

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP- DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E
BIOLOGIA

**Atividade da própolis verde contra o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum*
e análise da interação do composto majoritário Artepillin C com sistemas
biomiméticos de membranas**

Wallance Moreira Pazin

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área: Física
Aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

Wallance Moreira Pazin

**Atividade da própolis verde contra o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum*
e análise da interação do composto majoritário Artepillin C com sistemas
biomiméticos de membranas**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências. Área: Física
Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pazin, Wallance Moreira.

Atividade da própolis verde contra o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* e análise da interação do composto majoritário Artepillin C com sistemas biomiméticos de membranas / Wallance Moreira Pazin; orientador Amando Siuiti Ito. – Ribeirão Preto, 2016.

125 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biofísica Molecular

1. Própolis verde; 2. Artepillin C; 3. *Pythium aphanidermatum*; 4. oomicetos; 5. bioensaios; 6. membranas modelo; 7. sistema ternário.



ATA DE DEFESA

Aluno: 59135 - 7117628 - 2 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Wallace Moreira Pazin no Programa: Física Aplicada à Medicina e Biologia, do(a) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 21 dias do mês de março de 2016, no(a) Bloco 4 Exatas - sala 11 realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Wallace Moreira Pazin, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"Atividade da própolis verde contra o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* e análise da interação do composto majoritário Artepillin C com sistemas biomiméticos de membranas"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Amando Siuiti Ito	Presidente	FFCLRP - USP	<u>Aprovado</u>
Maria Teresa Moura Lamy	Titular	IF - USP	<u>Aprovado</u>
Rose Mary Zumstein Georgetto Naal	Titular	FCFRP - USP	<u>Aprovado</u>
Iouri Borissevitch	Titular	FFCLRP - USP	<u>APROVADO</u>
Cássia Alessandra Marquezin	Titular	UFG - Externo	<u>Cássia Alessandra Marquezin digo APROVADO</u>

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Vanessa Junqueira Migliori Carabolante Carabolante, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 21 dias do mês de março de 2016.

Maria Teresa Moura Lamy
Maria Teresa Moura Lamy

Rose Mary Zumstein Georgetto Naal
Rose Mary Zumstein Georgetto Naal

Iouri Borissevitch
Iouri Borissevitch

Cássia Alessandra Marquezin
Cássia Alessandra Marquezin

Amando Siuiti Ito
Amando Siuiti Ito
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 02/04/2016 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Paulo Olivi
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
Prof. Dr. Paulo Olivi
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

À minha família, que me apoiou em todos os momentos e acreditou que este dia chegaria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar a força necessária para que eu conseguisse trabalhar durante estes quatro anos com saúde, alegria e muita disposição;

Ao professor Amando, pela enorme amizade, acolhimento e todo auxílio que me deu durante o doutorado. Agradeço imensamente por me ensinar como um orientador de verdade deve ser;

Ao Marcus, por todas as conversas e conselhos, tanto profissionais quanto pessoais. Agradeço especialmente por estar ao meu lado sessenta dias consecutivos durante meu período do doutorado sanduíche em Odense – Dinamarca;

Aos meus pais Ivete e Júnior e às minhas irmãs Drielle e Drienne, que me apoiaram desde sempre para que eu conseguisse chegar até aqui. Ao meu sobrinho Nicolás, por cada sorriso que me alegra!

Aos meus amigos, pela cumplicidade.

À Giusi, esposa do professor Amando, por cada gesto de amor e afeto, pelos encontros memoráveis e pelo período em que me hospedou junto ao prof. Amando em sua casa.

Ao professor Ademilson Espencer (Departamento de Genética, FMRP - USP), por acreditar em nosso potencial e aceitar a colaboração neste trabalho. Agradeço também por todos os ensinamentos e conversas;

Ao profissionalismo dos membros do grupo de Fotobiofísica (Departamento de Física, FFCLRP – USP): prof. Iouri, Érika, Gustavo Parra, Luciana Mônaco, Marina Berardi, André Pavanelli e Adriano. Agradeço em especial ao Danilo Olivier, pelo auxílio na simulação de dinâmica molecular, pelas conversas construtivas (ou não) e pelo companheirismo.

Ao pessoal da Embrapa – Meio Ambiente, em especial à Sonia Queiroz e Suikinai por toda colaboração neste trabalho, pela grande amizade e pelas hospedagens em suas casas, ao Rodrigo Castanha pela ajuda com as cromatografias e amizade, à Camila Pansa pelos testes de bioatividade, ao Itamar por disponibilizar o seu laboratório e à Marcia Assalin pela ajuda com as injeções das amostras no espectrômetro de massas.

À professora Ana Paula Ramos e seu grupo de pesquisa (Departamento de Química, FFCLRP – USP), pelo auxílio nas medidas de monocamada e potencial zeta, pela grande amizade e por toda ajuda prestada.

Às professoras Karin e Kátia (Departamento de Biofísica – UNIFESP), por todo suporte prestado durante o período em que precisei ir a São Paulo para utilizar seus laboratórios, pelas conversas e pela grande amizade. Agradeço também aos seus respectivos alunos, em especial ao Bruno Mattei, pela ajuda com os experimentos de ITC.

Ao professor Jairo Kenupp e ao técnico de laboratório Mário Ogasawara (FCFRP – USP) pelos compostos isolados da própolis verde e pela ajuda no fracionamento da mesma.

A todos da *University of Southern Denmark* (SDU) – Odense, Dinamarca, que contribuíram para que fosse possível a realização do meu doutorado sanduíche durante o período de seis meses, no *Center for Biomembrane Physics* (MEMPHYS), *Department of Biochemistry and Molecular Biology* (BMB). Em especial, agradeço ao Luis Bagatolli, pelo acolhimento, orientação, ensinamentos, discussões, amizade e todo auxílio prestado; ao Jonathan Brewer pela co-orientação, pela valiosa ajuda com os microscópios, conversas e amizade; às secretárias Ulla Lauritsen (Memphys), Ulla Aljene (BMB) e Laura Haas (SDU) pela ajuda com toda a burocracia para a ida à Dinamarca; ao Lars Duelund e ao Pablo pelo suporte técnico no laboratório; ao Jes Dreier pela ajuda com os experimentos de LAURDAN-GP; ao Bjarne Thorsted pelos incansáveis experimentos de *two photon absorption*; Ao professor Michael Lomholt pelos memoráveis encontros do *Whisky club* em sua casa; aos colegas de sala Søren Brier, Henrik Thoke, aos grandes amigos Allan Hansen, Páll Pálsson, Mie Pedersen e Dennis Bruhn e à minha “família dinamarquesa” Bjarne Pedersen, Teresa Cadierno, Anna e Sarah, que não mediram esforços para que eu me adaptasse rapidamente aos costumes dinamarqueses e tornaram ainda mais gratificante a minha vivência no país!

Agradeço à professora Elizabeth Arêas (IQ-USP) e a todos os profissionais da *Eindhoven University of Technology* (TU/e) – Eindhoven, Holanda, que prestaram ajuda durante os meus últimos três meses de doutorado sanduíche, no *Institute for Complex Molecular Systems* (ICMS). Em especial à profa. Ilja Voets pela orientação e amizade; Neus Vilanova, pela ajuda com os experimentos de SAXS, pelas conversas, amizade, dedicação e profissionalismo; ao Tom Paffen pela ajuda com os experimentos de DSC; aos amigos Cintia Silva, Henrique Oliveira e Rochan Sinha pela companhia diária e por tornar o ambiente de trabalho ainda mais agradável.

Ao prof. Georg Pabst, do *Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Graz, Áustria*, pelo auxílio com as análises das curvas de SAXS;

Ao professor Manuel Prieto e às suas alunas Maria João, Ana Melo e Sandra Pinto, do Centro Química-Física Molecular, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, pela recepção em Portugal e auxílio na aprendizagem de eletroformação de GUVs.

Aos profissionais do Departamento de Física, em especial à Nilza Marino e ao Ricardo Gastaldi, por toda ajuda prestada durante os quatro anos de doutorado e ao Aziani e Renato, pela ajuda na oficina;

À USP, pela infraestrutura, à CAPES, pelo financiamento da pesquisa durante o período do doutorado no país e na Dinamarca (processo 004137/2014-00) e ao CNPq, pelo fomento durante meu período de pesquisa na Holanda (processo 232302/2014-6).

This research forms part of the research programme of the Dutch Polymer Institute (DPI), project #772ap.

