



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

---



**ANDRÉ HENRIQUE OLER DE NOVAES**

**TRANSPORTE DO ESTEVIOL, ISOESTEVIOL E  
ESTEVIOLBIOSÍDEO ATRAVÉS DA MEMBRANA  
PLASMÁTICA DE CÉLULAS 3T3-L1**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MARINGÁ - PARANÁ  
2017**

**ANDRÉ HENRIQUE OLER DE NOVAES**

---

**TRANSPORTE DO ESTEVIOL,  
ISOESTEVIOL E ESTEVIOLBIOSÍDEO  
ATRAVÉS DA MEMBRANA PLASMÁTICA  
DE CÉLULAS 3T3-L1**

---

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali**

Maringá  
2017

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

N934t

Novaes, André Henrique Oler de  
Transporte do esteviol, isoesteviol e  
esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de  
células 3T3-L1 / André Henrique Oler de Novaes. --  
Maringá, 2017.  
40 f. : figs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Ida Bonini  
Ravanelli Speziali.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Departamento de Ciências Fisiológicas.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas,  
2017.

1. Stevia rebaudiana. 2. Agluconas. 3. Flip-flop.  
4. Sonda de pH intracelular (BCECF). 5. Sonda de  
cargas de superfície (FPE). I. Speziali, Maria Ida  
Bonini Ravanelli, orient. II. Universidade Estadual  
de Maringá. Departamento de Ciências Fisiológicas.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.  
III. Título.

CDD 23.ed. 572.565

Glauçia Volponi de Souza - CRB-9/948

ANDRÉ HENRIQUE OLER DE NOVAES


**TRANSPORTE DO ESTEVIOL,  
ISOESTEVIOL E ESTEVIOLBIOSÍDEO  
ATRAVÉS DA MEMBRANA PLASMÁTICA  
DE CÉLULAS 3T3-L1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

APROVADO em ..26.... de ..julho..... de 2017.



Prof. Dr. Antônio Roberto  
Giriboni Monteiro



Profa. Dra. Célia Regina  
Ambiel da Silva



Profa. Dra. Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali  
(Orientadora)

# Dedicatória



*Dedico a nós, a todos nós.*

# **Agradecimentos**

---

---

Este estudo não seria possível sem o apoio das seguintes pessoas:

Minha orientadora Profa. Dra. Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali, por todo o tempo investido em mim e por me entender quando nem eu mesmo me entendo, organizando minhas ideias.

Minha coorientadora Profa. Dra. Kellen Brunaldi, por me acolher como seu orientando e pela confiança.

A banca examinadora composta pela Profa. Dra. Célia Regina Ambiel da Silva e Prof. Dr. Antônio Roberto Giriboni Monteiro, por aceitarem ler e contribuir com o nosso estudo.

À Profa. Cecília E. Mareze da Costa, Prof. Sílvio Cláudio da Costa, Profa. Paula Gimenez Milani Fernandes e Sérgio Dacome pela produção e fornecimento dos produtos da estévia e pelo auxílio sempre que foi necessário.

Os Professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, eu sempre vou lembrar de suas aulas e tomá-las como inspiração.

Os meus colegas da Turma 1 de Mestrado em Ciências Fisiológicas, eles tornaram essa experiência mais divertida. E em especial, Luciana Marciano, por sempre me salvar.

E minha mãe e meu pai, por sempre confiarem em minhas decisões.

NOVAES, André Henrique Oler de. **Transporte do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3L-1**. 2017. 40 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

## RESUMO

---

---

O esteviol é um diterpeno extraído das folhas de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, uma planta nativa da América do Sul. Nas últimas décadas, os glicosídeos de esteviol, principalmente o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A, têm sido utilizados como adoçantes em alimentos e bebidas e, após sofrerem metabolização no trato gastrointestinal, o esteviol é o principal metabólito encontrado no plasma. Além disso, diversos estudos têm atribuído propriedades terapêuticas aos produtos derivados de *S. rebaudiana*. No entanto, é escasso o número de trabalhos descrevendo a interação desses compostos com as membranas biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar o transporte do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1. Para isso, empregamos uma metodologia baseada em espectroscopia de fluorescência, utilizando as sondas FPE e BCECF. A ligação destes produtos, que são moléculas com grupamentos ionizáveis, à membrana plasmática e sua translocação (flip-flop) foram avaliadas por meio de medidas de fluorescência do FPE (sonda de cargas de superfície) e BCECF (sonda de pH intracelular), respectivamente. Nossos dados utilizando a sonda FPE demonstraram que há uma rápida ligação do esteviol e isoesteviol à monocamada externa da membrana plasmática ( $t_{1/2} < 2s$ ), seguida de uma recuperação do sinal de volta aos valores iniciais. Por outro lado, o esteviolbiosídeo não apresentou o mesmo efeito. Os experimentos com a sonda BCECF mostraram que o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo sofreram translocação através da membrana plasmática ( $t_{1/2} < 2s$ ). Em ambas as sondas, o isoesteviol causou quedas mais intensas na fluorescência. O efeito do esteviolbiosídeo foi consideravelmente menor do que o causado pelas agluconas, possivelmente em função da presença das moléculas de glicose associadas. Baseado em nossos resultados, concluímos que o esteviol e seu isômero isoesteviol são capazes de ligarem-se rapidamente à monocamada externa de células 3T3-L1 e serem translocados através da membrana plasmática alcançando a monocamada interna, sendo a resposta ao esteviolbiosídeo comparativamente menor.

Palavras-Chave: *Stevia rebaudiana*. agluconas. Flip-flop. BCECF. FPE.

NOVAES, André Henrique Oler de Novaes. **Steviol, isosteviol and steviolbioside transport across 3T3-L1 plasma membrane.** 2017. 40 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

## ABSTRACT

---

---

Steviol is a diterpene extracted from leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a plant native from South America. In the last decades, steviol glycosides, mainly stevioside and rebaudioside A, have been used as sweeteners in foods and beverages. However, these glycosides are metabolized by colonic bacteria into steviol, the main metabolite found in the plasma. In the last years, several studies have been attributed therapeutic properties to the glycosides from *S. rebaudiana*. However, information about the interaction of these compounds with biological membranes is scarce. Therefore, the aim of this study is to evaluate the transport of steviol, isosteviol and steviolbioside through the plasma membrane of 3T3-L1 cells. For this, we employed a methodology based on fluorescence spectroscopy. The binding and diffusion across the plasma membrane of the compounds, molecules with ionizable groups, were measured by the charge surface probe FPE and the intracellular pH probe BCECF, respectively. Our data with FPE demonstrated a rapid binding of steviol and isosteviol to the outer monolayer of the plasma membrane ( $t_{1/2} < 2s$ ), measured as a reduction in FPE fluorescence emission, followed by a recovery of the signal back to the baseline. Experiments with BCECF also indicated a rapid translocation of steviol and isosteviol across the plasma membrane ( $t_{1/2} < 2s$ ), measured as a reduction in BCECF fluorescence. Steviol caused more intense reductions in fluorescence in both probes. On the other hand, the effect of steviolbioside, a glycoside from steviol with an ionizable group, on BCECF and FPE was considerably lower than that caused by aglucones. These data are explained by the presence of glucose residues in the steviolbioside molecule, which probably reduce its binding to the plasma membrane. Based on our initial results, we conclude that steviol and its isomer isosteviol are able to rapidly bind and translocate across the plasma membrane of 3T3-L1 cells, besides, the response of steviolbioside was comparatively lower.

Keywords: *Stevia rebaudiana*. aglucones. Flip-flop. BCECF. FPE.



# LISTA DE FIGURAS

---

---

<b>Figura 1 -</b>	Estrutura molecular dos glicosídeos de estévia e sua aglucona, o esteviol.....	12
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura molecular do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo.....	13
<b>Figura 3 -</b>	Estrutura molecular das sondas FPE e BCECF-AM.....	15
<b>Figura 4 -</b>	Espectro de excitação e emissão da sonda FPE.....	21
<b>Figura 5 -</b>	Avaliação da ligação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo à monocamada externa da membrana plasmática de células 3T3-L1 marcada com a sonda sensível a cargas de superfície FPE.....	22
<b>Figura 6 -</b>	Avaliação da translocação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1 carregadas com a sonda sensível a pH intracelular BCECF.....	24
<b>Figura 7 -</b>	Avaliação da translocação do esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1 carregadas com a sonda sensível a pH intracelular BCECF em três concentrações de glicose diferentes.....	25
<b>Figura 8 -</b>	Avaliação da ligação e translocação do ácido oléico através da membrana plasmática de células 3T3-L1 por meio das sondas FPE e BCECF.....	26
<b>Figura 9 -</b>	Avaliação da resposta das sondas FPE e BCECF à adição de DMSO puro ao meio externo contendo células 3T3-L1.....	27

# LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

---

<b>ACSL</b>	Long-chain acyl-CoA synthetase
<b>AM</b>	Éster acetoximetil
<b>AMP</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>BCECF-AM</b>	2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(e-6)-carboxifluoresceína éster acetoximetil
<b>BCS</b>	Bovine calf serum
<b>Caco-2</b>	Caucasian colon adenocarcinoma
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>FABP<sub>pm</sub></b>	Fatty acid binding protein
<b>FAT</b>	Fatty acid translocase
<b>FATP</b>	Fatty acid transport protein
<b>FPE</b>	Fluoresceína fosfatidiletanolamina
<b>GLUT</b>	Transportador de glicose
<b>HEK</b>	Human Embryonic Kidney
<b>MOPS</b>	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
<b>OAT</b>	Transportadores de ânions orgânicos
<b>UGT</b>	Uridina difosfato glicuronosiltransferase

