UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

YURIKA OKAMOTO IWAKI

Interação de capsaicinóides com sistema modelo de membrana celular

São Carlos 2016

## YURIKA OKAMOTO IWAKI

# Interação de capsaicinóides com sistema modelo de membrana celular

## Versão corrigida

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Thatyane Morimoto Nobre

São Carlos 2016 AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Iwaki, Yurika Okamoto
I96i Interação de capsaicinóides com sistema modelo de membrana celular / Yurika Okamoto Iwaki; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Junior; coorientadora Thatyane Morimoto Nobre. São Carlos, 2016.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento Caracterização e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.
1. Capsaicinóides. 2. Pimenta malagueta. 3. Pimenta dedo-de-moça. 4. Monocamadas de Langmuir. 5. Filmes de Langmuir-Blodgett. 6. Lipossomos. I. Título.

# FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira YURIKA OKAMOTO IWAKI.

Título da tese: "Interação de capsaicinóides com sistema modelo de membrana celular".

Data da defesa: 18/04/2016.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Titular Osvaldo Novais de Oliveira Junior

(Orientador) (Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Profa. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Prof. Dr. Antonio Riul Junior

(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Profa. Dra. Marli Leite de Moraes

(Instituto de Ciência e Tecnologia/ICT - UNIFESP)

Profa. Titular Rosângela Itri

(Ínstituto de Física da Universidade de São Paulo/IF-USP)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais: Prof. Titular Antonio José Felix de Carvalho

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Associado Paulo César Lima Segantine Resultado:



APROVADA

APROVADA



apurade

# DEDICATÓRIA

À minha *FAMÍLIA* por todo amor, apoio e compreensão ao longo do período de elaboração deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo privilégio de viver.

Ao meu orientador, prof. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., pela paciência, carinho, orientação e exemplo de dignidade e conhecimento a serem seguidos.

À minha coorientadora, Thatyane Morimoto Nobre Pavinatto, pela paciência, instrução, orientação e conhecimentos compartilhados, sem os quais não teria conseguido concluir este trabalho.

Aos meus pais, Tatuo Iwaki e Mituko Okamoto Iwaki, pela vida, educação e exemplo.

Ao meu amado esposo, Rodrigo Lins Pagliai, pela paciência e incentivo.

Aos meus irmãos, Edson Ryoji Okamoto Iwaki e Erika Okamoto Iwaki, por simplesmente fazerem parte da minha vida; e em especial ao meu irmão Leonardo Eidi Okamoto Iwaki, por sempre me apoiar e me ajudar sempre que precisei.

Ao meu sogro, Antônio Jorge Paulo Pagliai e minha sogra, Thereza Cristina Pessoa Lins Pagliai, por todo carinho e apoio prestados nestes anos.

À minha querida comadre, Dilleys Ferreira da Silva, que esteve presente nesta jornada desde o início dando o privilégio de ser madrinha da amada, Anahi Valentine Ferreira Bachelard.

Às amigas Alessandra Keiko Lima Fujita e Patricia Kaori, por alegrarem minha vida.

Aos queridos amigos da sala, que passaram em minha vida e com certeza deixaram muitas saudades das risadas e tudo mais: Vaninha, Drica, Analine, Rafinha, Alexandre, Fran, Washington, Val, Ju, Andrey, Lívia, Olivia, Lorena, Hevelinne.

Aos amigos da república: Juliano, Daniel, Vitor e Janderson.

Aos amigos, Javier Jurado Moncada, Maria Serrano, Romain Bachelard.

Ao querido amigo Adriano Lopes de Souza, pelas dúvidas sanadas.

Aos queridos técnicos, Débora, Bruno, Felippe, Níbio, Bertho e Ademir, por todo o apoio prestado.

As secretarias Rô e Simone.

Ao secretário, Victor Luiz Bariotto, que sempre me deu suporte.

A Simone Barbosa, pelo apoio em vários experimentos.

A técnica da biofísica, Bel, pelo suporte.

Aos chefes, Paulo Eduardo Vicente Dias, Márcio Zorzetto e Ana Elis Lopes Cláudio, que me deram a oportunidade de concluir essa jornada.

Aos colegas de trabalho da USEXA: Carla, Camila, Walter, Mauricio, Vinicius, Esteban, Roberta, Pedral e Cássia.

Aos colegas de trabalho do LADEM: Salmi, Renata, Diogo, Michelle, Espindola, Fábio, Júlio, Isabel e Aline.

Aos colegas de trabalho do LABMAT, em especial a amiga Erica.

A todos o meu sincero agradecimento.

EPÍGRAFE

"I was taught that the way of progress was neither swift nor easy." – Marie Curie (1867-1934)

#### RESUMO

IWAKI, Y. O. Interação de capsaicinóides com sistema modelo de membrana celular (2016) 120p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016

Este trabalho visa ao entendimento da interação de capsaicinóides com membranas celulares utilizando sistemas modelo. Dentre os alcalóides derivados de plantas do gênero Capsicum, a capsaicina e a dihidrocapsaicina respondem por 90% dos capsaicinóides, que são usados como analgésicos e antiinflamatórios, devido a sua interação específica com receptores. O mecanismo neurofarmacológico já foi bastante estudado, mas o modo de ação não neural ainda não foi elucidado. Usamos extratos brutos (EBs) de pimenta malaqueta e de dedo-de-moça, que têm atividade superficial, e afetaram monocamadas de Langmuir de fosfatidil colina de dipalmitoíla (DPPC) e fosfatidil glicerol de dipalmitoíla (DPPG). Tais efeitos não tiveram dependência expressiva com a carga, pois o EB de dedo-de-moça interagiu mais fortemente com o DPPC do que com o DPPG, ao passo que o contrário se verificou para o EB de malagueta. Também não houve diferenca significativa entre os EBs das duas pimentas. Nas monocamadas de Langmuir representativas para a bactéria S. aureus, ambos os EBs tiveram efeito, tanto nas isotermas de pressão quanto nos resultados de espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com modulação de polarização (PM-IRRAS), sem distinção significativa entre malagueta e dedo-de-moca. No entanto, as medidas de vazamento com lipossomos mostraram maior interação com o EB de dedo-de-moça, o que é consistente com a atividade bactericida para S. aureus. De fato, a concentração inibitória mínima (MIC) foi 0,13 mg mL<sup>-1</sup> para o EB da pimenta dedo-de moca e 4,0 mg mL<sup>-1</sup> para o EB de malagueta. Para a E. coli, os EBs interagiram com as monocamadas de Langmuir sem diferenças dignas de nota para as duas pimentas, e nas medidas de vazamento o efeito maior foi para a dedo-de-moça. Não houve efeito bactericida para nenhum dos extratos. Isso se explica porque bactérias gram-negativas, como a E. coli, têm uma camada externa protetora de lipossacarídeos (LPS). Das medidas de monocamadas de Langmuir representativas da camada de LPS, observou-se pouca incorporação dos EBs. Conclui-se, assim, que os EBs não conseguem causar rompimento da camada de LPS. Do conjunto dos resultados, infere-se que o mecanismo de ação para a S. aureus envolve solubilização parcial da membrana, e não há relação entre pungência e atividade bactericida, pois a pimenta dedo-demoça, que é menos pungente, teve maior efeito do que a malagueta. Depreende-se, também, que a ação de extratos de pimenta deve depender da interação com receptores na membrana, o que explica porque o uso de tais extratos tem sido principalmente em aplicações tópicas.

Palavras-chave: capsaicinóides, pimenta malagueta, pimenta dedo-de-moça, monocamadas de Langmuir, filmes de Langmuir-Blodgett, lipossomos.

## ABSTRACT

IWAKI, Y. O. Capsaicinoids interaction of with cell model membrane system (2016) 120p. Thesis (Doctorate) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016

This study is aimed at understanding the interaction of capsaicinoids with cell membranes using model systems. Among the alkaloids derived from plants of the genus Capsicum, capsaicin and dihydrocapsaicin account for 90% of capsaicinoids, which are used as analgesic and anti-inflammatory due to their interaction with specific receptors. The neuropharmacological mechanism has been well studied, but the non-neural mode of action has not been elucidated. Here, we use crude extracts (EBs) of malagueta and dedo-de-moca chilli peppers, which are surface active, and affected Langmuir monolayers of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG). Such effects did not depend on the charge, since EB from dedo-de-moça interacted more strongly with DPPC than with DPPG, while the opposite applied for malagueta. In addition, there was no significant difference between the two EBs. For Langmuir monolayers representing the bacteria S. aureus, both EBs affected the surface pressure isotherms and the polarizationmodulated infrared reflection-absorption spectroscopy (PM-IRRAS) data, without significant distinction between dedo-de-moca and malagueta. However, in the leakage measurements with liposomes the EB from dedo-de-moca was more efficient in rupturing the liposome, which is consistent with the bactericidal activity for S. aureus. In fact, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 0.13 mg mL<sup>-1</sup> for dedo-de-moça and 4.0 mg mL<sup>-1</sup> for malagueta. For the Langmuir monolayers mimicking the *E. coli* membrane, the EBs interacted much in the same way, while the EB from dedo-de-moça caused larger leakage in liposomes. There was no bactericidal effect of the EBs. This is explained by the fact that gram-negative bacteria, such as *E. coli*, have a protective outer layer of liposaccharides (LPS). In monolayers representing LPS, there was little incorporation of EBs, from which one infers that the EBs cannot cause disruption of the LPS layer. Taking all these results together, it appears that the mechanism of action for S. aureus involves partial solubilization of the membrane. Furthermore, there is no relationship between pungency and bactericidal activity because dedo-de-moça, which is less pungent, had greater effect than malagueta. It seems also that the action of pepper extracts must depend on the interaction with membrane receptors, which explains why the use of such extracts has been essentially in topical applications.

Key words: capsaicinoids, malagueta pepper, dedo-de-moça pepper, Langmuir monolayers, Langmuir-Blodgett film, liposome.

#### LISTA DE FIGURAS

- Figura 5 Histórico sobre a estrutura da membrana plasmática: A) Versão revisada do modelo de Davson-Danielli (1954); B) modelo do mosaico fluido proposto em 1972 por Singer e Nicholson; C) representação atual da membrana plasmática mostrando a organização básica proposta por Singer e Nicholson mostrando a superfície externa da maioria das proteínas da membrana com uma porcentagem de fosfolipídios contendo pequenas cadeias de açúcares formando glicoproteínas e os glicolipídios (KARP, 2005).......41
- Figura 6 A) Modelo de Singer-Nicholson; B) proposta alterada e versão atualizada de acordo com Engelman (Engelman, D. M., 2005) (GOÑI, 2014)......43
- Figura 7 Esquema representativo de membrana de bactérias: A) Gram negativas e B) Gram-positivas. (MOLINARO, E. M., 2009)......45
- Figura 8 Cuba de Langmuir: 1) Quadro de apoio da cuba; 2) Barreiras móveis; 3) Reservatório de água com poço para deposição de filmes LB; 4) Eletrobalança com sensor de Wilhelmy; 5) Mecanismo de imersão

(para filmes LB); 6) Unidade de interface. Figura adaptada de http://www.biolinscientific.com/ksvnima/technologies em 22/11/2015...47

- Figura 11– Representação esquemática de um lipossomo. ...... 52
- Figura 12 Representação esquemática da organização estrutural das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios no estado de gel-sólido e de cristallíquido. (representação obtida de dissertação de FERREIRA, 2006) .... 53

- Figura 15 Sistema de fabricação de filmes de Langmuir Microcuba Kibron. ...... 57
- Figura 17 Foto do equipamento de BAM acoplado à cuba de Langmuir. ...... 59
- Figura 18 Foto do equipamento de PM-IRRAS acoplado à cuba de Langmuir. .... 60
- Figura 19 Método de preparação de lipossomos e representação esquemática da obtenção de LUVs e SUVs. A) formação do filme lipídico nas

- Figura 21 Curva de tensão superficial-concentração para a pimenta malagueta em solução PBS pH7,4......66
- Figura 22 Curva de tensão superficial-concentração para a pimenta dedo-demoça em solução PBS pH7,4......67
- Figura 24 Cs<sup>-1</sup> para monocamadas para diferentes concentrações de EB de pimenta malagueta (indicadas no encarte da figura) com: A) DPPC, B) DPPG......70
- Figura 25 Pressão superficial versus concentração de EB de pimentas malagueta sem espalhamento de fosfolipídio na interface ar/água (curva vermelha) e com espalhamento de fosfolipídio na interface ar/água para: A) DPPC B) DPPG......71
- Figura 26 Isotermas π-A para as monocamadas de Gibbs de EB de pimenta malagueta (A), isotermas de monocamadas de Langmuir de DPPC (B) e DPPG (C) com EB de pimenta dedo-de-moça na subfase de solução tampão PBS (PH 7,4) (concentrações indicadas na tabela).....73

- Figura 34 Espectro de PM-IRRAS na região C=O (1730 cm<sup>-1</sup>), para monocamadas de DPPG com E.B. pimenta malagueta e E.B. pimenta dedo-de-moça (0,05 mg mL<sup>-1</sup>) em subfase aquosa. π = 30 mN m<sup>-1</sup>..... 81

- Figura 41 Isotermas de filmes de membrana de *E. coli* com: A) E.B. da pimenta malagueta e C) E.B. da pimenta dedo-de-moça. Gráficos de área molecular x concentração para filmes de membrana de *E. coli* com: B)
  E.B. da pimenta malagueta e D) E.B. da pimenta dedo-de-moça......90

- Figura 46 Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de Langmuir de membrana de *S. aureus* e 0,003 mg mL-1 de EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça, em tampão PBS pH 7,4 – 30 mN m-1. A) região de vibração dos alcanos; B) região de vibração do vinileno C=C; C) região de vibração dos P=O; D) região de vibração éster, CO.99

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Escala de Scoville para determinação de pungência das pimentas
(adaptado de http://pepperheadsforlife.com/the-scoville-scale/)
Tabela 2 - Proporção de lipídios nas membranas de bactérias (EPAND et. al,
2010)
Tabela 3 – Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados ao EB de
pimenta malagueta e dedo-de-moça76
Tabela 4 - Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados à
monocamada de DPPC/EB de pimenta malagueta e DPPC/ EB de
pimenta dedo-de-moça78
Tabela 5 – Tabela com os principais resultados dos experimentos com os
fosfolipídios DPPC e DPPG com EB de pimenta malagueta e dedo-
de-moça
Tabela 6 – Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados à membrana
de <i>E. coli</i> e EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça95
Tabela 7 – Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados a membrana
de LPS de <i>E. coli</i> e EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça97
Tabela 8 – Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados à
composição lipídica de <i>S. aureus</i> e EB de pimentas malagueta e
dedo-de-moça98
Tabela 9 – Proporção de capsaicinóides nos filmes LB de 10 camadas de
membranas de bactérias com EB de pimentas malagueta e dedo-de-
moça, determinadas por UV-Vis100
Tabela 10 – Tabela com os principais resultados dos experimentos com
composição lipídica de S. aureus com EB de pimenta malagueta e
dedo-de-moça108
Tabela 11 - Tabela com os principais resultados dos experimentos com
composição lipídica de <i>E. coli</i> com EB de pimenta malagueta e dedo-
de-moça
Tabela 12 - Tabela com os principais resultados dos experimentos com LPS de E.
coli com EB de pimenta malagueta e dedo-de-moça
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

# LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BAM	Microscopia no ângulo de Brewster
caps	Capsaicinóides
CF	Carboxifluoresceína
CL	Cardiolipina
CMC	Concentração Micelar Crítica
CS <sup>-1</sup>	Módulo de compressibilidade
DOPE	Dioleoil Fosfoetanolamina
DOPG	Dioleoil Fosfatidilglicerol
DPPC	Dipalmitoil Fosfatidil Colina
DPPG	Dipalmitoil Fosfatidil Glicerol
EB	Extrato bruto
G	Gasoso
GUV	Vesículas Unilamelares Gigantes
LB	Langmuir-Blodgett
LC	Líquido-condensado
LE	Líquido-expandido
LPS	Lipopolissacarídeo
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
MIC	Concentração Inibitória Mínima
PBS	Solução Tampão Fosfato
PM-IRRAS	Espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com
0	modulação de polarização
SHU	Scoville Heats Unit
SUV	Vesiculas Unilamelares Pequenas
00-015	Espectroscopia no Ultravioleta Visivel
11	Pressao Superficial

# SUMÁRIO

Apro	esent	ação	27
Mot	ivaçã	o e Objetivos	29
1.	Int	rodução e Revisão Bibliográfica	31
	1.1.	Pimentas	31
		1.1.1. Capsaicinóides	33
	1.2.	Modelos de membrana	34
		1.2.1. Componentes da membrana celular	35
		1.2.1.1. Lipídios	35
		1.2.1.2. Proteínas	38
		1.2.2. Modelos que descrevem a biomembrana	40
		1.2.2.1. Membrana Bacteriana	43
		1.2.2.2. Modelos que Mimetizam a Membrana Celular	46
2.	Pro	ocedimentos Experimentais	54
	2.1.	Materiais	54
	2.2.	Metodologias	55
		2.2.1. Metodologia para obtenção dos EBs de pimenta malagueta e dedo-d	e-
		moça	55
		2.2.2. Determinação de curvas de Concentração Micelar Crítica (CMC)	56
		2.2.3. Isotermas de pressão superficial	57
		2.2.4. Microscopia no ângulo de Brewster	57
		2.2.5. Espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modula	ição
		da polarização (PM-IRRAS)	59
		2.2.6. Espectros de UV-Vis de filmes Langmuir-Blodgett (LB)	60
	2.2.7	7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima	60
		2.2.8.Metodologia para elaboração de lipossomos com composição lipídica o	de
		E.coli e S. aureus	61
		2.2.9.Medidas de cinética de vazamento	64
3.	Re	sultados e discussões	65

3.1.	Tensiometria das pimentas malagueta (C. frutescens) e dedo-de- moça (C. bacattum)6	5
3.2.	Isotermas de Pressão superficial dos fosfolipídios DPPC e DPPG com EB de pimentas malagueta6	7
3.3.	Estudo da interação através de PM-IRRAS, entre os capsaicinóides do EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça e monocamadas de fosfolipídios DPPC e DPPG	5
3.4.	Caracterizações morfológicas das monocamadas de Langmuir por microscopia no ângulo de Brewster (BAM)8	2
3.5.	Interação dos EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça com membranas de bactérias E. coli, LPS de E. coli e S. aureus	8
3.5.	1. Resultados de Concentração Inibitória Mínima	9
	3.5.2.Isotermas de pressão superficial de membranas de E. coli, LPS de E. cole S. aureus com EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça89	i Э
3.6.	Estudo da interação entre monocamadas de membranas de E. coli,	
	LPS de E. coli e S. aureus e caps dos EB de pimentas malagueta e	
	dedo-de-moça	3
	3.6.1. <i>E. coli</i> 94	4
	3.6.2. LPS E. coli 96	5
	3.0.3. 5. aureus 90	S
3.7.	Quantificação de capsaicinóides incorporados em filmes LB de com	
	membranas de E. coll e S. aureus com EB de pimentas malagueta e	^
	dedo-de-moça atraves de espectroscopia UV-VIS	9
3.8.	Caracterizações morfológicas das monocamadas de Langmuir	
	através de microscopia no ângulo de Brewster (BAM) de	_
	monocamadas formadas por composição lipídica de bactérias E. col	i
	e S. aureus	1
3.9.	Cinética de vazamento dos lipossomos de composição lipídicas de	
	E. coli e S. aureus na presença de EB de pimentas malagueta e dedo de-moça –	- 5
Co	nclusão	3

4.