*“Man går først så gruelig meget ondt igennem...
og så bliver man berømt!”*
Hans Christian Andersen – “Mit Livs Eventyr”, 1855

*“Primeiro você tem uma quantidade terrível de adversidades para atravessar...
e só então você se torna famoso!”*
Hans Christian Andersen – “O conto de fadas da minha vida”, 1855

Atividade da própolis verde contra o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* e análise da interação do composto majoritário Artepillin C com sistemas biomiméticos de membranas

Wallance Moreira Pazin^{1,2} - ¹Departamento de Física, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Brasil; ²Instituto Holandês de Polímeros (DPI), PO Box 902, 5600 AX Eindhoven, Holanda

RESUMO

O aumento da resistência microbiana devido a fatores como uso excessivo e ineficiente de antibióticos convencionais acarreta a necessidade da busca por novos compostos bioativos que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos já conhecidos. Na agricultura, o uso intensivo de pesticidas para o combate de microrganismos que comprometem principalmente a parte alimentícia também traz diversos problemas relacionados à resistência antimicrobiana e a riscos ambientais, oriundos do acúmulo dessas substâncias no solo. Dentro deste aspecto, o pseudofungo *Pythium aphanidermatum*, da classe dos oomicetos, destaca-se por ser uma espécie agressiva e altamente resistente a fungicidas comuns, apodrecendo raízes e frutos de cultivos de tomate, beterraba, pepino, pimentão, etc. A própolis verde, constituída em sua grande parte por material resinoso coletado e processado pela abelha da espécie *Apis mellifera* tem sido utilizada na medicina tradicional devido ao seu amplo espectro de ações preventivas e tratamentos de doenças, possuindo propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas e antioxidantes, tornando-se um produto de grande interesse na busca de novos compostos bioativos. Dentro destes aspectos apresentados, neste trabalho investigamos a ação da própolis verde contra o fitopatógeno *P. aphanidermatum* e identificamos através da técnica de cromatografia e bioensaios que a Artepillin C (3,5-diprenil-4-ácido-hidroxicinâmico), majoritária na própolis verde, foi o principal composto nesta ação. Os efeitos terapêuticos desta molécula tem sido foco de muitos estudos, porém ainda não há evidência em sua interação com agregados anfifílicos que mimetizam membranas celulares. O caráter anfifílico do composto, elevado pela presença dos grupos prenilados ligados ao ácido cinâmico, favoreceram a sua inserção nas membranas modelo, principalmente em seu estado agregado. Estas conclusões puderam ser inferidas devido às alterações nas propriedades das bicamadas lipídicas na presença da Artepillin C, podendo causar, especificamente para o caso de fitopatógenos como o *P. aphanidermatum*, perdas funcionais das proteínas de membranas, liberação de eletrólitos intracelulares e desintegração citoplasmática dos micélios e esporos. Ainda, as diferentes composições lipídicas nas vesículas influenciam no modo de interação do composto e

consequentes alterações em suas estruturas, principalmente na presença do colesterol, que auxilia na manutenção da permeabilidade da bicamada lipídica, que pode contribuir para a integridade do conteúdo citoplasmático da célula.

Palavras-chave: Própolis Verde; Artepillin C; *Pythium aphanidermatum*; oomicetos; bioensaios; membranas modelo; sistema ternário.

Activity of green propolis against the phytopathogen *Pythium aphanidermatum* and analysis of the interaction of the majority compound Artepillin C with membrane biomimetic systems

Wallance Moreira Pazin^{1,2} - ¹Department of Physics, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil; ²Dutch Polymer Institute (DPI), PO Box 902, 5600 AX Eindhoven, the Netherlands

ABSTRACT

The increase in the microbial resistance due to the excessive and inefficient use of conventional antibiotics brings the necessity to search new bioactive compounds which play their mechanism of action differently from the known drugs. In the agriculture, the intensive use of pesticide for the combat of microorganisms which undermine mainly the food portion also brings several issues related to the antimicrobial resistance and environment risks, originated from the high amount of these substances on the soil. In this aspect, the fungus-like *Pythium aphanidermatum* microorganism, from class Oomycete, stands out for being an aggressive species and highly resistant to common fungicides, rotting roots and fruits of tomato, beet, cucumber, pepper, etc. Green propolis, constituted by resinous material collected and processed by bees of the species *Apis mellifera*, has been used in the traditional medicine due its wide spectrum of preventive actions and diseases treatments, promoting anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer and antioxidant properties, becoming a product of interest for investigation in the research of new bioactive compounds. Under all the aspects showed so far, in this work we investigated the action of the green propolis against the phytopathogen *P. aphanidermatum* and identified through chromatography and bioassays that Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid), majority in the green propolis, was the main compound in this action. The therapeutic effects of this molecule have been the focus of several studies, but, so far there is no evidence for its interaction with amphiphilic aggregates that mimic cell membranes. The amphiphilic character of the compound, enhanced by the presence of two prenylated groups bounded to the cinnamic acid, favors the insertion of the compound in the model membranes mainly in its aggregation state. These conclusions could be inferred due the alterations in the properties of the lipid bilayer in the presence of Artepillin C, that may cause, specifically in the case of phytopathogens like *P. aphanidermatum*, functional losses of membrane proteins, releasing of intracellular electrolytes and cytoplasmatic disintegration of mycelium and spores. Moreover, the difference of the lipid composition in the vesicles influence in the action of the compound and consequent alteration in their structures, mainly in the presence of cholesterol, that provides

the maintenance of permeability of the lipid bilayer, contributing to the integrity of the cytoplasmic material of the cell.

Keywords: Green Propolis; Artepillin C; *Pythium aphanidermatum*; oomycetes; bioassays; model membranes, ternary system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura molecular da Artepillin C.....	27
Figura 2.1. Mapa do Brasil, com destaque da região do cerrado brasileiro. Extraído de: [36]..	31
Figura 2.2. Arbustos de plantas da espécie <i>Baccharis dracunculifolia</i>	32
Figura 2.3. Abelha da espécie <i>Apis mellifera</i> no momento da coleta de material resinoso de ápices foliares de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	33
Figura 2.4. Linha do tempo ao longo dos séculos XIX e XX marcando as principais contribuições para o estudo das membranas celulares.	38
Figura 2.5. Representação ilustrativa dos tamanhos de vesículas lipídicas.	39
Figura 2.6. Estruturas químicas alguns fosfolipídios – dependência na composição da cabeça polar e tamanho/insaturações das caudas.	40
Figura 2.7. Curva DSC de dispersão lipídica de vesículas multilamelares de DMPC com concentração 10 mmol.L ⁻¹	41
Figura 3.1. A) Funil de separação contendo extrato resinoso da própolis verde em uma mistura bifásica contendo MeOH/H ₂ O (90:10 v/v) e hexano; B) Extrato resinoso da própolis verde fracionado em quatro solventes de diferentes polaridades (da esquerda para direita): hexano, acetato de etila, clorofórmio e água.	43
Figura 3.2. A) Extrato resinoso da própolis macerado com sílica gel; B) Coluna cromatográfica para separação dos compostos pertencentes à fração bioativa do extrato resinoso de própolis; C) CCD visualizada por luz UV.....	45
Figura 3.3. A) Fracionamento do extrato resinoso da própolis verde através da placa de CCD preparativa; B) Raspagem da fase estacionária relacionada às subfrações determinadas; C) Subfrações resultantes após a coleta do sobrenadante.	46
Figura 3.4. Placa utilizada para análise da difusão do fitopatógeno, na presença de extratos resinosos de própolis verde impregnados em discos de papel.	46
Figura 3.5. Representação dos métodos de preparação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs) pela técnica de eletroformação, utilizando-se: A) fios de platina e B) placa condutora de ITO (adaptado de: [62]).....	48
Figura 3.6. Osmômetro crioscópico utilizado para determinação da osmolalidade das soluções de glicose e sacarose (após preparo das GUVs).....	49
Figura 3.7. Equipamento SAXSLAB GANESHA 300 XL SAXS, utilizado para aquisição das curvas de espalhamento de raio-X a baixo ângulo, instalado no <i>Institute for Complex Molecular Systems, Eindhoven University of Technology, Eindhoven – Holanda</i>	53

- Figura 3.8.** Estrutura molecular da sonda fluorescente DiIC₁₈..... 57
- Figura 3.9. A)** Microscópio Zeiss LSM 510 Meta, utilizado para a realização das medidas de fluorescência confocal, localizado no *Center for Biomembrane Physics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense – Dinamarca;* **B)** Representação do caminho óptico necessário para obtenção das medidas de fluorescência confocal (Adaptado de [69]).....58
- Figura 3.10.** Estrutura molecular da sonda fluorescente LAURDAN..... 58
- Figura 3.11.** Representação dos espectros de emissão do LAURDAN nas fases fluida (2) e gel (1) de bicamadas lipídicas, com o máximo de emissão em 490 e 440 nm, respectivamente. 60
- Figura 4.1.** Análise da inibição da difusão do fitopatógeno da espécie *P. aphanidermatum* pela placa de ágar, na presença de compostos resinosos coletados na região de Bambuí, MG, pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, fracionados em solventes de diferentes polaridades. A difusão do fitopatógeno é comprometida principalmente próxima à fração clorofórmica (2), criando-se um halo de inibição nesta região. As outras frações foram separadas em hexano (1), acetato de etila (3) e água (4). 64
- Figura 4.2.** Oito subgrupos obtidos (G1 a G8) pela partição da fração clorofórmica através de ensaio cromatográfico. A fração clorofórmica foi obtida inicialmente pelo fracionamento do extrato etanólico de própolis verde. 65
- Figura 4.3.** Fitopatógeno da espécie *P.aphanidermatum* difundido pela placa de ágar, mostrando uma formação de halo próximo aos grupos G2 e G3 obtidos pela separação molecular da fração clorofórmica em coluna de sílica..... 65
- Figura 4.4.** Espectro de massas obtido através da injeção do subgrupo 2 em um TOF/MS. O pico de alta intensidade é referente à presença majoritária do composto Artepillin C no produto injetado..... 67
- Figura 4.5.** Fitopatógeno da espécie *P.aphanidermatum* difundido em ágar após 30 horas de sua aplicação em placas com discos de papel impregnados com diferentes concentrações do composto Artepillin C. A) Concentrações de 50 a 1000 µg.mL⁻¹ do composto e metanol (MeOH) aplicado como controle – halos de inibição foram mantidos próximos aos discos de 750 µg.mL⁻¹ e 1000 µg.mL⁻¹. B) Concentrações de 1 mg.mL⁻¹ a 10 mg.mL⁻¹ – halos de inibição mantidos para todas as concentrações..... 68
- Figura 4.6.** A) Espectros de absorção óptica do composto Artepillin C obtidos em metanol, nas concentrações compreendidas entre 5 e 100 µmol.L⁻¹; B) Absorbância em 314 nm, em função da concentração de Artepillin C, para o cálculo do coeficiente de absorção molar pela lei de Lambert-Beer (equação 1)..... 69
- Figura 4.7.** A) Espectros de absorção óptica do composto Artepillin C obtidos em água milli-Q, nas concentrações compreendidas entre 5 e 100 µmol.L⁻¹. B) Espectros de absorção normalizados, mostrando o deslocamento para o vermelho com o aumento da concentração de Artepillin C no sistema..... 71