**DFS** Departamento de Ciências Fisiológicas

**CCB** Centro de Ciências Biológicas

**UEM** Universidade Estadual de Maringá

# SUMÁRIO

---

---

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	17
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
<b>4 RESULTADOS</b> .....	21
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

# 1 INTRODUÇÃO

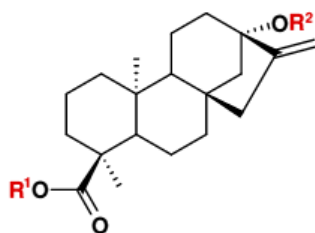
## *Esteviol e os glicosídeos da estévia*

Os terpenos são uma classe de hidrocarbonetos amplamente distribuídos na natureza, encontrados em plantas e em alguns animais. São formados pela ligação de unidades de isopreno, com fórmula molecular  $C_5H_8$ , arranjados linearmente ou em anéis. Sua fórmula básica é  $(C_5H_8)_n$ , onde  $n$  é o número de unidades de isopreno ligadas, um monoterpreno é formado por dois isoprenos ( $C_{10}$ ). Em mamíferos, terpenos são responsáveis pela estabilização de membranas plasmáticas, participam de rotas metabólicas e são reguladores de reações enzimáticas. Um dos principais exemplos é o colesterol, um triterpreno (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2006; PADUCH et al., 2007).

O esteviol ( $C_{20}H_{30}O_3$ ) é uma molécula que pertence à subclasse dos diterpenos e pode ser extraída das folhas de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, uma planta nativa da América do Sul que é utilizada pelos povos locais como remédio natural e adoçante há centenas de anos. Nas folhas, a molécula de esteviol encontra-se associada a carboidratos, formando os glicosídeos de esteviol. Os principais glicosídeos encontrados nas folhas de *S. rebaudiana* são: esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A-F e dulcosídeo A (**Fig. 1**). Estes glicosídeos variam em sua estrutura química, de acordo com a posição e a quantidade de resíduos de carboidratos associados à sua aglucona, o esteviol. A partir da degradação desses glicosídeos, por meio de hidrólise enzimática e hidrólise ácida, esteviol e isoesteviol são obtidos, respectivamente (**Fig. 2**) (MOSETTIG et al., 1963; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009; LEMUS-MONDACA et al., 2012; CEUNEN; GEUNS, 2013).

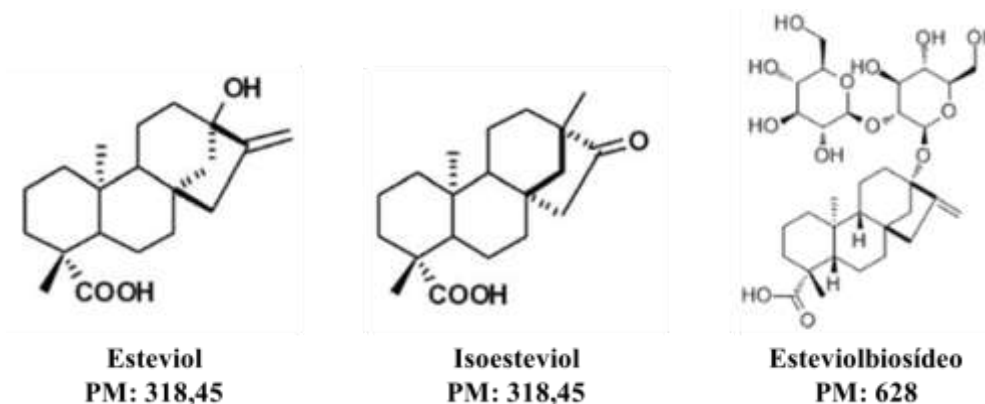
Nas últimas décadas, o grande poder edulcorante não-calórico do esteviosídeo atraiu a atenção da indústria e, desde então, tem sido utilizado como adoçante em alimentos e bebidas (GEUNS et al., 2003b). Após a ingestão, o esteviosídeo é metabolizado pela microbiota intestinal em esteviolbiosídeo e depois em esteviol, sendo este último absorvido no trato gastrointestinal. O esteviol absorvido é, então, transportado para o fígado e depois excretado na bile e urina na forma de esteviol e esteviol glicuronídeo (CARDOSO et al., 1996; GARDANA et al., 2003; GEUNS et al.,

2006; WHEELER et al., 2008; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009). Mais recentemente, o rebaudiosídeo A tornou-se a molécula de escolha entre os glicosídeos de estévia, sendo cada vez mais utilizado como edulcorante em sucos e refrigerantes pela indústria alimentícia, devido à sua maior palatabilidade. A metabolização da molécula de rebaudiosídeo A pela microbiota intestinal é bastante similar à do esteviosídeo, sendo apenas o esteviol absorvido pelo epitélio intestinal (ROBERTS; RENWICK, 2008). O metabolismo dos outros glicosídeos de esteviol ocorre de maneira semelhante, primeiramente são degradados em esteviol pela microbiota e então absorvidos (KOYAMA et al., 2003b; RENWICK; TARKA, 2008; PURKAYASTHA et al., 2015).



Composto	R <sup>1</sup> (C-19)	R <sup>2</sup> (C-13)
Esteviol	H	H
Esteviolbiosídeo	H	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
Esteviosídeo	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
Rebaudiosídeo A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
Rebaudiosídeo B	H	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
Rebaudiosídeo C	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
Rebaudiosídeo D	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
Rebaudiosídeo E	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
Rebaudiosídeo F	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Xyl(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
Dulcosídeo A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2 $\rightarrow$ 1)

**Fig. 1.** Estrutura molecular dos glicosídeos de estévia e sua aglucona, o esteviol. Glc: glicose; Rha: ramnose; Xyl: xilose.



**Fig. 2.** Estrutura molecular do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo. PM: peso molecular.

O esteviol é, portanto, o principal metabólito da degradação do esteviosídeo e rebaudiosídeo A após serem ingeridos. O metabolismo hepático do esteviol foi estudado *in vitro* utilizando microssomas hepáticos de ratos e humanos, e metabólitos oxidativos semelhantes foram encontrados nas duas espécies. Esse processo requer um sistema gerador de NADPH, sugerindo a participação do citocromo P450 na oxidação do esteviol (KOYAMA et al., 2003a). Para ser excretada, a molécula de esteviol pode sofrer glicuronidação pelas enzimas UGT2B7 e UGT1A3. Neste processo, um ácido glicurônico é adicionado à molécula de esteviol, aumentando sua solubilidade em água e facilitando a excreção na urina (WANG et al., 2014). A principal via de excreção do esteviol glicuronídeo em ratos é através da bile e, conseqüentemente, fezes. Já em humanos, a excreção se dá predominantemente pela urina (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

#### *Ações biológicas dos derivados de estévia*

Os terpenos são moléculas de natureza lipofílica e, provavelmente, um dos principais alvos de suas ações seja a membrana plasmática. O colesterol, um triterpeno endógeno constituinte das membranas celulares, é o principal regulador da fluidez de membrana, modulando suas fases líquido-ordenada (rígida) e líquido-desordenada (fluida) (HARADA, 2005).

A membrana plasmática é uma estrutura celular constituída principalmente de lipídeos, que se organizam formando uma bicamada, e proteínas inseridas nela. Além

de funcionar como uma barreira física entre o meio intra e extracelular, a membrana também regula as trocas de íons e nutrientes da célula com seu meio externo. Para uma molécula lipofílica atravessar a membrana das células ela deve primeiramente se particionar, ou seja, se solubilizar na membrana, alcançando sua monocamada externa. Em seguida, esta molécula se movimenta no interior hidrofóbico da membrana, sendo translocada (flip-flop) para a monocamada interna. Por fim, realiza a desorção, isto é, a molécula deixa a membrana e se direciona para o meio intracelular. Estas etapas caracterizam a difusão simples (GOÑI, 2014).

Estudos realizados com outros terpenos mostraram que a fluidez da membrana plasmática pode ser influenciada de modo importante por estas moléculas. A glicirrizina, um triterpeno extraído da *Glycyrrhiza glabra* L., conhecida popularmente como alcaçuz, diminui a fluidez de membrana, deixando-a mais rígida, dificultando infecções por vírus (HARADA, 2005). Diterpenos extraídos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) também mostraram efeitos na fluidez em modelos de membranas fosfolipídicas, tornando-as mais rígidas, levando à hipótese de que essas moléculas possuem propriedade antioxidante, justamente pela capacidade de aumentar a rigidez da membrana, dificultando a penetração e propagação de radicais livres em membranas biológicas (PÉREZ-FONS et al., 2006).

Há inúmeros artigos que reportam atividades biológicas dos extratos de *S. rebaudiana* e seus compostos isolados, como por exemplo ações anti-hiperglicêmicas, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, antitumorais, antidiarreicas, diuréticas, imunomodulatórias, antioxidantes, entre outras (PADUCH et al., 2007; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009). Entretanto, é escasso o número de trabalhos descrevendo a interação das agluconas dos glicosídeos de estévia, esteviol e isoesteviol, com as membranas biológicas e seus efeitos em suas propriedades físico-químicas e, nenhum deles demonstrou as cinéticas de ligação e translocação destas moléculas na membrana plasmática.