REFERÊNCIAS	 115
REFERENCIAS	 115

### Apresentação

O trabalho de doutorado foi desenvolvido no período entre março de 2010 a fevereiro de 2016, que é mais longo do que o normal em virtude de a pesquisa ter sido realizada em tempo parcial, para conciliar com o trabalho na Marinha do Brasil. A parte experimental da pesquisa foi realizada em sua maioria no grupo de Polímeros Bernhard Gross do Instituto de Física de São Carlos. Os experimentos de cinética de vazamento dos lipossomos foram feitos no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, com autorização do Prof. Eduardo Mafud Cilli e auxílio do Dr. Esteban Nicolás Lorenzón. A tese está dividida em 4 capítulos além desta apresentação, que contém motivação e objetivos. Estes capítulos são divididos em:

 Introdução e revisão bibliográfica sobre os principais assuntos abordados no trabalho;

2) Procedimentos experimentais, materiais utilizados e métodos;

3) Resultados e discussões;

4) Conclusões gerais e perspectivas.

O capítulo 1 é destinado a dar ao leitor um suporte teórico para entendimento do trabalho. O capítulo 2 detalha os procedimentos experimentais, incluindo parâmetros e equipamentos. No capítulo 3 são mostrados os resultados e as discussões, ao passo que as conclusões aparecem no capítulo 4.

## Motivação e Objetivos

O projeto desenvolvido nesta tese visava a compreender a interação entre capsaicinóides (caps), princípio ativo das pimentas do gênero *Capsicum*, e membranas celulares por meio de sistemas modelo, que pudessem ser correlacionadas com sua atividade antimicrobiana em nível molecular.

# **Objetivos específicos**

Eram objetivos específicos investigar:

- 1. O mecanismo de atividade antimicrobiana dos capsaicinóides;
- 2. Os motivos da exclusividade na utilização tópica de capsaicinóides;
- 3. A possível correlação entre pungência e atividade antimicrobiana.

#### 1. Introdução e Revisão Bibliográfica

O advento de antibióticos trouxe uma revolução na medicina do século XX, mas a eficácia dos antibióticos pode ser reduzida pela capacidade das bactérias de se tornarem resistentes (FAIR, 2014). O problema com bactérias super-resistentes é alarmante no mundo todo, aumentando tempo de internação, e elevando a mortalidade. Isso tem levado à busca por antimicrobianos naturais, principalmente os que possam apresentar rotas alternativas de combate a bactérias. Nesta tese escolhemos como objeto de estudo as pimentas, cujos componentes podem ser usados por sua ação antimicrobiana.

#### 1.1. Pimentas

Pimentas são frutos usados na alimentação e em condimentos, pois possuem componentes químicos que estimulam as papilas gustativas, produzindo sensações picantes e de calor. A pimenta-do-reino, também conhecida como pimenta branca ou pimenta preta, pertence à família Piperaceae, sendo obtida por diversos tipos de processamento de seus frutos. Esse condimento, utilizado na conservação dos alimentos, era valorizado na antiguidade por indianos e egípcios, sendo alvo de intenso comércio durante as Grandes Navegações por árabes e europeus. Pimentas vêm sendo usadas por diversas civilizações na medicina e na culinária, havendo registros que datam cerca de 9 mil anos, encontrados em sítios arqueológicos em Tehuacán, no México. As mais consumidas no Brasil pertencem ao gênero Capsicum, da família Solanaceae: Capsicum baccatum (pimenta dedo-de-moça), Capsicum annuum, Capscicum frutescens (pimenta malagueta), Capscicum chinense (pimenta comari) e Capsicum pubescens (BARBIERI, acessado em 14/09/2013). Sabe-se que os indígenas já usufruíam dos benefícios de pimentas do gênero Capscicum muito antes da chegada de Colombo às Américas (BARBIERI, acessado em 14/09/2013).

As pimentas são ricas em vitamina E, antioxidantes, carotenóides e capsaicinóides (caps), sendo estes nutrientes importantes para a visão, para a integridade dos epitélios (células que revestem o corpo e formam uma barreira contra infecções) e no crescimento e desenvolvimento do esqueleto. Capsaicinóides são alcalóides responsáveis pela pungência das pimentas, cujo teor é indicativo de ardência das pimentas. A pungência pode ser expressa por uma escala sensorial denominada Scoville Heat Units (SHU) ou Unidades de Calor Scoville, que varia entre zero, para pimentas "doces" sem sensação de ardor, até em torno de um milhão de SHU para pimentas extremamente picantes. Mostrada na Tabela 1, esta escala foi desenvolvida em 1912 pelo químico americano Wilbur Scoville, e baseiase no método de diluição e prova, sendo, portanto, denominada de escala organoléptica. Os testes são realizados com a pimenta diluída em uma solução de água com açúcar até que não haja mais a percepção da pungência das pimentas. Posteriormente, o método foi aperfeiçoado e foram criadas as unidades de Scoville. Uma (1) unidade na escala de Scoville indica que a cada xícara de pimenta são necessárias 1000 xícaras de solução de água com açúcar para neutralizar o ardor provocado pelos caps. Para os pimentões, observa-se o valor de 0 unidades Scoville. Já para a capsaicina pura, obtém-se o equivalente a 16.000.000 de unidades Scoville.

Nome da pimenta	Classificação na escala de Scoville (SHU)
Capsaicina pura	16.000.000
Dihidrocapsaicina	15.000.000
Nordihidrocapsaicina	9.100.000
Carolina Reaper	2.200.000
Bhut Jolokia	1.041.427
Trinidad Scorpion	1.000.000
Piri piri	300.000
Malagueta	100.000
Cumari	50.000
Pimenta Bode	30.000
Dedo-de-moça	1.500
Pimentão	0

Tabela 1- Escala de Scoville para determinação de pungência das pimentas (adaptado de http://pepperheadsforlife.com/the-scoville-scale/).
## 1.1.1. Capsaicinóides

Os capsaicinóides (caps) são um grupo de alcalóides do gênero *Capsicum* das pimentas. Dentre estes alcalóides, a capsaicina e a dihidrocapsaicina, cujas estruturas são mostradas na Figura 1, respondem por 90% da pungência das pimentas, sendo que a quantidade de capsaicinóides depende do tipo de pimenta (GYULA MÓZSIK, 2009). As propriedades farmacológicas dos capsaicinóides têm sido investigadas em analgésicos (HAYMAN, 2008; SHARMA, S. K. et al., 2013), anti-inflamatórios (HAYMAN, 2008); (SHARMA et al., 2013), anticancerígenos (SHARMA et al., 2013), aceleradores de metabolismo (HAYMAN, 2008) devido ao efeito termogênico que possuem estes compostos, redutores de níveis de colesterol (HAYMAN, 2008), fungicidas (ANAYA-LÓPEZ, 2006) e bactericidas (TAVEIRA, 2013); (KOFFI-NEVRY, 2012). Alguns compostos utilizam os caps como princípios ativos para o alívio de dores agudas, principalmente decorrentes de artrite (DEAL *et al.*, 1991), gastrite (Hayman, 2008), dores musculares e neuropáticas, indigestão crônica e câncer (LAU et al., 2014).

Os efeitos farmacológicos dos capsaicinóides são altamente seletivos para os neurônios sensoriais, devido a uma interação específica com os nocireceptores (TSUCHIYA, 2001). Entretanto, capsaicinóides também apresentam atividade de agregação de plaquetas e potencial atividade bactericida (NASCIMENTO *et. al,* 2014); (VELOSO, 2012). Embora o mecanismo neurofarmacológico tenha sido bastante estudado, o modo de ação não-neuronal ainda não é claro. Acredita-se que a interação dos caps com a biomembrana consista de uma das etapas iniciais para o desempenho de sua atividade biológica (OMOLO et al., 2014).



Figura 1 – Estrutura molecular (A) capsaicina (B) dihidrocapsaicina.

## 1.2. Modelos de membrana

As membranas plasmáticas são responsáveis por delimitar o meio intracelular (citoplasma) e o meio extracelular. Também denominada de membrana plasmática, sua principal função é a de regular a permeabilidade de substâncias do interior para o exterior da célula, e vice-versa, bem como delimitar as organelas no interior das células (ALBERTS et al., 2010). Elas consistem basicamente de uma matriz hidrofóbica, formada por uma bicamada orientada de lipídios e proteínas, onde as proteínas são ligadas de diferentes formas: proteínas integrais (intrínseca ou transmembranares) ou proteínas periféricas (extrínsecas). As proteínas integrais atravessam a membrana, sendo firmemente aderidas aos lipídios desempenhando a função de permitir a passagem de substâncias hidrofílicas, pois formam canais de transporte de substâncias. Aproximadamente 70% das proteínas são do tipo integral, sendo em sua maioria receptores específicos de hormônios. As proteínas periféricas encontram-se na superfície interna ou externa da membrana, não mergulhadas na bicamada fosfolipídica, ligando-se à membrana através da região polar dos lipídios ou com as proteínas integrais. As glicoproteínas são aquelas que possuem um ou mais açucares ligados covalentemente à estrutura proteica. Possuem como função celular o reconhecimento e proteção quando presentes na superfície ou dentro da membrana plasmática (glicocálices ou glicocálix).

A membrana plasmática também apresenta quantidades de colesterol, um esteroide responsável pela fluidez da membrana, que varia de acordo com a temperatura. A molécula de colesterol fornece rigidez à membrana devido a sua cadeia hidrofóbica que se liga à parte hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana. Os glicolipídios são uma associação entre carboidratos e lipídios, responsáveis pela determinação dos grupos sanguíneos e auxiliam na proteção da membrana plasmática em condições adversas (ALBERTS *et al.*, 2010). Nos próximos itens será detalhado cada um dos componentes da membrana celular.

#### 1.2.1. Componentes da membrana celular

As membranas celulares possuem como componente mais abundante os lipídios e proteínas, e em minoria os polissacarídeos. A bicamada lipídica possui como função prioritária a de sustentação da membrana, além do controle de entrada e saída de substâncias. As proteínas desempenham a maioria das funções específicas. Em células animais (eucariontes), que possuem uma membrana delimitando o núcleo celular do citoplasma, a composição depende do tipo de célula. Pode ser de 30 a 80% de fosfolipídios, 20 a 60% de proteínas e 0 a 10% de polissacarídeos (YEAGLE, 1993).

## 1.2.1.1. Lipídios

Os lipídios que formam o arcabouço das membranas são moléculas anfifílicas ou anfipáticas apresentando uma extremidade hidrofílica, ou polar, e uma região hidrofóbica, ou apolar. Existem três principais tipos de lipídios na membrana: fosfoglicerídios, esfingolipídios e colesterol. Os lipídios em sua maioria possuem um grupo fosfato, sendo então fosfolipídios. Como a maioria dos lipídios das membranas contém grupo glicerol, denominam-se fosfoglicerídios. Na membrana, os glicerídeos encontram-se na forma de diglicerídios, sendo apenas duas hidroxilas do glicerol esterificadas por ácidos graxos, enquanto a terceira hidroxila é esterificada por um fosfato hidrofílico. Os fosfoglicerídios da membrana possuem um grupo adicional, que pode ser: colina, formando-se a fosfatidilcolina (PC); etanolamina formando-se a fosfatidiletanolamina (PE); serina formando-se a fosfatidilserina (PS) ou o inositol formando-se o fosfatidilinositol (PI). Em pH fisiológico a cabeça polar do PS e PI está carregada negativamente, enquanto as cabeças polares do PC e PE são neutras. Estes fosfolipídios estão representados na Figura 2A (KARP, 2005).

As cadeias de ácidos graxos dos fosfoglicerídios possuem entre 16 e 20 carbonos, sendo em geral uma saturada e outra insaturada. Os esfingolipídios, representados na Figura 2B, são uma classe menos abundantes de lipídios da membrana, e consistem de uma molécula de esfingosina ligada a um ácido graxo através do grupo amina, resultando na molécula de ceramida. Os lipídios que se

baseiam na esfingosina possuem grupos esterificados adicionais à ligação O-H do álcool terminal da esfingosina. Se a substituição por fosforilcolina, a molécula será denominada esfingomielina, sendo este o único fosfolipídio de membrana a não possuir a estrutura de glicerol. Se for feita uma substituição por um carboidrato, a molécula será denominada de glicolipídio. Quando o carboidrato substituinte for um monossacarídeo, será denominado cerebrosídeo ou oligossacarídeo, denomina-se gangliosídeo (KARP, 2005).



Figura 2 – Estrutura química dos lipídios de membrana: A) estrutura dos fosfoglicerídios. B) estrutura dos esfingolipídios (figura extraída de KARP, 2005).

O colesterol, representado na Figura 3, é componente de algumas membranas de células animais, representando até 50% das moléculas lipídicas da membrana, mas está ausente em células bacterianas. As moléculas de colesterol orientam-se com pequenos grupos hidroxila voltados para a superfície da membrana, estando o restante da molécula imerso na bicamada lipídica.



Figura 3 - Representação das moléculas de colesterol (em amarelo) orientadas com as extremidades hidrofílicas voltadas para a superfície externa da bicamada e sua estrutura agrupada entre as caudas dos fosfolipídios (figura extraída de KARP, 2005).

## 1.2.1.2. Proteínas

Além dos fosfolipídios, as membranas contêm diversas proteínas, dispostas de maneiras diferentes. As proteínas integrais atravessam a bicamada lipídica e possuem domínios que se projetam tanto para a parte exterior quanto interior (citoplasma) da membrana. Estas proteínas desempenham a maioria das funções específicas das membranas, tais como o transporte de íons e moléculas polares, interações com hormônios, transdução de sinais e estabilização estrutural. A forma na qual as proteínas se associam à bicamada determina sua função. Uma proteína integral exerce sua função nos dois lados da bicamada (canais iônicos, proteínas transportadoras e receptoras). As proteínas que se encontram em um lado da bicamada exercem sua função apenas no lado em que se encontram. As proteínas integrais apresentam a formação de uma α-hélice, caracterizada por ligações de hidrogênio entre suas ligações peptídicas. Essas se classificam em função da forma como atravessam a bicamada: unipasso para as que atravessam apenas uma vez a bicamada e multipasso para as que atravessam múltiplas vezes, como mostra a Figura 4A. As proteínas periféricas da Figura 4B localizam-se fora da bicamada lipídica e encontram-se tanto do lado extracelular guanto do lado citoplasmático, associando-se à superfície da membrana por meio de ligações de hidrogênio com outras proteínas periféricas, proteínas integrais ou lipídios. Essa interação é considerada fraca e essas proteínas podem ser liberadas das membranas por exposição a soluções de força iônica elevada ou variações de pH, ao contrário das ligações entre as proteínas integrais e a bicamada lipídica, onde a interação só pode ser rompida com o uso de detergentes.

Existem dois tipos de proteínas de membrana ancoradas na bicamada lipídica, que podem ser diferenciadas pelo tipo de âncora lipídica e pela superfície sobre a qual estão expostas. As proteínas ancoradas em lipídios que se localizam na superfície externa da bicamada lipídica associam-se à membrana através de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), ligadas covalentemente a oligossacarídeos ligados aos lipídios da bicamada (Figura 4C). Estas podem ser liberadas da âncora de GPI através de enzimas específicas que as clivam. Outro tipo de proteína ancorada fica na face interna da membrana (citoplasma), ancorada à membrana

plasmática por longas cadeias de hidrocarbonetos imersas na face interna da bicamada lipídica.



Figura 4 - Esquema de classes de proteínas de membrana: A) Proteínas integrais contêm uma ou mais hélices trans-membrânicas; B) Proteínas periféricas ligadas não covalentemente a um grupo polar da bicamada lipídica e/ou uma proteína integral de membrana; C) Proteínas ancoradas em lipídios, covalentemente ligadas a um fosfolipídio ou a um ácido graxo inserido em uma das extremidades da bicamada lipídica (figura extraída e adaptada de KARP, 2005).

## 1.2.2. Modelos que descrevem a biomembrana

Em 1935, Hug Davson e James Danielle propuseram um modelo de membrana plasmática, mostrado na Figura 5A, que consistia de uma bicamada lipídica revestida internamente e externamente por proteínas globulares. Estas são formadas por cadeias polipeptídicas que se dobram adquirindo a forma esférica, incluindo a maioria das enzimas. Possuem várias estruturas secundárias, o que lhes garante certa mobilidade e capacidade de executar diversas funções no corpo humano, como são os casos dos anticorpos, hormônios e proteínas transportadoras, como a albumina sérica e hemoglobina. No início dos anos 1950, levando em consideração a permeabilidade seletiva das membranas, propuseram a existência de poros revestidos de proteínas, responsáveis pela entrada e saída de solutos polares e íons. Em 1972, S. Jonathan Singer e Garth Nicholson propuseram um modelo de membrana denominado "modelo do mosaico fluido" ilustrado na Figura 5B (SINGER; NICHOLSON, 1972). Este modelo de Singer e Nicholson pressupõe que:

- a) Os lipídios encontram-se em uma bicamada, onde a membrana lipídica é anfipática, com fosfolipídios, glicolipídios e esteróis;
- b) As proteínas nas membranas podem ser associadas à bicamada lipídica através dos grupos polares (proteínas periféricas) ou através da matriz hidrofóbica, atravessando a membrana (proteínas integrais). As proteínas neste modelo são definidas através de sua solubilidade, ou seja, proteínas periféricas podem ser liberadas da membrana utilizando-se métodos suaves, como mudanças de pH ou força iônica, enquanto proteínas integrais requerem o uso de métodos mais agressivos, tais como detergentes ou solventes orgânicos;
- c) Os lipídios e proteínas encontram-se em constante movimento. A membrana não possui uma estrutura rígida havendo mobilidade entre as moléculas constituintes, ou seja, a membrana celular seria uma estrutura dinâmica, em que seus componentes possuem mobilidade para unir-se através de interações transientes. Em princípio, dois movimentos são considerados: o movimento de rotação quando os lipídios movem-se em torno de seu próprio eixo; e o movimento de translação ou difusão lateral que consiste no

movimento por toda a extensão da monocamada, no plano da membrana lipídica;

 As membranas lipídicas são assimétricas, assim os dois lados da membrana não são idênticos.