- Figura 4.8.** A) Espectros de absorção óptica do composto Artepillin C obtidos em solução tampão fosfato (10 mmol.L^{-1}), nas concentrações compreendidas entre 5 e $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$; B) Absorbância em 295 nm , em função da concentração de Artepillin C, para o cálculo do coeficiente de absorção molar pela lei de Lambert-Beer.....71
- Figura 4.9.** Espectros de emissão de fluorescência do composto Artepillin C em metanol (A), tampão fosfato (B) e em água milli-Q (C). O comprimento de onda de excitação foi 290 nm para água e 310 para as soluções metanol e tampão. As intensidades máximas de emissão de fluorescência do composto em metanol, tampão e água milli-Q foram, respectivamente, 386 nm , 391 nm e 406 nm , normalizadas e plotadas em função da concentração de Artepillin C (D)..... 73
- Figura 4.10.** Titulação de dispersão fosfolipídicas contendo LUVs de DOPC (10 mmol.L^{-1}) em soluções tampão (A) e água milli-Q (B), na presença de $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. Os diagramas superiores mostram o calor gerado nos sistemas para cada titulação. Abaixo se encontram as curvas da integral da entalpia em função da razão lipídio/Artepillin C nos sistemas estudados. 75
- Figura 4.11.** Isotermas de ligação de Artepillin C em vesículas de DOPC. As constantes de ligação para os sistemas em água milli-Q e tampão foram calculadas através dos ajustes em termo da isoterma de adsorção de Langmuir..... 76
- Figura 4.12.** Diagramas de SAXS (A) e perfil da densidade eletrônica de vesículas de DOPC (B) na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/DOPC 1:10), a $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ 77
- Figura 4.13.** Imagens da projeção 3D sobre o plano-Z de GUVs constituídas por DOPC, obtidas por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram coletadas na ausência e na presença de Artepillin C no sistema, acompanhadas no tempo..... 80
- Figura 4.14.** Imagens coletadas por microscopia de contraste de fase (acima) e fluorescência (abaixo) de GUVs de DOPC na ausência e presença de concentrações de Artepillin C..... 81
- Figura 4.15.** Imagens de GUVs de DOPC coletadas por microscopia de fluorescência ao longo do tempo, na presença de $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (acima) e $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (abaixo) de Artepillin C. Análise das GUVs por microscopia de contraste de fase foi feita para os tempos finais..... 83
- Figura 4.16.** Extravasamento das sonda fluorescente Alexa Fluor 488 a partir do interior de GUVs de DOPC por medidas de microscopia confocal. Esquerda: Intensidade de fluorescência da sonda no interior das GUVs de DOPC em função do tempo. Direta: Imagens coletadas das GUVs de DOPC antes e depois da inserção de 100 e $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C na suspensão. 84
- Figura 4.17.** Imagens de GUVs constituídas de DOPC, obtidas através da microscopia confocal com excitação 2 fótons ($\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$), utilizando-se a técnica LAURDAN-GP. As imagens são acompanhadas dos seus respectivos histogramas de valor LAURDAN-GP, calculados na ausência e na presença de: A) $100 \text{ } \mu\text{mol.L}$ de Artepillin C e B) $200 \text{ } \mu\text{mol.L}$ de Artepillin C, ambos em função do tempo..... 86

- Figura 4.18.** Curvas DSC de dispersão lipídica (10 mmol.L^{-1}) de vesículas multilamelares de DMPC (A) e DPPC (B), na ausência e presença de concentrações de Artepillin C, nas razões molares Artepillin C:lipídio 1:100, 5:100 e 10:100. O intervalo de temperatura medido para o sistema contendo DMPC varia de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto para o DPPC varia de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $55 \text{ }^\circ\text{C}$.
..... 88
- Figura 4.19.** Diagramas de SAXS de vesículas de DMPC (acima) e DPPC (abaixo), nas fases gel (esquerda) e fluida (direita), na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/lipídio 1:10). 91
- Figura 4.20.** Perfis de densidade eletrônica obtidos através do ajuste dos diagramas de SAXS de vesículas de DMPC (acima) e DPPC (abaixo), nas fases gel (esquerda) e fluida (direita), na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/lipídio 1:10). 92
- Figura 4.21.** Diagramas de SAXS de vesículas de DMPC (A), DPPC (B) e DOPC (C), na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C:lipídio 1:10). 93
- Figura 4.22.** A) Isotermas de monocamadas de DMPC na ausência (curva em preto) e presença (curva em vermelho) de Artepillin C, obtidas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. B) Área ocupada por Artepillin C na monocamada, em função da pressão superficial. 95
- Figura 4.23.** Valores de potencial zeta medidos para vesículas de DMPC na ausência e presença de Artepillin C, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 96
- Figura 4.24.** Interação entre Artepillin C e bicamada lipídica de DMPC: imagens coletadas através de simulações de dinâmica molecular ao longo de 500 ns. 98
- Figura 4.25.** A) Mapa de contato em função do tempo de simulação; B) Área ocupada por lipídios em função do tempo de simulação; C) Mapa de contorno da espessura da bicamada lipídica para os últimos 10 ns de simulação (scala de cor representa a espessura da bicamada ao longo da direção normal da superfície); D) Parâmetro de ordem das cadeias acílicas do DMPC; E) Perfil de densidade eletrônica obtido nos últimos 10 ns de simulação. 99
- Figura 4.26.** Ilustração esquemática de moléculas de Artepillin C inseridas na bicamada lipídica. A carga negativa no oxigênio (vermelho), localizado no ácido carboxílico, posiciona-se voltado para a interface água/lipídio, representada aqui pelos átomos de fosfato (roxo) e água (pontos azuis), enquanto os grupos prenilados estão voltados para a região hidrofóbica. 100
- Figura 4.27.** Imagens da projeção 3D no plano-Z de GUVs constituídas por DPPC, obtidas por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram coletadas na ausência e na presença de Artepillin C no sistema em função do tempo, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 102
- Figura 4.28.** Extravasamento da sonda fluorescente Alexa Fluor 488 a partir do interior de GUVs de DPPC por medidas de microscopia confocal. Esquerda: intensidade de fluorescência da sonda no interior das GUVs de DPPC em função do tempo. Direita: imagens coletadas das GUVs de DPPC antes e depois da inserção de 100 e $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C na suspensão. 103

- Figura 4.29.** Imagens de GUVs constituídas de DPPC, obtidas através da microscopia confocal com excitação 2 fótons ($\lambda_{exc} = 780 \text{ nm}$), utilizando-se a técnica LAURDAN-GP. As imagens são acompanhadas dos histogramas do valor obtido, calculados na ausência e na presença de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C em função do tempo. 104
- Figura 4.30.** Diagrama de fases representando as frações de área da fase l_o dependente da razão molar da mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol. A tabela ao lado representa as referências marcadas no diagrama. A mistura ternária do trabalho corresponde à letra c. Adaptado de [92]. 105
- Figura 4.31.** Curvas DSC de dispersão lipídica (10 mmol.L^{-1}) de vesículas multilamelares de DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), na ausência e presença de concentrações de Artepillin C nas razões molares Artepillin C:lipídio 1:100, 5:100 e 10:100. O intervalo de temperatura medido para o sistema varia de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 107
- Figura 4.32.** Diagramas de SAXS de vesículas extrusadas (A) e não-extrusadas (B), compostas da mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol, na razão molar 23:47:30, na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/lipídio 1:10), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 109
- Figura 4.33.** Perfil da densidade eletrônica de vesículas constituídas da mistura DOPC/DPPC/Colesterol na razão 23:47:30, na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/lipídio 1:10), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 109
- Figura 4.34.** Imagens da projeção 3D de GUVs constituídas pela mistura DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), obtidas por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram coletadas na ausência e na presença de Artepillin C no sistema em função do tempo, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 111
- Figura 4.35.** Imagens da projeção 3D de GUVs constituídas pela mistura DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), obtidas por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram coletadas na ausência e na presença de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C no sistema em função do tempo, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 112
- Figura 4.36.** Extravasamento das sonda fluorescente Alexa Fluor 488 a partir do interior de GUVs formadas pela mistura DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol) por medidas de microscopia confocal Esquerda: intensidade de fluorescência da sonda no interior das GUVs em função do tempo. Direita: imagens coletadas das GUVs constituídas pela mistura ternária antes e depois da inserção $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C na suspensão. 114
- Figura 4.37.** GUVs constituídas de DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), obtidas através da técnica LAURDAN-GP. A) Valores de LAURDAN-GP calculados nas fases l_o/l_d ; B) GUVs obtidas em função do tempo, após interação de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. C) GUVs obtidas em função do tempo, após interação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. D) Imagens de GUVs coletadas em plano focal diferente da região equatorial, após interação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. 116

