitados/agregados em solução eram observados, principalmente com concentrações dos produtos acima de 500 μM . Ao se elevar a concentração de LUVs, o aspecto da solução melhorava, mostrando claramente o limite de solubilidade dessas moléculas no meio aquoso.

A resposta típica observada com os produtos da estévia em DMSO é ilustrada por um experimento representativo na FIG. 13. Mediante a adição de esteviol e esteviolbiosídeo às LUVs, observou-se uma redução imediata da fluorescência seguida de uma recuperação à linha de base em segundos, semelhante ao reportado com FPE. Entretanto com o isoesteviol, a primeira dose adicionada causou uma redução da fluorescência sem retorno à linha de base, semelhante ao resultado com BSA. A partir da segunda adição de isoesteviol era observado um retorno parcial da fluorescência. Apesar de não ter sido detectado visualmente a presença de precipitados/agregados em solução, a presença dos mesmos não poderia ser descartada.

Comparando os dados obtidos com DMSO e BSA, para uma mesma concentração de produtos da estévia e LUVs, foi observado que: i) as cinéticas de redução inicial da fluorescência da piranina foram praticamente idênticas ($t_{1/2} < 1$ segundo), o que indica que a dissociação dos produtos da BSA não é a etapa limitante no transporte através da bicamada lipídica; ii) a magnitude da redução inicial da fluorescência da piranina foi maior com BSA do que com DMSO, o que provavelmente reflete a maior eficiência da BSA como veículo, gerando uma concentração efetiva de produtos da estévia maior no meio aquoso e na bicamada lipídica.

Como controle dos experimentos com piranina, a responsividade desta sonda foi verificada frente a adição de ácido oleico (BRUNALDI et al., 2007. BRUNALDI et al., 2010. SIMARD; KAMP; HAMILTON, 2008) e ao NH_4Cl . A FIG. 14 reporta uma redução imediata da fluorescência da piranina ($t_{1/2} < 1$ segundo) após a adição de ácido oleico a LUVs com piranina encapsulada. Este resultado indica a chegada de prótons ao meio intravesicular, os quais foram transportados pela forma protonada do ácido oléico, ou seja, pela dissociação do grupamento carboxila posicionado na interface água/membrana interna. Portanto, a fluorescência da piranina estava respondendo na direção esperada e de fato, encapsulada no interior das LUVs.

Como esperado, a piranina respondeu com um aumento da sua fluorescência frente a adição de NH_4Cl ao tampão externo. Em solução, o íon NH_4^+ (espécie ionizada) encontra-se em equilíbrio com NH_3 (espécie neutra). Entretanto, a permeabilidade da membrana ao NH_3 é maior do que ao NH_4^+ . Uma vez no interior das LUVs, o NH_3 atinge um novo equilíbrio de ionização se combinando com um próton para a formação de NH_4^+ . Portanto, neste processo é gerado uma alcalinização do meio interno. O experimento controle com NH_4Cl indica a integridade da bicamada lipídica.

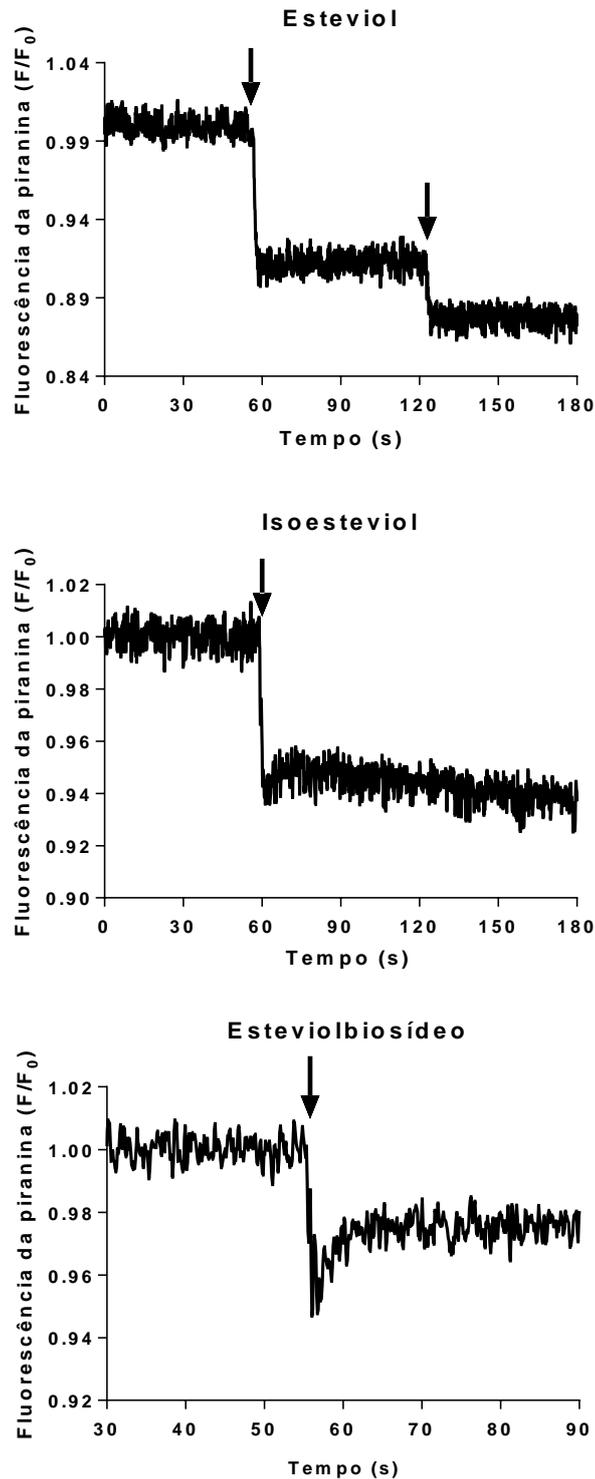


Figura 12 - Efeito do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo, complexados a albumina, sobre a fluorescência da piranina encapsulada em LUVs de egg-PC. Adição (setas) de 50 μM de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo complexados à BSA (2 mol de BSA: 1 mol de produto da estévia) a 2 mL de LUVs de egg-PC (500 μM) encapsuladas com piranina (100 μM). O tampão utilizado foi HEPES 25 mM, pH 7,4. Piranina foi excitada a 458 nm e a emissão coletada em 510 nm. Fendas de excitação e emissão de 5 e 10 nm, respectivamente.