Figura 5 – Histórico sobre a estrutura da membrana plasmática: A) Versão revisada do modelo de Davson-Danielli (1954); B) modelo do mosaico fluido proposto em 1972 por Singer e Nicholson; C) representação atual da membrana plasmática mostrando a organização básica proposta por Singer e Nicholson mostrando a superfície externa da maioria das proteínas da membrana com uma porcentagem de fosfolipídios contendo pequenas cadeias de açúcares formando glicoproteínas e os glicolipídios (figura extraída e adaptada de KARP, 2005).

Com a descoberta de novas características da membrana celular, o modelo de Nicholson foi atualizado (NICHOLSON, 2014), incluindo a função dos domínios especializados (aglomeração de componentes iguais, denominados *rafts*) na membrana, assim como a grande quantidade de lipídios e complexos de proteína/glicoproteína na microestrutura. Além disso, a associação entre a

membrana, o citoesqueleto e a matriz celular é importante por limitarem a difusão lateral e a amplitude de movimentação dos componentes da membrana. Uma representação do novo modelo proposto por Nicholson é mostrada na Figura 6.

As mudanças incorporadas no modelo de Singer e Nicholson após quarenta anos foram descritas por Goñi (GÕNI, 2014), e podem ser resumidas em:

- A alta densidade das proteínas transmembranares. No modelo original são vistas apenas proteínas transmembranares espalhadas na bicamada lipídica, apenas uma cada vez. No modelo atual, observa-se uma multiplicidade de proteínas transmembranares, onde dificilmente há uma fração da bicamada que não esteja perturbada por estas proteínas;
- b) Proteínas que se ligam às membranas ocasionalmente. No modelo tradicional as proteínas eram solúveis no citoplasma ou ancoradas na camada lipídica. Atualmente é aceito que existem dois tipos de proteínas, as que ficam ancoradas na camada lipídica e as que não têm função significativa quando ligadas à camada, que podem ser encontradas ligadas à camada ou solúveis no citoplasma;
- c) Novas funções fisiológicas da fase lipídica. Considerando apenas a bicamada, a fase lamelar líquido-cristalina era tida como a única que apresentava funcionalidade relevante. No novo modelo, as outras fases da bicamada também aparentam ter funcionalidades fisiológicas interessantes;
- d) Desvios de equilíbrio estrutura não lamelar. No modelo antigo, os lipídios encontravam-se organizados na forma de bicamadas. Atualmente, uma membrana pode adotar outra arquitetura que não a de bicamada;
- e) As membranas possuem morfologia curvilínea. Sua curvatura depende de propriedades geométricas e mecânicas de proteínas e lipídios, ao contrário do modelo tradicional onde as bicamadas são mostradas de maneira retilínea;
- f) Heterogeneidade lateral das membranas. Na bicamada tradicional não se observam grandes heterogeneidades na superfície, além de saliências provocadas pelas proteínas. Na visão atual formam-se domínios heterogêneos, com diâmetros entre 0,1 e 1,0 µm, compostos de proteínas e lipídios que proporcionam características funcionais à bicamada;
- g) Movimento flip-flop: no modelo atual os lipídios da membrana são capazes de atravessar a monocamada. (GOÑI, 2014).



Figura 6 – A) Modelo de Singer-Nicholson; B) proposta alterada e versão atualizada de acordo com Engelman (figura extraida de Engelman, D. M., 2005) (GOÑI, 2014).

## 1.2.2.1. Membrana Bacteriana

As bactérias possuem estrutura celular procariótica, não possuindo material nuclear organizado por carioteca, sendo que este se encontra disperso no citoplasma. São organismos unicelulares que medem de 0,2 a 1,5 µm, e podem aglomerar-se em colônias ou viver isoladamente. A partir dos anos 1990 o Reino Monera foi dividido em dois grupos: domínio Archaea/arquea e domínio Bactérias/eubactérias. As diferenças entre estes dois domínios podem ser resumidas nas características dos organismos pertencentes ao domínio arqueas: a) não possuírem peptidioglicanos em sua parede celular; b) produzirem como resíduo metabólico o gás metano; e c) sobreviverem em ambientes com condições extremas, tais como vulcões, crateras, regiões salinas etc.

As bactérias possuem quatro componentes em sua estrutura formada por: membrana celular; citoplasma; ribossomos e cromatina (molécula de DNA circular, que constitui o único cromossomo bacteriano). Externamente à membrana plasmática, as bactérias possuem uma estrutura denominada parede celular, que se localiza ao redor da membrana plasmática tendo como função a proteção da célula bacteriana. Os flagelos são apêndices alongados e finos responsáveis pela locomoção em alguns tipos de bactérias; no plasmídeo há moléculas de DNA que não se encontram ligadas ao cromossomo bacteriano, espalhados no hialoplasma e trocadas entre bactérias por pili (filamentos semelhantes a flagelos, sem função locomotora, que desempenham função de fixação em substratos ou troca de DNA). Determinadas espécies possuem em sua estrutura um envoltório, externo à parede celular, denominado cápsula, constituídas de polissacarídeos ou polipeptídios.

Em bactérias Gram-negativas a parede celular é mais complexa, sendo composta por uma ou mais camada de peptidioglicanos e três outros componentes que a envolvem externamente; lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo (LPS), causador de patogenicidade. Como as paredes das bactérias Gram-negativas são menos permeáveis aos antibióticos, estas são consideradas mais nocivas (MOLINARO, E. M., 2009). Na Figura 7A é apresentado o esquema da membrana de bactérias Gram-negativas.

As bactérias podem ser classificadas em função da presença de parede celular através do método de coloração Gram, criado por Hans Christian Gram, um bacteriologista dinamarquês, em 1884. Esta técnica expressa importante método de coloração da parede celular de bactérias, distinguindo-as como Gram-positiva ou Gram-negativa (BURNETT & SCHUSTER, 1982; NISENGARD & NEWMAN, 1994). O método baseia-se na capacidade das paredes celulares das bactérias Grampositivas mudarem de cor devido ao corante cristal violeta (violeta de metila), enquanto na parede celular de bactérias Gram-negativas não há mudança de cor. Esta técnica consiste em acrescentar o corante cristal violeta em uma cultura de bactérias em meio sólido ou líquido e posteriormente o inserir o fixador lugol. Neste procedimento tanto as paredes celulares de bactérias do tipo Gram-positivas e Gram negativas irão absorver o corante primário e seu fixador, mantendo a coloração violeta na parede celular. Após esse procedimento, a cultura de bactérias é tratada com uma solução de solvente orgânico etanol (99,5°). Este solvente orgânico irá remover a porção lipídica da parede celular das bactérias Gram-negativas, removendo a coloração violeta. Após esse procedimento, as amostras são tratadas com um segundo corante, safranina, que deixará a coloração das paredes celulares de bactérias Gram-positivas na cor violeta escuras e as paredes celulares de bactérias Gram-negativas em vermelho ou rosa escuro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

44



Figura 7 – Esquema representativo de membrana de bactérias: A) Gram negativas e B) Gram-positivas. (MOLINARO, E. M., 2009).

Nas paredes celulares de bactérias Gram-positivas (Figura 7B), além da camada de peptidioglicanos, há o ácido teicóico, encontrado ao longo da parede celular, ligados aos lipídios da membrana plasmática (MOLINARO, E. M., 2009).

## 1.2.2.2. Modelos que Mimetizam a Membrana Celular

Devido à complexidade da membrana celular, empregam-se modelos que a mimetizam, como os filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) (GIRARD-EGROTT, 2005) e lipossomos. As monocamadas de Langmuir mimetizam apenas metade da membrana celular, porém possuem uma série de vantagens, pois permitem um controle de composição; controle do estado de compactação, além da planaridade, que se assemelha ao formato da superfície celular (FENG, 1999); (FENG, 2006); (PAVINATTO, 2014). Os detalhes sobre a formação dos filmes de Langmuir serão explicados nos próximos itens.

## Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

Benjamim Franklin, em 1765, realizou os primeiros experimentos de formação de filmes lipídicos na interface ar-água, espalhando uma camada de óleo em água. Embora os primeiros experimentos tenham sido realizados no século XVIII, apenas no início do século XX os filmes monomoleculares foram estudados pelo cientista americano Irving Langmuir, que detalhou a estrutura do filme em nível molecular, rendendo-lhe o prêmio Nobel em 1932. Langmuir teve seu reconhecimento ao ter seu nome associado aos filmes, denominados de filmes de Langmuir (LANGMUIR, 1917). Na década de 1930, foram realizados os primeiros trabalhos de transferência dos filmes da superfície da água para substratos sólidos, por Katherine Blodgett (BLODGETT, 1935). Esses filmes depositados em substratos sólidos foram denominados filmes Langmuir-Blodgett (ROBERTS, 1990).

Os filmes de Langmuir são produzidos na chamada cuba de Langmuir, mostrada no esquema da Figura 8, que consiste em um compartimento raso feito de material inerte (Teflon<sup>®</sup>), dentro da qual há uma subfase aquosa juntamente com um sensor de tensão superficial denominado placa de Wilhelmy. O conjunto também dispõe de barreiras móveis para compressão da monocamada e um dispositivo imersor para fabricação de filmes Langmuir-Blodgett.



Figura 8 - Cuba de Langmuir: 1) Quadro de apoio da cuba; 2) Barreiras móveis; 3) Reservatório de água com poço para deposição de filmes LB; 4) Eletrobalança com sensor de Wilhelmy; 5) Mecanismo de imersão (para filmes LB); 6) Unidade de interface. Figura adaptada de http://www.biolinscientific.com/ksvnima/technologies em 22/11/2015.

A técnica de Langmuir baseia-se na propriedade de moléculas orgânicas anfifílicas, tais como fosfolipídios, de orientarem-se na interface ar/água para minimizar a energia livre, formando uma monocamada insolúvel. As moléculas anfifílicas diluídas em uma solução volátil e imiscível em água são espalhadas sobre uma interface aquosa. Após a evaporação do solvente, forma-se um filme com espessura de uma molécula, com as cabeças hidrofílicas imersas na subfase aquosa e as caudas hidrofóbicas em contato com o ar (GIRARD-EGROTT, 2005); (KSV NIMA, 2015). A técnica possibilita o controle da organização da monocamada em sua compactação e arquitetura por meio de barreiras móveis, que comprimem as moléculas na interface ar/água. Quando as barreiras móveis são fechadas, há uma redução da área ocupada pelo filme, alterando-se a compactação da monocamada. Como a área superficial é reduzida devido à compressão da barreira móvel, a distância intermolecular diminui, reduzindo também a tensão superficial. As moléculas começam a interagir exercendo uma repulsão entre elas. A força exercida pelo filme por unidade de área é chamada de pressão superficial ( $\pi$ ), calculada pela fórmula:

47

 $\pi = Y_0 - Y$ 

onde  $v_0$  é a tensão de superfície da subfase sem a monocamada e v é a tensão de superfície na presença da monocamada (GIRARD-EGROTT, 2005); (ROBERTS, 1990).

Durante a compressão, as moléculas organizam-se, podendo passar por transformações de fase análogas às transformações tridimensionais, com estado gasoso, líquido e sólido até a formação de uma monocamada ordenada. Durante esse processo, as moléculas alinham-se como observamos na Figura 9, que mostra os estágios de formação da monocamada para uma substância específica. Ao espalhar a solução lipídica na interface, as moléculas não possuem interação lateral umas com as outras e, portanto, é dito que se encontram na fase gasosa bidimensional (Figura 9A). Aumentando-se a compressão, elas atingem a fase líquido-expandida, resultando em aumento da interação entre as moléculas e redução de área molecular (Figura 9B). Com a subsequente compressão do filme, as moléculas atingem grau de empacotamento máximo, formando um filme de espessura monomolecular, denominado de estado sólido bidimensional. Comprimindo-se ainda mais as barreiras, atinge-se o colapso, em que o filme perde a estrutura de monocamada para formar multicamadas não organizadas (GIRARD-EGROTT, 2005). O colapso da monocamada pode ser observado na isoterma de pressão superficial versus área molecular da Figura 10.



Figura 9 – Princípios da técnica de Langmuir-Blodgett. (adaptado de GIRARD-EGROT *et al.*, 2005).

As isotermas de pressão superficial ( $\pi$ -A) originam do monitoramento da pressão superficial em função da área disponível para cada molécula (área por molécula expressa em Å<sup>2</sup>). Na Figura 10, observam-se os estados da monocamada interpretados de forma equivalente aos estados tridimensionais da matéria (solido, liquido e gasoso).



Figura 10 - Isoterma π-A para o fosfolipídio DPPC e ilustração da estruturação das moléculas no filme durante os diferentes estágios de compressão. (•) = cabeça hidrofílica e (|) cauda hidrofóbica. (figura modificada de GIRARD-EGROT *et al*, 2005).

A técnica de Langmuir-Blodgett foi criada para transferir a monocamada para um substrato sólido (BLODGETT, 1935); (BLODGETT; LANGMUIR, 1937), podendo gerar diferentes tipos de filme de acordo com a natureza hidrofílica ou hidrofóbica do substrato. Na Figura 9D, mostra-se uma representação simplificada do processo de transferência da monocamada para o substrato. A primeira monocamada será transferida com o substrato sendo retirado de dentro da subfase, ou imergindo-o se estiver fora da subfase. Assim, as multicamadas se depositarão sucessivamente em cada travessia pela interface de monocamada/ar. Na deposição chamada tipo Y (Fig 9D.b), o empilhamento das monocamadas segue a configuração cabeça-cabeça ou cauda-cauda; este último representa o empilhamento natural das membranas biológicas. Há também os empilhamentos do tipo X, onde a monocamada é transferida apenas na imersão (Figura 9D.a) e do tipo Z, onde a monocamada é depositada na emersão (Figura 9D.c). (GIRARD-EGROT *et al.*, 2005).

As monocamadas constituem um modelo interessante para o estudo biofísico de membranas, uma vez que uma membrana biológica pode ser considerada como constituída por duas monocamadas fracamente acopladas. A subfase aquosa mimetiza os meios intra e extracelulares e, assim, moléculas de interesse podem ser dissolvidas para o estudo de interações moleculares (BREZESINSKI; MOHWALD, 2003). Acredita-se que a pressão de 25-30 mN m<sup>-1</sup> corresponde à pressão lateral exercida pelas moléculas na membrana (MARSH, 1996).

Modelos de membrana podem ser obtidos com filmes de Langmuir com apenas um componente ou em monocamadas mistas (PANDA et. Al., 2010), sendo os fosfolipídios os mais empregados (BREZESINSKI; MOHWALD, 2003). Outros componentes podem ser incorporados à monocamada por adição na subfase, tais como fármacos, polissacarídeos, proteínas etc. A interação destes componentes pode ser avaliada através das isotermas de pressão superficial. A estabilidade das monocamadas mistas pode ser avaliada pela pressão de colapso, pois se a pressão para a mistura for maior do que a dos componentes puros, o filme é dito mais estável. Diferenças na pressão de colapso também indicam miscibilidade. Uma mistura deve ter somente uma pressão de colapso, normalmente diferente daquelas dos componentes puros (Tong, 2005; PAVINATTO, 2014). Há uma grande variedade de técnicas de caracterização das monocamadas, incluindo microscopia no ângulo de Brewster e espectroscopia no infravermelho com modulação da polarização.

## Lipossomos

Em 1965, Alec Bangham e colaboradores descreveram a formação espontânea de estruturas membranares fechadas, ao investigar a difusão de íons através de membranas lipídicas (SANTOS; Castanho, 2002). Weissmann deu a elas o nome de lipossomos (SESSA; WEISSMANN,1968). No entanto, em 1947, Bernard já havia postulado a existência de estruturas multilamelares obtidas da hidratação de fosfolipídios, às quais denominou "figuras de mielina" (SANTOS; CASTANHO, 2002); (JONES; CHAPMAN,1995). Os lipossomos, ou vesículas lipídicas, representados na Figura 11, são formados por fosfolipídios com duas cadeias hidrofóbicas, podendo também incluir outros componentes, como o colesterol (LASIC, 1993); (NEW, 1990). Os lipossomos podem ser constituídos por uma ou várias membranas concêntricas, com tamanho de 20 nm até alguns µm de diâmetro (NEW, 1990).



Figura 11- Representação esquemática de um lipossomo.

Uma característica física importante das bicamadas lipídicas é a temperatura de transição de fase, Tc, em que ocorre alteração da organização dos fosfolipídios. Esta temperatura depende da natureza do grupo polar e do comprimento e grau de insaturação das cadeias (NEW, 1990). Assim, bicamadas lipídicas podem ser ordenadas em uma fase gel-sólido e em temperaturas mais elevadas, em uma fase mais fluida denominada de cristal-líquido (LASIC, 1993); (NEW, 1990), como mostrado esquematicamente na Figura 12. Abaixo de T<sub>c</sub>, as cadeias de hidrocarbonetos adotam conformação distendida e empacotadas com movimentos restritos. Acima da T<sub>c</sub>, há um aumento da mobilidade das cadeias, a área ocupada por cada molécula de fosfolipídio é maior e a espessura da bicamada diminui (LASIC, 1993); (NEW, 1990). A fase da bicamada determina propriedades da membrana, como permeabilidade, fusão, agregação, ligação de proteínas e funcionalidade das moléculas.

Existem vários métodos para a preparação de diferentes tipos de lipossomas. Em sua maioria, incluem a hidratação de um filme lipídico, em que os lipídios são inicialmente dissolvidos em solvente orgânico, seguido de evaporação do solvente. Posteriormente esse filme é hidratado com água ou solução tampão, sob agitação magnética vigorosa, o que promove formação da dispersão de lipossomos multilamelares (MLVs). O fármaco a ser encapsulado pode ser incorporado na solução tampão (hidrofílicos) ou dissolvido na mistura lipídica (lipofílicos). Entretanto este método possui a desvantagem da baixa encapsulação para fármacos hidrofílicos (Sharma, 1997). A partir das dispersões de MLV's, podem ser utilizados vários métodos para produzir dispersões homogêneas de vesículas unilamelares pequenas (SUV's), que possuem diâmetro de 45 a 80 nm, e vesículas unilamelares grandes (LUV's), que possuem diâmetro superior a 100 nm. Podem-se empregar processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos. Os mais utilizados são os processos mecânicos, que incluem: a extrusão através de membranas de policarbonato com diferentes porosidades, prensa de French ou uso de homogeneizador/ microfluidificador e a sonicação (Lasic, 1993). As SUV's e LUV's também podem ser preparadas pelo método de injeção de etanol ou éter (processo químico), com lipídios sendo dissolvidos no solvente orgânico e injetados em solução aquosa aquecida, seguido de evaporação do solvente (LASIC, 1993).