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1.** Valores de constante dielétrica (ϵ_D) dos solventes utilizados para o fracionamento do extrato etanólico da própolis verde.....63
- Tabela 4.2.** Identificação por TOF/MS do constituinte majoritário do subgrupo 2, obtido pelo fracionamento em coluna do grupo bioativo G2, pertencente à fração clorofórmica da própolis verde.....67
- Tabela 4.3.** Valores de coeficiente de absorção molar (ϵ) da Artepillin C em solução metanólica e tampão fosfato.....70
- Tabela 4.4.** Valores de constante de ligação (k_b) e entalpia (ΔH) dos processos termodinâmicos de titulação de vesículas de DOPC (10 mmol.L^{-1}) em solução de Artepillin C ($50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) em tampão e água milli-Q, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$76
- Tabela 4.5.** Parâmetros de ajuste dos diagramas de SAXS obtidos para medidas de vesículas de DOPC na ausência e presença de Artepillin C, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. *espaçamento-d*: distância compreendida entre espessura da bicamada lipídica e camada de água entre as lamelas, para as vesículas oligolamelares; z_H : centro da distribuição gaussiana referente à cabeça polar dos lipídios; σ_H : distribuição média de z_H ; ρ_C : amplitude da gaussiana relativa à σ_H ; σ_C : distribuição média da região das cadeias acílicas; %ULVs: porcentagem de vesículas unilamelares no sistema; d_B : espessura calculada das bicamadas lipídicas.....78
- Tabela 4.6.** Parâmetros termodinâmicos obtidos através da análise das curvas de DSC, medidas para a suspensão de vesículas multilamelares formadas por DMPC e DPPC, na ausência e presença de concentrações de Artepillin C. T_p = temperatura de pré-transição; ΔH_p = variação de entalpia correspondente ao pico de pré-transição; T_m = temperatura da transição principal; ΔH_m = variação de entalpia correspondente ao pico de transição principal.....89
- Tabela 4.7.** Parâmetros de ajuste dos diagramas de SAXS obtidos para medidas de vesículas de DMPC e DPPC (nas fases gel e fluida), na ausência e presença de Artepillin C, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. *espaçamento-d*: distância compreendida entre espessura da bicamada lipídica e camada de água entre as lamelas, para as vesículas oligolamelares; z_H : centro da distribuição gaussiana referente à cabeça polar dos lipídios; σ_H : distribuição média de z_H ; ρ_C : amplitude da gaussiana relativa à σ_H ; σ_C : distribuição média da região das cadeias acílicas; %ULVs: porcentagem de vesículas unilamelares no sistema; d_B : espessura calculada das bicamadas lipídicas.....93
- Tabela 4.8.** Parâmetros termodinâmicos obtidos através da análise das curvas de DSC, medidas para a suspensão de vesículas multilamelares formadas pela mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), na ausência e presença de concentrações de Artepillin C. T_C = temperatura da transição principal; ΔH_C = variação de entalpia correspondente ao pico de transição principal.....109
- Tabela 4.9.** Parâmetros de ajuste dos diagramas de SAXS obtidos para medidas de vesículas formadas por DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), na ausência e presença de Artepillin C, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. *espaçamento-d*: distância compreendida entre espessura da bicamada lipídica e camada de água entre as lamelas, para as vesículas oligolamelares; z_H : centro da distribuição

gaussiana referente à cabeça polar dos lipídios; σ_H : distribuição média de z_H ; ρ_C : amplitude da gaussiana relativa à σ_H ; σ_C : distribuição média da região das cadeias acílicas; %ULVs: porcentagem de vesículas unilamelares no sistema; d_B : espessura calculada das bicamadas lipídicas.....110

LISTA DE SÍMBOLOS

T_C	temperatura de transição principal
T_P	temperatura de pré-transição
C_p	capacidade térmica
ΔH	variação de entalpia
L_α	fase líquido-cristalina
L_β	fase gel
l_o	fase líquido-ordenada
l_d	fase líquido-desordenada
ε	coeficiente de absorção molar
l	caminho óptico
N_2	nitrogênio gasoso
Pt	platina
z_H	centro da distribuição gaussiana referente à cabeça polar dos lipídios;
σ_H	distribuição média de z_H ;
σ_C	distribuição média da região das cadeias acílicas;
%ULVs	porcentagem de vesículas unilamelares no sistema;
d_B	espessura calculada das bicamadas lipídicas
ε_D	constante dielétrica
η	viscosidade do solvente
μ_e	mobilidade eletroforética

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PC	Fosfatidilcolina
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
MLV	Vesículas multilamelares
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
LUV	Vesículas unilamelares grandes
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
SAXS	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo
DM	Dinâmica molecular
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
DiIC₁₈	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato
LAURDAN	6-lauroil-2-(<i>N,N</i>-dimetilamino)naphthaleno
EEP	Extrato etanólico de própolis
MeOH	Metanol
UV	Ultra-violeta
CCD	Cromatografia de camada delgada
ITO	Óxido de índio dopado com estanho
NA	Abertura numérica
LSM	Microscopia de varredura de laser
G	Fator-G

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE SÍMBOLOS	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XX
PREFÁCIO	24
1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Considerações gerais	25
1.2. Objetivos	28
1.2.1. Objetivos gerais.....	28
1.2.2. Objetivos específicos.....	28
2. REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1. Própolis: aspectos gerais	30
2.2. O uso doméstico da própolis	34
2.3. <i>Pythium aphanidermatum</i>	35
2.4. Membranas modelo	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Reagentes químicos.....	42
3.2. Processo de extração e purificação dos compostos resinosos	42
3.3. Fracionamento do extrato etanólico de própolis (EEP).....	43
3.4. Fracionamento de compostos bioativos através de ensaios bioguiados	44

3.5.	Avaliação do potencial antifúngico contra a espécie <i>Pythium aphanidermatum</i>	46
3.6.	Preparação de vesículas fosfolipídicas	47
3.6.1.	Preparação de vesículas multilamelares (MLVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs).....	47
3.6.2.	Preparação de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)	48
3.7.	Medidas de absorção óptica.....	50
3.8.	Medidas de espectroscopia de fluorescência do estado estacionário.....	51
3.9.	Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	51
3.10.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	52
3.11.	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS).....	53
3.12.	Monocamadas de Langmuir	54
3.13.	Potencial Zeta (ζ).....	55
3.14.	Microscopia de fluorescência e contraste de fase.....	56
3.15.	Microscopia confocal de fluorescência com excitação 1-fóton.....	57
3.16.	Medidas de LAURDAN-GP por microscopia confocal de fluorescência com excitação 2-fótons.....	58
3.17.	Simulações de dinâmica molecular	61
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
4.1.	Ensaio bioguiado para identificação de molécula(s) bioativa(s) de própolis contra o fitopatógeno <i>Pythium aphanidermatum</i>	63
4.2.	Bioatividade do composto majoritário Artepillin C contra o fitopatógeno <i>P. aphanidermatum</i>	67
4.3.	Caracterização espectroscópica da Artepillin C	69
4.4.	Estudo da interação da Artepillin C com sistemas miméticos de membranas celulares	73
4.4.1.	Efeitos da Artepillin C em vesículas fosfolipídicas de DOPC	74
4.4.1.1.	Termodinâmica do processo de ligação.....	74
4.4.1.2.	Investigação nas mudanças estruturais das bicamadas lipídicas	77
4.4.1.3.	Estudo dos efeitos da Artepillin C em GUVs de DOPC por microscopia confocal de fluorescência	79

4.4.1.4. Estudo dos efeitos da Artepillin C em GUVs de DOPC por microscopia de fluorescência e contraste de fase.....	80
4.4.1.5. Extravasamento por microscopia confocal.....	83
4.4.1.6. Análises da fluidez das GUVs de DOPC por medidas de LAURDAN-GP	84
4.4.2. Efeitos da Artepillin C em vesículas fosfolipídicas zwitteriônicas saturadas.....	87
4.4.2.1. Medidas de calorimetria diferencial de varredura	87
4.4.2.2. Investigação nas mudanças estruturais das bicamadas lipídicas em vesículas de DMPC e DPPC.....	89
4.4.2.3. Influência da Artepillin C em monocamadas de DMPC	94
4.4.2.4. Medidas de potencial zeta em vesículas de DMPC	95
4.4.2.5. Investigação da interação da Artepillin C com bicamada lipídica de DMPC por simulação de dinâmica molecular.....	96
4.4.2.6. Estudo dos efeitos da Artepillin C em GUVs de DPPC por microscopia confocal de fluorescência	101
4.4.2.7. Extravasamento por microscopia confocal.....	103
4.4.2.8. Análises da fluidez das bicamadas lipídicas em GUVs de DPPC por medidas de LAURDAN-GP.....	104
4.4.3. Efeitos da Artepillin C em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol	105
4.4.3.1. Medidas de calorimetria diferencial de varredura em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol	106
4.4.3.2. Investigação nas mudanças estruturais das bicamadas lipídicas em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol.....	107
4.4.3.4. Extravasamento por microscopia confocal.....	113
4.4.3.5. Análises da fluidez das bicamadas lipídicas em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol por medidas de LAURDAN-GP	114
5. CONCLUSÕES.....	117
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

PREFÁCIO

A proposta inicial do projeto de pesquisa que rendeu esta tese de doutorado, discutida entre mim e o meu orientador, professor Amando Ito, era o estudo de peptídeos antimicrobianos que são promissores frente aos problemas de resistência antimicrobiana. Numa conversa rotineira de laboratório, pensamos que seria interessante estudar os efeitos da melitina, um destes peptídeos antimicrobianos e que está presente no veneno de abelhas. Até então, não sabíamos que a procura pela melitina iria nos guiar a um estudo totalmente inovador, ainda na vertente da busca de compostos bioativos e seus estudos de interação com membranas modelo. Numa conversa com o professor Ademilson Espencer da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que é o “dono das abelhas”, decidimos fazer uma colaboração para estudar, ao invés de peptídeos antimicrobianos, as própolis brasileiras, que são constituídas por inúmeros compostos fitoquímicos que as abelhas coletam para a proteção de suas colmeias. “Ótimo! Vamos lá enfrentar este desafio, afinal, é um projeto de doutorado”, disse eu em uma de nossas primeiras reuniões. A partir de então, através de mais algumas outras conexões com outros pesquisadores, tivemos o prazer de conhecer a Dra. Sônia e a Dra. Suikinai da Embrapa – Meio Ambiente, que propuseram alguns testes das própolis contra o *Pythium aphanidermatum*, um fitopatógeno de grande interesse na agricultura. Novo desafio aceito e tudo caminhou melhor que o esperado, pois, diferentemente de muitos outros antifúngicos e/ou novos compostos já testados contra este microrganismo, a própolis destacou-se nessa atividade. Foi aí que o interesse da nossa pesquisa se expandiu: o estudo da interação e dos efeitos da própolis em membranas modelo caminhará concomitantemente aos estudos de microbiologia, agregado a um árduo aprendizado químico e biológico que, felizmente, tornou-se uma experiência única e de grande sucesso para este trabalho.