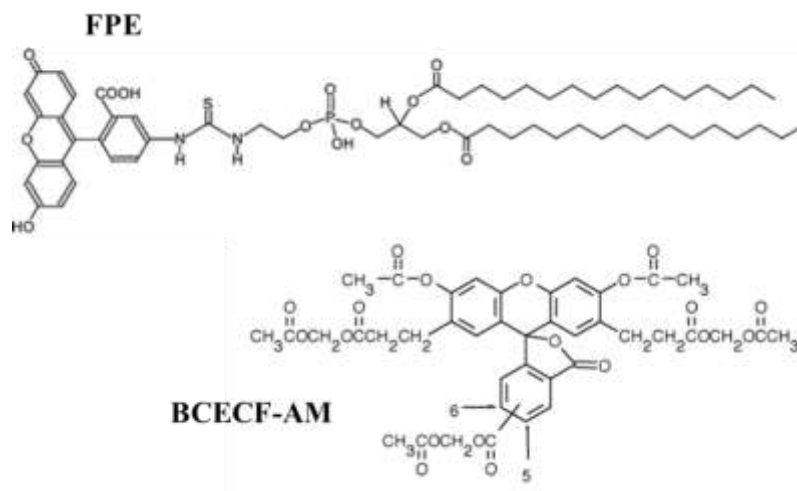
Considerando o caráter lipofílico do esteviol, do isoesteviol e do esteviolbiosídeo, a hipótese deste estudo foi de que essas moléculas são capazes de interagir com a membrana plasmática, podendo influenciar suas propriedades físico-químicas, bem como serem transportadas para o meio intracelular. Para isso, empregamos uma

metodologia baseada em espectroscopia de fluorescência para a avaliar o transporte, em tempo real e sem separação, do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células indiferenciadas e imortalizadas, da linhagem pré-adipocitária 3T3-L1, provenientes de camundongos, utilizando as sondas fluoresceína fosfatidiletanolamina (FPE) e 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(e-6)-carboxifluoresceína éster acetoximetil (BCECF-AM).

- FPE

A sonda FPE é uma molécula de fosfatidiletanolamina com uma fluoresceína ligada ao grupamento polar (**Fig. 3**). Quando adicionado às membranas celulares ou artificiais, a porção apolar (caudas de ácidos graxos) do FPE insere-se na monocamada externa da bicamada lipídica e o grupamento polar (fluoresceína) se posiciona na interface membrana/água. Como a molécula de FPE é grande e polar, a sua difusão através da membrana leva dias e, portanto, na escala temporal do experimento (máximo 3 horas), o FPE se mantém na monocamada externa da membrana celular.

Essa configuração permite à fluoresceína detectar a inserção de cargas que se particionam na monocamada externa da bicamada lipídica e que encontram-se entre os grupamentos polares dos fosfolipídios de membrana, ou seja, a fluorescência de emissão do FPE reporta indiretamente o potencial de superfície (BRUNALDI; HUANG; HAMILTON, 2010; SIMARD et al., 2010).



**Fig. 3.** Estrutura molecular das sondas FPE e BCECF-AM.



Como mostrado na **Figura 2**, o esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo possuem grupamentos passíveis de ionização. A ligação dos produtos de estévia à monocamada externa, com o posicionamento dos grupamentos ionizáveis na interface membrana/água, é detectada pelo FPE. Alterações da fluorescência de emissão do FPE refletem a etapa de ligação dos produtos à membrana plasmática.

- BCECF-AM

A presença de grupamentos éster acetoximetil (AM) na molécula de BCECF-AM a torna não fluorescente e lipossolúvel (**Fig. 3**), facilitando a permeação através da membrana plasmática. Uma vez dentro da célula, esterases não específicas, presentes no citoplasma, clivam os grupamentos AM, gerando a molécula de BCECF, a qual é fluorescente e hidrossolúvel sendo, portanto, retida no meio intracelular.

A sonda BCECF funciona como um sensor do pH intracelular, uma vez que a sua fluorescência é pH-dependente. Quando o pH intracelular diminui, isto é, o meio intracelular torna-se mais ácido, a fluorescência da sonda também diminui devido à protonação dos grupamentos carboxila da molécula. Adicionalmente à informação referente ao pH intracelular, a conversão do BCECF-AM em BCECF pelas esterases intracelulares pode ser utilizada como um indicador de viabilidade celular, sendo a intensidade da fluorescência diretamente proporcional ao número de células viáveis (HAN; BURGESS, 2010).

Neste trabalho, a fluorescência do BCECF foi utilizada como um indicador indireto da translocação (flip-flop) do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1. Como mostrado na **Figura 2**, esses produtos possuem pelo menos um grupamento passível de ionização. Portanto, ao alcançarem a monocamada interna da membrana plasmática e/ou o citoplasma, os grupamentos ionizáveis liberam prótons ( $H^+$ ) para o meio intracelular, acidificando-o. A cinética da mudança da fluorescência da sonda BCECF reporta as etapas de ligação e translocação dos produtos de estévia através da membrana plasmática.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o transporte do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a cinética de ligação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo à membrana plasmática de células 3T3-L1 utilizando a sonda sensível a cargas de superfície FPE;
- Avaliar a cinética de translocação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1 com a sonda sensível a pH intracelular BCECF-AM.

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

*Material:* todo o material necessário para a manutenção da cultura de células foi adquirido da ThermoFisher Scientific (IN, EUA). Os produtos de *Stevia rebaudiana*, esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo, foram extraídos e doados pelo Prof. Dr. Sílvio Cláudio da Costa do Departamento de Bioquímica – Núcleo de Estudo em Produtos Naturais (NEPRON-UEM), e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich MO, EUA). As sondas BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(e-6)-carboxifluoresceína éster acetoximetil) e FPE (fluoresceína fofatidiletanolamina) foram adquiridas da ThermoFisher Scientific (IN, EUA) e o ácido oléico da Sigma-Aldrich, (MO, EUA). Para análise das amostras foi utilizado fluorímetro Varian Cary Eclipse locado no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP - UEM).

*Cultivo das células:* as células 3T3-L1 são células provenientes de camundongos, de linhagem pré-adipocitária, indiferenciadas e imortalizadas, com morfologia semelhante a um fibroblasto. O cultivo foi realizado em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino (BCS), glicose 25 mM, glutamina 2 mM, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram mantidas em estufa incubadora umidificada à 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% ar e utilizadas com uma confluência de 80-90%.

*Tampões de medida:* As células 3T3-L1 foram suspensas em tampão contendo ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) 20 mM, NaCl 118 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM e glicose 5,1 mM para as medidas de fluorescência. No protocolo para avaliação do transporte do esteviolbiosídeo foram realizadas adicionalmente medidas em tampão MOPS contendo glicose a 1 mM ou 0 mM. Para calibração da sonda BCECF com nigericina foi utilizado tampão MOPS 20 mM, KCl 135 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM e CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM. O pH foi ajustado para 7,4 em todos os experimentos e a temperatura era controlada em 37 °C.

*Ensaio de fluorescência:* ao atingirem 80-90% de confluência, as células foram lavadas três vezes com tampão MOPS (pH 7,4) e incubadas com BCECF-AM (2  $\mu$ M) por 20 min ou com FPE (9  $\mu$ M) por 2 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram tratadas com tripsina (Sigma-Aldrich MO, EUA), incubadas em estufa a 37°C por 1 minuto. Após a dissociação foram adicionados 2 mL de tampão MOPS e todo conteúdo transferido para um cubo cônico e levado à centrifugação. As células foram lavadas e centrifugadas por duas vezes (5 min, 2.000 rpm) e, por fim, mantidas em suspensão em tampão MOPS à 37°C.

*Estimativa do número de células em suspensão:* após a lavagem, o número de células em suspensão foi estimado utilizando câmara de Neubauer. Foram utilizadas nos experimentos, suspensões com concentrações entre 3 e 6  $\times 10^5$  células/mL.

*Medidas de fluorescência:* as medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse (modo Kinetics para FPE e modo Ratio para BCECF). A excitação do FPE foi em 490 nm e a emissão coletada em 520 nm. A fluorescência do BCECF foi medida usando excitação de 439 nm e 505 nm e emissão coletada em 535 nm. A razão entre as intensidades de fluorescência obtidas nesses dois comprimentos de onda de excitação ( $R = I_{505}/I_{439}$ ) foi utilizada para eliminar alguns artefatos relacionados à medida de pH intracelular pela sonda BCECF, tais como: fotorredução, vazamento e carregamento não uniforme do BCECF. As amostras contendo células foram diluídas em tampão MOPS na proporção 1:1, resultando em uma suspensão de células marcadas com as sondas FPE ou BCECF com volume final 2,0 mL na cubeta. A intensidade de fluorescência de cada sonda foi monitorada continuamente em tempo real, antes, durante e após a adição dos produtos de estévia. As medidas foram realizadas em temperatura controlada em 37 °C.

*Calibração do pH com nigericina:* a relação entre o pH intracelular e a fluorescência da sonda BCECF foi obtida após a permeabilização das células com 10  $\mu$ M de nigericina, um ionóforo que transporta íons K<sup>+</sup> e H<sup>+</sup> e equilibra o pH extracelular com o pH intracelular (ZAVOICO; CRAGOE; FEINSTEIN, 1986). O pH externo foi modificado pela

adição de alíquotas de NaOH ou HCl ao tampão e medido com pHmetro (Hanna Instruments, Inc. RI, USA) conectado a um eletrodo para microvolumes (Analyser Com Ind, LTDA. SP, BRA).

*Análise dos dados:* a análise dos dados de fluorescência foi feita com auxílio do software GraphPad Prism 5. Os dados foram expressos como a razão entre a medida de fluorescência após e antes da adição dos produtos,  $R/R_0$ . A linha de base ( $R_0$ ), por sua vez, foi obtida pela média do registro nos primeiros 120 segundos após estabilização do sinal.