Estado de gel-sólido

Estado de cristal-líquido

Figura 12 - Representação esquemática da organização estrutural das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios no estado de gel-sólido e de cristal-líquido. (representação obtida de dissertação de FERREIRA, 2006)

Formam-se lipossomos apenas quando os lipídios são manipulados em temperaturas acima da  $T_c$ , para permitir que a água penetre entre as camadas lipídicas. A temperatura pode, contudo, diminuir sem que haja destruição dos lipossomos (JONES; CHAPMAN, 1995); (FERREIRA, 2006).

## 2. Procedimentos Experimentais

### 2.1. Materiais

Foram utilizados nos experimentos solução tampão fosfato-salino (PBS)  $(8 \text{ g L}^{-1} \text{ de NaCl}, 0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ de Na}_2\text{HPO}_4, 0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ , com pH 7.4; e sal obtido da dipalmitoilfosfatidilcolina Synth). Os lipídios (DPPC); dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG); dioleoilfosfoetanolamina (DOPE); dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG); e cardiolipina (CL) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids, o lipopolissacarídeo de E. coli J5 (Rc mutant) (L5014) foi adquirido da Sigma Aldrich, o clorofórmio e metanol da Merck. As estruturas dos fosfolipídios são mostradas na Figura 13. A água foi previamente purificada pelo System Milli-Q -Integral 10, da Millipore (resistividade 18.2 MΩcm; pH 5,6). Todos os outros reagentes e soluções foram utilizados com grau analítico. Os experimentos foram realizados em sala limpa com temperatura de 23 ± 1°C e umidade controlada.





Figura 13 - Estrutura Molecular: A) DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina; B) DPPG – Dipalmitoilfosfatidilglicerol; C) DOPE- Dioleoil Fosfoetanolamina; D) DOPG -Dioleoil Fofatidilglicerol; E) CL – Cardiolipina (figuras obtidas de http://www.avantilipids.com/index.php em 10/06/15); e F) LPS *E. coli* 

#### 2.2. Metodologias

## 2.2.1. Metodologia para obtenção dos EBs de pimenta malagueta e dedo-demoça

A pimenta malagueta possui de 15 a 40 mm de comprimento e 3 a 10 mm de diâmetro. A pimenta dedo-de-moça possui comprimento de 70 a 75 mm com diâmetro de 10 a 20 mm. A coloração vermelha em ambas as variedades indica a maturidade do fruto (MONTEIRO, 2006). A Figura 14 mostra as duas variedades de pimentas usadas para extração dos capsaicinóides (caps).

Os caps são solúveis em solventes orgânicos como hexano, clorofórmio, acetona, etanol, metanol, acetato de etila etc. (SUZUKI E IWAI, 1984). Entretanto, neste estudo foi escolhido como solvente o etanol 99,3% devido à disponibilidade, segurança de manuseio, toxicidade e baixo custo. Os extratos brutos (EB) das pimentas foram obtidos triturando-se 1 kg de pimenta fresca com 1L de etanol em um liquidificador. A mistura permaneceu em infusão durante 5 dias. Após este período, o extrato foi filtrado a vácuo e o resíduo da filtração foi novamente colocado em 800 mL de álcool e deixados em infusão durante mais 5 dias sendo posteriormente repetido o processo de filtração. O extrato obtido foi submetido a um rotoevaporador para concentrar o EB através da evaporação do solvente, sendo então separados em tubos Falcon e colocados em uma centrífuga para retirada de resíduos de etanol e água. A extração do EB das pimentas foi realizada no laboratório de química do Grupo de Polímeros Bernhard Gross.



A)



Figura 14 – Fotos dos dois tipos de pimentas utilizadas: a) Pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) e b) Pimenta dedo-de-moça (*Capsicum bacatum*)

## 2.2.2. Determinação de curvas de Concentração Micelar Crítica (CMC)

Curvas de tensão superficial versus concentração dos EB de pimentas foram medidas para estimar a concentração micelar crítica (CMC), usando-se uma microcuba da marca Kibron, mostrada na Figura 15. As tensões foram medidas inserindose sucessivas soluções com concentrações pré-determinadas de amostras de caps dos EB de pimentas em tampão PBS (pH 7,4) na micro cuba contendo 500 µL de solução tampão.



Figura 15 – Sistema de fabricação de filmes de Langmuir Microcuba Kibron.

### 2.2.3. Isotermas de pressão superficial

Na metodologia para verificar a interação entre os fosfolipídios e os EB de pimentas, as amostras de EB de pimentas foram incorporadas à subfase por diluição prévia do EB com a solução tampão PBS, antes da formação do filme de Langmuir. A pressão foi zerada apenas com solução tampão PBS e sugada rapidamente para colocar a solução contendo EB de pimenta e tampão PBS. Após colocar a solução de EB pimenta em tampão PBS na cuba, a solução de fosfolipídio foi espalhada cuidadosamente na interface ar/água. O sistema ficou em repouso durante 20 min até que todo o clorofórmio evaporasse. As monocamadas foram comprimidas através do fechamento das barreiras móveis para obtenção das isotermas. As medidas de isoterma de pressão de superfície dos filmes de Langmuir e a deposição dos filmes Langmuir-Blodgett foram realizadas em cubas de Langmuir da *KSV Instruments*, modelo minitrough (área superficial de 75 x 323 mm<sup>2</sup> e volume de 250 mL), com temperatura (23±1°C) e umidade controladas dentro de sala limpa.

## 2.2.4. Microscopia no ângulo de Brewster

A visualização das monocamadas de Langmuir em tempo real pode ser realizada através da microscopia no ângulo de Brewster (BAM), que utiliza o fato de não haver reflexão de luz polarizada *p* quando luz incide num ângulo específico, o ângulo de Brewster. Este é determinado pela lei de Snell e depende dos índices de refração dos materiais do sistema. Para um feixe incidente de luz polarizada numa interface ar/água na cuba de Langmuir (Figura 16), tan  $\alpha = n_2/n_1$ , onde  $\alpha$  é o ângulo

de Brewster em radianos (rad);  $n_2$  é o índice de refração do ár (≈1) e  $n_1$  é o índice de refração da água (≈1,33). Assim, o ângulo de Brewster para a interface ar/água é 53° (NOBRE et al, 2010); (HÖENING; MOEBIUS, 1991). Não havendo reflexão, a imagem que aparece na superfície da água pura é escura. Ao adicionar um material na interface ar/água, modifica-se o índice de refração, há reflexão de luz e forma-se uma imagem da monocamada, que pode conter regiões com diferentes brilhos dependendo do tipo de molécula e da sua densidade.



Figura 16 – Esquema explicativo da técnica BAM: a luz polarizada incide sobre uma superfície com subfase pura, sendo que no ângulo de Brewster não ocorre reflexão. Quando o laser incide sobre a monocamada a imagem é refletida no detector, podendo ser observada durante a medida em tempo real. (figura adaptada de http://www.biolinscientific.com/ksvnima/technologies).

As micrografias obtidas por BAM, cujo equipamento é mostrado na Figura 17, foram realizadas inserindo o EB com diluição prévia de diferentes concentrações na subfase com solução tampão PBS (pH=7,4) e espalhando o fosfolipídio na superfície. As imagens foram salvas em função da compressão da monocamada. O equipamento utilizado foi BAM2 Plus (Nanofilms Technologies Germany), equipada com uma lente objetiva de 10x posicionada sobre uma cuba Nima com capacidade de 350 mL.



Figura 17 – Foto do equipamento de BAM acoplado à cuba de Langmuir.

# 2.2.5. Espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)

A espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) é especialmente útil para filmes finos e monocamadas na interface ar/água. Este método utiliza diferenças na refletividade de interfaces para a luz com polarizações *s*, perpendicular ao plano de incidência, e *p*, paralela a esse mesmo plano. Com PM-IRRAS, é possível utilizar a modulação de polarização para minimizar os efeitos de ruído nas medidas de refletividade e compensar as bandas de absorção do vapor d'água (Mendelsohn et. al, 2010). O espectro da refletividade diferencial pode ser determinado através das refletividades polarizadas na direção paralela (Rp) e perpendicular (Rs) ao plano de incidência através da equação:

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s}$$

O sinal medido no detector consiste em uma componente de alta frequência (50 kHz) (BLAUDEZ, 1996) que se baseia na diferença da intensidade da luz entre a radiação p e s da luz polarizada no modulador fotoelástico e um componente de baixa frequência baseado na soma destes sinais. Assim, o espectro da refletividade diferencial normalizada S é calculado a partir da diferença coletada ( $\Delta$ R) e a soma dos espectros ( $\Sigma$ R) das intensidades detectadas da luz p e s polarizadas. Os

espectros de PM-IRRAS foram obtidos mantendo-se o mesmo procedimento dos experimentos para obter as isotermas de pressão superficial, apenas pausando o experimento nas pressões onde seriam medidos os espectros. O equipamento utilizado foi o espectrômetro modelo PMI550 da KSV Instruments, com lâmpada de carbeto de silício como fonte de luz infravermelha. As medidas foram realizadas com ângulo de incidência de 80° à temperatura de 23±1°C. A cuba de Langmuir possui área superficial de 75 x 323 mm<sup>2</sup> e volume de 250 mL, mostrada na foto da Figura 18.



Figura 18 – Foto do equipamento de PM-IRRAS acoplado à cuba de Langmuir.

## 2.2.6. Espectros de UV-Vis de filmes Langmuir-Blodgett (LB)

Foram depositados filmes LB com 10 camadas de composição lipídicas de *E. coli* e *S. aureus* juntamente com os EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça em lâminas de quartzo para medidas de espectroscopia na região de 280 nm do espectro ultravioleta-visível (UV-VIS).

## 2.2.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima.

Para a determinação da CIM seguiu-se o protocolo descrito no manual "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI), do ano de 2012 (Clsi, 2012). Os ensaios consistiram na incubação das bactérias (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) com uma diluição seriada (de 10 a 0.04 mg/mL) dos EB das pimentas em microplacas esterilizadas de 96 poços (Costar microtiter plate) em um volume final de 200 µL (100 µL da cultura bacteriana e 100 µL de extrato). A quantidade inicial de bactéria foi aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. Como controle da ausência de proliferação bacteriana, utilizou-se o antibiótico ciprofloxacina. Os controles de meio de cultura (Muller-Hinton) e de solvente (água) também foram realizados. A inibição do crescimento foi determinada visualmente com ajuda de resazurina, após incubação por 24 h a 37°C. O ensaio foi realizado em triplicata.

# 2.2.8.Metodologia para elaboração de lipossomos com composição lipídica de E.coli e S. aureus

Utilizou-se o método de hidratação do filme lipídico, apresentado por Alec Bangham (PAPAHADJOPOULOS, D, 1978), em que é preparada uma solução de lipídio com um solvente ou uma mistura de solventes orgânicos que sejam, simultaneamente, eficientes na dissolução do lipídio e voláteis. Exemplos são o clorofórmio e clorofórmio/metanol. A solução preparada em um tubo de vidro é seca por injeção de gás inerte ou por evaporação a vácuo, formando-se uma fina camada lipídica nas paredes do tubo. O filme lipídico é hidratado com solução aquosa e após ciclos de agitação e aquecimento, formam-se lipossomos multilamelares. A Figura 19 apresenta os principais passos deste método.



Figura 19 – Método de preparação de lipossomos e representação esquemática da obtenção de LUVs e SUVs. A) formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; B) adição de uma solução aquosa ao filme lipídico; C) agitação e obtenção dos MLVs; D) processamento dos MLVs por extrusão ou sonicação levando à formação de SUVs (adaptado de http://www.avantilipids.com/).

Para simular diferentes tipos de membrana, foram produzidos lipossomos de acordo com as composições estabelecidas por Epand. (EPAND et.al, 2010), conforme a Tabela 2. Os lipossomos de LPS de *E. coli* foram obtidos com LPS rugoso de *E. coli* J5 (Rc mutant) (L 5014)da Sigma-Aldrich.

A ação dos caps derivados de pimentas na parede da composição lipídica celular das bactérias foi verificada com medidas de emissão de fluorescência com lipossomos contendo uma sonda fluorescente encapsulada. Estudou-se como os EB de pimentas interagem com lipossomos constituídos pelos fosfolipídios majoritários da membrana interna de *E. coli, S. aureus* e com LPS de *E. coli,* componente da membrana externa da bactéria Gram-negativa. Os lipossomos foram preparados a partir de uma concentração 1 mg mL<sup>-1</sup> para membrana de *E. coli e S. aureus,* solubilizados com uma mistura de 2 mL de clorofórmio/metanol (3:1). Os solventes foram evaporados com nitrogênio em fluxo baixo com leve rotação para formação de uma camada de filme fino na parede do tubo, e em seguida os tubos de ensaio foram armazenados num dessecador por um dia para eliminar o restante de solvente orgânico e umidade. Os filmes foram re-suspendidos com 2 mL solução de concentração 80 mM de carboxifluoresceína (CF) com tampão HEPES/NaCI (30 mM, pH 7,4). Cada tubo de ensaio foi submetido a ciclos de sonicação no ultrassom, aquecimento a 60°C e agitação em vórtex, por uma hora. Este procedimento foi

realizado para desestabilizar as lamelas concêntricas. Para obter lipossomos unilamelares, cada solução foi passada em um mini extrusor da Avanti Polar Lipids Inc., que consiste em duas microsseringas acopladas em uma mini extrusora da Avanti Polar Lipids (Figura 20), com membrana de policarbonato de porosidade 100 nm (Nucleopore).

O procedimento acima foi realizado para cada uma das composições da Tabela 2. O excesso de solução de CF não encapsulada foi eliminado por passagem da solução em uma coluna contendo Sephadex G-50 para separação por cromatografia de exclusão molecular, empregando-se tampão HEPES/Glicose 86 mM, pH 7,4 para eluição. Os lipossomos foram separados em eppendorfs à medida que saíam da coluna de cromatografia. Em seguida, foram realizadas as medidas de cinética de vazamento (*Leakage*), de acordo com o procedimento abaixo.

Tabela 2 - Proporção de lipídios nas membranas de bactérias (EPAND et. al, 2010)

Lipídio	E. coli	S. aureus
Dioleoilfosfoetanolamina (DOPE)	80%	-
Dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG)	15%	57%
Cardiolipina (CL)	5%	19%



Figura 20 – Mini extrusora da Avanti Polar Lipids, para obtenção de lipossomos com tamanhos iguais. (figura adaptada de http://www.avantilipids.com/index.php?option=com\_content&view=article&id=185 &ltemid=193, em 27/11/2015)

## 2.2.9. Medidas de cinética de vazamento

Em uma cubeta de quartzo de 600 mL foi colocada uma alíquota de 0,5 µL de solução de lipossomos com solução de HEPES/Glicose 86 mM, pH 7,4. Essa quantidade de solução tampão foi variada de um experimento a outro devido à inserção de volumes variados de EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça. A solução foi excitada em 492 nm, com emissão medida em 517 nm no fluorímetro modelo Cary Eclipse da VARIAN.

Colocada a alíquota de lipossomo na cubeta, juntamente com quantidades predeterminadas de tampão HEPES/Glicose 86 mM, pH 7,4, foi realizado um teste, em que se mediu a fluorescência por um minuto, após o que o compartimento da cubeta foi aberto para adicionar uma alíquota da solução de E.B. de pimenta. Fechou-se o compartimento e a medida foi retomada por 8 minutos. Após este tempo, a medida foi interrompida novamente para adicionar detergente TRITON 1%, para verificação do rompimento do restante dos lipossomos e liberação da CF restante. O experimento foi realizado para a composição fosfolipídica das bactérias *E. coli* e *S. aureus* com E.B. de pimenta malagueta e dedo-de-moça.

## 3. Resultados e discussões

As interações dos caps dos EB de pimenta malagueta e dedo-de-moça foram estudadas com filmes dos fosfolipídios DPPC e DPPG, além de composições fosfolipídicas típicas de membranas de *S. aureus* e *E. coli*, representativas das classes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Uma vez que membranas de bactérias Gram-negativas possuem uma camada externa de lipopolissacarídeo (LPS), foram realizados também estudos com LPS de *E. coli* para fins comparativos. Inicialmente serão mostrados os resultados para os fosfolipídios DPPC e DPPG com os EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça. Estas análises foram divididas em subitens e posteriormente seguirão os resultados pertinentes à caracterização de membranas de bactérias.

# 3.1. Tensiometria das pimentas malagueta (C. frutescens) e dedo-de-moça (C. bacattum)

Uma característica comum a moléculas tensoativas é a capacidade de formar micelas a partir da saturação da interface da solução, em que as partes apolares das moléculas unam-se e sua parte polar fique em contato com a solução. A concentração em que se formam as micelas é denominada concentração micelar crítica (CMC), propriedade intrínseca dos surfactantes (RIZZATTI, 2009). Em micelas, a área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas (cauda apolar) do surfactante e a água é reduzida. A Figura 21 mostra resultados das curvas de tensão de superfície versus concentração para o EB de pimenta malagueta, de onde se infere uma CMC de 0,0288 mg mL<sup>-1</sup>, obtida pela intersecção dos dois regimes lineares no gráfico.



Figura 21 - Curva de tensão superficial-concentração para a pimenta malagueta em solução PBS pH7,4.

A dependência da tensão superficial com a concentração do EB da pimenta dedo-de-moça é mostrada na Figura 22, levando a um valor de CMC de 0,06 mg mL<sup>-1</sup>, maior que o EB de pimenta malagueta. A queda total na tensão superficial foi tão grande quanto para o EB de pimenta malagueta. Na concentração de 0,05 mg mL<sup>-1</sup>, a tensão superficial foi reduzida para 60 mN m<sup>-1</sup>, enquanto para o EB de pimenta malagueta, na mesma concentração, a tensão foi 55 mN m<sup>-1</sup>. Essa redução pode ser associada às altas quantidades de dihidrocapsaicina na pimenta malagueta. Como esse composto possui uma cadeia alquil totalmente saturada, visto na estrutura molecular da Figura 1, é possível esperar um empacotamento mais compacto na interface com o EB malagueta. Isso gera maior partição do extrato na interface com a água, e portanto maior queda na tensão superficial.