A tese está apresentada em 6 capítulos: o primeiro refere-se à abordagem principal deste trabalho, trazendo alguns porquês da busca de novos compostos bioativos, da importância da própolis para as abelhas e dos efeitos de drogas em membranas biológicas de células-alvo. O segundo capítulo apresenta um enfoque histórico da própolis, na biologia do fitopatógeno estudado e no estudo das membranas modelo. O capítulo 3 traz a metodologia utilizada neste trabalho, onde é possível encontrar inúmeras referências que estão relacionadas aos aspectos teóricos das técnicas envolvidas. No quarto encontram-se os resultados e discussões, explorando desde os efeitos biológicos da ação da própolis contra o fitopatógeno até os estudos com as membranas modelo. O quinto capítulo fecha as principais discussões deste trabalho como forma de conclusão e no sexto estão as referências bibliográficas que foram utilizadas para a construção da tese.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

A busca por novas drogas para o combate das mais diversas classes de microrganismos, que têm se tornado resistentes a antibióticos convencionais por fatores como uso excessivo e ineficiente de fármacos em geral, tem chamado a atenção não apenas para o combate de doenças infecciosas em humanos, mas também devido à grande perda de produtos de interesse agrônômico que são danificados por fitopatógenos multirresistentes¹⁻³.

No quadro clínico, a causa mais comum que leva à resistência antimicrobiana é o uso excessivo de antibióticos, que auxilia na replicação errônea dos microrganismos levando à geração de espécies geneticamente modificadas. Este problema pode ser agravado em situações onde não existem condições sanitárias adequadas e em lugares públicos, tais como hospitais, onde há um alto índice de proliferação e infecção microbiana⁴.

Na agricultura, o uso intensivo de pesticidas para o combate de microrganismos que comprometem principalmente a parte alimentícia também acarreta diversos problemas relacionados à resistência antimicrobiana. Diferentemente da infecção em humanos, o aumento na dose destes tóxicos responsáveis pela ação contra os fitopatógenos pode trazer como consequência, além da mutação genética das espécies, riscos ambientais oriundos do acúmulo dessas substâncias no solo⁵.

Dentro do aspecto agrônômico, o pseudofungo *Pythium aphanidermatum*, da classe dos oomicetos, destaca-se por ser uma espécie agressiva e altamente resistente a fungicidas comuns, apodrecendo por exemplo raízes e frutos de cultivos de tomate, beterraba, pepino e pimentão⁶⁻¹⁰. Quando comparado a fungos, o *P. aphanidermatum* apresenta um grande diferencial: a ausência de ergosterol na composição lipídica de sua membrana celular, tornando muitos fungicidas ineficientes em seu combate, uma vez que os principais antifúngicos conhecidos interagem com ou inibem o ergosterol em sua ação¹¹.

A necessidade de compostos bioativos que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos já conhecidos tem sido alvo de grande número de estudos, principalmente relacionados a produtos naturais, como é o caso da própolis, que são produtos resinosos formados por compostos que abelhas coletam de diferentes espécies de plantas e os processam através de suas enzimas salivares, protegendo suas colônias contra patógenos que podem atacá-las levando a colmeia à destruição¹²⁻¹⁴.

Cada espécie de abelha é capaz de coletar os metabólitos secundários exsudatos de plantas e formar diversos tipos de própolis, que são dependentes do ambiente em que elas vivem e das fontes vegetais que possuem para os coletarem e, assim, manter a ação antimicrobiana dentro de suas colônias. Dentre todos os tipos de própolis existentes, a própolis brasileira coletada pela espécie de abelha *Apis mellifera*, denominada própolis verde, é o produto com maior destaque mundial e que tem sido comercializado e exportado para indústrias farmacológicas (principalmente para o Japão), destacando-se por seu amplo espectro de ações preventivas e tratamentos de doenças, possuindo propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas e antioxidantes^{15,16}. Os principais agentes bioativos encontrados neste produto são ácidos fenólicos, terpenóides, ácidos cafeicos e diversas classes de flavonoides, como kaempferol e quercetina, que são dependentes do tipo de vegetação à qual a abelha tem acesso na região e pela seletividade específica de cada espécie nesta coleta, possivelmente devido à necessidade de atividade antimicrobiana no interior da colmeia¹⁷⁻²¹.

A Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) foi destacada dentre todos os compostos da própolis verde como o composto majoritário e responsável por diversos mecanismos de ação contra patógenos de diversas espécies, tornando-se uma molécula de interesse farmacológico principalmente pelo seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno²²⁻²⁴. Esta molécula pertence ao grupo dos derivados de ácido cinâmico, possui baixo peso molecular e é constituída por dois grupos prenilados ligados a um grupo fenil (Figura 1.1) que aumentam a hidrofobicidade da molécula, provavelmente viabilizando sua interação com agregados anfifílicos tais como as membranas celulares.

O mecanismo da Artepillin C dentro do seu espectro de ação biológica ainda não está elucidado, mas estudos demonstraram que agentes fitoquímicos que apresentam semelhanças estruturais a esta molécula, interagem e modificam estruturalmente

biomembranas de células-alvo, resultando na perda de funções de proteínas de membrana e refletindo em um grande repertório de ações biológicas^{25,26}. A bioatividade destes compostos é vinculada às características estruturais que a favorecem, tais como a presença de anéis benzênicos e duplas ligações em suas estruturas, além de um ou mais grupos hidroxila ligados a sistemas de anéis aromáticos²⁷. A presença desses grupos químicos permite a interação desta molécula com a membrana celular por diferentes tipos de interações intermoleculares, ampliando sua gama de atividade farmacológica.

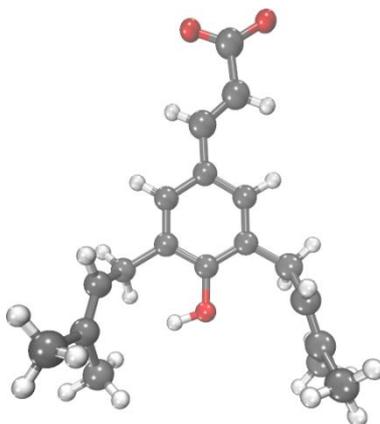


Figura 1.1. Estrutura molecular da Artepillin C.

O estudo de sistemas auto-organizados formados a partir de lipídios é de extrema importância devido às suas similaridades com as propriedades das membranas celulares, que são essenciais para a vida da célula. As membranas biológicas possuem uma estrutura geral, formadas principalmente de moléculas de lipídios e proteínas, estabilizadas por interações físicas. São algumas características fundamentais das membranas celulares: i) estruturas dinâmicas, fluidas e a maior parte de suas moléculas são capazes de mover-se no plano da membrana; ii) as moléculas lipídicas são arranjadas como uma dupla camada contínua com cerca de 5 nm de espessura e iii) as bicamadas lipídicas formadas fornecem a estrutura básica da membrana e atuam como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis²⁸. As proteínas de membrana têm papel importante no transporte de entrada e saída de moléculas da célula e também em processos de sinalização química, enquanto suas funções são determinadas pelas propriedades estruturais das bicamadas

lipídicas em que estão inseridas²⁹. Atualmente a busca pelo entendimento na organização lateral dos lipídios em diferentes tipos celulares tornou-se alvo para o entendimento da ação de compostos bioativos, utilizando-se principalmente fosfolipídios zwitteriônicos saturados e insaturados, além de moléculas pertencentes à família dos esteróis (p. ex. colesterol e ergosterol), que são importantes componentes de membranas plasmáticas e que podem, espontaneamente, formar separação de fases para manter sua integridade. Os tipos de moléculas anfifílicas que constituem o envoltório celular diferem de classe para classe, sendo esta composição a principal seletividade para o repertório de ação de fármacos, peptídeos bioativos e outras moléculas com efeitos terapêuticos que modificam propriedades estruturais de membranas celulares apenas em células-alvo^{30,31}.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivos gerais

Dentro dos aspectos apresentados, o interesse deste trabalho foi: i) verificar a ação da própolis coletada pela espécie de abelha *Apis mellifera* contra o fitopatógeno da espécie *Pythium aphanidermatum*; ii) o estudo da ação do composto majoritário da própolis verde, a Artepillin C, em sistemas de membranas modelo constituídos por lipídios zwitteriônicos saturados e insaturados e iii) verificar se a presença do colesterol nestas estruturas lipídicas nano-organizadas altera as propriedades de interação entre o composto e as membranas modelo, uma vez que o principal diferencial do fitopatógeno em estudo é a ausência de esteróis em sua membrana plasmática.