## 4 RESULTADOS

---

---

4.1. Avaliação da ligação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo à monocamada externa da membrana plasmática de células 3T3-L1 marcadas com a sonda sensível a cargas de superfície FPE.

A **Figura 4** representa o espectro de emissão da sonda FPE após incubação das células 3T3-L1 por 2 horas, seguida de dissociação das células da placa de cultura, lavagem e centrifugação para eliminação da sonda não ligada. As células encontravam-se suspensas em tampão MOPS livre de albumina. Nestas condições, a sonda FPE particiona-se na monocamada externa da membrana plasmática de células 3T3-L1. Como reportado na literatura (THELEN et al., 1984), o pico de emissão do FPE, quando a sonda é excitada à 495 nm, foi de 518 nm.

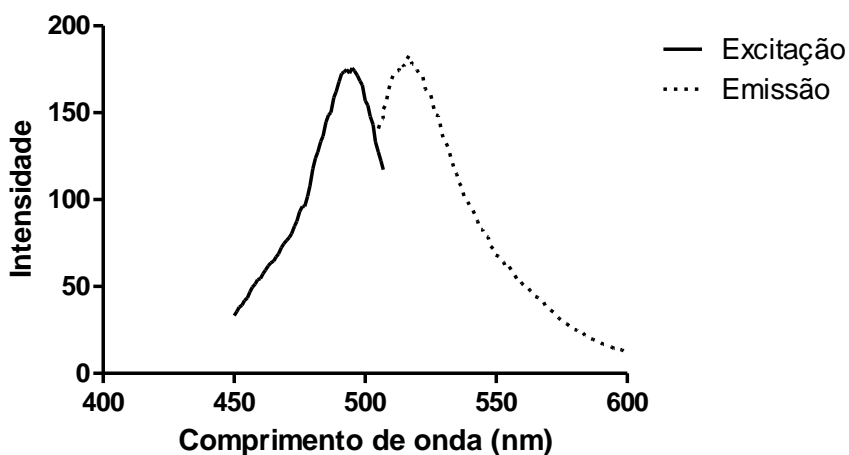
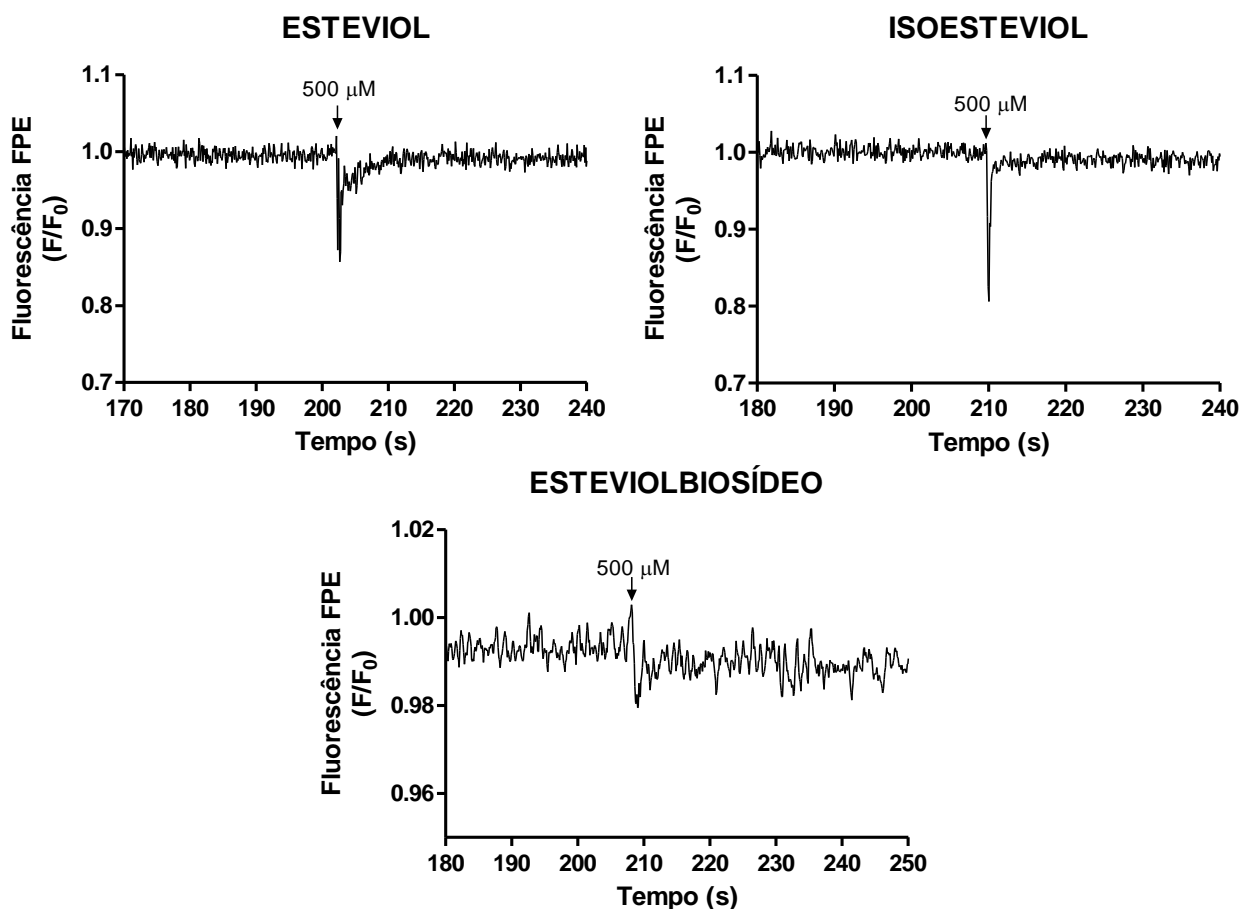


Fig. 4. Espectro de excitação e emissão da sonda FPE.

A **Figura 5** apresenta os dados de um experimento representativo, entre três realizados, no qual a intensidade da fluorescência do FPE, inserido na monocamada externa da membrana plasmática de células 3T3-L1, foi monitorada ao longo do tempo, após a adição de 500  $\mu$ M de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo ao tampão externo. O esteviol e o isoesteviol promoveram uma redução, em segundos, da intensidade da fluorescência do FPE ( $t_{1/2} < 2$  segundos), seguida de um retorno à linha de base, também em segundos. A redução da fluorescência do FPE é indicativo da inserção de cargas negativas na interface água/membrana.



**Fig. 5.** Resultados de um experimento representativo da avaliação da ligação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo à monocamada externa da membrana plasmática de células 3T3-L1 marcada com a sonda sensível a cargas de superfície FPE. As setas indicam o momento da adição de 2,5  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque dos produtos da estévia a 400 mM em DMSO. O volume de tampão MOPS livre de albumina era de 2 mL e a concentração de células de  $4,3 \times 10^5$  células/mL. A concentração final dos produtos da estévia na cubeta foi de 500  $\mu\text{M}$  por adição. FPE foi excitado a 495 nm e a emissão coletada a 518 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm; ( $n=3$ ). Para os demais experimentos os resultados se mostraram semelhantes.

Ao se comparar os dados obtidos com esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo para este experimento representativo, observa-se que a magnitude da redução da fluorescência após a adição de esteviol e isoesteviol foi consideravelmente maior do que a registrada com esteviolbiosídeo (delta de 0,13 para o esteviol, de 0,2 para o isoesteviol e 0,02 para o esteviolbiosídeo). Ainda, o retorno à linha de base mostrou-se ligeiramente mais lento ( $\sim 7$  s) com o esteviol em relação ao isoesteviol.

Diferentemente dos outros glicosídeos da estévia, o esteviolbiosídeo apresenta um grupamento carboxila ionizável e, portanto, sua ligação à membrana plasmática é passível de detecção pelo FPE. Como mostrado na **Figura 5**, a adição do

esteviolbiosídeo ao meio, também na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , causou uma discreta alteração no nível de fluorescência do FPE. Esses dados indicam que o esteviolbiosídeo não se particiona na membrana plasmática da mesma forma que as agluconas.

#### *4.2. Avaliação da translocação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1 carregadas com a sonda sensível a pH intracelular BCECF.*

A medida da fluorescência da sonda BCECF, por si, constitui um indicativo da viabilidade celular, pois a conversão de BCECF-AM (forma penetrante e não fluorescente) em BCECF (forma retida e fluorescente) ocorre apenas no citoplasma por ação de esterases. De forma consistente, nos experimentos com BCECF foram obtidas linhas de base com valores de R (I505/I439) em torno de 10 a 12 para uma concentração de células de  $4 \times 10^5$  células/mL (dados não mostrados, uma vez que as razões expostas no eixo Y dos gráficos foram apresentadas na forma de  $R/R_0$ ). Assim, determinou-se que eventuais preparações com linha de base fora da faixa estabelecida seriam descartadas por, provavelmente, refletirem uma viabilidade celular reduzida.