Figura 22 - Curva de tensão superficial-concentração para a pimenta dedo-de-moça em solução PBS pH7,4.

## 3.2. Isotermas de Pressão superficial dos fosfolipídios DPPC e DPPG com EB de pimentas malagueta

Para evitar efeitos das micelas na interação com a monocamada lipídica, foram utilizadas apenas concentrações abaixo da CMC para o estudo na incorporação de caps na monocamada lipídica. Os caps formam monocamadas de Gibbs através da compressão de moléculas anfifílicas solúveis. Na Figura 23A são mostradas isotermas das monocamadas de Gibbs do EB de pimenta malagueta em diferentes concentrações. Nota-se que com o aumento da concentração há também aumento da pressão superficial para grandes e pequenas áreas moleculares.

Ao espalhar o fosfolipídio na superfície para formação de filmes de Langmuir observa-se que em baixas concentrações, as moléculas de capsaicinóides encontram-se em equilíbrio com a solução e adsorvidas na superfície. Aumentando a concentração de capsaicinóides há um aumento da interação entre as moléculas de caps/DPPC ou caps/DPPG e consequentemente a adsorção destas sob a superfície. A Figura 23B mostra isotermas de pressão de superfície para o EB de pimenta malagueta inserida na subfase da monocamada de DPPC. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e as curvas da figura são representativas. Em pressões de superfície menores que 30 mN m<sup>-1</sup>, as curvas são deslocadas para áreas maiores, ou seja, a monocamada se torna mais expandida. Por outro lado, para valores de pressão superficial maiores que 30 mN m<sup>-1</sup>, a curva se desloca para pequenas áreas. A expansão da monocamada pode ser atribuída à área de caps incorporados na monocamada lipídica, pois a expansão aumentou com a concentração de extrato na subfase. Essa penetração deveria ser esperada, pois o extrato contém compostos anfifílicos com caudas hidrofóbicas.

Já o deslocamento para menores áreas sob altas pressões de superfície pode ser explicado pela solubilidade parcial dos capsaicinóides em água. Eles podem ser expulsos das cadeias alquílicas do DPPC para a subfase aquosa retirando algumas moléculas de DPPC da monocamada. Kundo e colaboradores observaram comportamento similar na interação entre tenoxicam e monocamadas de DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina) (KUNDO et al., 2009), em que a redução de área foi atribuída à solubilização dos lipídios na subfase. A outra hipótese é que a atividade superficial pode causar sua permanência na subsuperfície, região imediatamente abaixo da interface. Esta interação pode atenuar a interação entre as cabeças polares de DPPC, facilitando a aproximação lipídica durante a compressão. Em outras palavras, a interação caps-cabeça polar lipídica pode estabilizar a monocamada, permitindo a compressão desta para menores áreas.




Figura 23 - Isotermas π-A para as monocamadas de Gibbs de EB de pimenta malagueta (A), isotermas de monocamadas de Langmuir de DPPC (B) e DPPG (C) com EB de pimenta malagueta na subfase de solução tampão PBS (PH 7,4) (concentrações indicadas na tabela).

Este efeito de condensação não varia linearmente com a concentração. Além disso, há duas importantes mudanças na isoterma: a primeira é a transição entre as fases líquido-expandida (LE) e líquido-condensada (LC) que não é mais uma região definida como um platô, ao contrário do DPPC puro. A segunda mudança está relacionada a um pequeno ombro em pressões de superfície em torno de 40 mN m<sup>-1</sup>. O primeiro fenômeno pode ser associado ao aumento na pressão a grandes áreas superficiais quando os capsaicinóides estão na subfase. Por exemplo, na menor concentração empregada a pressão aumenta para 5 mN m<sup>-1</sup>, que está próximo do valor de transição (entre a curva do DPPC puro e DPPC/0,002 mg mL<sup>-1</sup>) e pode mascarar a transição entre as fases. Outra explicação é que um filme híbrido

geralmente não sofre transição de primeira ordem (não há formação de platô), devido à dificuldade dos lipídios em se ordenarem quando um segundo elemento está presente. Isso tende a alterar a fluidez da monocamada, tornando-a mais compressível.



Figura 24 – Cs<sup>-1</sup> para monocamadas para diferentes concentrações de EB de pimenta malagueta (indicadas no encarte da figura) com: A) DPPC, B) DPPG.

A compressibilidade do filme pode ser avaliada com o cálculo do módulo de compressibilidade (Cs<sup>-1</sup>), definido por Davies e Rideal como –A ( $\partial \pi/\partial A$ )<sub>T</sub>, sendo T a temperatura absoluta. As monocamadas são classificadas com base no K, em que cada intervalo de valores corresponde a um estado físico. De acordo com Davies e Rideal (DAVIES; RIDEAL, 1963), no intervalo entre 12,5 e 50 mN m<sup>-1</sup> a monocamada se encontra no estado LE, entre 50 a 100 mN m<sup>-1</sup>, no estado L, entre 100 a 250 mN m<sup>-1</sup> no estado LC, e acima de 250 mN m<sup>-1</sup>, estado S. A Figura 24 mostra que na pressão de 40 mN m<sup>-1</sup>, que corresponde a aproximadamente 40 Å<sup>2</sup> de área molecular, K diminui de 160 m Nm<sup>-1</sup> para o DPPC puro, a 100 mN m<sup>-1</sup> para o DPPC com 0.001 mg mL<sup>-1</sup> de capsaicinóides do EB de pimenta malagueta. A pressão de 40 mN m<sup>-1</sup> corresponde à região de formação de um ombro na região das isotermas de pressão superficial, provavelmente porque a introdução de capsaicinóides dificulta o empacotamento das moléculas de lipídios, principalmente devido à insaturação da capsaicina. A presença de um ombro em altas pressões pode ser associada ao início de uma transição 2D-3D, com colapso da monocamada e expulsão das moléculas incorporadas nas cadeias alquílicas do DPPC para a subfase.

Para o DPPG na Figura 23C, um comportamento similar foi observado, com a contínua expansão para grandes quantidades de caps introduzidos na subfase aquosa, e um ombro em torno de 50 - 60 mN m<sup>-1</sup>. As explicações são similares às

para o DPPC, sendo que o efeito de condensação acima descrito para DPPG ocorre a valores de pressão de superfície muito próximos do colapso da monocamada. As monocamadas são expandidas para altas concentrações de caps (aumento a partir de 0,003 mg mL<sup>-1</sup>), comprovando que as moléculas permanecem interagindo com os lipídios na interface. O módulo de compressibilidade para a monocamada com DPPG, na pressão de 50 mN m<sup>-1</sup>, é aproximadamente 200 mN m<sup>-1</sup> e se reduz a 150 mN m<sup>-1</sup> para concentração de 0,001 mg mL<sup>-1</sup>. Esses valores sofrem redução à medida que a concentração de caps aumenta, até o valor de 100 mN m<sup>-1</sup> para a concentração de 0,006 mg mL<sup>-1</sup>.

Uma indicação de que os caps que compõem o EB da pimenta malagueta interagem com a monocamada de fosfolipídios DPPC e DPPG está na Figura 25, que mostra a variação de pressão superficial em monocamadas de fosfolipídio puro e de fosfolipídios na sufbase variando a concentração de EB. Estes valores foram obtidos das isotermas de pressão superficial antes da compressão da monocamada de fosfolipídios com o EB das pimentas. Aumentando-se a concentração há um aumento da pressão nas curvas de EB de pimentas sem a presença do fosfolipídio. Com o fosfolipídio na interface ar/água há um aumento de pressão superficial indicando interação entre as moléculas de fosfolipídio e EB de pimentas para grandes áreas moleculares.



Figura 25 – Pressão superficial versus concentração de EB de pimentas malagueta sem espalhamento de fosfolipídio na interface ar/água (curva vermelha) e com espalhamento de fosfolipídio na interface ar/água para: A) DPPC B) DPPG.

As isotermas para as monocamadas de Gibbs dos EB de pimenta dedo-demoça são mostradas na Figura 26A, na qual valores maiores de concentração implicam em maiores valores de pressões superficiais. Nas monocamadas de DPPC da Figura 26B para o E.B. da pimenta dedo-de-moça, observam-se modificações significativas em comparação com as isotermas de DPPC com pimenta malagueta. Há expansão das monocamadas mesmo em altas pressões superficiais. Acreditamos que isso se deva à diferença na composição de capsaicinóides em cada extrato. Para o DPPG na Figura 26C, as isotermas na presença do extrato de dedo-de-moça mostram expansão da monocamada para baixas pressões, sendo que em altas pressões de superfície há pequeno efeito de condensação. Este efeito é muito semelhante ao das isotermas de DPPC e DPPG com EB de pimenta malagueta. A partir de 40 mN m<sup>-1</sup>, há expulsão das moléculas de caps da monocamada de DPPG, ou devido à carga negativa das cabeças polares ou devido ao EB de pimenta dedo-de-moça possuir maior proporção de dihidrocapsaicina que o EB de pimenta malagueta.



A)



Figura 26 - Isotermas π-A para as monocamadas de Gibbs de EB de pimenta dedo-demoça: (A) isotermas de monocamadas de Langmuir de DPPC (B) e DPPG (C) com EB de pimenta dedo-de-moça na subfase de solução tampão PBS (PH 7,4) (concentrações indicadas na tabela).

Na Figura 27 é mostrado o efeito do aumento de pressão superficial das monocamadas com e sem o espalhamento dos fosfolipídios indicando interação entre as moléculas de fosfolipídio e EB de pimentas para grandes áreas moleculares, tais como para o EB de pimenta malagueta.



Figura 27 – Pressão superficial versus concentração de EB de pimenta dedo-de-moça sem espalhamento de fosfolipídio na interface ar/água (curva vermelha) e com espalhamento de fosfolipídio para: A) DPPC B) DPPG.

O módulo de compressibilidade do DPPC manteve-se alto na presença de EB de pimenta dedo-de-moça, a despeito de um deslocamento da curva para áreas maiores com a expansão da monocamada, como mostra a Figura 28A. Surpreendentemente, os efeitos maiores ocorreram para as menores concentrações de EB de pimentas. Para as monocamadas de DPPG na Figura 28B, os efeitos são semelhantes aos observados com EB de pimenta malagueta, em que houve redução do módulo de compressibilidade de 160 mN m<sup>-1</sup> (monocamada de DPPG puro) para aproximadamente 100 mN m<sup>-1</sup> para todas as concentrações na pressão de 40 mN m<sup>-1</sup>.



Figura 28 – Cs<sup>-1</sup> para monocamadas contendo diversas concentrações de EB de pimenta dedo-de-moça (indicadas no encarte da figura) com: A) DPPC B) DPPG.

Em resumo, os filmes de DPPC são mais afetados pelos extratos das duas pimentas do que os de DPPG. É provável que tal diferença seja atribuída à carga da cabeça polar do DPPG, mas os dados apresentados aqui não permitem comprovar esta hipótese. Os maiores efeitos da pimenta dedo-de-moça, por outro lado, podem

estar associados à maior presença de moléculas de dihidrocapsaicina do que na pimenta malagueta onde inicialmente supomos ter maior quantidade de capsaicina. Por possuir um grupo vinileno em sua cadeia alquílica, a capsaicina pode impedir um empacotamento eficaz, o que reduziria os efeitos. Entretanto, esta hipótese também não pôde ser comprovada integralmente, uma vez que a interação com as cabeças polares é relevante, como será mostrado na análise dos espectros de PM-IRRAS.

## 3.3. Estudo da interação através de PM-IRRAS, entre os capsaicinóides do EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça e monocamadas de fosfolipídios DPPC e DPPG

Para a caracterização dos filmes de Langmuir dos EB das pimentas malagueta e dedo-de-moça pela técnica de PM-IRRAS foram obtidos espectros entre o intervalo de numero de onda 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>, sendo mostradas somente as bandas de interesse. A concentração de EB de pimentas utilizadas na subfase das monocamadas foi de 0,05 mg mL<sup>-1</sup>. As bandas atribuídas ao espectro da Figura 29 são mostradas na Tabela 3. Na Figura 29 observa-se o espectro de PM-IRRAS para filmes de Gibbs dos EB pimenta malagueta e dedo-de-moça, com as principais bandas de absorção das pimentas. As bandas de estiramento dos grupamentos aromáticos dos EB das pimentas são fracas, podendo ser confundidas com ruídos. A banda referente ao grupamento N-H das amidas aparece em 1526 cm<sup>-1</sup>. O estiramento do grupamento C=O para amidas e o estiramento C=C nos vinilenos geralmente aparecem em 1620-1700 cm<sup>-1</sup>, onde observamos maior quantidade de capsaicina no EB da pimenta malagueta. Notam-se apenas pequenas diferenças entre os dois espectros, pois os extratos contêm grupamentos químicos semelhantes. Na região de 1272 cm<sup>-1</sup> aparece a banda intensa e negativa da ligação C-O do éter no anel aromático dos caps. A maior diferença encontrada nos espectros seria o grupo vinileno (C=C) na cadeia alquílica, em maior quantidade no EB da pimenta malagueta. Porém, este grupamento é de difícil detecção devido à interferência da banda H-O-H em 1620-1700 cm<sup>-1</sup>.

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Modo vibracional / Grupo funcional	Intensidade
2850 – 3000	υ <sub>ass</sub> (CH <sub>2</sub> ) alcanos υ <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> ) alcanos (CH <sub>3</sub> ) alcanos	Forte
1620 - 1680	υ (C=C) vinileno	Fraca/média
1400 - 1600	υ (C=C) anel aromático	Média
3000 - 3100	υ (C-H) anel aromático	Média/múltiplas bandas
1000 - 1300	υ <b>(C-O) éter</b>	Forte
1500 - 1700	ບ <sub>axial</sub> N-H amida	-
1640 - 1690	υ C=O amida	Forte
1600	N-H amina	Média
1050 - 1150	υ (C-O) álcool	Forte
3200 - 3600	υ (O-H) álcool	Forte
3500 - 3700	(O-H) álcool	Forte

Tabela 3 – Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados ao EB de pimenta malagueta e dedo-de-moça.



Figura 29 - Espectro de PM-IRRAS para E.B. pimenta malagueta e E.B. pimenta dedo-demoça em monocamadas de Gibbs formadas a partir de soluções dos extratos na concentração de 0,05 mg mL<sup>-1</sup>.

A Figura 30 mostra espectros para monocamadas de DPPC, apresentando as bandas de estiramento da ligação C=O em 1736 cm<sup>-1</sup> e uma banda larga, positiva, entre 1600 e 1700 cm<sup>-1</sup> aproximadamente, referente ao vinileno (C=C). Na presença dos EB de pimentas, esta banda larga torna a região do DPPC negativa, assim como nos filmes de Gibbs da Figura 29. A banda negativa em 1683 cm<sup>-1</sup>, atribuída à ligação interfacial H-O-H da água, se tornou ainda mais negativa com a introdução dos caps.

Na comparação dos espectros de IRRAS do DPPC e do sistema DPPC/ EB da pimenta dedo-de-moça, observam-se dois deslocamentos nas bandas vibracionais na região dos carbonos alifáticos na cauda dos fosfolipídios (Figura 31A). O primeiro deslocamento ocorre na banda de deformação assimétrica CH<sub>2</sub> (2843 cm<sup>-1</sup> para 2853 cm<sup>-1</sup>) para maiores valores de números de onda e o segundo nos agrupamentos metila terminais (2975 cm<sup>-1</sup> para 2962 cm<sup>-1</sup>) para menores números de onda (PAVINATTO, 2009; DICKO, 1991). Ambos os deslocamentos são indicativos de aumento de interação com o aumento de conformações trans entre as cadeias do DPPC com a molécula de capsaicina, presente em maior quantidade no EB de pimenta malagueta. Na região entre 1200 cm<sup>-1</sup> e 1300 cm<sup>-1</sup> (Figura 31) observa-se o deslocamento dos grupos P=O de 1224 cm<sup>-1</sup> para 1255 cm<sup>-1</sup>, indicando desidratação (NUNES, 2011). Este comportamento pode ser atribuído à interação das cabeças polares com os capsaicinóides sem ser caracterizada como ligação de hidrogênio. A interação observada nos espectros de PM-IRRAS das cadeias alifáticas e do grupo fosfato do fosfolipídio DPPC e a molécula de dihidrocapsaicina em maior quantidade no EB de pimenta dedo-de-moça é consistente com os resultados de isotermas de pressão para o DPPC do EB de pimenta dedo-de-moça.

Para o EB de pimenta malagueta não houve interações significativas, apenas um deslocamento para 2986 cm<sup>-1</sup> em relação ao DPPC, sem aumento de intensidade da banda, indicando desordem das cadeias carbônica. Nas isotermas de DPPC/EB de pimenta malagueta não foram observadas grandes alterações e os resultados dos espectros de PM-IRRAS estão coerentes com as isotermas de pressão superficial.

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Modo vibracional / Grupo funcional	Intensidade
	υ <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> ) alcanos	
2850 – 3000	υ <sub>ass</sub> (CH <sub>2</sub> ) alcanos	Forte
	υs (CH3) alcanos	
1000 - 1400	(P=O)	Forte
1620 - 1680	(C=C) vinileno	Fraca/média
1735- 1750	(C=O) éster	Forte
1000 - 1300	(C-O) éster	2 bandas ou
1000 - 1300	(C-O) ester	mais
1550 - 1640	(N-H) amida	Forte
1640 - 1690	(C=O) amida	Forte
1050 - 1150	(C-O) álcool	Forte
3200 - 3600	(O-H) álcool	Forte

Tabela	4	-	Tabela	de	atribuições	dos	grupos	funcionais	s re	elacionad	os à	monocam	ada	de
		Ľ	OPPC/E	Βd	e pimenta m	nalag	ueta e D	DPPC/EB	de	pimenta d	dedo	-de-moça.		



Figura 30 - Espectro de PM-IRRAS para monocamadas de Langmuir de DPPC com EB pimenta malagueta *e* EB pimenta dedo-de-moça (0.05 mg mL<sup>-1</sup>) em subfase de tampão PBS (pH 7,4),  $\pi = 30$  mN m<sup>-1</sup>.



Figura 31 - Espectros de PM-IRRAS na região: A) alcanos (2800 a 300 cm<sup>-1</sup>) B) P=O (1224 cm<sup>-1</sup>) para monocamadas de DPPC com EB pimenta malagueta (0,03 mg mL<sup>-1</sup>) e EB pimenta dedo-de-moça (0,02 mg mL<sup>-1</sup>) em subfase de tampão PBS (pH 7,4),  $\pi$  = 30 mN m<sup>-1</sup>.