1.2.2. Objetivos específicos

- Investigar a inibição da difusão do fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* pela ação dos compostos resinosos extraídos da própolis verde, coletada pela abelha da espécie *Apis mellifera*;

- Fracionar o extrato resinoso da própolis verde por técnicas cromatográficas para encontrar, através de ensaio bioguiado, o composto majoritário responsável pela atividade contra o fitopatógeno em estudo;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas do composto bioativo em soluções aquosas e metanólica através de técnicas de espectroscopia de absorção óptica e fluorescência;
- Investigar as propriedades das bicamadas lipídicas formadas por DOPC, DMPC, DPPC e pela mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol na ausência e na presença do composto bioativo, através das técnicas de calorimetria (DSC e ITC), microscopia de fluorescência e contraste de fase, difração de raio-X (SAXS), monocamadas de Langmuir, potencial-zeta e simulação de dinâmica molecular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Própolis: aspectos gerais

A própolis é um nome genérico para o conjunto de substâncias resinosas coletadas por espécies de abelhas a partir da vegetação. A palavra própolis é derivada do grego *pro-*, para ou em defesa de, e *polis*, cidade, que forma no sentido denotativo “defesa da cidade”, onde, no caso, a cidade é a colmeia, ambiente em que as abelhas vivem. Própolis é um produto altamente adesivo e resinoso que abelhas utilizam principalmente para selar cavidades abertas em suas colmeias e protegê-las contra invasores¹⁹. A resina contida na própolis é coletada na vegetação das cercanias da colmeia. O espectro de vôo de uma abelha da espécie *A. mellifera* abrange um raio de cerca de 4-5 km em torno da colmeia, de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, bem como resina para a própolis. A fonte para a coleta dos compostos varia de acordo com as regiões em que as diferentes espécies de abelhas que os coletam vivem, sendo principalmente obtidos a partir de exsudatos de plantas, de brotos e de outras partes do tecido vegetal¹⁷. De acordo com a composição, as própolis podem apresentar aparências diversificadas em sua coloração (do amarelo claro ao marrom escuro) e possuir, de uma maneira geral, 50% da massa constituída de material resinoso e bálsamo vegetal, 30% de cera de abelhas, 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias³².

A própolis verde, coletada pela espécie de abelha *Apis mellifera*, denominada própolis verde, é um dos produtos brasileiros com maior destaque mundial e conhecido pelas diversas atividades biológicas que apresenta, destacando-se em suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas e antioxidantes^{17,33}.

A espécie de abelha *Apis mellifera scutellata*, de origem africana, foi introduzida no sudeste do Brasil (região de Camaquã, estado de São Paulo) no ano de 1956, e, devido à subsequente fuga acidental dos enxames essas abelhas se espalharam por diversas regiões e se cruzaram com as abelhas de origem europeia, criando diversas colônias e resultando no processo de africanização das abelhas no país¹⁹.

Em relação à principal fonte botânica de obtenção do material resinoso que constitui a própolis verde, alguns trabalhos mostraram que a região do cerrado (Figura 2.1), que é uma importante fonte de biodiversidade brasileira, possui uma grande concentração da planta da espécie *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como alecrim-do-campo (Figura 2.2) e que tem uma constituição química similar ao dessa própolis, tornando-se após esta descoberta uma espécie vegetal de grande interesse na busca por novos compostos bioativos naturais³⁴. No processo de coleta, as abelhas cortam os ápices da *B. dracunculifolia* (Figura 2.3), que são ricos em tecidos jovens (gemas vegetativas) e, com o auxílio de suas pernas, acumulam um material de característica verde em suas corbículas (região localizada no terceiro par de pernas das abelhas), repleto de fragmentos epidérmicos e tricomas glandulares, além de uma elevada concentração de clorofila que está presente nos tecidos jovens da planta, dando origem ao nome desta própolis³⁵.



Figura 2.1. Mapa do Brasil, com destaque da região do cerrado brasileiro. Extraído de: [36].

É importante ressaltar que estruturas como os tricomas glandulares têm papel importante no acúmulo de compostos bioativos para a proteção das plantas contra diversos tipos de patógenos e predadores. A grande parte dos constituintes das resinas coletadas pelas abelhas para a formação da própolis são os óleos voláteis e compostos aromáticos, que são encontrados nos tricomas glandulares que as abelhas acumulam na coleta³⁷. No caso da própolis verde, os principais compostos bioativos são derivados de

ácidos fenólicos, terpenos, aldeídos aromáticos e flavonoides, identificados como metabólitos secundários envolvidos nos mecanismos que auxiliam a adaptação das plantas ao seu meio³⁸.



Figura 2.2. Arbustos de plantas da espécie *Baccharis dracunculifolia*.

Os metabólitos secundários possuem estruturas complexas com baixo peso molecular, destacando-se, além das atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, um largo espectro de ações farmacológicas. A produção de resinas pelas plantas contendo os metabólitos secundários está intimamente associada a fatores climáticos e a estímulos externos, tais como a presença dos fungos endofíticos em suas estruturas³⁸. Dentre os metabólitos secundários, podemos destacar como majoritário na própolis verde a Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), que possui dois grupos prenilados ligados ao grupo fenólico do ácido cinâmico. Este composto foi identificado em 1979 e exclusivamente pertence à própolis brasileira, majoritariamente na própolis verde³⁹. São algumas atividades biológicas já identificadas deste composto: ação analgésica e anti-inflamatória, antiangiogênica, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante^{22-24,40,41}.



Figura 2.3. Abelha da espécie *Apis mellifera* no momento da coleta de material resinoso de ápices foliares de *Baccharis dracunculifolia*.

Paulino et al.²³ investigaram a ação analgésica e anti-inflamatória *in vivo* pela administração via oral da Artepillin C em ratos e também testes *in vitro* utilizando-se células do tipo RAW 264.7, obtendo resultados positivos pela absorção da própolis no organismo do animal devido à afinidade do composto pela membrana celular. Outra ação importante do composto foi comprovada por Ahn et al.⁴⁰ contra a angiogênese, doença que leva à nutrição e ao conseqüente crescimento de células tumorais. Dentro do espectro de ação da Artepillin C, o estudo de sua citotoxicidade em células neoplásicas é um dos alvos de interesse e que tem trazido excelentes resultados, tais como mostrados por Kimoto et al.²⁴, que aplicaram o composto bioativo, por testes *in vitro* e *in vivo*, em células tumorais malignas de humanos e murinos, mostrando sua alta citotoxicidade por meio de algumas ações específicas, incluindo apoptose celular, que podem estar relacionados à perda da funcionalização de proteínas de membranas pela alteração na organização lipídica durante a inserção da droga na membrana celular. A atividade antioxidante da Artepillin C foi comprovada por Shimizu et al.²², que investigaram *in vitro* a prevenção de danos causados por espécies reativas de oxigênio, causando a peroxidação lipídica em células de carcinoma (Caco-2 e HepG2) na presença do composto. Em relação à atividade antimicrobiana, Aga et al.⁴¹ estudaram a ação da própolis verde contra microrganismos de diferentes espécies, incluindo

bactérias e fungos, identificando que a Artepillin C destacou-se nestas atividades, dentre os compostos presentes na própolis, estudando três espécies de patógenos: *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Arthroderma benhamiae*.

Além da Artepillin C, a própolis verde contém outros compostos derivados de ácidos fenólicos também importantes para a manutenção e defesa das colônias das abelhas, tais como a drupanina, ácido p-coumárico, ácido caféico, além dos flavonoides pinobanksina e kaempferol¹⁹.

Embora as resinas e as própolis já tenham sido demonstradas como potenciais fornecedores de matéria prima para a indústria farmacêutica, principalmente pela enorme quantidade de metabólitos secundários, um dos grandes desafios é compreender o verdadeiro papel dessas resinas no interior das colmeias como eventuais controladores de doenças e como as abelhas detectam a necessidade de coletar e encontrar a resina adequada¹⁵.

Um dos maiores custos para evolução da sociabilidade das abelhas dentro de suas colmeias foi a sua exposição aos patógenos. Notadamente nos insetos eussociais e em particular nas abelhas, que vivem geralmente em colônias com divisões de trabalho e onde o contato com o meio externo é fundamental para a sua sobrevivência, elas se expõem continuamente aos patógenos que podem ingressar nas colônias pelas operárias forrageadoras. O ambiente interno da colônia é propício ao desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias, que muitas vezes estão associados à própria integridade da colônia, como na fermentação do pólen utilizado na alimentação das larvas¹⁵.

2.2. O uso doméstico da própolis

A utilização da própolis pela civilização antiga data de 300 a.c. Os egípcios, por exemplo, utilizavam o produto para embalsamar os mortos, enquanto gregos, romanos e incas a utilizavam como agente cicatrizante, antisséptico e antipirético^{32,42-44}. Desde então, a própolis foi um dos produtos naturais mais utilizados como remédio popular; porém, apenas no século 17 esse produto foi listado oficialmente, pela primeira vez no mundo pela farmacopeia de Londres, como uma droga⁴⁵. O seu uso ainda tem se destacado até os dias atuais, encontrando-se disponível em sua forma natural ou purificada (onde são extraídos apenas os compostos resinosos). Apesar dos benefícios

trazidos pela própolis terem sido descobertos há mais de dois mil anos, a investigação científica das propriedades biológicas de seus constituintes foi realizada apenas a partir do século 20, surgindo em 1908 o primeiro trabalho relatando algumas características do produto. Apesar de inúmeros trabalhos relacionados ao estudo das propriedades biológicas terem sido publicados ao longo do século 20, foi a partir de 1980 que a pesquisa relacionada às características da própolis cresceu substancialmente no mundo todo, inclusive no Brasil, que teve a sua primeira publicação em 1980⁴⁶, mostrando que a atividade da própolis contra a bactéria da espécie *Staphylococcus auerus* obteve mais sucesso em sua inibição que os antibióticos testados. Mas foi nos anos 90 que as pesquisas com própolis oriundas de diferentes regiões do Brasil passaram a tomar novos rumos e vários grupos de pesquisas se preocuparam em caracterizar suas propriedades físico-químicas, bem como as suas atividades antimicrobianas, inibição de tumores, regeneração de tecidos, ação cicatrizante, atividade anticariogênica, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, analgésica, atividade estrogênica, antiangiogênica e regenerativa de cartilagens⁴³.