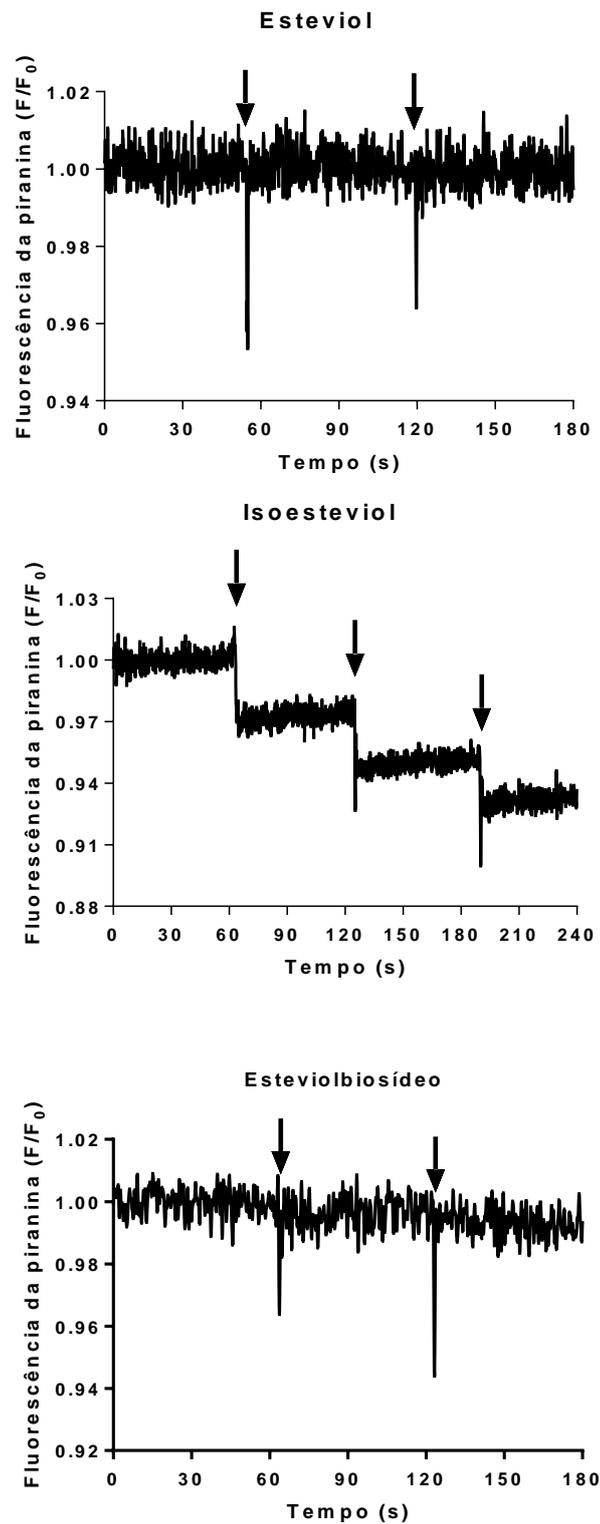


Figura 13 - Efeito do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo solubilizados em DMSO sobre a fluorescência da piranina encapsulada em LUVs de egg-PC. Adição (setas) de 50 μM de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo (10 μL de uma solução estoque a 10 mM em DMSO) a LUVs de egg-PC (500 μM) encapsuladas com piranina (100 μM). O tampão utilizado foi HEPES 25 mM, pH 7,4. Piranina foi excitada a 458 nm e a emissão coletada em 510 nm. Fendas de excitação e emissão de 5 e 10 nm, respectivamente.

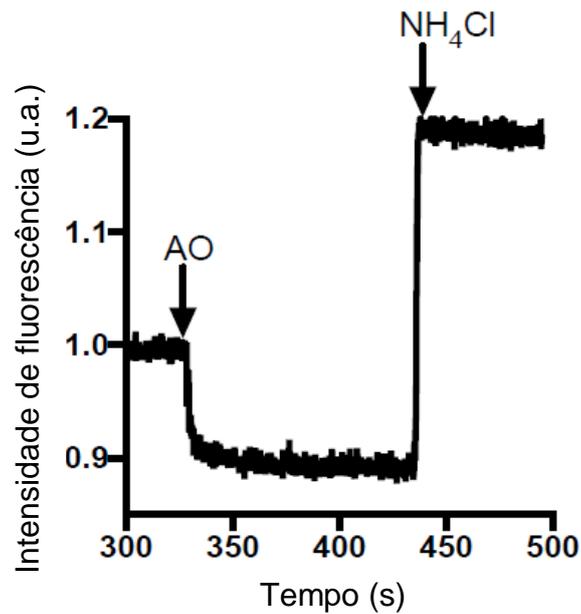


Figura 14 - Efeito do ácido oleico e do NH_4Cl sobre a emissão de fluorescência da piranina encapsulada em LUVs de egg-PC. Adição de uma alíquota de 200 μM de ácido oleico em DMSO (seta) e de uma alíquota de NH_4Cl (20 μL de uma solução estoque a 50 mM. Concentração de egg-PC: 500 μM . Concentração de piranina encapsulada: 100 μM . Fendas de excitação e emissão: 5 e 10 nm, respectivamente. Tampão Hepes, 25 mM, pH 7,4.

4.4 EFEITO DOS PRODUTOS DA ESTÉVIA SOBRE O RAIOS HIDRODINÂMICO DE LUVs

As FIG. 15 e 16 representam os valores médios com o desvio padrão dos raios hidrodinâmicos e dos índices de polidispersividade de três preparações independentes de LUVs de egg-PC (500 μM) frente a concentrações crescentes de produtos da estévia (0 a 300 μM), respectivamente.

Os dados apresentaram distribuição normal e o tamanho das LUVs (121,8 a 141,8 nm) não foi alterado significativamente pelos produtos da estévia, assim como pela BSA não complexada (controle) ($p > 0,05$). Ao se comparar os diferentes produtos para uma mesma concentração, não foi observada diferença significativa no tamanho das LUVs ($p > 0,05$).

Já, o índice de polidispersividade aumentou significativamente com o aumento da concentração de produtos da estévia ($p < 0,05$). Essa diferença provavelmente está associada à maior concentração de BSA em solução devido a presença de subpopulações em torno de 9 a 10 nm (dados não mostrados) (TAHA et

al., 2015). Não foi observada diferença entre os índices de polidispersividade para uma mesma concentração de produtos e conseqüentemente de BSA.

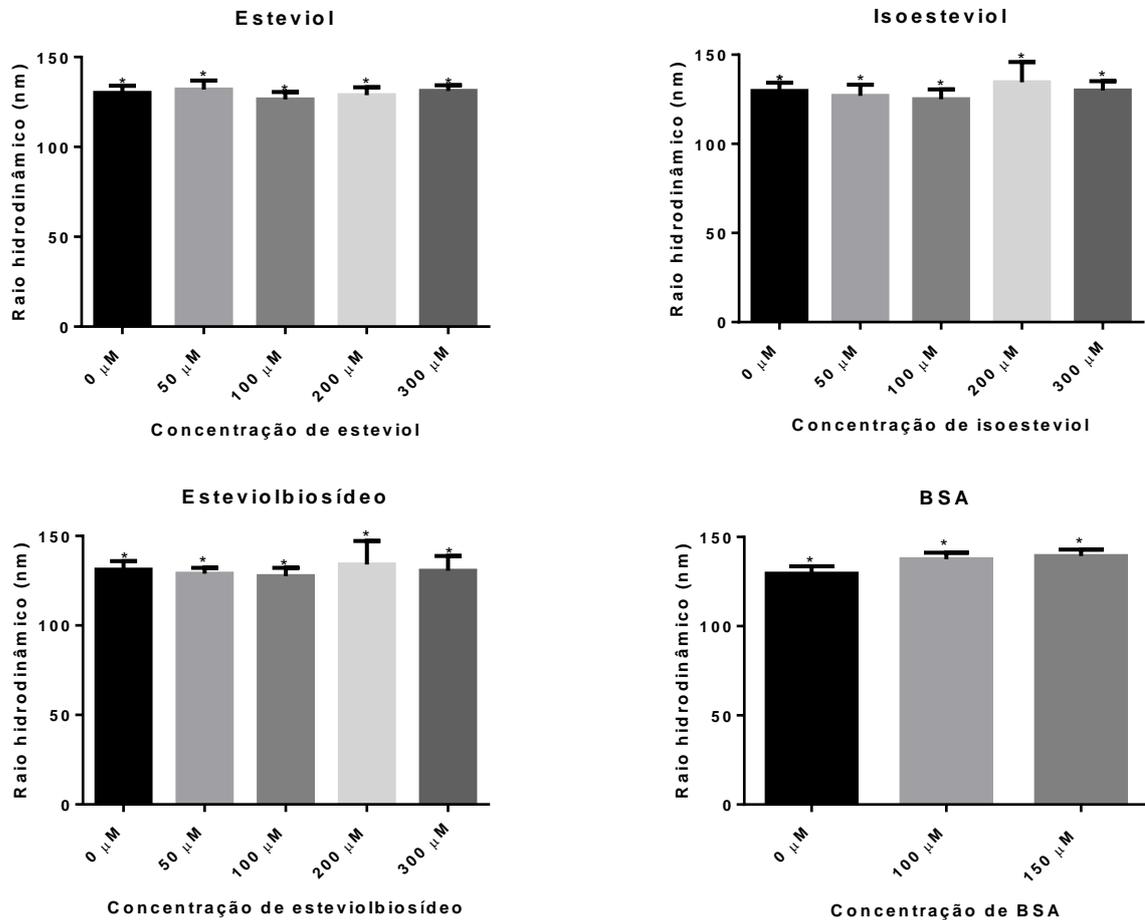


Figura 15 – Efeito dos produtos da estévia sobre o raio hidrodinâmico de LUVs de egg-PC. Concentrações crescentes dos produtos de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo (0 a 300 μM) foram adicionadas em 1 mL de suspensão de LUVs de egg-PC (500 μM em tampão Hepes 25 mM pH 7,4). BSA (0 – 150 μM) foi utilizada como controle dos experimentos. O raio hidrodinâmico médio de três medidas é apresentado acima em conjunto com \pm desvio padrão. Tampão Hepes, 25 mM, pH 7,4.

*Nível de significância $p > 0,05$.