Os espectros de PM-IRRAS para as monocamadas de DPPC com EB de pimenta dedo-de-moça indicaram maior interação do que com EB de pimenta malagueta. Essas interações foram tanto na cauda quanto na cabeça dos fosfolipídios. Não houve mudanças significativas em outras regiões do espectro e pressões mais elevadas de superfície não alteraram o espectro significativamente.

A Figura 32 mostra os espectros da região entre 2800 cm<sup>-1</sup> a 3000 cm<sup>-1</sup>, correspondentes às ligações CH das cadeias alifáticas das monocamadas do DPPG puro e do DPPG com cada EB das pimentas malagueta e dedo-de-moça. Observase que não há diferenças no espectro da região –CH<sub>2</sub> alifático e CH<sub>3</sub> terminal das caudas de ambas pimentas em relação ao DPPG puro, evidenciando que não há interação entre as moléculas de DPPG e as moléculas de capsaicina e dihidrocapsaicina em maiores quantidades nos EA bruto de malaqueta e dedo-demoça, respectivamente. Na região do agrupamento P=O nas cabeças polares (Figura 33), observa-se inversão da banda dos espectros de DPPG com o EB das pimentas em relação ao extrato puro. Tal inversão está relacionada à orientação do agrupamento fosfato em relação à superfície da subfase aquosa. A presença dos EB de pimentas nas monocamadas de DPPG alterou a orientação do agrupamento fosfato, de sua orientação preferencialmente paralela na monocamada de DPPG puro para uma orientação preferencialmente perpendicular. Esta nova orientação mostra que o fosfato do DPPG tende a ficar disposto numa orientação paralela na superfície da subfase aquosa, o que resulta numa maior área molecular nas

monocamadas contendo EB das pimentas. Não há alteração na região do espectro do agrupamento C=O, mas a diminuição na intensidade dos espectros das pimentas em relação ao DPPG puro mostra expulsão mais acentuada das moléculas de DPPG nas monocamadas contendo EB de pimenta dedo-de-moça do que o EB de pimenta malagueta, conforme observado nos resultados das isotermas.



Figura 32 - Espectro de PM-IRRAS na região dos alcanos (2800 cm<sup>-1</sup> a 3000 cm<sup>-1</sup>) para monocamadas de Langmuir com DPPG/EB pimenta malagueta e EB pimenta dedo-de-moça (0,05 mg mL<sup>-1</sup>) em subfase de tampão PBS (pH 7,4),  $\pi$  = 30 mN m<sup>-1</sup>.



Figura 33 - Espectro de PM-IRRAS para monocamadas de Langmuir com DPPG/EB pimenta malagueta e EB pimenta dedo-de-moça (0,05 mg mL<sup>-1</sup>) em subfase de tampão PBS (pH 7,4),  $\pi$  = 30 mN m<sup>-1</sup>.



Figura 34 - Espectro de PM-IRRAS na região C=O (1730 cm<sup>-1</sup>), para monocamadas de DPPG com E.B. pimenta malagueta e E.B. pimenta dedo-de-moça (0,05 mg mL<sup>-1</sup>) em subfase aquosa. π = 30 mN m<sup>-1</sup>.

O maior efeito para o EB da pimenta dedo-de-moça na organização das moléculas de DPPG é contrário ao esperado com base nas isotermas de pressão de superfície, uma vez que o EB da pimenta malagueta apresentou maior efeito nas isotermas. Uma possível explicação para a discrepância nos resultados é que os maiores efeitos nas isotermas de pressão para o EB da pimenta malagueta estão relacionados a maiores expansões dos filmes de DPPG. Como maior expansão é causada pela possibilidade de acomodação das moléculas do EB de pimenta malagueta, o fato de a organização do DPPG ter sido menos afetada – como comprovam os espectros de PM-IRRAS – significa que tal acomodação foi facilitada. De fato, o espectro na região do estiramento C=O em 1730 cm<sup>-1</sup> indica que os caps no E.B. de pimenta malagueta mantêm orientação paralela à interface, da mesma maneira que o DPPG puro. Isso explica a preferência das moléculas do EB de pimenta malagueta manterem-se na monocamada de DPPG, causando grandes expansões nas isotermas de pressão da Figura 10B.

### 3.4. Caracterizações morfológicas das monocamadas de Langmuir por microscopia no ângulo de Brewster (BAM).

Para obter informações sobre a morfologia das monocamadas, foram obtidas imagens de microscopia no ângulo de Brewster (BAM), que permite a visualização direta do filme durante sua compressão. As imagens da Figura 35 para monocamada de DPPC puro mostram domínios na forma de feijões (bean-shaped) conforme o aumento da pressão, como esperado da literatura (KLOPFER, K.J, 1997). Tais domínios surgem quando o filme passa por uma transição LE-LC. Inicialmente, a monocamada é homogênea, sendo que os primeiros domínios aparecem em 3 mN m<sup>-1</sup>, aumentando de tamanho para pressões entre 5 e 10 mN m<sup>-1</sup>. Ao fim da transição de fase, estes domínios tendem a coalescer e formar um filme homogêneo na fase LC até seu colapso (NOBRE, 2010).



Figura 35 – Imagens de BAM de por monocamadas de DPPC em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

A Figura 36 mostra a incorporação de EB de pimenta malagueta na monocamada de DPPC, com formação de estruturas em baixas pressões. A nucleação de domínios na forma de pequenos pontos é ilustrada na Figura 36 ( $\pi$  = 7 mN m<sup>-1</sup>), provavelmente pela incorporação dos EB de pimenta malagueta. Esses pequenos pontos se mantêm até 10 mN m<sup>-1</sup>, com a formação de domínios maiores espalhados sobre a superfície e que se assemelham à monocamada de DPPC puro da Figura 35. Das isotermas de pressão da Figura 23, nota-se efeito da caps de EB de pimenta malagueta na monocamada apenas para a concentração mais baixa de 0,001 mg mL-1, a partir da pressão superficial de 14 mN m<sup>-1</sup>.



Figura 36 - Imagens de BAM de monocamadas de DPPC com EB de pimenta malagueta em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

Na Figura 37 são mostradas imagens do EB de pimenta dedo-de-moça incorporado às monocamadas de DPPC, com formação de domínios a partir de 8 mN m<sup>-1</sup>. As isotermas de pressão superficial para o DPPC mostram maior interação

entre o EB de pimenta dedo-de-moça com esse fosfolipídio. Porém, de acordo com as imagens por BAM, não houve grandes mudanças; em 10 mN m<sup>-1</sup>, os domínios encontram-se bem espalhados em comparação com o DPPC puro, em que os domínios se encontram bem compactados.



Figura 37 - Imagens de BAM de fosfolipídio DPPC com EB de pimenta dedo-de-moça em diferentes pressões (indicadas na figura).

As imagens das monocamadas de DPPG são mostradas na Figura 38, e revelam domínios de morfologia irregular em pressão de 8 mN m<sup>-1</sup>. Em áreas menores, abaixo da região de platô, em 9 mN m<sup>-1</sup>, a imagem é homogênea e os domínios crescem ao longo da região LE-LC transformando-se em figuras poligonais (MINÕNES, J. Jr., 2003). A partir de 11 mN m<sup>-1</sup>, os domínios ocupam toda a área disponível tornando-se bem empacotados.



Figura 38 – Imagens de BAM de monocamadas de DPPG em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

Com a adição de EB de pimenta malagueta (Figura 39), as imagens revelam a formação de domínios em pressões maiores (9 mN m<sup>-1</sup>) do que para as monocamadas de DPPG puro (3 mN m<sup>-1</sup>), além de mudanças na morfologia dos domínios que aparecem na monocamada de DPPG puro com EB de pimenta malagueta com formação de vilosidades. As isotermas de DPPG com EB de pimenta malagueta mostram maior interação do que o outro EB. Na pressão de 15 mN m<sup>-1</sup>, o

EB de malagueta induz alterações significativas na monocamada de DPPG, ao contrário do EB de pimenta dedo-de-moça da Figura 40.



Figura 39 - Imagens de BAM formadas por monocamadas de fosfolipídio DPPG com EB de pimenta malagueta em diferentes pressões (indicadas nas figuras).





Figura 40 - Imagens de BAM formadas por monocamadas de fosfolipídio DPPG com EB de pimenta dedo-de-moça em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

A análise das microestruturas das imagens de BAM é condizente com os resultados das isotermas de pressão superficial, pois a introdução dos EB das pimentas malagueta e dedo-de-moca alterou as monocamadas de DPPC e DPPG. A exceção ocorreu para monocamadas de DPPC/EB de pimenta dedo-de-moça, para as quais se esperavam mudanças de morfologia ou aumento domínios que justificassem a maior interação entre DPPC e EB de dedo-de-moça.

Os principais resultados dos experimentos com os fosfolipídios DPPC e DPPG com os EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça encontram-se resumidos na Tabela 5.

Π –ΔΑ					DAM			
	(30 m	N m <sup>-1</sup> )	FWFIKKAS		DAW			
	DPPC	DPPG	DPPC	DPPG	DPPC	DPPG		
malagueta	+8Å <sup>2</sup>	+15Å <sup>2</sup>	Não houve alterações significativas	1269 cm <sup>-1</sup> : houve inversão da banda com adição de EB	Π =10 mN m <sup>-1</sup> As imagens são semelhantes com a do DPPC sem EB - indicando que não há mais caps inseridos na monocamada.	Maior proporção de regiões LE (regiões escuras) - condizente com as isotermas.		
dedo-de-moça	+30Å <sup>2</sup>	+20Å <sup>2</sup>	CH <sub>2</sub> : deslocamento de 10 cm <sup>-1</sup> para maiores números de onda: ordenamento das cadeias. P=O: deslocamento de 30 cm <sup>-1</sup> para maiores números de onda: desidratação.	de ambas as pimentas: mudança na orientação do grupo fosfato de paralelo para perpendicular	$\Pi$ =10 mN m <sup>-1</sup> Domínios (LC) são maiores com predominância da fase LE (região escura) – condizentes com isotermas.	Π =16 mN m <sup>-1</sup> As imagens são semelhantes com a do DPPG sem EB - indicando que não há mais caps inseridos na monocamada.		

Tabela 5 – Tabela com os principais resultados dos experimentos com os fosfolipídios DPPC e DPPG com EB de pimenta malagueta e dedo-de-moça.

# 3.5. Interação dos EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça com membranas de bactérias E. coli, LPS de E. coli e S. aureus.

Os estudos com DPPC e DPPG com os EB de pimentas malagueta e dedode-moça ajudaram a investigar a interação com membranas que simulam as de mamíferos. Para verificar efeitos em membranas de bactérias, serão empregados modelos de membrana de *E. coli* e *S. aureus*, que são bactérias gram-negativa e gram-positiva, respectivamente.

#### 3.5.1. Resultados de Concentração Inibitória Mínima.

Os resultados dos experimentos de MIC não demonstraram nenhuma atividade para a bactéria do tipo GRAM-negativa, *E. coli*, para nenhum dos EB de pimentas. Por outro lado, para a bactéria tipo GRAM-positiva, *S. aureus*, a MIC foi correspondente a 0,13 mg mL<sup>-1</sup> para o EB de pimenta dedo-de-moça e 4,00 mg mL<sup>-1</sup> para o EB de pimenta malagueta.

### 3.5.2. Isotermas de pressão superficial de membranas de E. coli, LPS de E. coli e S. aureus com EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça

Na Figura 41 são mostradas as isotermas das monocamadas para a composição que simula membranas de *E. coli* (vide Tabela 2) com EB de pimenta malagueta (Figura 41A) e dedo-de-moça (Figura 41C) incorporados. As isotermas para *E. coli* são mais expandidas e com menor pressão de colapso comparadas com as isotermas dos fosfolipídios DPPC e DPPG.

A incorporação de EB das pimentas torna a isoterma mais expandida, com a área por molécula em baixas pressões aumentando com a concentração do EB. Para o EB de pimenta malagueta parece haver uma concentração de saturação, a partir da qual a monocamada já não fica ainda mais expandida. Em altas pressões, as isotermas praticamente coincidem com aquela da *E. coli*, o que deve indicar que os caps do EB não permanecem incorporados nessas altas pressões. Nos gráficos da Figura 41 B, nota-se expansão dos filmes para todas as pressões em diferentes concentrações. Por exemplo, na pressão de 10 mN m<sup>-1</sup>, com o aumento da concentração de EB de pimenta malagueta, há aumento da área molecular, indicando que as moléculas de caps dos EB da pimenta interagem com a membrana de *E. coli*. A partir da pressão de 15 mN m<sup>-1</sup>, a quantidade de caps se torna estável nos filmes, a partir da concentração de 30 mN m<sup>-1</sup>. Na Figura 41 D, observamos um comportamento um pouco diferente do que ocorre com o EB de pimenta malagueta. Com o aumento da concentração de EB de pimenta de do-de-moça há um aumento

gradativo da área molecular. Por exemplo, para a pressão de 10 mN m<sup>-1</sup>, na concentração de 0,003 mg mL<sup>-1</sup>, a área molecular é ~150 Å<sup>2</sup>, aumentando para 220 Å<sup>2</sup> na concentração de 0,010 mg mL<sup>-1</sup>. Na pressão de 30 mN m<sup>-1</sup>, a área aumenta de ~82 Å<sup>2</sup> para ~110 Å<sup>2</sup>, nas concentrações de 0,003 e 0,010 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente. Este resultado demonstra que os filmes formados por membrana de *E. coli* interagem mais com o EB de pimenta dedo-de-moça.



Figura 41 - Isotermas de filmes de membrana de *E. coli* com: A) E.B. da pimenta malagueta e C) E.B. da pimenta dedo-de-moça. Gráficos de área molecular x concentração para filmes de membrana de *E. coli* com: B) E.B. da pimenta malagueta e D) E.B. da pimenta dedo-de-moça.

As isotermas de pressão superficial para monocamadas de LPS de *E. coli* contendo EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça encontram-se na Figura 42A e C, respectivamente. Para baixas pressões, no estado líquido-expandido, a incorporação de EBs causa deslocamento progressivo para maiores áreas. Para o EB de pimenta malagueta, todas as isotermas são deslocadas mesmo em altas pressões superficiais, mas para a dedo-de-moça as isotermas coincidem em altas pressões. Na Figura 42 (B e D), observa-se expansão das monocamadas com aumento das concentrações de ambos os EBs de pimentas em todas as pressões.

O efeito da variação de concentração de EB de pimentas foi maior para monocamadas de membrana de *E. coli* do que por LPS de *E. coli*. Isto pode ser resultado dos açúcares de LPS, que podem causar efeito estérico desfavorecendo o empacotamento da monocamada. Para pressão superficial acima de 10 mN m<sup>-1</sup>, observa-se que EB de pimenta malagueta continua nas monocamadas de LPS de *E. coli*, ao contrário do que ocorre com EB de pimenta dedo-de-moça. Podemos concluir assim que para monocamadas de membranas de LPS de *E.coli*, o EB de pimenta malagueta possui maior interação.



Figura 42 - Isotermas de filmes de membrana de LPS de *E. coli* com: A) E.B. da pimenta malagueta e C) E.B. da pimenta dedo-de-moça. Gráficos de área molecular x concentração para filmes de membrana de LPS de *E. coli* com: B) E.B. da pimenta malagueta e D) E.B. da pimenta dedo-de-moça.

Isotermas π-A das monocamadas de membrana de *S. aureus* com subfase contendo EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça são mostradas na Figura 43A e C, respectivamente. Observa-se que também houve aumento da pressão superficial inicial com aumento da concentração de EB de pimentas antes da

compressão do filme. Para pressão superficial de 10 mN m<sup>-1</sup>, nas concentrações de EB de pimentas em 0,015 mg mL<sup>-1</sup> as áreas moleculares foram semelhantes, em aproximadamente 160 Å<sup>2</sup>. Em baixas pressões de superfície observa-se expansão crescente das curvas com aumento da concentração de EB de pimentas. Na isoterma para o EB de pimenta malagueta (Figura 43A) observa-se expansão das curvas com o aumento da concentração de EB de pimentas de 0.001 mg mL<sup>-1</sup> até 0,008 mg mL<sup>-1</sup>. A partir da concentração de 0,01 mg mL<sup>-1</sup> houve redução do efeito de expansão a partir da pressão superficial de 20 mN m<sup>-1</sup>, ou seja, as curvas para essas concentrações se tornam mais condensadas. Para a concentração de 0.01 mg mL<sup>-1</sup>, a partir da pressão superficial de 25 mN m<sup>-1</sup>, houve expulsão das moléculas de EB de pimenta malagueta, que ao serem expulsas da monocamada carrearam moléculas da membrana de S. aureus, resultando na condensação abaixo da isoterma de pressão da monocamada formada apenas com membrana de S. aureus. Na Figura 43B, mostra-se expansão dos filmes de S. aureus, com queda na área por molécula para todas as pressões na concentração de 0,008 mg mL<sup>-1</sup> e aumento da área a partir da concentração de 0,01 mg mL<sup>-1</sup>.

Nas isotermas relacionadas ao EB da pimenta dedo-de-moça (Figura 43C), observa-se o mesmo efeito inicial ao aumentar-se a concentração de EB de pimentas, ou seja, houve aumento da pressão superficial inicial com aumento da concentração de EB de pimentas antes da compressão do filme. Para baixas pressões, observa-se o efeito de expansão das isotermas em todas as concentrações, porém para baixas concentrações de EB de pimenta dedo-de-moça com 0,001 mg mL<sup>-1</sup> e 0,003 mg mL<sup>-1</sup>, houve expulsão das moléculas de pimenta do filme a partir de 20 mN m<sup>-1</sup> e a partir de 30 mN m<sup>-1</sup> houve expulsão das moléculas de EB de pimenta de todas as concentrações restantes. Na Figura 43D, há expansão dos filmes de S. aureus à medida que se aumenta a concentração de EB de pimenta dedo-de-moça. No entanto, não se observa queda da área por molécula em nenhuma concentração como observado para o EB de pimenta malagueta. Em todas as concentrações há expansão dos filmes, exceto para a pressão superficial de 30 mN m<sup>-1</sup>, onde há queda da área na concentração de 0,06 mg mL<sup>-1</sup>. Destes gráficos conclui-se que os maiores efeitos são para os filmes de S. aureus com o EB de pimenta malagueta.

92



Figura 43 - Isotermas de filmes de membrana de S. aureus com: A) E.B. da pimenta malagueta e C) E.B. da pimenta dedo-de-moça. Gráficos de área molecular x concentração para filmes de membrana de S. aureus com: B) E.B. da pimenta malagueta e D) E.B. da pimenta dedo-de-moça.

# 3.6. Estudo da interação entre monocamadas de membranas de E. coli, LPS de E. coli e S. aureus e caps dos EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça.