Dentre os países em destaque na pesquisa da própolis, o Japão tem chamado atenção por publicar principalmente estudos com a própolis brasileira. Isso se deve principalmente à alta taxa de consumo da própolis verde pelos japoneses como suplemento alimentar na profilaxia de doenças, devido às suas ótimas características organolépticas e também em razão do menor teor de poluentes ambientais, bem como a sua atividade antitumoral, que está relacionada principalmente com os derivados de ácidos fenólicos presentes no produto¹⁵.

2.3. *Pythium aphanidermatum*

De acordo com a sistemática filogenética e análises moleculares, os organismos anteriormente classificados como fungos são divididos atualmente em três reinos: *Fungi*, *Straminipila* e *Protista*, sendo os membros pertencentes aos Reinos *Fungi* e *Stramenopila* os principais fitopatógenos encontrados na natureza^{47,48}. O microrganismo *Pythium aphanidermatum*, baseado nessa classificação, pertence ao Reino *Stramenopila*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* e espécie *P. aphanidermatum*. Sabe-se que os seres-vivos pertencentes à Classe

Oomycetes (oomicetos) possuem características bastante similares aos fungos, tal como crescimento filamentosos no estágio vegetativo, produção de micélios e formação de esporos, porém, são considerados como falsos-fungos por apresentarem características filogenéticas que os aproximam mais às algas que aos membros do *Reino Fungi*⁴⁷. Dentre estas características, destacam-se: i) mitocôndrias de crista tubular; ii) diferenciação da parede celular, composta por β -Glucanas, celulose e hidroxiprolina (enquanto fungos possuem parede celular composta por quitina); iii) ausência de ergosterol na membrana plasmática, sendo esta uma das maiores diferenciações em relação às ações de drogas no combate de oomicetos fitopatogênicos, uma vez que a atividade em fungos se dá pela interação com ou pela inibição do ergosterol nas bicamadas lipídicas, podendo causar um aumento na permeabilidade da membrana plasmática, que, em ambos os microrganismos, são constituídas principalmente por fosfolipídios saturados e insaturados⁴⁸⁻⁵⁰.

O gênero *Pythium* possui mais de 120 espécies distribuídas em todo o planeta, sendo a grande maioria habitante de solo e, com exceção à espécie *Pythium insidiosum*, que é patógeno de mamíferos, todas as espécies pertencentes a este gênero são fitopatogênicas, ou seja, agridem plantas de diferentes espécies^{47,51}. Estes ataques podem causar diferentes tipos de doenças, tais como a podridão e morte de sementes (*damping-off*) de pré (antes da germinação) e pós-emergência (após a germinação), além da podridão da raiz⁵². Dentre as espécies mais conhecidas nestas devastações, a espécie *Pythium aphanidermatum* tem se destacado por ser agressiva e altamente resistente a fungicidas utilizadas em seu combate, apodrecendo raízes e frutos, como, por exemplo, de cultivos de tomate, beterraba, pepino e pimentão⁶⁻¹⁰.

Apesar da espécie *P. aphanidermatum* estar vinculada quase que exclusivamente ao desastre de cultivos de plantas, no ano de 2011 foi publicado um estudo que relata a infecção de um humano pelo patógeno, ferido durante operações de combate no Afeganistão⁵³.

A infecção bem sucedida dos oomicetos em seus hospedeiros deve-se à produção eficiente e uma vasta dispersão dos esporos, que, conseqüentemente, formam os zoósporos, isentos de parede celular e que possuem dois flagelos de diferentes comprimentos, que auxiliam na sua movimentação. Uma vez que os zoósporos atingem seu hospedeiro, seus flagelos são retraídos e eles tornam-se cistos imóveis⁴⁸. No caso do

Pythium aphanidermatum, um material adesivo é estocado em pequenas vesículas dentro dos zoósporos, que é liberado causando o início do seu desenvolvimento. Quando a infecção acontece nas raízes das mudas, o micélio se desenvolve no tecido das plantas destruindo suas paredes celulares, aproveitando desta maneira da absorção de nutrientes necessários para sua sobrevivência⁵⁴. O *Pythium aphanidermatum* é um patógeno policíclico, ou seja, com vários ciclos de vida durante um período, podendo assim reinfestar a planta hospedeira ou viajar até uma outra para nova infecção⁵⁵. São algumas características importantes após a infecção: i) formação de novas estruturas assexuadas, incluindo esporangióforo e esporângios, que liberam mais zoósporos que podem infectar a planta hospedeira, ou mover-se para outras plantas; ii) pode haver uma reprodução sexual a partir do acasalamento: quando dois tipos diferentes de hifas se encontram, é criado um oogônio (estrutura fêmea) e um antheridium (estrutura do sexo masculino). Isto resulta na recombinação genética e existe como um oósporo – que é o estado de hibernação inicial do agente patogênico⁵⁴.

2.4. Membranas modelo

A membrana plasmática, que constitui o envoltório celular, foi evidenciada pela primeira vez ao longo da segunda metade do século 19 quando cientistas provaram a existência de uma barreira que separava o interior e exterior das células em dois ambientes de diferentes composições, possibilitando a passagem de moléculas de água e impedindo a passagem de outras macromoléculas. Essa descoberta teve como consequência o desenvolvimento de novos estudos realizados principalmente por Pfeffer, que foi pioneiro na proposição de um modelo para a membrana, sugerindo que essa fina e semi-permeável camada funcionava como uma barreira osmótica para o controle da saída e entrada de moléculas no interior celular, nomeando-a de membrana plasmática⁵⁶.

Essas evidências foram essenciais para que o final do século 19 e o século 20 trouxessem importantes nomes, tais como Overton, Langmuir, Nicolson e Singer, que auxiliaram na criação de um modelo cada vez mais realístico das membranas celulares que se encontra em discussão até os dias atuais^{57,58}. A Figura 2.4 traz uma breve apresentação cronológica dos principais estudos que contribuíram para o avanço dos modelos das membranas plasmáticas.

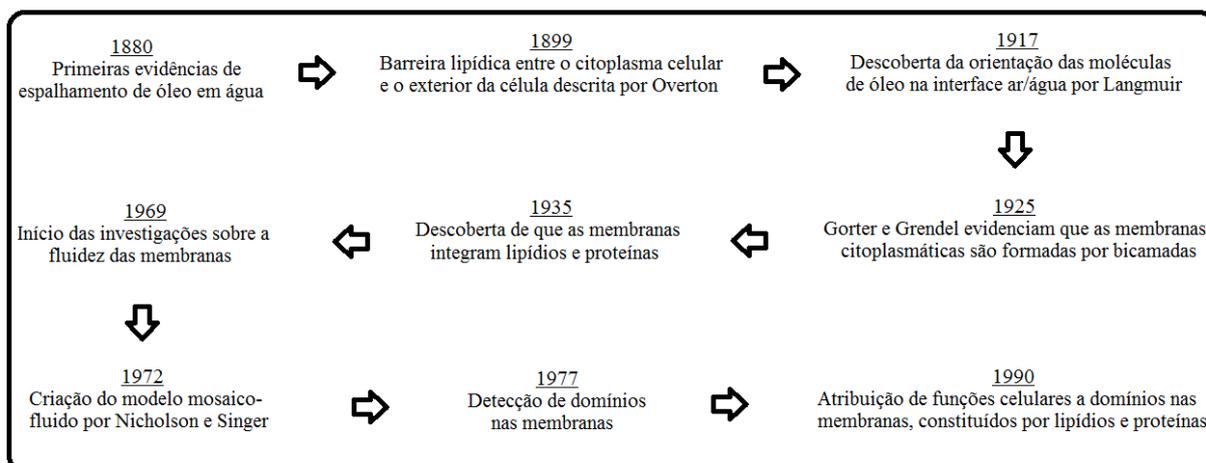


Figura 2.4. Linha do tempo ao longo dos séculos XIX e XX marcando as principais contribuições para o estudo das membranas celulares.

Estas evidências ao longo do tempo levaram ao conhecimento básico de que as membranas celulares possuem uma estrutura geral formada por lipídios e proteínas que se mantêm juntos por interações físicas, resultando em uma estrutura dinâmica, onde os lipídios são arranjados como uma dupla camada contínua com cerca de 5 nm de espessura conferindo sua estrutura principal, enquanto as proteínas são responsáveis principalmente pelo transporte de entrada e saída de moléculas da célula e em processos de sinalização química, tendo suas funções determinadas pelas propriedades estruturais das bicamadas lipídicas em que estão inseridas²⁹. A composição lipídica das membranas celulares depende das classes de seres vivos, porém, fosfolipídios zwitteriônicos, aniônicos, esfingolipídios e colesterol são os principais componentes estruturais de membranas de diversas classes de seres vivos e exercem um papel essencial na manutenção da sua integridade, estando ligados a algumas funções de proteínas de membranas.

A criação do modelo do mosaico-fluido, proposto por Singer e Nicholson, possibilitou que a linha do tempo de estudo das membranas celulares fosse direcionada a partir do final do século 20 à descoberta de um sistema ainda mais complexo, que revela a existência de regiões específicas nas membranas celulares, conhecido hoje como domínios lipídicos. Isso se deve à associação espontânea entre diferentes tipos de lipídios com o colesterol, criando-se estados de agregação que se diferenciam da

membrana como um todo⁵⁹. Estudos posteriores têm mostrado que estes domínios não são estáveis e que podem estar diretamente vinculado às funções de proteínas transmembranas⁶⁰.

Agregados lipídicos são alvos de estudos que auxiliam no entendimento do arranjo estrutural e de aspectos dinâmicos das membranas biológicas, sendo na maioria das vezes constituídos principalmente pelos fosfolipídios. Estes arranjos podem formar lipossomos (Figura 2.5), que têm como característica um filme esférico bastante fino com diâmetro compreendido na ordem de poucos nanômetros (vesículas unilamelares pequenas ou grandes) até micrometros (vesículas unilamelares gigantes).