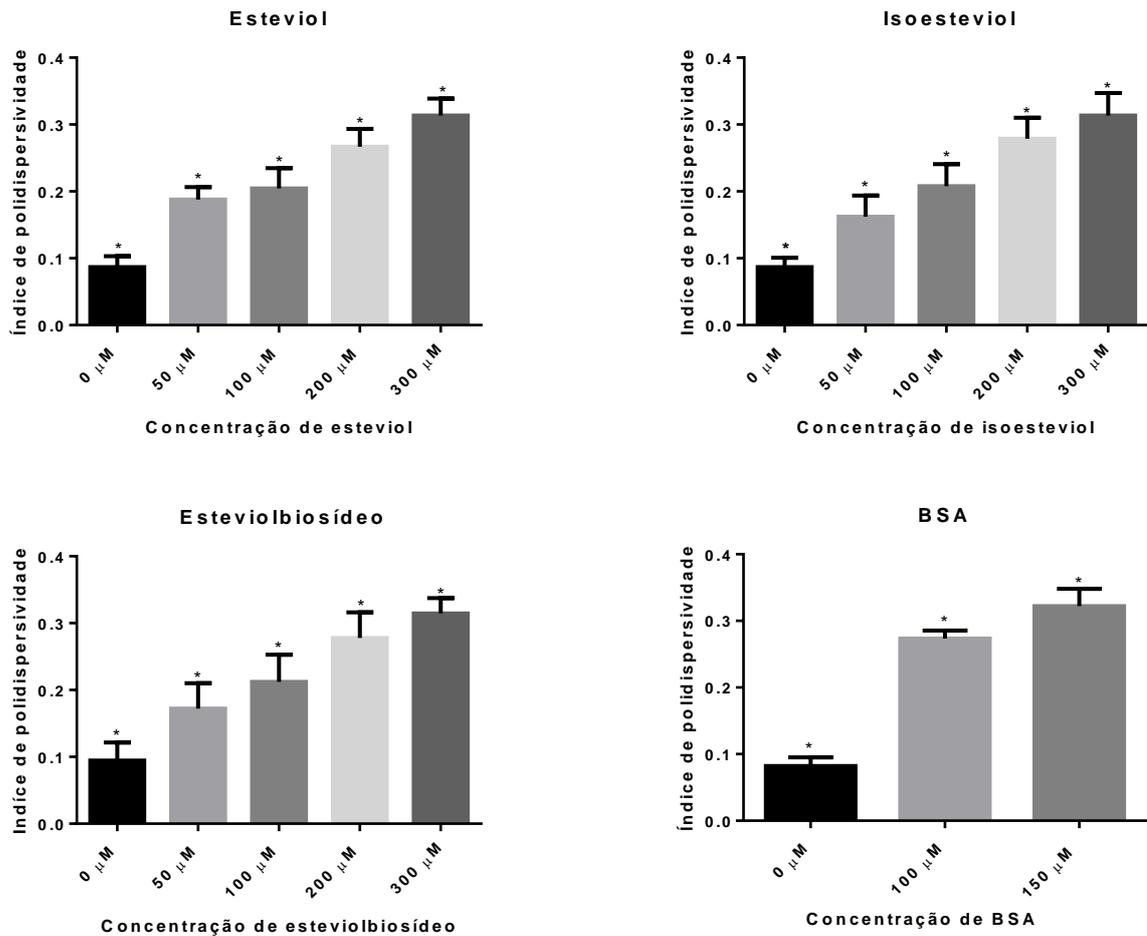


Figura 16 – Efeito do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo sobre o índice de polidispersividade de LUVs de egg-PC. Concentrações crescentes dos produtos de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo (0 a 300 μM) foram adicionadas em 1 mL de suspensão de LUVs de egg-PC (500 μM em tampão Hepes 25 mM pH 7,4). BSA (0 – 150 μM) foi utilizada como controle dos experimentos. O índice de polidispersividade e o raio hidrodinâmico é apresentado como média \pm desvio padrão de três medidas independentes.

*Nível de significância $p < 0,05$.

4.5 EFEITO DOS PRODUTOS DA ESTÉVIA SOBRE O VAZAMENTO DE CALCEÍNA

O ensaio de calceína é baseado em um fenômeno de autossupressão da fluorescência ocasionada pela elevada concentração de calceína encapsulada. Entretanto, mudanças na permeabilidade e integridade da bicamada lipídica podem induzir o vazamento da calceína para o tampão externo, o que é detectado como um aumento da fluorescência (HAMANN et al., 2002).

Como apresentado na FIG. 17, o esteviol, isoesteviol e esteviosídeo não causaram vazamento de calceína para o tampão externo, ou seja, não promoveram alterações na permeabilidade da bicamada lipídica. A concentração de produtos da estévia, a cada adição, foi de 20 μM de produtos da estévia complexados a 10 μM de BSA enquanto que a concentração em egg-PC foi de 150 μM . Como controle, foi realizado a adição de três alíquotas de 10 μM de BSA, não sendo observado vazamento de calceína. Ao final de cada registro, as LUVs eram permeabilizadas com Triton-X 20% (100% de fluorescência).

Os resultados com calceína eliminaram a possibilidade de artefatos relacionados ao vazamento de piranina e das outras sondas fluorescentes devido a alterações de permeabilidade da bicamada lipídica. Os produtos da estévia estavam à 13 mol % em relação à quantidade de egg-PC, razão semelhante à utilizada nos ensaios com a piranina e o FPE (10 mol % de produto em relação ao egg-PC).

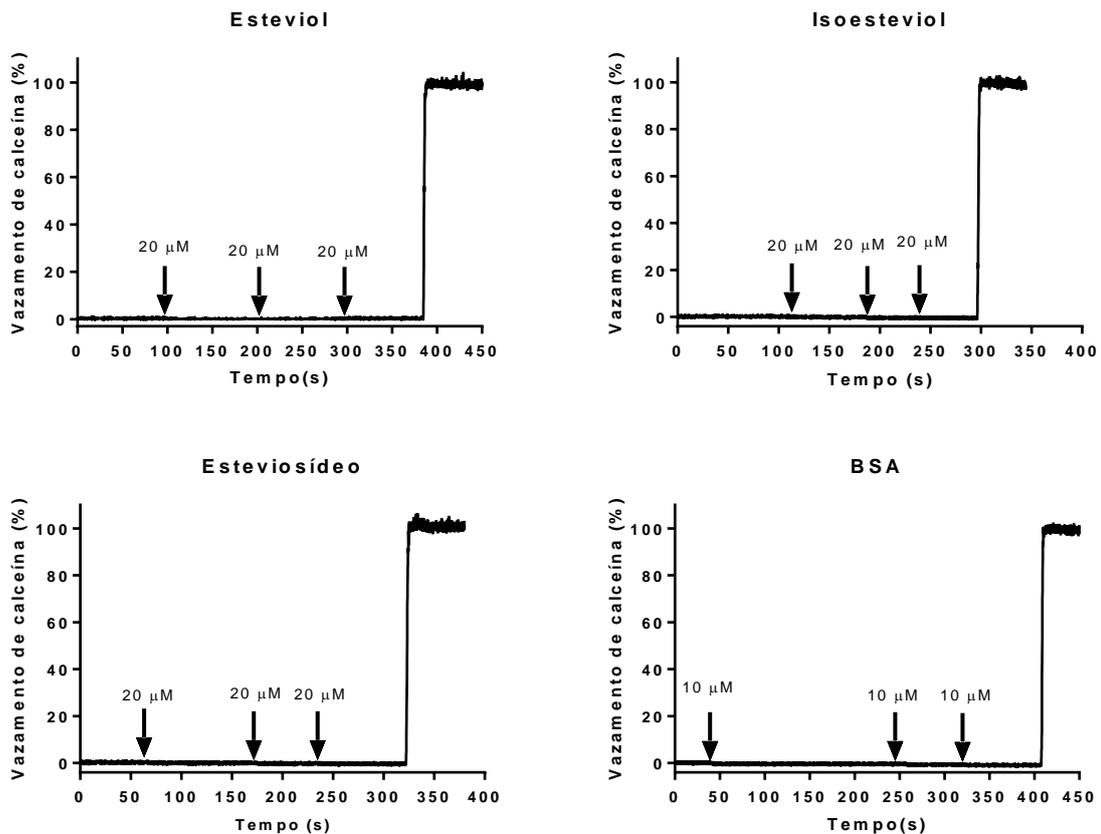


Figura 17 - Efeito do esteviol, isoesteviol, esteviosídeo e da albumina sobre a fluorescência da calceína encapsulada em LUVs de egg-PC. Adição (setas) de 20 μM de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo complexados a 10 μM de BSA (20 μL de uma solução estoque a 2 mM produtos da estévia e 1 mM de BSA defatada) e 10 μM de BSA a 2 mL de LUVs de egg-PC (150 μM) encapsuladas com calceína (70 mM). O tampão utilizado foi 100 mM de KCl e 20 mM de NaHPO_4 . A permeabilização total das LUVs representa 100% de fluorescência e foi alcançada pela adição, ao final do experimento, de 10 μL de triton X a 20%. Calceína foi excitada em 490 nm e a emissão coletada em 520 nm. As fendas de excitação e emissão foram 2,5 nm, respectivamente. As setas indicam o momento da adições dos produtos, os quais foram: 98, 206 e 292 segundos para o esteviol; 117, 186 e 239 segundos para o isoesteviol e 65, 173 e 237 segundos para o esteviosídeo. Para a BSA, as adições foram realizadas em 39, 248 e 318 segundos.