Foram caracterizados os filmes de Langmuir dos EB das pimentas malagueta e dedo-de-moça com monocamadas de membrana de *E. coli*, LPS de *E. coli* e *S. aureus* pela técnica de PM-IRRAS. Os espectros foram obtidos no intervalo do número de onda entre 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, sendo mostradas apenas as bandas de interesse. A concentração de EB de pimentas na subfase foi de 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, e os experimentos realizados com solução tampão PBS (pH 7,4), na pressão de 30 mN m<sup>-1</sup>, pois observa-se maior interação sem colapso da monocamada.

#### 3.6.1. *E. coli*

Na Tabela 6 são mostradas as atribuições dos grupos funcionais das monocamadas formadas a partir da composição artificial de fosfolipídios da membrana de *E. coli* pura e de cada EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça. Na região de 2800 cm<sup>-1</sup> a 3000 cm<sup>-1</sup> (Figura 44A) observam-se três bandas atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> terminal, referentes à cauda dos fosfolipídios da membrana de E. coli. Na Figura 44A nota-se que para ambos EB de pimentas, estas três bandas comparadas à membrana de E. coli pura, sofrem deslocamentos para menores números de onda. Para a banda de CH<sub>2</sub> assimétrico houve deslocamento de 2844 cm<sup>-1</sup> para 2823 cm<sup>-1</sup> no filme com EB de pimenta malagueta e 2844 cm<sup>-1</sup> para 2832 cm<sup>-1</sup> no filme com EB de pimenta dedo-de-moça. Para a banda de CH<sub>2</sub> simétrico, ocorrem deslocamentos de 2901cm<sup>-</sup> <sup>1</sup> para 2893 cm<sup>-1</sup> no filme com EB malaqueta e 2922 cm<sup>-1</sup> para 2913 cm<sup>-1</sup> no filme com EB de pimenta dedo-de-moça. O deslocamento na banda de CH3 terminal, apesar de evidente, se encontra na faixa de erro do equipamento, cerca de 8 cm<sup>-1</sup>. Com a adição dos EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça, ocorrem deslocamentos para menores números de onda, provavelmente devido à desordem das cadeias. Isso foi mencionado no item 6.3 para cadeias de DPPC, em que deslocamentos das bandas referentes à ligação C-H para números de onda menores (PAVINATTO A., 2014), verificado na Figura 44A, são em geral associados a maior desordenamento das cadeias dos fosfolipídios.

A banda referente à ligação CH<sub>2</sub> assimétrico, em 2901 cm<sup>-1</sup> para a membrana de *E. coli* também teve deslocamentos para menores números de onda quando adicionados EB das pimentas malagueta e dedo-de-moça, para 2893 cm<sup>-1</sup> e 2878 cm<sup>-1</sup> respectivamente. Para a banda referente ao CH<sub>2</sub> simétrico, em 2844 cm<sup>-1</sup> para a membrana de *E. coli*, observamos a mesma tendência de redução no número de onda para 2823 cm<sup>-1</sup> e 2832 cm<sup>-1</sup> com o EB de pimenta dedo-de-moça e malagueta, respectivamente. Estes resultados condizem com as isotermas de pressão superficial, pois é esperada grande interação entre as caudas das cadeias resultando numa alta compressibilidade da monocamada, como foi observado nas isotermas de *E. coli* e os EB de ambas pimentas. Esta contradição pode ser explicada pelo aumento da complexidade das moléculas na formação da membrana, onde os diferentes tipos de moléculas tendem a aumentar a desordem na

membrana. A adição dos caps dos EB pode superar este efeito pela grande interação entre os agrupamentos da cadeia alquílica, como observado nos espectros de PM-IRRAS.

Analisando as bandas dos grupos fosfato nas cabeças polares dos fosfolipídios (Figura 44B) em 1258 cm<sup>-1</sup>, é possível notar que não há nenhum deslocamento das membranas contendo as pimentas em comparação com a membrana pura de *E. coli*. Mas o aumento na intensidade das bandas nos espectros contendo os EB de pimentas é indicativo de maior densidade de caps na interface. Este mesmo comportamento pode ser observado nas bandas dos grupos vinileno (C=C) em 1746 cm<sup>-1</sup> na região da cauda (Figura 44C) e nas bandas de amina em 1614 cm<sup>-1</sup> (Figura 44D) da cabeça polar do fosfolipídio DOPE.

Tabela 6 – Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados à membrana de *E. coli* e EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça.

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Modo vibracional / Grupo funcional	Intensidade
2850 – 3000	$v_{ass}$ (CH <sub>2</sub> ) alcanos $v_{s}$ (CH <sub>2</sub> ) alcanos $v_{s}$ (CH <sub>3</sub> ) alcanos	Forte
1000 - 1400	v <sub>ass</sub> (P=O)	Forte
1620 - 1680	υ(C=C) vinileno	Fraca/média
1735- 1750	υ(C=O) éster	Forte
1000 - 1300	υ <b>(C-O) éster</b>	2 bandas ou mais
1550 - 1640	υ <b>(N-H) amida</b>	Forte
1640 - 1690	υ (C=O) amida	Forte
1600	υ(N-H) amina	média







Figura 44 – Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de Langmuir formadas pela composição lipídica de *E. coli* e 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça, em tampão PBS pH 7,4 – 30 mN m<sup>-1</sup>. A) região de vibração dos alcanos; B) região de vibração dos P=O; C) região de vibração do vinileno C=C; D) região de vibração da amida N-H.

#### 3.6.2. LPS E. coli

Na Tabela 7 encontram-se as atribuições dos grupos funcionais referentes à membrana de LPS de *E. coli* juntamente com os EBs pimentas malagueta e dedode-moça. A região entre 2800 cm<sup>-1</sup> e 3000 cm<sup>-1</sup> é mostrada na Figura 45A, com bandas do estiramento simétrico e assimétrico das ligações CH<sub>2</sub>, em 2853 cm<sup>-1</sup> e 2916 cm<sup>-1</sup>, respectivamente e uma banda em 2982 cm<sup>-1</sup> referente ao CH<sub>3</sub> terminal das cadeias alifáticas. A intensidade da banda em 2917 cm<sup>-1</sup> diminui ao inserir o EB de pimentas na subfase, possivelmente porque as moléculas de caps interferem nas caudas apolares das moléculas de LPS, restringindo o empacotamento e reduzindo a intensidade do espectro. Na região entre 1670 e 1820 cm<sup>-1</sup> na Figura 45B aparecem as bandas das ligações C=O (carbonila), em 1739 cm<sup>-1</sup> para C=O dos ácidos carboxílicos da cadeia de LPS, e em 1698 cm<sup>-1</sup> aparece um ombro associado a C=O das ligações amida, presentes tanto no LPS quanto nos EB de pimentas.

Entre 1000 e 1300 cm<sup>-1</sup>, Figura 45C, na região da ligação C-O dos ésteres: a) o espectro do LPS possui três bandas em 1113, 1170 e 1244 cm<sup>-1</sup>; b) com inserção do EB de pimentas, as bandas se deslocam para 1146, 1204 e 1285 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, denotando desordem das cadeias de fosfolipídios. A banda referente ao fosfato (P=O), Figura 45D, encontra-se em 1240 cm<sup>-1</sup>, deslocando-se

para 1230 cm<sup>-1</sup> como efeito de hidratação e maior número de ligações de hidrogênio que o grupo participa com moléculas de água na interface (HÜBNER et.al, 1998).

Número de Onda (cm⁻¹)	Modo vibracional / Grupo funcional	Intensidade
	υ <sub>ass</sub> (CH <sub>2</sub> ) alcanos	-
2850 – 3000	υs (CH2) alcanos	Forte
	υ <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> ) alcanos	
1000 – 1400	υ (P=O)	Forte
1620 – 1680	υ(C=C) vinileno	Forte
1735- 1750	υ(C=O) éster	Forte
1000 – 1300	υ(C-O) éster	2 bandas ou mais
1550 – 1640	υ(N-H) amida	
1640 – 1690	υ(C=O) amida	forte
1000 – 1300	υ <b>(C-O) éter</b>	forte

Tabela 7 – Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados a membrana de LPS de *E. coli* e EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça.



Figura 45 – Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de Langmuir formadas por membrana de LPS de *E. coli* e 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça, em tampão PBS pH 7,4 – 30 mN m<sup>-1</sup>. A) região de vibração dos

carbonos alifáticos; B) região de vibração da C=O, éster; C) região de vibração do C-O, éster D) região de vibração dos P=O.

#### 3.6.3. S. aureus

Os espectros de PM-IRRAS para as monocamadas de S. aureus com os EB de pimentas são mostrados na Figura 46, e a atribuição das bandas mostradas na Tabela 8. Analisando os espectros das bandas dos grupos da cauda e da cabeça dos fosfolipídios da composição lipídica da monocamada de S. aureus, notam-se maiores deslocamentos causados pelo EB de pimenta malagueta do que para o EB de pimenta dedo-de-moça. Isto pode ser evidenciado na comparação dos espectros das monocamadas de S. aureus pura e contendo o EB de pimenta malagueta onde a região das caudas apresentou deslocamentos nas bandas dos grupos CH<sub>2</sub> assimétrico de 2917 cm<sup>-1</sup> para 2931 cm<sup>-1</sup> e nos grupos vinileno de 1647 cm<sup>-1</sup> para 1632 cm<sup>-1</sup>. Na cabeça polar, foram deslocadas bandas dos grupos fosfato de 1224 cm<sup>-1</sup> para 1244 cm<sup>-1</sup> e nas duas bandas dos grupos éster (1187 cm<sup>-1</sup> e 1219 cm<sup>-1</sup>) foram deslocadas para 1178 cm<sup>-1</sup> e 1237 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes deslocamentos em grupos da cabeça e cauda dos fosfolipídios da membrana de S. aureus na presença do EB de pimenta malagueta evidenciam a grande interação e justificam os resultados das isotermas da Figura 43.

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Modo vibracional / Grupo funcional	Intensidade
2850 – 2950	$ u_{ass}$ (CH <sub>2</sub> ) alcanos $ u_s$ (CH <sub>2</sub> ) alcanos $ u_s$ (CH <sub>3</sub> ) alcanos	Forte
1000 - 1400	υ (P=O)	Forte
1620 - 1680	υ (C=C) vinileno	
1735- 1750	υ(C=O) éster	Forte
1000 - 1300	υ(C-O) éster	2 bandas ou mais

Tabela 8 – Tabela de atribuições dos grupos funcionais relacionados à composição lipídica de *S. aureus* e EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça.



Figura 46 – Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de Langmuir de membrana de S. aureus e 0,003 mg mL-1 de EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça, em tampão PBS pH 7,4 – 30 mN m-1. A) região de vibração dos alcanos; B) região de vibração do vinileno C=C; C) região de vibração dos P=O; D) região de vibração éster, CO.

## 3.7. Quantificação de capsaicinóides incorporados em filmes LB de com membranas de E. coli e S. aureus com EB de pimentas malagueta e dedode-moça através de espectroscopia UV-vis

Utilizamos a Lei de Beer-Lambert (SILVERSTEIN, R. M., 2006) para determinar a quantidade de caps nos EBs incorporados em filmes LB depositados a partir de filmes de Langmuir das membranas de bactérias e EB de pimentas. Para fins de calibração, medimos a absorbância em 280 nm para soluções de EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça, como mostra a Figura 47. Dessas curvas é



Absorbância

0,1

0.0

0,0

0,1

0,2

Concentração (mg mL-1)

EB dedo de moca

0,4

0,5

0,3

possível inferir a quantidade de EBs nos filmes LB a partir de sua absorbância em

Figura 47 – Curva de calibração: concentração versus absorbância em 280 nm para EB de pimentas: A) malagueta e B) dedo-de-moça.

B)

EB malagueta

0,4

0.2

Concentração (mg mL-1)

Os resultados para os filmes LB encontram-se na Tabela 9, em que houve maior incorporação para maiores concentrações de caps dos EBs, como esperado. As porcentagens incorporadas nos filmes LB tiveram aumento significativo com a concentração, sendo que o EB de pimenta malagueta foi mais efetivo tanto nas monocamadas do filme de S. aureus, de 6,24% para 11,3% quanto nas monocamadas do filme de E. coli, de 8,35 % para 13%. Os resultados são compatíveis com as isotermas de pressão superficial para E. coli, pois houve interação com os dois extratos, enquanto que para S. aureus a interação foi maior com EB de pimenta malagueta, como mostrado na tabela 5.

Tabela 9 – Proporção de capsaicinóides nos filmes LB de 10 camadas de membranas de bactérias com EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça, determinadas por UV-Vis.

Concentração	E. coli				S. aureus			
de EB de	dedo-de-moça		Malagueta		dedo-de-moça		malagueta	
pimenta na subfase	Absorb	Conc.(%)	Absorb	Conc.(%)	Absorb	Conc.(%)	Absorb	Conc.(%)
0,001	0,054	6,78	0,047	8,35	0,039	4,76	0,037	6,24
0,01	0,068	8,67	0,069	13,0	0,046	5,70	0,061	11,3

0,2

0,1

0,0

0.0

Absorbância

A)

## 3.8. Caracterizações morfológicas das monocamadas de Langmuir através de microscopia no ângulo de Brewster (BAM) de monocamadas formadas por composição lipídica de bactérias E. coli e S. aureus.

Nesta seção mostraremos resultados de caracterização morfológica das monocamadas de filmes com membranas de bactérias com EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça feitas por BAM. A concentração de EB de pimentas utilizada na subfase foi 0,01 mg mL<sup>-1</sup>. Das imagens de monocamadas de composição lipídica de *E. coli* da Figura 48, observa-se a formação de domínios no formato de pequenos pontos, em baixas pressões ( $\pi$  = 3 mN m<sup>-1</sup>). Aumentando-se a pressão superficial a partir de 6 mN m<sup>-1</sup>, esses domínios tendem a se unirem formando estruturas maiores ( $\pi$  = 15 e 18 mN m<sup>-1</sup>), desaparecendo em pressões maiores.



Figura 48 – Imagens de BAM formadas por monocamadas de composição lipídica de *E. coli* em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

Ao inserir EB de pimenta malagueta na subfase, de acordo com a Figura 49, não houve formação de domínios, sendo o filme homogêneo em altas pressões. Diferentemente do que ocorre com os filmes formados pela composição lipídica de *E. coli*.



Figura 49 - Imagens de BAM de monocamadas de *E. coli* com EB de pimenta malagueta em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

Nas imagens das monocamadas de *E. coli* com EB de pimenta dedo-de-moça da Figura 50, observam-se grandes estruturas mesmo em baixas pressões ( $\pi$  = 3 mN m<sup>-1</sup>), que se mantêm em altas pressões ( $\pi$  = 18 mN m<sup>-1</sup>).





Figura 50 - Imagens de BAM formadas por monocamadas de composição lipídica de *E. coli* com EB de pimenta dedo-de-moça em diferentes pressões (indicadas nas figuras)

As imagens da Figura 51 para monocamadas de *S. aureus* mostram domínios em altas pressões, a partir de  $\pi$  = 30 mN m<sup>-1</sup>. Esses domínios aparecem na forma de pequenos pontos que se aglomeram sem se tornar uma estrutura homogênea até a pressão de  $\pi$  = 35 mN m<sup>-1</sup>.



Figura 51 – Imagens de BAM formadas por monocamadas de composição lipídica de *S. aureus* em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

Com o acréscimo de EB de pimenta malagueta na monocamada de *S. aureus*, as micrografias (Figura 51) mostram que não houve formação de domínios a baixas pressões ( $\pi$  = 18 mN m<sup>-1</sup>), que começam a se formar em pressões mais altas, tais como no filme sem o EB de pimenta, a partir de  $\pi$  = 32 mN m<sup>-1</sup>. Estes domínios se aglomeram até altas pressões ( $\pi$  = 41 mN m<sup>-1</sup>), permanecendo como pequenos pontos.



Figura 52 - Imagens de BAM formadas por monocamadas de composição lipídica de *S. aureus* com EB de pimenta malagueta em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

Da Figura 53, as imagens das monocamadas de *S. aureus* com EB de pimenta dedo-de-moça mostram domínios em  $\pi$  = 32 mN m<sup>-1</sup>, que aparecem de forma distinta das monocamadas de *S. aureus* e com EB de pimenta malagueta. Nestas micrografias observam-se domínios maiores e mais espalhados, mantendo esta característica até pressões de  $\pi$  = 36 mN m<sup>-1</sup>.




Figura 53 - Imagens de BAM formadas por monocamadas de composição lipídica de *S. aureus* com EB de pimenta dedo-de-moça em diferentes pressões (indicadas nas figuras).

## 3.9. Cinética de vazamento dos lipossomos de composição lipídicas de E. coli e S. aureus na presença de EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça –

Nos experimentos de cinética de vazamento (*Leakage*) da carboxifluoresceína (CF) inserida nos lipossomos de *E. coli* e *S. aureus*, monitorou-se a fluorescência com um fluorímetro. Para obter uma referência, observou-se o vazamento da CF através do seguinte procedimento: 1) pipetou-se uma alíquota de 5 µL de solução de lipossomos numa cubeta de quartzo, adicionaram-se 495 µL de solução tampão HEPES (30 mM)/glicose (86 mM), pH 7,4. Mediu-se a fluorescência por 9 min, adicionaram-se 5 µL do detergente TRITON (1%) para rompimento dos lipossomos para que fosse observada a fluorescência máxima da CF; 2) Para verificar o comportamento dos lipossomos ao inserir-se o EB de pimentas, seguiu-se o mesmo procedimento, mas com parada do procedimento em 1 min para inserir concentrações variadas do EB de pimentas. Ao final de 9 min, adicionou-se detergente TRITON para o término do rompimento dos lipossomos.

Os resultados das cinéticas de vazamento de CF para os lipossomos de composição lipídica de *E. coli* e EB de pimentas malagueta e dedo-de-moça são mostrados na Figura 54. O EB de pimenta malagueta age gradualmente sobre os lipossomos liberando a CF, ao contrário do que ocorre com a pimenta dedo-de-moça. Na concentração de EB de pimenta malagueta de 670 µg mL<sup>-1</sup>, no tempo de 2 min, apenas 20% de CF foram liberados dos lipossomos, enquanto na maior concentração de EB de pimenta dedo-de-moça, de 267 µg mL<sup>-1</sup>, houve liberação de 60% de CF. Assim, concentrações menores de EB de pimenta dedo-de-moça são

mais efetivas que o EB da pimenta malagueta, uma vez que foi obtido maior efeito com menor concentração.