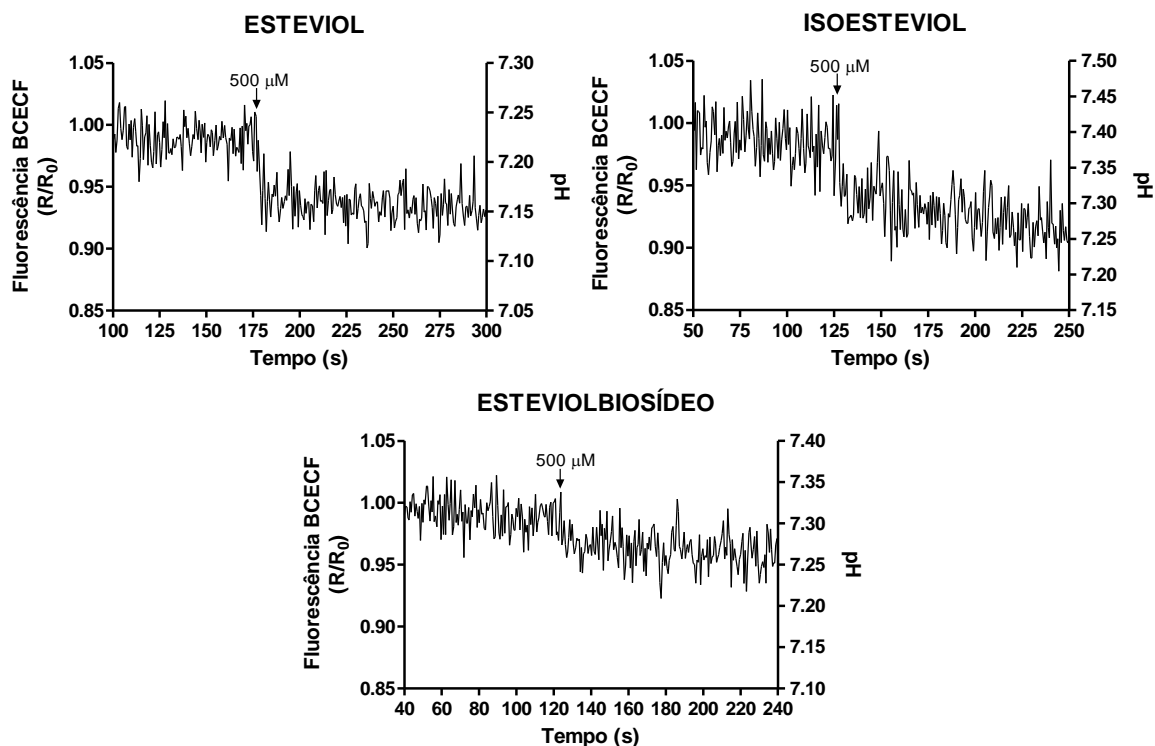
Na **Figura 6** pode-se observar os dados de um experimento representativo, entre quatro realizados, no qual a razão da fluorescência ( $R/R_0$ ) da sonda BCECF foi monitorada ao longo do tempo após a adição de 500  $\mu\text{M}$  de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo ao tampão externo. O esteviol e o isoesteviol promoveram uma redução da razão de fluorescência do BCECF em segundos ( $t_{1/2} < 2$  segundos), sem recuperação da fluorescência por, pelo menos, 200 segundos (tempo médio de observação para cada adição). Assim como observado nos experimentos com FPE, o efeito do isoesteviol foi um pouco maior em magnitude quando comparado ao efeito do esteviol. A redução da fluorescência do BCECF é indicativo de acidificação do meio intracelular, provavelmente promovida pela liberação de prótons dissociados dos grupamentos ionizáveis do esteviol e isoesteviol que alcançaram a monocamada interna da membrana plasmática. A adição de esteviol causou uma diminuição do pH intracelular de aproximadamente 7,25 para 7,15 ( $\Delta\text{pH} = 0,10$ ), enquanto o isoesteviol



diminuiu o pH intracelular de 7,37 para 7,25 ( $\Delta\text{pH} = 0,12$ ) para este experimento representativo.

O esteviolbiosídeo, por sua vez, causou apenas uma discreta diminuição no pH intracelular de 7,31 para 7,25 ( $\Delta\text{pH} = 0,06$ ).

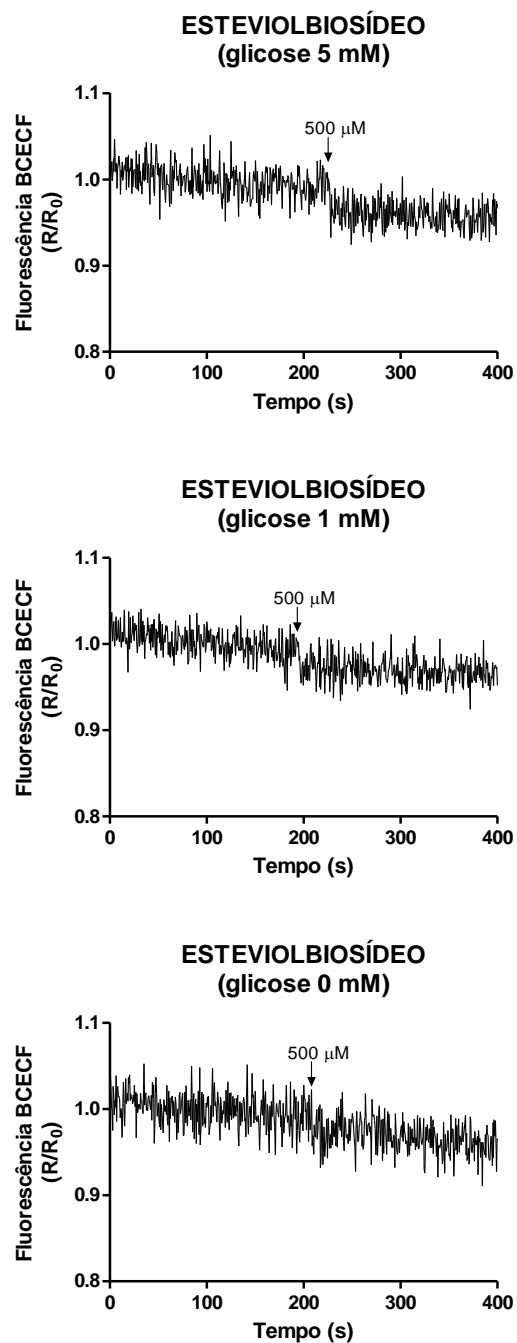
Ao final de cada experimento, a adição de 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foi realizada como um controle da integridade da membrana plasmática e, conseqüentemente, da viabilidade celular (dados não mostrados). Como esperado, houve uma alcalinização do meio intracelular, devido à rápida difusão do  $\text{NH}_3$  (dissociado do  $\text{NH}_4^+$ ) para dentro da célula e, a subsequente combinação da maioria destas moléculas com  $\text{H}^+$  intracelular.



**Fig. 6.** Resultados de um experimento representativo da avaliação da translocação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1 carregadas com a sonda sensível a pH intracelular BCECF. As setas indicam adições de 2,5  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque dos produtos da estévia a 400 mM em DMSO. O volume de tampão MOPS livre de albumina era de 2 mL e a concentração de células de  $4,1 \times 10^5$  células/mL. A concentração final dos produtos da estévia na cubeta foi de 500  $\mu\text{M}$  por adição. BCECF foi excitado a 439 e a 505 nm e a emissão coletada a 535 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm; (n=4). Para os demais experimentos os resultados se mostraram semelhantes.

A **Figura 7** apresenta os resultados de um experimento representativo, no qual o esteviolbiosídeo (500  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado às células em tampão MOPS contendo 0, 1 ou 5 mM de glicose. Nas três situações experimentais, o esteviolbiosídeo provocou

pequenas diminuições, de magnitudes semelhantes, na razão de fluorescência do BCECF, de aproximadamente 0,04.



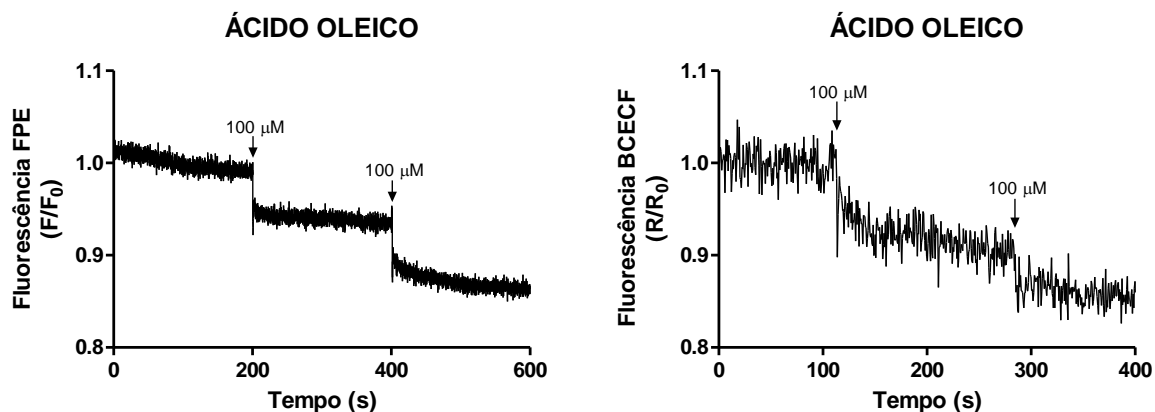
**Fig. 7.** Resultados de um experimento representativo da avaliação da translocação do esteviolbiosídeo através da membrana plasmática de células 3T3-L1 carregadas com a sonda sensível a pH intracelular BCECF em meio contendo tampão MOPS com 5 mM, 1 mM ou 0 mM de glicose. Nas setas indicadas foram adicionados 2,5  $\mu$ L de uma solução estoque dos produtos da estévia a 400 mM em DMSO. O volume de tampão MOPS livre de albumina era de 2 mL e a concentração de células de  $4,4 \times 10^5$  células/mL. A concentração final do esteviolbiosídeo na cubeta foi de 500  $\mu$ M por adição. BCECF foi

excitado a 439 e a 505 nm e a emissão coletada a 535 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm; (n=4).