5. DISCUSSÃO

5.1 TRANSPORTE DE ESTEVIOL, ISOESTEVIOL E ESTEVIOLBIOSÍDEO ATRAVÉS DA BICAMADA LIPÍDICA

As propriedades biológicas e o potencial terapêutico dos glicosídeos da estévia são amplamente reportados (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009. JEPPESEN et al., 2000). Entretanto, a interação dessas moléculas com membranas celulares, sob um ponto de vista biofísico, ainda são inconclusivas (GEUNS et al., 2003).

Portanto, no presente estudo, os seguintes questionamentos foram abordados: (1) os produtos da estévia se ligam e atravessam a bicamada lipídica? (2) a permeabilidade da membrana ao esteviol (aglucona) e aos seus derivados glicosídicos é diferente? (3) os glicosídeos da estévia podem alterar a estrutura organizacional da bicamada lipídica?

A metodologia empregada para a avaliação do transporte transmembrana dos produtos da estévia baseou-se no monitoramento dos grupamentos carboxila e hidroxila do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo na membrana plasmática por meio de sondas fluorescentes sensíveis a cargas de superfície (FPE) e de pH (piranina).

Os resultados indicaram que o esteviol, isoesteviol e o esteviolbiosídeo rapidamente (em segundos) se ligam e atravessam a bicamada lipídica (FIG. 10, 12 e 13). O mecanismo de transporte é por difusão simples pois, as LUVs de egg-PC eram livres de proteína. Ainda, como previsto, a permeabilidade da membrana às agluconas foi maior do que ao glicosídeo esteviolbiosídeo. Por sua vez, como demonstrado pelos resultados de raio hidrodinâmico (FIG. 15 e 16) e vazamento de calceína (FIG. 17), os produtos da estévia não promoveram alterações significativas na integridade da bicamada lipídica.

5.2 LIGAÇÃO DO ESTEVIOL E ISOESTEVIOL À BICAMADA LIPÍDICA

A ligação do esteviol e isoesteviol à bicamada lipídica foi avaliada por meio da sonda fluorescente sensível a cargas de superfície FPE. Quando inserido na

monocamada externa da bicamada lipídica, o FPE reporta a inserção de cargas negativas (redução da fluorescência) ou positivas (aumento da fluorescência) na superfície de LUVs (BRUNALDI et al., 2007)

O esteviol e o isoesteviol promoveram uma redução imediata seguida da recuperação da fluorescência do FPE, em segundos (FIG. 10). Esses resultados são interpretados como inserção e “desaparecimento” de cargas negativas na superfície externa da bicamada lipídica, respectivamente. Portanto, conclui-se que há na membrana espécies ionizadas carregadas negativamente e que o FPE reporta a ligação (redução da fluorescência) e difusão transmembrana (recuperação da fluorescência) dessas espécies.

De acordo com a natureza apolar do esteviol e isoesteviol, pode-se prever um elevado coeficiente de partição membrana/água, com os grupamentos polares carboxila e hidroxila se posicionando na interface água/membrana voltada para o tampão externo e os anéis apolares interagindo com as caudas acila da fosfatidilcolina. Estudos utilizando métodos de abordagem computacional predizem coeficientes de partição ($\text{LogP} = \text{Log} \frac{[\text{molécula}]_{\text{octanol}}}{[\text{molécula}]_{\text{água}}}$) de aproximadamente 3 para o esteviol e isoesteviol e de -0.05 para o esteviolbiosídeo (FOODB, 2017). Estes valores indicam que as agluconas possuem uma afinidade pelo solvente orgânico apolar de pelo menos 1000 vezes maior do que pela água. Por outro lado, o valor de LogP para esteviolbiosídeo sugere uma alta afinidade desse glicosídeo pela fase aquosa. A análise do equilíbrio de ionização do esteviol e isoesteviol em solução e na membrana é um outro ponto importante na interpretação dos resultados com FPE. Um pKa de aproximadamente 5 é reportado para essas moléculas, também a partir de simulações computacionais (FOODB, 2017).

Portanto, conclui-se que nas condições experimentais de pH 7,4, a maior parte das agluconas encontram-se ionizadas em solução. Por outro lado, o pKa de moléculas em solução pode ser diferente do pKa no ambiente hidrofóbico da membrana. Por exemplo, o pKa de ácidos graxos em água é de aproximadamente 5 enquanto que em membranas é 7.6 (KAMP; HAMILTON, 1992; KAMP et al, 1995).

Como os resultados com FPE indicam a presença de cargas negativas na membrana (pelo menos transitoriamente), pode-se inferir que o pKa do esteviol e do isoesteviol na membrana é menor ou igual a 7,4. Caso contrário, teríamos o predomínio da espécie protonada (neutra) na membrana sem alterações

significativas na fluorescência. Por sua vez, a espécie ionizada, predominante em solução ($pK_a < 7,4$), ao se particionar na membrana reduziria a fluorescência do FPE.

Portanto, neste cenário, em um primeiro momento, é desenvolvido um gradiente de concentração transmembrana para a espécie ionizada, o qual é dissipado à medida que essas espécies alcançam a monocamada interna da bicamada lipídica. Em outras palavras, a recuperação da fluorescência reporta o flip-flop da forma ionizada, o qual ocorre com uma cinética um pouco mais lenta que a etapa de ligação (provavelmente alguns milissegundos).

Não se pode excluir a possibilidade de que a cinética de recuperação da fluorescência reporte também a etapa de desorção da membrana. Porém, discutido anteriormente, a natureza apolar das agluconas provavelmente não favoreceria esse processo.

Finalmente, o retorno da fluorescência à linha de base indica que, pelo menos a monocamada externa, não apresenta mais cargas negativas. Porém, os dados com FPE não permitem concluir se houve uma completa ou parcial depleção de moléculas ou excluir a possibilidade de que espécies protonadas encontrem-se particionadas na membrana, as quais não seriam detectadas pelo FPE.

5.3 FLIP-FLOP DO ESTEVIOL, ISOESTEVIOL E ESTEVIOLBIOSÍDEO

As agluconas e em menor extensão o esteviolbiosídeo, promoveram uma redução, em segundos, da fluorescência ($t_{1/2} < 1$ segundo) da piranina encapsulada em LUVs (FIG. 12 e 13). Esses resultados indicam a entrega de prótons ao interior das LUVs pelos grupamentos ionizáveis carboxila do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo que alcançaram a monocamada interna.

A cinética da redução da fluorescência da piranina equivale às etapas combinadas de dissociação dos produtos da estévia da BSA (quando esse veículo era utilizado), ligação e difusão através da bicamada lipídica. Eventualmente, os produtos da estévia poderiam se dissociar da membrana e atingir o equilíbrio de ionização no interior aquoso das LUVs. Entretanto, considerando-se que essas moléculas, principalmente as agluconas, particionam-se preferencialmente em membranas, a desorção seria mínima.

A partir dos resultados com piranina conclui-se que há na membrana espécies protonadas, além da espécie ionizada, como concluído pelos experimentos com

FPE. Entretanto, há um predomínio da espécie protonada, caso contrário, a fluorescência da piranina aumentaria (alcalinização). Adicionalmente, a presença das espécies ionizadas foi demonstrado pela menor redução da fluorescência frente a adições subsequentes de produtos da estévia (FIG. 12) Nestas condições, a acidificação prévia do interior das LUVs suprime a ionização do grupamento carboxila, como já reportado para ácidos graxos (KAMP; HAMILTON, 1992).

Em conjunto, os resultados com piranina e FPE apontam para um aumento do pKa dos produtos da estévia no ambiente hidrofóbico da membrana comparado ao da solução, favorecendo a espécie protonada. Com base no modelo de flip-flop para ácidos graxos (KAMP; HAMILTON, 1992; KAMP et al., 1995) e portanto, considerando um pKa para os produtos da estévia menor ou próximo a 7,4 no ambiente da membrana, haveria, no interior da bicamada lipídica, uma concentração de espécies protonadas e neutras maior ou igual à concentração das espécies ionizadas e carregadas negativamente. As espécies neutras atravessariam a bicamada lipídica com maior facilidade. Uma vez na monocamada interna, se dissociariam liberando prótons para o interior das LUVs. A espécie neutra não necessitaria deixar a membrana para acidificar o volume intravesicular.