B)

Figura 54 – Gráfico de cinética de vazamento de CF para lipossomos de composição lipídica de *E. coli* para diferentes concentrações de: A) EB de pimenta malagueta B) EB de pimenta dedo-de-moça.

A Figura 55 mostra a cinética de vazamento de CF para os lipossomos da composição lipídica de *S. aureus*. Na concentração de 20 ug mL<sup>-1</sup>, observa-se que houve vazamento de 40% de CF quando acrescentado EB de pimenta malagueta e 80% de vazamento de CF para o EB de pimenta dedo-de-moça. Assim pode-se concluir que o efeito do EB da pimenta dedo-de-moça é maior sobre os lipossomos de composição lipídica de *S. aureus*.



Figura 55 - Gráfico de cinética de vazamento de CF para lipossomos de composição lipídica de *S. aureus* para diferentes concentrações de: A) EB de pimenta malagueta B) EB de pimenta dedo-de-moça.

Nas tabelas abaixo seguem os principais resultados obtidos nos experimentos com as composições lipídicas de *S. aureus* (Tabela 10), composição lipídica de *E. coli* (Tabela 11) e LPS de *E. coli* (Tabela 12).

	Π –ΔΑ (30 mN m <sup>-1</sup> )	PM-IRRAS (0,01 mg mL <sup>-1</sup> ) Π = 30 mN m <sup>-1</sup>	BAM (0,01 mg mL <sup>-1</sup> )	Leaka	age
malagueta	15 Ų	<ul> <li>14 cm<sup>-1</sup> – C-H</li> <li>Deslocamento para maiores números</li> <li>de onda → ORDENAMENTO das</li> <li>cadeias alquílicas (interação</li> <li>hidrofóbica).</li> <li>20 cm<sup>-1</sup> - P=O</li> <li>deslocamento para maiores números</li> <li>de onda: - efeito de desidratação.</li> </ul>	<ul> <li>Π=36 mN m<sup>-1</sup></li> <li>Houve formação de domínios (LC) com pouca região expandida comparada com as imagens de <i>S. aureus</i> sem EBs.</li> <li>Indicando a ausência dos caps do EB das monocamadas.</li> </ul>	Vazamento efetivo para os dois EB de - pimentas For nec me con EB	
dedo-de-moça	15 Å <sup>2</sup>	13 cm <sup>-1</sup> – C-H Deslocamento para maiores números de onda → ORDENAMENTO das cadeias alquílicas (interação hidrofóbica).	<ul> <li>Π=36 mN m<sup>-1</sup></li> <li>Formação de domínios maiores</li> <li>(LC), mas também uma proporção</li> <li>maior de região com fase LE</li> <li>(escura) → maior interação dos</li> <li>caps com a membrana.</li> </ul>		Foram necessárias menores concentrações de EB (20 µg mL <sup>-1</sup> ).

Tabela 10 – Tabela com os principais resultados dos experimentos com composição lipídica de *S. aureus* com EB de pimenta malagueta e dedode-moça.

	Π –ΔΑ (30 mN m <sup>-</sup> <sup>1</sup> )	PM-IRRAS (0,01 mg mL <sup>-1</sup> ) Π = 30 mN m <sup>-1</sup>	BAM (0,01 mg mL <sup>-1</sup> )	Leakage
Malagueta	75 Ų	Região dos carbonos: Deslocamento para - menores números de onda → DESORDEM das cadeias alquílicas.	Não houve formação de domínios → coerente com	-
Dedo-de-moça	125 Ų		isotermas de π-A que apresentam expansão em altas pressões superficiais (regiões escuras - LE).	Foi mais efetivo Foram utilizadas menores conc. do EB de pimenta para obter o vazamento.

Tabela 11 - Tabela com os principais resultados obtidos nos experimentos com composição lipídica de *E. coli* com EB de pimenta malagueta e dedo-de-moça.

Tabela 12 - Tabela com os principais resultados obtidos nos experimentos com LPS de *E. coli* com EB de pimenta malagueta e dedo-de-moça.

	Π –ΔΑ (30 mN m <sup>-1</sup> )	PM-IRRAS (0,01 mg mL <sup>-1</sup> ) Π = 30 mN m <sup>-1</sup>	
Malagueta	4 Ų	11 cm <sup>-1</sup> − P=O Deslocamento para menores números de onda: Efeito de hidratação	
Dedo-de-	4 Ų	9cm <sup>-1</sup> – CH <sub>2</sub> simétrico Deslocamento para menores números de onda → DESORDEM das cadeias alquílicas	

## **Perspectivas futuras**

Foram iniciados testes para cinética de vazamento de LPS de *E.coli*, no entanto só pôde ser realizado os testes que confirmavam a formação de lipossomos, como confirmado na Figura 56.



Figura 56 – Gráfico de cinética de vazamento de CF para lipossomos LPS de *E. coli* 

## 4. Conclusão

Dos resultados e discussões apresentadas, conclui-se que não há relação direta entre a pungência dos EB de pimentas e interação com modelos de membrana celular. O EB de pimenta dedo-de-moça teve maior efeito no DPPC, por outro lado EB de pimenta malagueta teve maior efeito no DPPG provavelmente devido à predominância de dihidrocapsaicina no EB de pimenta dedo-de-moça e capsaicina da EB pimenta malagueta. Os EB das pimentas não demonstraram grande incorporação nas monocamadas de composição lipídica de *S. aureus*. Entretanto, comprovou-se seu grande efeito através dos dados de cinética de vazamento e de MIC. Dentre os EBs, o extrato de pimenta dedo-de-moça apresentou maior eficácia.

Na composição lipídica de *E. coli*, houve considerável incorporação dos dois EB de pimentas nas monocamadas lipídicas, com maior efeito para dedo-de-moça. Os dois extratos levaram a menor vazamento do que observado para a composição lipídica de *S. aureus*. Os EBs de pimentas tiveram pouca incorporação nas monocamadas de LPS. Isto se deve, provavelmente, à grande complexidade estrutural, haja vista sua propriedade de barreira nas bactérias. Este resultado corrobora os dados de MIC, onde não se observou atividade significativa dos EBs para a *E. coli*. Apesar de a ação fungicida ter sido comprovada através dos estudos da aluna Analine Crespo Ziglio, o efeito bactericida foi predominante em bactérias do tipo Gram-negativa (*E. coli*), devido à camada de LPS de *E. coli* presentes na superfície da membrana.

Há estudos que mostram que os capsaicinóides possuem ação analgésica, através da interação com receptores. Neste trabalho, foi comprovada a interação dos capsaicinóides com a membrana celular, através dos modelos de membrana, o que nos permite concluir que os capsaicinóides podem causar efeitos colaterais, pois não interagem apenas com os receptores. Por isso, os capsaicinóides têm sido utilizados de maneira tópica. Nos experimentos de cinética de vazamento, observamos que o EB de pimenta dedo-de-moça é mais efetivo nos lipossomos formados pela composição lipídica tanto de *E. coli* quanto de *S. aureus*. Obteve-se cerca de 80 % de vazamento para uma menor concentração de EB, 267 µg mL<sup>-1</sup> de EB de pimenta dedo-de-moça em relação a 670 ug mL<sup>-1</sup> para a pimenta malagueta nesta mesma porcentagem de vazamento. Para a composição lipídica de *S. aureus*, o EB de pimenta dedo-de-moça também se mostrou mais efetivo, para uma concentração de 20 µg mL<sup>-1</sup>, observamos vazamento de 40% com a inserção de EB de pimenta malagueta e vazamento de 80% com o EB de pimenta dedo-de-moça. Destes dados também se conclui que são necessárias menores concentrações de EB de pimentas para agir nos lipossomos de composição lipídica de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) do que Gram-negativas (*E. coli*).

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

BARBIERI, R.L., STUMPF, E.R.T. **Pimentas** - um tempero prá lá de antigo\*. Pelotas: EMBRAPA clima temperado. Disponível em:<http://www.infoteca.cnpdia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/744964/1/artigoLi atempero.pdf>. Acesso em: 14/09/2013.

BATISTA, C. M., CARVALHO, C. M .B., SANTOS, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas v. 43, n. 2, 2007.

BIOLIN SCIENTIFIC. Langmuir, Langmuir- and Langmuir-schaefer technologies.

Disponível em:<http://www.biolinscientific.com/ksvnima/technologies>. Acesso em: 26/03/2013.

BLAUDEZ, D. et al. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions**, v.92, n.4, p.525-530, 1996.

BLODGETT, K.B. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. **Journal of the American Chemical Society**, v.57, n.6, p.1007-1022, June 1935.

BLODGETT, K.B.; LANGMUIR I. Built-up films of barium stearate and their optical properties. **Physical Review**, v.51, n.11, p.964, June 1937.

BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.100/102, p.563-584, Feb. 2003.

CULLIS, P.R.; HOPE, M.J. Liposomes, Dimitri papahadjopoulos and us. **Journal of** Liposome Research, v.5, n.4, p.829-836, 1995.

DAVIES, J.T.; RIDEAL, E.K. **Intefacial phenomena**. 2<sup>nd</sup>ed. New York: Academic Press, 1963.

DEAL, C.L. et al. Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. **Clinical Therapeutics**, v.13, n.3, p.383-395, May/June 1991.

DICKO, A.; BOURQUE, H.; PEZOLET, M. Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air-water interface and

transferred on solid substrates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.96, n.1/2, p.125-139, 1998.

ENGELMAN, D.M. Membranes are more mosaic than fluid. **Nature**, n.438, p.578-580. Doi: 10.1038/nature04394.

EPAND, R.F. et al. Depolarization, bacterial membrane composition, and the antimicrobial action of ceragenins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.9, p.3708-3713, 2010.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect. Medicin. Chem., v. 6, p. 25-64, 2014.

FENG, S.S. Interpretation of mechanochemial properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. **Langmuir**, v.15, n.4, p.998-1010, Feb. 1999.

FENG, S.S. Reply to comment on interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation os state or pressure-area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. **Langmuir**, v.22, n.6, p.2920-2922, Mar. 2006.

FERREIRA, H.S.C.M. **Utilização de lipossomos como modelos de biomembranas na avaliação e quantificação da atividade de antiinflamatórios**. 2006. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2006.

GOÑI, F.M. The Basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the singer-nicholson model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**: biomembranes, v.1838, n.6, p.1467-1476, June 2014.

GYÖRVARY, E.; ALBERS, W. M.; PELTONEN, J.. Miscibility in Binary Monolayers of Phospholipids and Linker Lipid. **Langmuir**, v.15, p. 2516-2524, 1999.

HAYMAN, M.; KAM, P.C.A. Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v.19, p.338-343, 2008. Doi: 10.1016/j.cacc.2008.07.003.

HIANIK, T. Structure and physical properties of biomembranes and model membranes. **Acta Physica Slovaca**, v.56, n.6, p.687-806, 2006.

HUBNER, W.; BLUME, A. Interactions at the lipid-water interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.96, n.1/2, p.99-123, 1998.

JONES, M.N.; CHAPMAN, D. **Micelles, monolayers and biomembranes**. New York: Wiley-Liss, 1995.

KAHYA, N. et al. Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.28109-28115, 2003. Doi: 10.1074/jbc.M302969200.

KARP, G. Biologia celular e molecular. 3.ed. São Paulo: Manole, 2005.

KLOPFER, K.J.; VANDERLICK, T.K.. Isotherms of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) monolayers: Features revealed and features obscured. **J. Colloid Interface Sci**., v.182, p.220-229, 1996.

KORLACH, J. et al. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. **Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.5, p.8461-8466, 1999.

KUNDU,S. et al. Interaction of oxicam NSAIDs with lipid monolayer: anomalous dependence on drug concentration. **Colloids and Surfaces B**: biointerfaces, v.70, n.1, p.157-161, 2009.

LASIC, D.D. Liposomes - from physics to applications. New York: Elsevier, 1993.

LATKA, P.D.; WYDRO, K.H. Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface. Colloids and Surfaces B: biointerfaces, v.37, n.1/2, p.21-25, 2004.

LAU, J.K. et al. Capsaicin induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. **Apoptosis**, v.19, p.1190-1201, 2014. DOI: 10.1007/s10495-014-1007-y.

MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta** (**BBA**): general subjects, v.1286, n.3, p.183–223, Oct. 1996.

MARTINEZ, D. et al. Effect of sphingomyelin and cholesterol on the interaction of St II with lipidic interfaces. **Toxicon**, v.49, n.1, p.68-81, Jan. 2007.

MCCONLOGUE, C. W.; VANDERLICK, T. K.. A Close Look at Domain Formation in DPPC Monolayers. **Langmuir**, v.13, n.26, p.7158-7164,1997.

MENDELSONHN, R.; MAO, G.; FLACH, C.R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** – general subjects, v.1798, n.4, p.788-800, Apr. 2010.

MINÕNES JR., J. et al. Orientational changes in dipalmitoyl phosphatidyl glycerol Langmuir monolayers. **Journal of Colloid Interface Science**, v.265, p.380-385, 2003.

MOLINARO, E. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.1, Rio de Janeiro, 2009.

MONTEIRO NETO, N.L. **Dicionário gastronômico**: pimentas com suas receitas. São Paulo: Boccato, 2006.

MÓZSIK, G. et al. CAPSAICINOIDS from the plant cultivation to the production of the human medical drug. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2009.

NASCIMENTO, P.L.A. et al. Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of capsicum frutescens (pimenta malagueta). **Molecules**, v.19, n.4, p.5434-5447, Apr. 2014.

NEW, R.R.C. **Liposomes** - a practical approach. New York: Oxford University Press, 1990.

NICHOLSON, G.L. The Fluid – mosaic model membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dinamics of biological membranes after more than 40 years. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - biomembranes, v.1838, n.6, p.1451-1466, June, 2014.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Oral microbiology and immunilogy**. 2<sup>nd</sup>ed. Philadelphia: Sauders, 1994.

NOBRE, T.M. et al. The Specificity of frutalin lectin using biomembrane models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - biomembranes, v.1798, n.8, p.1547-1555, Aug. 2010.

NUNES, C. et al. NSAIDs interactions with membranes: a biophysical approach. **Langmuir**, v.27, n.17, p.10847–10858, July 2011.

OLIVEIRA JR., O.N.; BONARDI, C. The Surface potential of Langmuir monolayers revisited. **Langmuir**, v.13, n.22, p.5920-5924, Oct. 1977.

OMOLO, M. A. et al.; Antimicrobial Properties of Chilli Peppers. Journal Infectious Diseases & Therapy, v. 2, n. 4, p. 1-8, 2014.

PANDA, A.K. et al. Thermodynamic and structural studies of mixed monolayers: mutual mixing of DPPC and DPPG with DoTAP at the air-water interface. **Materials Science & Engineering C**: materials for biological applications, v.30, n.4, p.542-548, 2010.

PATINO, J. M. R.; SÁNCHEZ, C. C.; NIÑO R. R.. Is Brewster angle microscopy a useful technique to distinguish between isotropic domains in beta-casein-monoolein mixed monolayers at the air-water interface. **Langmuir**, v.15, p. 4777-4788, 1999.

PAPAHADJOPOULOS, D.: Liposomes and their use in biology and medicine, Ann. NY Acad. Sci; 308, 1–412, 1978.

PAVINATTO, A. et al. Interaction of 0-acylated chitosans with biomembrane models: probing the effects from hydrophobic interactions ans hydrogen bonding. **Colloids and Surfaces B**: biointerfaces, v.114, p.53-59, Feb. 2014.

PAVINATTO, F.J. et al. Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v.25, n.17, p.10051-10061, Sept. 2009.

PROVIDA: provendo soluções...preservando vidas. **Técnica de Gram**. Disponível em:<http://www.provida.ind.br/site/index.php/bacterias/bacterias/122-tecnica-de-gram.html>. Acesso em: 05/01/2016.

RANADE, V.V.; CANNON, J.B. **Drug delivery systems**. 3<sup>th</sup>ed. New York: CRC Press, 2011.

RIZZATTI, I.M.; ZANETTE, D.R.; MELLO, L.C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química. **Quimica Nova**, v.32, n.2, 2009. Doi: 10.1590/S0100-40422009000200041.

ROBERTS, G. Langmuir-Blodgett films. New York: Plenum Press, 1990.

SANTOS, N.O.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomos: a bala mágica acertou?. **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1181-1185.

SEGOTA, S.; TEZAK, D. Spontaneous formation of vesicles. Advances in Colloid and Interface Science, v.121, n.1/3, p.51-75, Sept. 2006.

SESSA, G.; WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. **Journal of Lipid Research**, v.9, n.3, p.310-318, May 1968.

SHEIKH, K.H. et al. A Model system to study the insertion of cholesterol into a phospholipid monolayer. **Journal Physical Chemistry B**, v.111, n.2, p.379-386, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7.ed. RIO DE JANEIRO: LTC, 2006.

SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. Fluid mosaic modelo f structure os cellmembranes. **Science**, v.175, n.4023, p.720-731, 1972.

SOUZA, A.L.R. **Avaliação do efeito do praziquantel veiculado em disperses lipídicas no tratamento de camundongos infectados com Schistosoma Mansoni**. 2008. P5p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2008.

STANFIELD, W.D.; COLOMÉ, J.S.; CANO, R.J. **Molecular and cell Biology**. New York: McGraw-Hill, 2003.

STINE, K.J. Brewster angle microscopy: techniques. In: STEED, J.W.; GALE, P.A. (Ed.). **Supramolecular chemistry**: from molecules to nanomaterials. New York: John Wiley, 2012.

TONG, Y.J. et al. Synthesis of O,O'- dipalmitoyl chitosan and its amphiphilic properties and capability of cholesterol absorption. **Carbohydrate Polymers**, v.60, n.2, p.229-233, 2005.

TORCHILIN, P.V.; WEISSIG, V. **Liposomes** - a practical approach. New York: Oxford University Press, 1990.

TSUCHIYA, H. Biphasic membrane effects of capsaicin, an active component in capsicum species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.2/3, p.295–299, May 2001.

UMALKAR, D.G. et al. Applications ofliposomes in medicine – a review. **Pharma Science Monitor**, v.2, n.2, p.24-39, 2011.

VEATCH, S.L. et al. Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. **Biophysical Journal**, v.85, n.5, p.2910-2922, 2004.

VELOSO, J. et al. Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. **Plant Biology**, v.16, n.1, p.177-185, 2014. Doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00717.x.

WANG, J. et al. Microencapsulation of capsaicin by solvent evaporation method and thermal stability study of microcapsules. **Colloid Journal**, v.75, n.1, p.26–33, 2011.

WINTERHALTER, M.; LASIC, D.D. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.64, n.1/3, p.35-43, 1993.

YEAGLE, P. The Membrane of cells. 2<sup>nd</sup>ed. San Diego: Academic Press, 1993.