#### 4.3. Avaliação da ligação e translocação do controle ácido oléico através da membrana plasmática de células 3T3-L1 por meio das sondas FPE e BCECF.

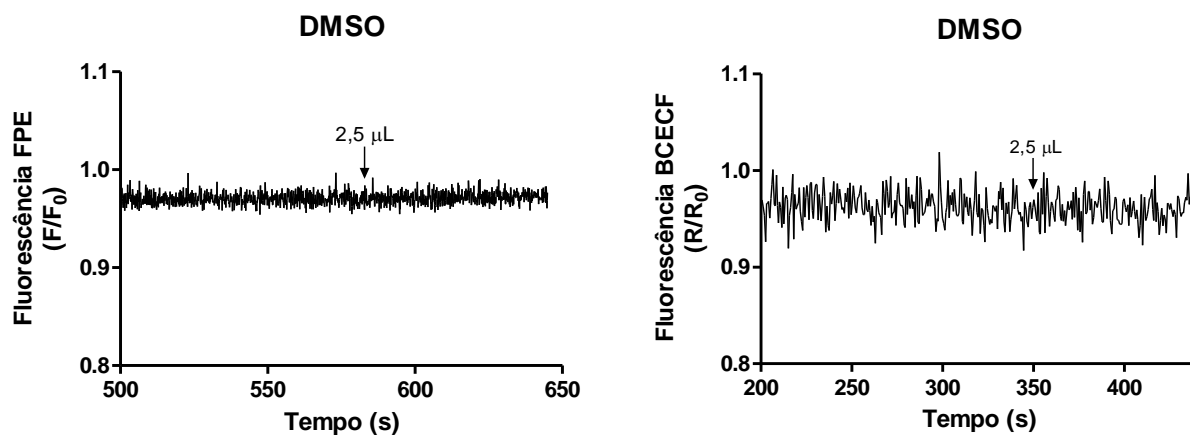
A **Figura 8** mostra os dados de um experimento representativo, no qual utilizou-se, como controle, a adição de ácido oléico ao meio contendo células 3T3-L1. Como previamente reportado na literatura (BRUNALDI; HUANG; HAMILTON, 2010), o ácido oléico promoveu uma redução em segundos da fluorescência tanto do FPE, quanto do BCECF ( $t_{1/2} < 2$  segundos), indicativos de sua ligação e translocação através da membrana plasmática, respectivamente.

Diferentemente de nossos resultados observados com esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo, não houve uma recuperação da razão de fluorescência da sonda FPE. Esse dado indica que as moléculas de ácido oléico se particionaram na membrana plasmática e, após atingido o equilíbrio, parte delas permaneceram inseridas na monocamada externa da membrana. Com este experimento controle pode-se confirmar que as sondas fluorescentes estavam corretamente posicionadas nas células e respondendo de acordo com o reportado por outros autores.



**Fig. 8.** Resultados de um experimento representativo da avaliação da ligação e translocação do ácido oléico através da membrana plasmática de células 3T3-L1 por meio das sondas FPE (painel esquerdo) e BCECF (painel direito) (experimentos controle). Nas setas indicadas foram adicionados 20  $\mu$ L de uma solução estoque de ácido oléico a 10 mM em DMSO. O volume de tampão MOPS livre de albumina era de 2 mL e a concentração de células de  $4 \times 10^5$  células/mL. A concentração final de ácido oléico na cubeta foi de 100  $\mu$ M por adição. FPE foi excitado a 495 nm e a emissão coletada em 518 nm. BCECF foi excitado a 439 e a 505 nm e a emissão coletada em 535 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm; (n=3).

É importante ressaltar que outros experimentos controles foram realizados (**Fig. 9**) com a adição do veículo DMSO puro (nos volumes de 2, 10 e 20  $\mu\text{L}$ ) ao meio contendo células 3T3-L1 em suspensão, com o objetivo de avaliar se o veículo, por si, era capaz de alterar o nível de fluorescência das sondas FPE e BCECF. A análise dos dados mostrou que nenhuma das sondas utilizadas respondeu ao DMSO, indicando que as alterações nos níveis basais de fluorescência observados foram causadas, de fato, pelos produtos de estévia analisados.



**Fig. 9.** Resultados de um experimento representativo com a adição de DMSO puro ao meio externo contendo células 3T3-L1, utilizando as sondas FPE (painel esquerdo) e BCECF (painel direito) (experimentos controle). Nas setas indicadas foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de DMSO. O volume de tampão MOPS livre de albumina era de 2 mL e a concentração de células de  $4 \times 10^5$  células/mL. FPE foi excitado a 495 nm e a emissão coletada em 518 nm. BCECF foi excitado a 439 e a 505 nm e a emissão coletada em 535 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm; (n=4).

# 5 DISCUSSÃO

---

---

Apesar do grande número de artigos demonstrando as propriedades biológicas e o potencial terapêutico de diferentes derivados de estévia (PADUCH et al., 2007; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009), poucos dedicaram-se a investigar a interação destes produtos com membranas celulares sob um ponto de vista biofísico (GEUNS et al., 2003a; KOYAMA et al., 2003a). Neste estudo, utilizando células 3T3-L1, evidenciou-se, de fato, que há uma rápida interação de produtos da estévia com as membranas biológicas e demonstrou-se pela primeira vez, experimentalmente, que as moléculas de esteviol e, seu isômero, isoesteviol ligam-se em segundos à membrana plasmática, alcançando o meio intracelular.

Destaque maior deve ser dado ao esteviol, uma vez que este é uma das poucas moléculas circulantes no plasma, quer seja pela absorção intestinal ou processamento hepático, após diferentes formas de administração de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (CARDOSO et al., 1996; GARDANA et al., 2003; GEUNS et al., 2006; WHEELER et al., 2008; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009; WANG et al., 2014). Ainda, nossos resultados detalham de forma inédita, a cinética de particionamento e translocação destes compostos através da membrana plasmática, em tempo real e sem a necessidade de métodos de separação.

## *Ligação dos produtos de estévia monitorada pela sonda FPE*

A análise em conjunto dos resultados obtidos com a sonda FPE (**Fig. 5**), indicam que o esteviol e o isoesteviol ligam-se de forma rápida (em segundos) à monocamada externa da membrana plasmática, causando uma imediata diminuição da fluorescência, seguida de uma recuperação praticamente total do sinal aos valores basais, em menos de 2 segundos. Entretanto, esses dados diferem dos obtidos nos experimentos controle com ácido oléico (**Fig. 8**), onde não se observa a recuperação da fluorescência do FPE.

No caso do ácido oléico, o resultado é atribuído à presença de ânions na monocamada externa, após o equilíbrio ter sido atingido, ou seja, o ácido oléico ter-se

distribuído entre as duas monocamadas da membrana. De acordo com o modelo de flip-flop proposto por Kamp et al. (1995), 50% do ácido oléico que se particiona na membrana encontra-se na forma ionizada, pois o pKa aparente deste ácido no ambiente hidrofóbico da membrana é de aproximadamente 7,6, muito próximo do pH fisiológico de 7,4.

Por sua vez, o retorno da fluorescência do FPE aos valores basais observado nos experimentos com esteviol e isoesteviol refletem o “desaparecimento” das cargas negativas, inicialmente inseridas na monocamada externa pelo particionamento dos grupamentos ionizáveis carboxila e, possivelmente, hidroxila na interface água/membrana. Tal achado poderia ser explicado pelo: 1) particionamento da forma ionizada do esteviol e isoesteviol na membrana plasmática, seguido de difusão e dissociação para o citoplasma, levando a uma depleção de moléculas na membrana (meio intracelular como um “sink”, isto é, um local para onde as moléculas se direcionam); neste cenário, a cinética de retorno da fluorescência poderia refletir as etapas de translocação e desorção combinadas; 2) particionamento da forma ionizada do esteviol e isoesteviol, seguido de difusão sem desorção; sendo apenas a monocamada externa depletada de moléculas (monocamada interna como um “sink”); neste cenário, a cinética de retorno da fluorescência poderia refletir apenas a etapa de translocação (flip-flop) da forma ionizada; 3) particionamento da forma ionizada do esteviol e isoesteviol com parte das moléculas difundindo-se para a monocamada interna. Neste caso, o remanescente na monocamada externa sofreria rearranjo, com suas cargas negativas neutralizadas ou posicionadas afastadas do FPE.

Não são do nosso conhecimento dados experimentais que demonstrem o pKa do esteviol e isoesteviol em solução ou em membranas. Entretanto, simulações computacionais preveem um pKa de aproximadamente 5,0 para essas moléculas em solução (CHEMSPIDER, 2017; FOODB, 2017). Portanto, nas condições experimentais de pH 7,4, a maior parte dos produtos da estévia estaria ionizada no tampão. 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 et al., 1995).

Nossos dados experimentais com FPE indicam que o esteviol e isoesteviol conferem cargas negativas à membrana (diminuição da fluorescência). Assim, pode-se inferir que o pKa dessas moléculas na membrana é menor do que 7,4, em caso contrário, teríamos o predomínio da espécie protonada (neutra) na membrana, sem qualquer alteração da fluorescência do FPE. Portanto, a recuperação secundária da fluorescência do FPE é indicativo de um “desaparecimento” das espécies ionizadas da monocamada externa.

Se partirmos da premissa de que as duas espécies, ionizada e protonada, encontram-se particionadas na membrana, podemos considerar que o flip-flop da espécie ionizada promove o retorno da fluorescência, uma vez que apenas esta é detectada pelo FPE, o que, por si, não exclui a possibilidade de permanência de espécies protonadas na monocamada externa.