A difusão transmembrana dos produtos da estévia gera um gradiente eletroquímico de prótons, ao qual está associado um potencial de equilíbrio, positivo no interior das LUVs. Por definição, no equilíbrio, os gradientes químico e elétrico são iguais e opostos, sendo o fluxo resultante de cargas através da membrana zero (KANDEL et al., 2014).

O influxo da espécie protonada é impulsionado pelo gradiente de concentração, enquanto que o efluxo é impulsionado pelo gradiente de prótons (maior concentração no interior), ao qual está associado um gradiente elétrico. A espécie protonada está em equilíbrio através da membrana e o seu fluxo resultante seria zero. Esta condição seria observada ao final da redução da fluorescência da piranina (menor valor da fluorescência).

Entretanto, paralelamente tem-se a difusão da espécie ionizada, movida tanto pelo gradiente químico e elétrico. À medida que as espécies ionizadas alcançam a monocamada interna e se combinam com os prótons, o gradiente elétrico é dissipado (condição de curto-circuito). A espécie protonada agora não está mais em equilíbrio. Há um fluxo constante de prótons e de ânions para o interior das LUVs,

carreados pelas espécies protonada e ionizada, respectivamente. Para cada carga positiva há uma negativa sendo transportada através da membrana.

Portanto, a fase de estabilização da fluorescência da piranina pode ser interpretada como uma condição de equilíbrio estacionário. Neste caso, a presença de BSA no tampão externo é importante pois, ao assegurar uma concentração constante dos produtos em solução, a BSA mantém o gradiente de concentração através da membrana (BSA como um “sink ou reservatório”) e conseqüentemente, o aporte de espécies protonadas e ionizadas para a membrana. Na sua ausência, os fluxos das espécies ionizada e protonada tenderiam a igualar as concentrações dos produtos da estévia entre o meio externo e o interior da LUV, como será discutido adiante.

O valor final da fluorescência da piranina no equilíbrio estacionário é um balanço entre o fluxo das espécies protonada e ionizada e conseqüentemente das permeabilidades da membrana a essas espécies. Como o resultado é uma redução da fluorescência da piranina, presume-se que a permeabilidade da membrana à forma protonada e neutra seja maior do que à forma ionizada.

Os resultados com piranina para o esteviolbiosídeo e as agluconas esteviol e isoesteviol, de certa forma, corroboram os estudos com sistemas biológicos conduzidos por Geuns et al. (2003) (células Caco-2) e Koyama (2003) (saco invertido de intestino delgado), os quais reportam uma permeabilidade celular mais elevada para o esteviol e praticamente nula para os glicosídeos esteviosídeo e rebaudiosídeo. Porém, o transporte mediado para glicosídeos da estévia não pode ser completamente descartado. Por exemplo, Thompson et al. (2015) reportaram inibição do GLUT1 e GLUT5 pelo glicosídeo rubusosídeo, um adoçante natural extraído da planta *Rubus suavissimus* e que apresenta uma estrutura química muito semelhante aos glicosídeos da estévia.

Conclui-se, ainda, que a taxa de flip-flop da forma protonada do esteviolbiosídeo é da mesma ordem de magnitude das agluconas, como observado pelas cinéticas de redução da fluorescência da piranina, que em ambos os casos eram de segundos (FIG. 12 e 13). Por outro lado, a recuperação parcial e mais lenta da fluorescência medida para o esteviolbiosídeo provavelmente revela a difusão transmembrana da espécie ionizada. Os resíduos de glicose aumentam o tamanho e a polaridade da molécula tornando a difusão através do ambiente hidrofóbico da membrana energeticamente menos favorável. Com o esteviol e isoesteviol a

estabilização da fluorescência foi imediata, indicando que as espécies protonada e ionizada apresentam taxas de flip-flop semelhantes mas, como discutido anteriormente, com permeabilidade maior para a forma protonada.

Quando os produtos da estévia eram utilizados em DMSO verificou-se em alguns registros um padrão de resposta semelhante ao do FPE (FIG. 13): redução da fluorescência, interpretada como flip-flop da forma protonada com entrega de prótons para o interior das LUVs e depois recuperação completa ou parcial da fluorescência dada pela ligação aos prótons com a forma ionizada que se difundiu para a monocamada interna da bicamada lipídica (flip-flop da forma ionizada).

Apesar do fato de que a suspensão de LUVs, visualmente apresentou-se límpida, não se pode descartar a possibilidade de que resultado com DMSO ser um artefato experimental, relacionado à baixa solubilidade dos produtos da estévia no tampão. A concentração de 50 μM , empregada nos ensaios com FPE e piranina, está muito próximo do limite de solubilidade em água previsto para o isoesteviol, porém abaixo dos valores para o esteviol (0.0158 mg/ml; massa molar de 318.45) e esteviolbiosídeo (1.37 mg/ml; massa molar de 642.73) (FOODB, 2017).

Na ausência da BSA no tampão externo, as concentrações de produtos da estévia entre os dois lados da membrana, ou entre as duas monocamadas da bicamada lipídica, se igualariam no equilíbrio (fluorescência de volta à linha de base). A espécie ionizada acompanha a espécie protonada. Em outras palavras, a difusão transmembrana da espécie protonada gera o gradiente elétrico que impulsiona a difusão da espécie ionizada.

O efeito do gradiente de elétrico sobre o fluxo das espécies ionizadas pode ser verificado no registro do isoesteviol em DMSO (FIG. 13). A primeira dose de isoesteviol adicionado às LUVs causou uma redução rápida da fluorescência da piranina. A cinética dessa resposta foi semelhante à obtida com isoesteviol em BSA, com exceção de que a magnitude da redução da fluorescência foi menor do que com BSA. Interessantemente, adições subsequentes da mesma concentração de isoesteviol, produziram reduções da fluorescência seguidas de recuperação parcial da mesma. Nestas condições, o gradiente elétrico gerado pela primeira adição de isoesteviol favorece o flip-flop da espécie ionizada enquanto restringe o da espécie protonada. No equilíbrio, o nível da fluorescência alcançado é sempre menor do que a inicialmente registrada, logo após a adição de isoesteviol.

Comparando as FIG. 12 e 13, verifica-se que as cinéticas de redução inicial da fluorescência da piranina com BSA e DMSO eram praticamente idênticas ($t_{1/2} < 1$ segundo). Esses dados sugerem que a dissociação da BSA não é a etapa limitante no transporte dos produtos da estévia através da bicamada lipídica. Por outro lado, para uma mesma concentração de produtos e LUVs, a magnitude da redução da fluorescência da piranina foi sempre maior na presença da BSA. Este resultado indica que a BSA entregou mais moléculas às membranas do que o DMSO, produzindo uma concentração de produtos efetiva na membrana muito maior, o que explicaria a maior acidificação.

Os espectros de emissão da BSA (FIG. 4, 5 e 6) mostram claramente a ligação dos produtos da estévia a esta proteína. Portanto, a concentração livre de produtos da estévia em solução, em equilíbrio com LUVs, deve ser menor quando o veículo BSA é utilizado, quando comparada ao DMSO. Contudo, esta comparação só é válida se os produtos adicionados em DMSO estiverem completamente dissolvidos no meio, ou seja, não agregados. Se este for o caso, a concentração de produtos da estévia disponível para o particionamento na membrana seria muito reduzida na ausência de BSA.

A utilização de BSA seria vantajosa porque aumentaria a solubilidade dos produtos em água e ao mesmo tempo, os entregaria rapidamente à membrana. A BSA atuaria como um reservatório de moléculas: à medida que as moléculas se ligam, atravessam e eventualmente se dissociam da membrana para o interior das LUVs, mais moléculas se dissociariam da BSA até um novo equilíbrio ser estabelecido. Desta forma, o equilíbrio químico seria favorecido em direção às LUVs, ou seja, a membrana sempre estaria “carregada” com produtos da estévia e a fluorescência se manteria estável.

5.4 EFEITO DO ESTEVIOL, ISOESTEVIOL E ESTEVIOLBIOSÍDEO SOBRE A ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BICAMADA LIPÍDICA

Os resultados com calceína indicam que os produtos da estévia (pelo menos, o esteviol e isoesteviol) não alteram a organização estrutural da bicamada lipídica ao ponto de induzirem um aumento da permeabilidade inespecífica da membrana e comprometimento da integridade da bicamada. Entretanto, o resultado com o

esteviosídeo pode apenas refletir a baixa afinidade desse glicosídeo pela membrana.