Apesar do elevado coeficiente de partição membrana/água das agluconas, a transferência da forma ionizada da membrana para o citoplasma poderia ser favorecida pela ligação às proteínas intracelulares e/ou particionamento em membranas intracelulares, levando à recuperação da fluorescência do FPE. A possibilidade de um retorno da forma ionizada ao meio extracelular também poderia ser considerada, entretanto, seria dependente de gradiente eletroquímico e, possivelmente, de um gradiente de pH.

Ainda, há a possibilidade de que a fluorescência do FPE apenas reporte a ligação dos produtos da estévia à membrana. Inicialmente, as espécies ionizadas, presentes em alta concentração no meio externo ( $pK_a < 7,4$ ), se particionariam na membrana, reduzindo a fluorescência do FPE. Na sequência, um novo equilíbrio de ionização na superfície da membrana é estabelecido ( $pK_a > 7,4$ ), a concentração das espécies protonadas aumentaria na monocamada externa, o que reduziria a fluorescência do FPE pela neutralização das cargas negativas.

#### *Monitoramento da translocação pela sonda BCECF*

A adsorção e translocação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo (**Fig. 6**) podem ser inferidas pela queda da fluorescência do BCECF e apresentam fenômenos com perfil bem semelhante ao observado para o ácido oleico (**Fig. 8**). Os dados obtidos

com BCECF, por sua vez, indicam a ligação e flip-flop da forma protonada (dada a ocorrência de acidificação do meio intracelular). Comparando-se os dados de FPE com de BCECF, observa-se que a redução da fluorescência de ambas as sondas ocorreu na mesma escala temporal, ou seja, menos que 2 segundos.

A análise combinada dos resultados indica que ambas as espécies, ionizada e protonada, estão presentes na membrana plasmática, apresentando cinéticas de ligação semelhantes e cinéticas de translocação diferentes. Os resultados com BCECF não possibilitam a diferenciação entre a ligação e flip-flop da forma protonada, ou seja, essas duas etapas ocorrem em menos de 2 segundos. Porém, como a redução da fluorescência do BCECF ocorre antes da recuperação da fluorescência do FPE, pode-se inferir que a taxa de flip-flop da forma protonada é mais rápida do que o da forma ionizada, gerando um gradiente de pH favorável à translocação da forma ionizada, evidenciada pela recuperação da fluorescência do FPE.

#### *Comparação entre as respostas ao esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo*

Ao se comparar o efeito da adição de uma mesma concentração de esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo às células com FPE e BCECF (**Fig. 5 e 6**), observou-se uma tendência a reduções um pouco mais intensas da fluorescência induzidas pelo isoesteviol do que pelo esteviol nas duas sondas. O esteviolbiosídeo, por sua vez, afetou muito pouco a fluorescência do FPE e do BCECF, quando comparado com as agluconas. Esses dados apontam para uma maior permeabilidade da membrana plasmática ao isoesteviol, seguido pelo esteviol e, comparativamente, bem menor para o esteviolbiosídeo. Essas diferenças de respostas podem, em parte, ser explicadas pelas diferenças nas propriedades físico-químicas dessas moléculas.

Como mostrado na **Figura 2**, o esteviol, isoesteviol e o esteviolbiosídeo podem ser consideradas moléculas anfifílicas, com um grupamento de anéis hidrofóbicos ciclopentanoperidrofenantreno (MOSETTIG; NES, 1955) e grupamentos polares e hidrofílicos carboxila, hidroxila e resíduos de glicose, no caso do esteviolbiosídeo. O esteviol possui dois grupamentos ionizáveis, uma carboxila (C-4) e uma hidroxila (C-13). Entretanto, o seu isômero, o isoesteviol possui uma carbonila (C-16) e um grupamento carboxila (C-4) e, dessa forma, apenas um grupamento ionizável.



Finalmente, o esteviolbiosídeo possui apenas uma carboxila ionizável (C-4) e duas moléculas de glicose ligadas ao radical hidroxila (C-13).

Novamente, se considerarmos que no pH fisiológico (7,4) todos os grupamentos ionizáveis do esteviol e isoesteviol estejam ionizados ( $pK_a < 7,4$ ), ou seja, carregados, o esteviol apresentaria 2 cargas negativas e o isoesteviol uma carga negativa resultante. Sabe-se que moléculas carregadas se particionam e se translocam em menor extensão através do ambiente hidrofóbico de membranas, o que explicaria a menor afinidade do esteviol pela membrana plasmática.

Por outro lado, os resultados com o esteviolbiosídeo apontam para uma menor permeabilidade da membrana plasmática a esse glicosídeo comparado às agluconas esteviol e isoesteviol. É bem conhecido que a permeabilidade da membrana a uma molécula é diretamente proporcional ao coeficiente de partição membrana/água, o qual é elevado para moléculas lipossolúveis, e inversamente proporcional ao tamanho da molécula. No caso do esteviolbiosídeo, a presença de resíduos de glicose torna a molécula maior e mais hidrofílica.

Foi demonstrado que a molécula de esteviol é capaz de atravessar monocamadas de células Caco-2, exibindo um comportamento de transporte com características de difusão passiva transcelular. Neste estudo, o transporte de esteviol não foi dependente da concentração e foi muito maior que o transporte medido para esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Na dose de 1 mM o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) do esteviol foi de  $31,9 \pm 3,4 \times 10^{-6}$  cm/s, enquanto do esteviosídeo e rebaudiosídeo A foi de  $0,16 \pm 0,01 \times 10^{-6}$  cm/s e  $0,11 \pm 0,03 \times 10^{-6}$  cm/s, respectivamente (GEUNS et al., 2003a). Ainda, experimentos *ex vivo*, utilizando o método do saco intestinal invertido, revelaram que o esteviol apresenta um maior índice de transporte (razão da concentração serosa/mucosa) no duodeno-jejuno e íleo quando comparado aos índices do esteviosídeo, rebaudiosídeo A, rebaudiosídeo C e dulcosídeo A (KOYAMA et al., 2003a). Assim como o esteviolbiosídeo, os glicosídeos de estévia supracitados possuem moléculas de glicose associadas, o que provavelmente explica o fato de seus  $P_{app}$  e índices de transporte serem menores que do esteviol.

Estudos ainda em células Caco-2 mostraram que o ácido benzóico (10 mM), um ácido que possui em sua estrutura um anel aromático e um grupo carboxila, diminuiu em 33% o transporte do esteviol (100  $\mu$ M). Concluiu-se dessa forma que, além da difusão simples, a absorção do esteviol pelas células Caco-2 também poderia ser explicada parcialmente pela difusão facilitada mediada por transportador de ácido monocarboxílico (GEUNS et al., 2003a).

#### *Esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo acidificam o meio intracelular*

O pH intracelular é um parâmetro fisiológico muito crítico e altamente controlado. Mudanças no pH intracelular podem acarretar alterações na estrutura e na atividade de macromoléculas, por exemplo, a conformação tridimensional de proteínas e atividade enzimática. Existem grandes evidências que modificações no pH intracelular desempenham o papel de segundo mensageiro no ambiente intracelular. Por exemplo, alterações na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  e no pH intracelular estão frequentemente associadas, assim como concentrações de AMP cíclico (BUSA; NUCCITELLI, 1984). A fosfofrutoquinase, enzima limitante da via glicolítica, e a proteína quinase S6 ribossomal são altamente sensíveis às variações de pH intracelular (TRIVEDI; DANFORTH, 1966; CHAMBARD, POUYSSEGUR, 1986). Mudanças no pH intracelular modificam a endocitose de transferrina e de fatores de crescimento epidermal (SANDVIG et al., 1987), também modulam a geração de superóxido e a motilidade (quimiotaxia) de neutrófilos (SIMCHOWITZ, 1985; SIMCHOWITZ; CRAGOE, 1986).

A variação de pH intracelular provocada pelos derivados de estévia, no momento em que eles realizam o movimento transmembrana, poderia ser uma das maneiras pelas quais esses compostos desempenham suas ações biológicas, tão bem demonstradas na literatura científica. Importante salientar que não é preciso, necessariamente, que a molécula do produto sofra desorção da membrana e adentre, de fato, o citoplasma para que o pH intracelular diminua.

Com base em nossos dados, podemos afirmar que o transporte dos derivados de estévia pelas células é um processo que envolve ao menos 3 fases: (1) difusão dessas

moléculas através do meio aquoso extracelular, (2) adsorção das moléculas na monocamada externa da membrana plasmática, (3) translocação da monocamada externa para a monocamada interna. Se as moléculas de fato sofrem desorção e se estão sendo transportadas por meio de difusão passiva através da membrana, por transportadores ou por ambos, ainda é uma questão que requer estudos posteriores.

Comparando os resultados da adição de esteviolbiosídeo (**Fig. 7**) às células suspensas em tampão de medida contendo glicose nas concentrações de 5, 1 e 0 mM, notamos que não houve diferença significativa na intensidade de resposta da sonda BCECF. Esses dados podem ser interpretados como um indicativo de que não há competição entre moléculas de esteviolbiosídeo e moléculas de glicose pelos transportadores de glicose (GLUT-1) presentes nas células 3T3-L1.