Por sua vez, o raio hidrodinâmico das LUVs não foi alterado pela incorporação dos produtos da estévia à bicamada lipídica. Quando combinados, os resultados com calceína e raio hidrodinâmico forneceram melhor embasamento para os estudos de transporte transmembrana. Se a estrutura da bicamada lipídica estivesse comprometida, as sondas fluorescentes encapsuladas, como a calceína e a piranina, poderiam vaziar para o meio externo e introduzir artefatos nas medidas de fluorescência. Adicionalmente, a difusão transmembrana dos produtos da estévia poderia ser catalisada pela indução de “defeitos” (flutuações) na bicamada lipídica.

5.5 INTERAÇÃO DO ESTEVIOL, ISOESTEVIOL E ESTEVIOLBIOSÍDEO COM A ALBUMINA BOVINA SÉRICA (BSA)

A BSA é uma proteína globular que consiste em uma cadeia polipeptídica com 580 aminoácidos. Ela possui 3 domínios homólogos (I, II e III) com dois subdomínios A e B, os quais contêm resíduos de triptofano, os quais conferem fluorescência intrínseca a BSA. Os dois resíduos de triptofano (Trp) encontram-se localizados no subdomínio IA (Trp-134), mais próximo da superfície da proteína e menos hidrofóbico, e no subdomínio IIA (Trp-212), um bolsão hidrofóbico da BSA (FIG. 18) (KRAGH-HANSEN, 1981; PETER, 1985; TAYEH; RUNGASSAMY; ALBANI, 2009).

Entre os glicosídeos da estévia, o rebaudiosídeo A forma complexos com a BSA, tornando a aglucona esteviol menos acessível às papilas gustativas (MUDGAL et al., 2016). Entretanto, não há na literatura estudos que abordem a termodinâmica da interação da BSA com os outros glicosídeos e agluconas da estévia.

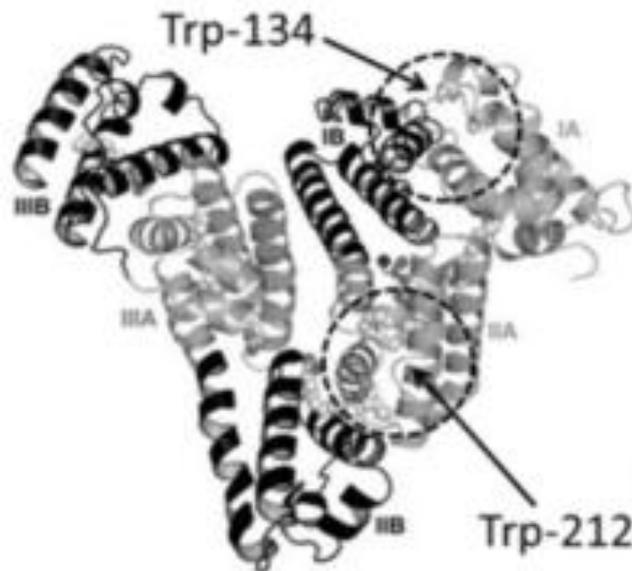


Figura 18 - Representação do arcabouço proteico da albumina sérica bovina (BSA). Nela estão ilustrados os domínios e subdomínios, destacando a localização dos resíduos de triptofano.

FONTE: adaptado de Moreira et al., 2015

Os resultados apresentados nas FIG. 4, 5 e 6, indicam claramente a ligação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo a BSA, causando supressão da fluorescência, provavelmente, por contato direto com os subdomínios IIA ou IB da BSA (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013) ou indiretamente via alterações na conformação da proteína, expondo os resíduos de triptofano a um microambiente com menor polaridade (SPECTOR, 1975).

A supressão de fluorescência pode ser induzida por uma variedade de interações moleculares com o supressor (produtos da estévia). Na supressão dinâmica, há a colisão do supressor com o fluoróforo no estado excitado. É observado um aumento da K_{sv} com a temperatura (maior número de colisões). Por sua vez, na supressão estática, há a interação do supressor com o fluoróforo no estado fundamental. A K_{sv} diminui com a temperatura devido a uma maior dissociação do supressor do fluoróforo (LAKOWICZ, 2006).

Não foi possível determinar a dependência do K_{sv} com a temperatura para o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo e conseqüentemente, o mecanismo de supressão da fluorescência. Isso provavelmente ocorreu pela restrição da faixa de temperatura utilizada: temperaturas menores que 27 °C ou maiores que 37 °C poderiam ocasionar alterações na conformação da BSA.

É amplamente conhecida a capacidade da albumina (BSA ou HSA) de se ligar a uma variedade de moléculas hidrofóbicas, assegurando a solubilidade dessas moléculas no plasma (KANAI; RAZ; GOODMAN, 1968; KRATZ, 2008). A afinidade da BSA é maior quanto mais hidrofóbica a molécula for. Por exemplo, a K_b da BSA por ácidos graxos aumenta com o comprimento da cadeia hidrocarbônica (SPECTOR; JOHN; FLETCHER, 1969; SPECTOR, 1975).

Portanto, esperaria-se uma maior afinidade da BSA pelas agluconas do que pelo esteviolbiosídeo. Os valores de $\text{Log } P_{\text{octanol/água}}$ para essas moléculas, inferidos a partir de softwares de modelagem molecular, indicam que isoesteviol e esteviol são mais hidrofóbicos do que esteviolbiosídeo ($\text{Log } P_{\text{octanol/água}}$ do isoesteviol, esteviol e esteviolbiosídeo são 4.13, 3.65 e 0.11, respectivamente) (FOODB, 2017; CHEMSPIDER, 2017).

De fato, os valores de K_b e n calculados para o isoesteviol a 32 e a 37 °C foram maiores do que os calculados para o esteviol. Este resultado indica uma maior afinidade do isoesteviol pela BSA, provavelmente um reflexo da sua maior hidrofobicidade. Adicionalmente, os resultados apontam para uma menor estabilidade do complexo esteviol/BSA já que a K_b e o n diminuíram com o aumento da temperatura.

Contudo, a K_b do esteviolbiosídeo pela BSA a 37 °C foi na ordem de 1000 a 10000 vezes maior do que pelas agluconas (TAB 2), apontando para a formação de um complexo de BSA e esteviolbiosídeo mais estável (HU et al., 2005). A K_b do esteviolbiosídeo ($4,29 \times 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{L}$) é da mesma ordem de magnitude da K_b reportada para o ácido láurico ($2,4 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L}$), um ácido graxo de hidrofobicidade intermediária quando comparado aos ácidos graxos de cadeia longa (SPECTOR, 1969).

O resultado obtido com o esteviolbiosídeo é contrário ao observado com os compostos fenólicos genisteína e daidzeína, cujas agluconas apresentam uma maior afinidade pela BSA do que os glicosídeos devido ao impedimento estérico causado pela inserção de moléculas de glicose (ZHAO; REN, 2009).

As diferenças de afinidades das agluconas e esteviolbiosídeo pela BSA podem refletir a interação dessas moléculas com domínios distintos na proteína. A supressão da fluorescência pelo esteviol e o isoesteviol foi acompanhado de um deslocamento hipsocrômico (*blue shift*) no espectro de emissão da BSA, o que é explicado pelo aumento na hidrofobicidade ao redor dos resíduos de triptofano e o

provável rearranjo da proteína em uma conformação mais compacta (LAKOWICZ, 2006; ZHAO; REN, 2009). Assim, é possível que as agluconas tenham se ligado ao subdomínio IIA, mais interno e mais hidrofóbico em relação ao subdomínio IA (SUŁKOWSKA, 2002), o que está de acordo com a maior hidrofobicidade dessas moléculas.

Por sua vez, seria lógico supor que o esteviolbiosídeo se associaria ao subdomínio IA hidrofóbico e mais superficial da BSA, assegurando, dessa forma a interação da sua parte hidrofóbica (conjunto de anéis da aglucona) e hidrofílica (resíduos de glicose) com a proteína e com o meio aquoso, respectivamente. A maior supressão da fluorescência pelo esteviolbiosídeo se daria pela facilidade de acesso ao sítio mais superficial, o que seria favorecido pelo aumento da temperatura (maior número de colisões intermoleculares) (PETERS JR, 1995; ATKINS; PAULA, 1999).