O transporte de ácidos graxos livres de cadeia longa, como o ácido oléico, em adipócitos é mediado por proteínas, que incluem FABPpm, FAT/CD36, caveolina-1, FATP e ACSL, e através de difusão passiva pela membrana (HAMILTON; KAMP, 1999; THOMPSON; LOBO; BERNLOHR, 2010). As células 3T3-L1 constituem uma linhagem celular pré-adipocitária proveniente de camundongos que mantêm a morfologia de um fibroblasto. Contudo, ainda apresentam pouco ou nenhum dos transportadores envolvidos na captação de ácidos graxos (KAMPF; PARMLEY; KLEINFELD, 2007). Logo, é provável que o transporte de ácido oléico nessas células ocorra por meio de difusão passiva e/ou outras proteínas de membrana ainda não conhecidas.

Já existem relatos de interações entre o esteviol e transportadores de ânions orgânicos (OATs) na literatura (CHATSUDTHIPONG; JUTABHA, 2001; SRIMAROENG et al., 2005a; SRIMAROENG et al., 2005b). Os transportadores OAT3, OATP1B1, OATP1B3 e OATP2B1 estão aparentemente envolvidos na captação de esteviol glicuronídeo em células HEK293 transfectadas, com uma maior participação do OAT3, tanto em baixa (5  $\mu$ M) quanto em alta (30  $\mu$ M) concentração (WANG et al., 2015). Esses transportadores são expressos nas células epiteliais de todo o corpo, na barreira hematoencefálica, plexo coróide, fígado, rins, pulmão, intestino, músculo esquelético e placenta, e medeiam a absorção, distribuição e eliminação de drogas (ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2011). Não é de nosso conhecimento que células 3T3-L1 expressem tais transportadores, tampouco há indícios de que eles participem do

transporte destas moléculas, considerando apenas os dados dos experimentos aqui apresentados.

## 6 CONCLUSÃO

---

---

Este estudo apresentou, pela primeira vez, a cinética de ligação do esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo na membrana plasmática de células 3T3-L1. Baseado nos resultados dos experimentos com a sonda FPE, combinados com os da sonda BCECF, concluímos que as agluconas, esteviol e isoesteviol são capazes de ligarem-se rapidamente à monocamada externa da membrana de células 3T3-L1 e serem translocadas através da membrana plasmática, causando considerável acidificação do meio intracelular. A resposta ao glicosídeo, esteviolbiosídeo, entretanto, foi comparativamente menor.

Os dados aqui trazidos preenchem uma importante lacuna na literatura, possibilitando novos estudos para desvendar os mecanismos de ação do esteviol em nível celular e molecular, visto que esta molécula é grande candidata a ser, de fato, a molécula biologicamente ativa nas mais diferentes ações terapêuticas atribuídas aos glicosídeos de estévia.

# REFERÊNCIAS

---

---

BRUNALDI, K.; HUANG, N.; HAMILTON, J. A. Fatty acids are rapidly delivered to and extracted from membranes by methyl-beta-cyclodextrin. **J Lipid Res**, v. 51, n. 1, p. 120-31, 2010.

BUSA, W. B.; NUCCITELLI, R. Metabolic regulation via intracellular pH. **Am J Physiol**, v. 246, n. 4 Pt 2, p. R409-38, 1984.

CARDOSO, V. N. et al. Pharmacokinetic studies of 131I-stevioside and its metabolites. **Nucl Med Biol**, v. 23, n. 1, p. 97-100, 1996.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function. **J Nat Prod**, v. 76, n. 6, p. 1201-28, 2013.

CHAMBARD, J. C.; POUYSSEGUR, J. Intracellular pH controls growth factor-induced ribosomal protein S6 phosphorylation and protein synthesis in the G0---G1 transition of fibroblasts. **Exp Cell Res**, v. 164, n. 2, p. 282-94, 1986.

CHATSUDTHIPONG, V.; JUTABHA, P. Effect of steviol on para-aminohippurate transport by isolated perfused rabbit renal proximal tubule. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298, n. 3, p. 1120-7, 2001.

CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacol Ther**, v. 121, n. 1, p. 41-54, 2009.

CHEMSPIDER. iso-steviol. Disponível em: <<http://chemspider.com/Chemical-Structure.89905.html>>. Acesso em junho de 2017.

DE CARVALHO, C. C.; DA FONSECA, M. M. Biotransformation of terpenes. **Biotechnol Adv**, v. 24, n. 2, p. 134-42, 2006.

FOODB. Showing compound steviol. Disponível em: <<http://foodb.ca/compounds/FDB015642>>. Acesso em junho de 2017.

FOODB. Showing compound steviolbioside. Disponível em: <<http://foodb.ca/compounds/FDB015643>>. Acesso em junho de 2017.

GARDANA, C. et al. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 22, p. 6618-22, 2003.

- GEUNS, J. M. et al. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. **Food Chem Toxicol**, v. 41, n. 11, p. 1599-607, 2003a.
- \_\_\_\_\_. Identification of steviol glucuronide in human urine. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 7, p. 2794-8, 2006.
- \_\_\_\_\_. Metabolism of stevioside by chickens. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 4, p. 1095-101, 2003b.
- GOÑI, F. M. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer-Nicolson model. **Biochim Biophys Acta**, v. 1838, n. 6, p. 1467-76.
- HAMILTON, J. A.; KAMP, F. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? **Diabetes**, v. 48, n. 12, p. 2255-69, 1999.
- HAN, J.; BURGESS, K. Fluorescent indicators for intracellular pH. **Chem Rev**, v. 110, n. 5, p. 2709-28, 2010.
- HARADA, S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. **Biochem J**, v. 392, n. Pt 1, p. 191-9, 2005.
- KAMP, F. et al. Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. **Biochemistry**, v. 34, n. 37, p. 11928-37, 1995.
- KAMPF, J. P.; PARMLEY, D.; KLEINFELD, A. M. Free fatty acid transport across adipocytes is mediated by an unknown membrane protein pump. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 5, p. E1207-14, 2007.
- KOYAMA, E. et al. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. **Food Chem Toxicol**, v. 41, n. 3, p. 359-74, 2003a.
- \_\_\_\_\_. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. **Food Chem Toxicol**, v. 41, n. 6, p. 875-83, 2003b.
- LEMUS-MONDACA, R. et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chem**, v. 132, n. 3, p. 1121-32, 2012.
- MOSETTIG, E. et al. The absolute configuration of steviol and isosteviol. **J Am Chem Soc**, v. 85, n. 15, p. 2305-9, 1963.
- MOSETTIG, E.; NES, W. R. Stevioside. II. The structure of the aglucon. **J Org Chem**, v. 20, n. 7, p. 884-99, 1955.

- PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 55, n. 5, p. 315-27, 2007.
- PÉREZ-FONS, L. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. **Arch Biochem Biophys**, v. 453, n. 2, p. 224-36, 2006.
- PURKAYASTHA, S. et al. In vitro metabolism of rebaudioside E under anaerobic conditions: Comparison with rebaudioside A. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 72, n. 3, p. 646-57, 2015.
- RENWICK, A. G.; TARKA, S. M. Microbial hydrolysis of steviol glycosides. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. S70-4, 2008.
- ROBERTS, A.; RENWICK, A. G. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. S31-9, 2008.
- ROTH, M.; OBAIDAT, A.; HAGENBUCH, B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 5, p. 1260-87, 2011.
- SANDVIG, K. et al. Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. **J Cell Biol**, v. 105, n. 2, p. 679-89, 1987.
- SIMARD, J. R. et al. Caveolins sequester FA on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane, augment triglyceride formation, and protect cells from lipotoxicity. **J Lipid Res**, v. 51, n. 5, p. 914-22, 2010.
- SIMCHOWITZ, L. Intracellular pH modulates the generation of superoxide radicals by human neutrophils. **J Clin Invest**, v. 76, n. 3, p. 1079-89, 1985.
- SIMCHOWITZ, L.; CRAGOE, E. J., JR. Regulation of human neutrophil chemotaxis by intracellular pH. **J Biol Chem**, v. 261, n. 14, p. 6492-500, 1986.
- SRIMAROENG, C. et al. Transport of the natural sweetener stevioside and its aglycone steviol by human organic anion transporter (hOAT1; SLC22A6) and hOAT3 (SLC22A8). **J Pharmacol Exp Ther**, v. 313, n. 2, p. 621-8, 2005a.
- \_\_\_\_\_. Interactions of stevioside and steviol with renal organic anion transporters in S2 cells and mouse renal cortical slices. **Pharm Res**, v. 22, n. 6, p. 858-66, 2005b.
- THELEN, M. et al. The use of fluorescein-dipalmitoylphosphatidylethanolamine for measuring pH-changes in the internal compartment of phospholipid vesicles. **Biochim Biophys Acta**, v. 766, n. 1, p. 161-8, 1984.



THOMPSON, B. R.; LOBO, S.; BERNLOHR, D. A. Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. **Mol Cell Endocrinol**, v. 318, n. 1-2, p. 24-33, 2010.

TRIVEDI, B.; DANFORTH, W. H. Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. **J Biol Chem**, v. 241, n. 17, p. 4110-2, 1966.

WANG, M. et al. Steviol glucuronidation and its potential interaction with UDP-glucuronosyltransferase 2B7 substrates. **Food Chem Toxicol**, v. 64, p. 135-43, 2014.

\_\_\_\_\_. Transmembrane transport of steviol glucuronide and its potential interaction with selected drugs and natural compounds. **Food Chem Toxicol**, v. 86, p. 217-24, 2015.

WHEELER, A. et al. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. S54-60, 2008.

ZAVOICO, G. B.; CRAGOE, E. J.; FEINSTEIN, M. B. Regulation of intracellular pH in human platelets. **J Biol Chem**, v. 261, n. 28, p. 13160-7, 1986.