Entretanto, não se pode descartar a possibilidade do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo interferirem indiretamente na fluorescência do triptofano dos subdomínios IA e IIA ao induzir uma mudança conformacional na proteína dada por uma interação com outros domínios da proteína como é o caso dos ácidos graxos (SPECTOR, 1975)

A ausência de supressão da fluorescência da BSA pelo esteviolbiosídeo a 23 e 32 °C pode ser atribuída ao tempo inadequado de incubação entre a adição das alíquotas de produto e o registro dos espectros. Para todas as concentrações, o tempo entre cada adição de produto e sua respectiva leitura foi de cinco minutos cronometrados. Porém, durante o preparo de soluções estoque de esteviolbiosídeo em BSA (foram utilizadas nos ensaios com piranina e FPE), foi observado a formação de uma “nuvem” na solução, que após aproximadamente 30 minutos se dissipava com a solução tornando-se límpida.

Resumidamente, os resultados apontam para a ligação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo a BSA (80% de homologia com a HSA) (MAJOREK et al., 2012). Tendo em vista que os glicosídeos da estévia são convertidos em esteviol por bactérias do trato gastrointestinal, o qual é prontamente absorvido (GARDANA et al., 2003; RENWICK; TARKA, 2008), pode-se supor que a maior parte do esteviol plasmático estará complexado a HSA antes da sua metabolização hepática em esteviol glucoronídeo (KOYAMA et al., 2003a. WHEELER et al., 2008). Adicionalmente, a ligação da BSA aos produtos da estévia comprova a eficácia da

BSA como veículo dessas moléculas nos estudos de transporte transmembrana realizados nesse trabalho.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram, pela primeira vez na literatura, que as agluconas esteviol e isoesteviol se ligam e atravessam membranas lipídicas por difusão simples, sem promover alterações na organização estrutural da bicamada lipídica, ao menos nas concentrações aqui avaliadas. Ainda, que a permeabilidade da bicamada lipídica ao glicosídeo esteviolbiosídeo é bastante reduzida, podendo se estender aos outros glicosídeos da estévia. Os resultados em conjunto indicam que as ações biológicas das agluconas possam vir a ocorrer no ambiente intracelular, enquanto para os glicosídeos da estévia, as interações estariam mais restritas à superfície celular.

REFERÊNCIAS

- ABUDULA, R., JEPPESEN, P. B., ROLFSEN, S. E. D., XIAO, J., HERMANSEN, K. Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. **Metabolism**, v. 53, n. 10, p. 1378-1381, 2004.
- ANEL, A.; RICHERI, G. V.; KLEINFELD, A. M. Membrane partition of fatty acids and inhibition of T cell function. **Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 530-536, 1993.
- ATKINS, P. W.; PAULA, J. **Físico-Química**. 6ª edição. Tradução Horácio Macedo. Rio de Janeiro. Livros, 1999.
- BRANDLE, J. E.; TELMER, P. G. Steviol glycoside biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 1855-1863, 2007.
- BRUNALDI, K.; HUANG, N.; HAMILTON, J. A. Fatty acids are rapidly delivered to and extracted from membranes by methyl- β -cyclodextrin. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 1, p. 120-131, 2010.
- BRUNALDI, K.; SIMARD, J.; KAMP, F.; REWAL, C.; ASAWAKARN, T.; O'SHEA, P.; HAMILTON, J. A. Fluorescence assays for measuring fatty acid binding and transport through membranes. **Methods in Molecular Biology**, p. 237-255, 2007.
- CARAKOSTAS, M.; PRAKASH, I.; KINGHORN, A. D.; WU, C. D.; SOEJARTO, D. D. **Alternative Sweeteners**. p. 159-180, 2012.
- CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacology & therapeutics**, v. 121, n. 1, p. 41-54, 2009.
- CHEMSPIDER. iso-Steviol. Disponível em: < <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.89905.html> > Acessado em 01/06/2017.
- CIEŚLIK-BOCZULA, K.; ŚWIĄTEK, P.; JASZCZYSZYN, A.; ZAWILSKA, P.; GAŚSIOROWSKI, K.; MALINKA, W.; KÖHLER, G. Phase separation in phosphatidylcholine membrane caused by the presence of a pyrimidine analogue of fluphenazine with high anti-multidrug-resistance activity. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 13, p. 3605-3615, 2014.
- COSTA, S. C.; FONTANA, J. D.; DACOME, A. S.; COSTA, C. E. M.; SILVA, C. C.; ADELMANN, J. . Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and eletrophoretic methods. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3597-3594, 2005
- CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications

for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J.; MORGAN, M. R.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. **FEBS letters**, v. 436, n. 1, p. 71-75, 1998.

DE OLIVEIRA, B. H.; PACKER, J. F.; CHIMELLI, M.; DE JESUS, D. A.. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 1, p. 92-96, 2007.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. Departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos. U.S. Food and Drug Administration. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm397725.htm>> com acesso em 05/05/2017.

FOODB. Showing Compound Steviol. Disponível em: <<http://foodb.ca/compounds/FDB015642>> Acessado em 01/06/2017.

FOODB. Showing Compound Steviolbioside. Disponível em: <<http://foodb.ca/compounds/FDB015643>> Acessado em 01/06/2017.

GALLO, M.; VITULANO, M.; ANDOLFI, A.; DELLAGRECA, M.; CONTE, E.; CIARAVOLO, M.; NAVIGLIO, D. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): a New Rapid and Greener Method for Extracting Two Steviol Glycosides (Stevioside and Rebaudioside A) from Stevia Leaves. **Plant Foods for Human Nutrition**, p. 1-8, 2017.

GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; CANZI, E.; ZANCHI, R.; PIETTA, P. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6618-6622, 2003.

GEUNS, J. M.; AUGUSTIJNS, P.; MOLS, R.; BUYSE, J. G.; DRIESSEN, B. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 11, p. 1599-1607, 2003.

HAMANN, S.; KIILGAARD, J. F.; LITMAN, T.; ALVAREZ-LEEFMANS, F. J.; WINTHER, B. R.; ZEUTHEN, T. Measurement of cell volume changes by fluorescence self-quenching. **Journal of fluorescence**, v. 12, n. 2, p. 139-145, 2002.

HAMILTON, J. A.; JOHNSON, R. A.; CORKEY, B.; KAMP, F. Fatty acid transport. **Journal of molecular neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 99-108, 2001.

HORIO, Y.; SUN, Y.; LIU, C.; SAITO, T.; KURASAKI, M. Aspartame-induced apoptosis in PC12 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n.1, p. 158-165, 2014.

HU, Y. J.; LIU, Y.; SHEN, X. S.; FANG, X. Y.; QU, S. S. Studies on the interaction between 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 738, n. 1, p. 143-147, 2005.

ISHII, E. L.; SCHWAB, A.J.; BRACHT, A. Inhibition of monosaccharide transport in the intact rat liver by stevioside. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 9, p.1417-1433, 1987.

ISHII-IWAMOTO, E. L.; BRACHT, A. Stevioside is not metabolized in the isolated perfused rat liver. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 87, n. 2, p. 167-175, 1995.

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 activity. **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 208-214, 2000.

JEPPESEN, P. B., GREGERSEN, S., ROLFSEN, S. E. D., JEPSEN, M., COLOMBO, M., AGGER, A., XIAO, J., KRUIHOFFER, M., ORNTOFT, T., HERMANSEN, K. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. **Metabolism**, v. 52, n. 3, p. 372-378, 2003.

JOOKEN, E.; AMERY, R.; STRUYF, T.; DUQUENNE, B.; GEUNS, J.; MEESCHAERT, B. Stability of Steviol Glycosides in Several Food Matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.42, p.10606-10612, 2012.

KAMP, F.; HAMILTON, J. A. pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 23, p. 11367-11370, 1992.

KAMP, F.; ZAKIM, D.; ZHANG, F.; NOY, N.; HAMILTON, J. A. Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. **Biochemistry**, v. 34, n. 37, p. 11928-11937, 1995.

KAMP, F.; GUO, W.; SOUTO, R.; PILCH, P. F.; CORKEY, B. E.; HAMILTON, J. A. Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7988-7995, 2003.

KAMP, F.; HAMILTON, J. A. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 75, n. 3, p. 149-159, 2006.

KANAI, M.; RAZ, A.; GOODMAN, D S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 9, p. 2025, 1968.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T.; SIEGELBAUM, S.; HUDSPETH, A. J. **Princípios de Neurociências**. AMGH Editora, 2014.

KINGHORN, A. D. **Stevia: the genus Stevia**. CRC Press, 2003.

KOYAMA, E.; SAKAI, N.; OHORI, Y.; KITAZAWA, K.; IZAWA, O.; KAKEGAWA, K.; FUJINO, A.; UI, M. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. **Food and chemical toxicology**, v.41, n.6, p. 875-883, 2003 (a).

KOYAMA, E.; KITAZAWA, K.; OHORI, Y.; IZAWA, O.; KAKEGAWA, K.; FUJINO, A.; UI, M. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. **Food and chemical toxicology**, v. 41, n. 3, p. 359-374, 2003 (b).

KRAGH-HANSEN, U. Molecular Aspects of Ligand to Serum Albumin. **Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 16-53, 1981.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of controlled release**, v. 132, n. 3, p. 171-183, 2008.

KROYER, G. Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 5, n. 2, p. 225-229, 2010.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3. ed. Nova York: Springer Science, 2006.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 42, n. 6, p. 413-421, 1998.

MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; KHEIROLOMOOM, A.; GENY, D.; LINDER, M. Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. **Biochimie**, v. 95, n. 11, p. 2018-2033, 2013.

MAJOREK, K. A.; POREBSKI, P. J.; DAYAL, A.; ZIMMERMAN, M. D.; JABLONSKA, K.; STEWART, A. J.; CHRUSZCZ, M.; MINOR, W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular immunology**, v. 52, n. 3, p. 174-182, 2012.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013.

MATTES, R.D.; POPKIN, B.M. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 1, p. 1-14, 2009.

MELIS, M. S. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 67, n. 2, p. 157-161, 1999.

MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C.; SOUZA, J. R. B. D.; NAKATANI, H. S.; SOUZA, V. R. D. Investigation of the fluorescence quenching of

bovine and human serum albumin by ruthenium complex. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.

MUDGAL, S.; KERESZTES, I., FEIGENSON, G.W.; RIZVI, S.S.H. Controlling the taste receptor accessible structure of rebaudioside A via binding to bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 197, p. 84-91, 2016.

NAKAMURA, Y.; SAKIYAMA, S.; TAKENAGA, K. Suppression of syntheses of high molecular weight nonmuscle tropomyosins in macrophages. **Cytoskeleton**, v. 31, n. 4, p. 273-282, 1995.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances–nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 14, p. 53-71, 2013.

NÉMETH, K.; PLUMB, G. W.; BERRIN, J. G.; JUGE, N.; JACOB, R.; NAIM, H. Y.; WILLIAMSON, G.; SWALLOW D.M.; KROON, P. A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 29-42, 2003.

O'TOOLE, P.J.; MORRISON, I. E.G.; CHERRY, R. J. Investigations of spectrin–lipid interactions using fluoresceinphosphatidylethanolamine as a membrane probe. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1466, n. 1, p. 39-46, 2000.

PAYNE, A. N.; CHASSARD, C.; LACROIX, C. Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: implications for host–microbe interactions contributing to obesity. **Obesity Reviews**, v. 13, n. 9, p. 799-809, 2012.

PETER, T. Serum Albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 37, p. 161- 245, 1985.

PETERS JR, T. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. São Francisco: Academic press, 1995.

POPKIN, B. M.; NIELSEN, S. J. The Sweetening of the World's Diet. **Obesity Reviews**. v. 11, p. 1325- 1332, 2003.

RENWICK, A. G.; TARKA, S. M. Microbial hydrolysis of steviol glycosides. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 7, p. S70-S74, 2008.

RIZZO, B.; ZAMBONIN, L.; ANGELONI, C.; LEONCINI, E.; DALLA SEGA, F. V.; PRATA, C.; FIORENTINI, D.; HRELIA, S. Steviol glycosides modulate glucose transport in different cell types. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, sn, 2013.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes *mellitus* no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n. s1, p. 29-36,

2003.

SEHAR, I.; KAUL, A.; BANI, S.; PAL, H. C.; SAXENA, A. K. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. **Chemico-biological interactions**, v. 173, n. 2, p. 115-121, 2008.

SIMARD, J. R.; KAMP, F.; HAMILTON, J. A. Measuring the adsorption of fatty acids to phospholipid vesicles by multiple fluorescence probes. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 11, p. 4493-4503, 2008.

SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of stevia leaf herbarium samples for sweetness. **Journal of Natural Products**, v.45, n. 5, p. 590-599, 1982.

SPECTOR, A.A.; JOHN, K.; FLETCHER, J. E. Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. **Journal of lipid research**, v. 10, n. 1, p. 56-67, 1969.

SPECTOR, A. A. Fatty acid binding to plasma albumin. **Journal of lipid research**, v. 16, n. 3, p. 165-179, 1975.

SRIMAROENG, C.; CHATSUDTHIPONG, V.; ASLAMKHAN, A. G.; PRITCHARD, J. B. Transport of the natural sweetener stevioside and its aglycone steviol by human organic anion transporter (hOAT1; SLC22A6) and hOAT3 (SLC22A8). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 2, p. 621-628, 2005 (a).

SRIMAROENG, C.; JUTABHA, P.; PRITCHARD, J. B.; ENDOU, H.; CHATSUDTHIPONG, V. Interactions of stevioside and steviol with renal organic anion transporters in S2 cells and mouse renal cortical slices. **Pharmaceutical research**, v. 22, n. 6, p. 858-866, 2005 (b).

SUEZ, J.; KOREM, T.; ZEEVI, D.; ZILBERMAN-SCHAPIRA, G.; THAISS, C. A.; MAZA, O.; ISRAELI, D.; ZMORA, N.; GILAD, S.; WEINBERGER, A.; KUPERMAN, Y.; HARMELIN, A.; KOLODKIN-GAL, I.; SHAPIRO, H.; HALPERN, Z.; SEGAL, F.; ELINAV, E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 181-186, 2014.

SUŁKOWSKA, A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. **Journal of molecular structure**, v. 614, n. 1, p. 227-232, 2002.

SYLVETSKY, A.; ROTHER, K. I.; BROWN, R. Artificial sweetener use among children: epidemiology, recommendations, metabolic outcomes, and future directions. **Pediatric Clinics of North America**, v. 58, n.6, p. 1467-1480, 2011.

TAHA, M.; QUENTAL, M. V.; CORREIA, I.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1158-1166, 2015.

TANAKA, O. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 1, n. 11, p. 246-248, 1982.

TAYEH, N.; RUNGASSAMY, T.; ALBANI, J. R. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 50, n. 2, p. 107-116, 2009.

THOMPSON, A. M. G.; IANCU, C. V.; NGUYEN, T. T. H.; KIM, D.; CHOE, J. Y. Inhibition of human GLUT1 and GLUT5 by plant carbohydrate products; insights into transport specificity. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

TOLEDO-FUENTES, X.; LIS, D.; CECCHET, F. Structural changes to lipid bilayers and their surrounding water upon interaction with functionalized gold nanoparticles. **J Physical Chemistry C**, v. 120, n. 38, p. 21399-21409, 2016.

TOSKULKAO, C.; SUTHEERAWATANANON, M.; WANICHANON, C.; SAITONGDEE, P.; SUTTAJIT, M.. Effects of stevioside and steviol on intestinal glucose absorption in hamsters. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 41, n. 1, p. 105-114, 1995.

WALL, J.; GOLDING, C. A.; VEEN, M. V.; O'SHEAT, P. The use of fluoresceinphosphatidylethanolamine (FPE) as a real-time probe for peptide-membrane interactions. **Molecular membrane biology**, v. 12, n. 2, p. 183-192, 1995.

WANG, M.; QI, H.; LI, J.; XU, Y.; ZHANG, H. Transmembrane transport of steviol glucuronide and its potential interaction with selected drugs and natural compounds. **Food and chemical toxicology**, v. 86, p. 217-224, 2015.

WEIHRAUCH, M. R.; DIEHL, V. Artificial sweeteners - do they bear a carcinogenic risk?. **Annals of Oncology**, v. 15, n. 10, p. 1460-1465, 2004.

WHEELER, A.; BOILEAU, A. C.; WINKLER, P. C.; COMPTON, J. C.; PRAKASH, I.; JIANG, X.; MANDARINO, D. A. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 7, p. S54-S60, 2008.

WHITEHOUSE, C. R.; BOULLATA, J.; MCCAULEY, L. A. The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. **Workplace Health Safety**, v. 56, n. 6, p. 251-259, 2008.

WOOD JR, H. B., Allerton, R.; DIEHL, H. W.; FLETCHER JR, H. G. Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 875-883, 1955.

YASUKAWA, K.; KITANAKA, S.; SEO, S.. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 11, p. 1488-1490, 2002.

ZHAO, J.; REN, F. Influence of hydroxylation and glycosylation in ring A of soybean isoflavones on interaction with BSA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 72, n. 3, p. 682-685, 2009.