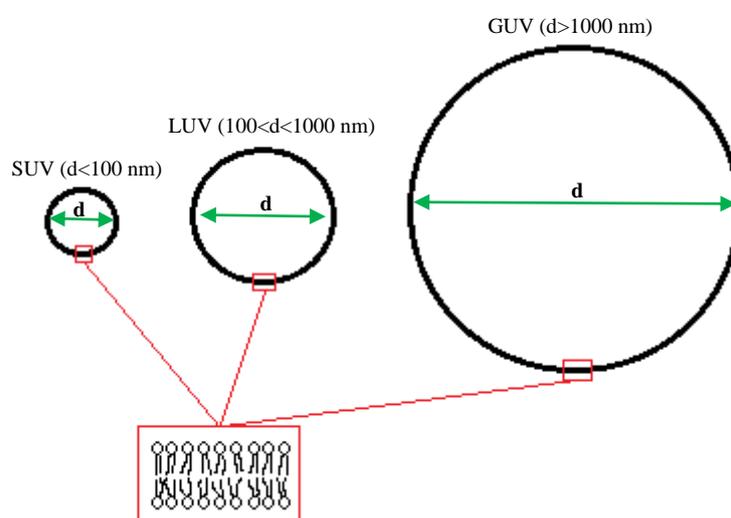


Figura 2.5. Representação ilustrativa dos tamanhos de vesículas lipídicas.

As moléculas fosfolipídicas possuem uma estrutura geral formada por uma cabeça polar e duas longas cadeias de hidrocarbonetos, constituindo as caudas hidrofóbicas. A cabeça polar pode ser carregada negativamente (fosfolipídios aniônicos), positivamente (fosfolipídios catiônicos) ou possuir o balanço total de cargas nulo (fosfolipídios zwitteriônicos). Além da diferença no balanço de cargas da cabeça, o lipídio pode apresentar diferenças na estrutura da cauda hidrofóbica, tanto na quantidade de átomo de carbono das cadeias de ácido graxo, como na ausência ou presença de uma ou mais duplas ligações, como ilustrado pela Figura 2.6.

Outra característica importante diz respeito às formas com que os fosfolipídios se organizam nas membranas em diferentes condições de temperatura e pressão,

resultando, principalmente no caso de membranas modelo constituídas por um único fosfolipídio, em duas fases termodinâmicas que dependem do estado de ordenação das cadeias hidrofóbicas.

Quando os fosfolipídios assumem conformações das caudas estendidas e ordenadas, a estrutura lipídica é mais rígida, ou seja, dizemos que eles se encontram na fase gel (L_{β}) devido à restrição do seu movimento lateral.

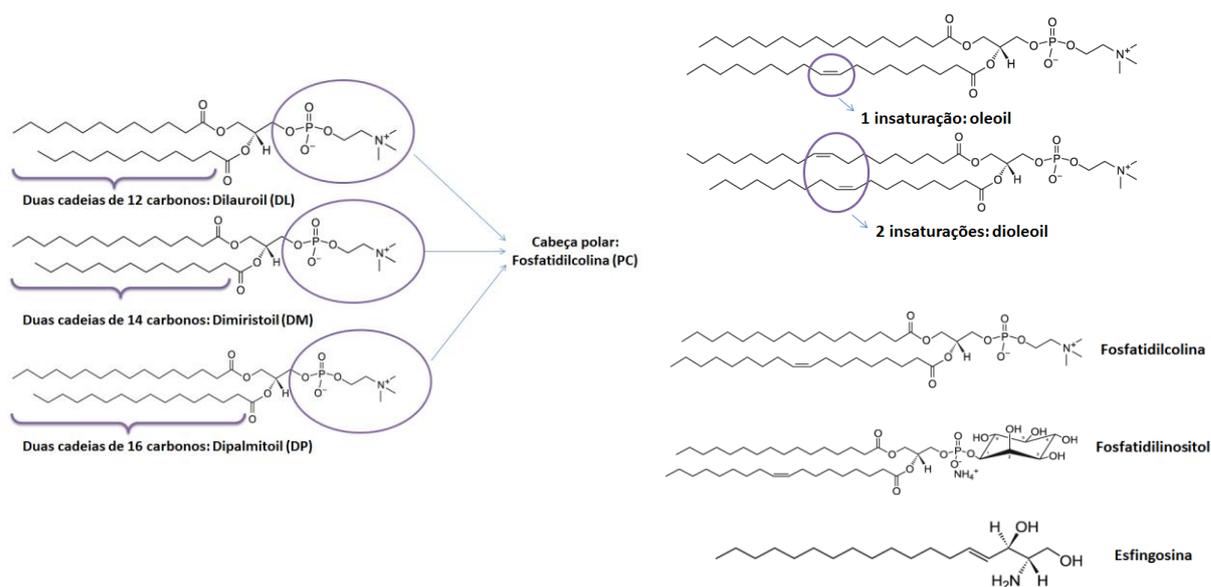


Figura 2.6. Estruturas químicas alguns fosfolipídios – dependência na composição da cabeça polar e tamanho/insaturações das caudas.

Essa estrutura pode ser alterada pela perda na ordem lateral dos fosfolipídios após atingir uma dada temperatura que caracteriza a transição termotrópica pelo aquecimento do sistema, conhecida como temperatura de transição (T_C), que depende da natureza do grupo polar da cabeça lipídica e do comprimento e grau de insaturação das cadeias de ácido graxo. Em geral, a T_C aumenta com o comprimento das cadeias e diminui com o grau de insaturação. Para temperaturas acima da T_C , onde os lipídios se organizam numa fase conhecida como líquido-cristalina (L_{α}), as caudas apolares não apresentam ordem lateral (*trans-gauche*) devido à sua grande mobilidade e a área da superfície ocupada por cada uma das cabeças polares na bicamada torna-se maior. A Figura 2.7 ilustra uma curva que pode ser obtida pela técnica de calorimetria diferencial de

varredura (DSC), onde é possível obter a temperatura de transição de um sistema composto por agregados lipídicos.

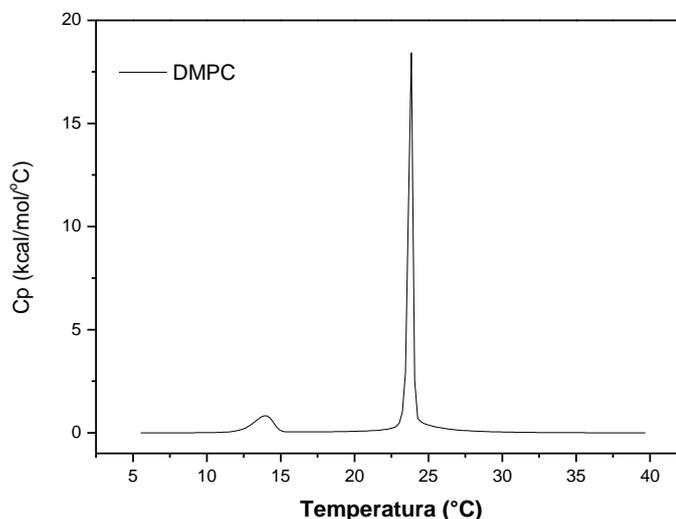


Figura 2.7. Curva DSC de dispersão lipídica de vesículas multilamelares de DMPC com concentração 10 mmol.L⁻¹.

Diversos processos e sistemas de interesse biológico, incluindo conformações estruturais e dinâmicas de membranas modelo, bem como suas alterações através da interação com diversos tipos de fármacos têm sido observados por técnicas relacionadas à espectroscopia e microscopia de fluorescência, calorimetria diferencial de varredura, calorimetria de titulação isotérmica (ITC), técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), técnicas de difração de raio-X e espalhamento de luz. Uma abordagem físico-química das propriedades estruturais e dinâmicas das bicamadas lipídicas pode ser realizada pela combinação destas técnicas, que fornecem resultados que se complementam e auxiliam no entendimento dos processos que ocorrem nas membranas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes químicos

Os lipídios 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), além do colesterol, foram adquiridos da Avanti Lipids (Alabaster, AL). As sondas fluorescentes 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato (DiI_{C18}) e 6-lauroil-2-(*N,N*-dimetilamino)naphthaleno (LAURDAN) foram adquiridas da Invitrogen (Copenhagen, Dinamarca), enquanto a sonda Alexa Fluor 488 C5-maleimide foi adquirida da Life Technologies (Nærum, Dinamarca). A Artepillin C, isolada e purificada da própolis verde, foi adquirida da Wako (Osaka, Japão). Todos os outros reagentes químicos utilizados, tais como tampão fosfato e os solventes orgânicos: hexano, diclorometano, etanol, metanol, acetato de etila e clorofórmio são de alto grau de pureza. Soluções e suspensões aquosas foram preparadas utilizando-se água milli-Q (18,2 M Ω .cm).

3.2. Processo de extração e purificação dos compostos resinosos

A própolis verde foi coletada das colônias das abelhas africanizadas na região do cerrado, na cidade de Bambuí (Minas Gerais, Brasil). Os compostos resinosos, já extraídos da própolis e purificados, foram fornecidos pelo Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Para a extração e purificação destes produtos, foi preparada uma mistura de 300 g do cerume (mistura de resina + cera) extraído do interior das colônias em 1000 mL de etanol (70%), colocado para macerar no escuro, por dois meses. Após esse período foi feita uma filtração em filtro de papel Watman-1 e obteve-se uma solução hidroalcolica, da qual foram coletadas amostras de 40 mL e distribuídas em frascos de boca larga de 50 mL, colocados abertos em uma estufa (temperatura 35° C) para evaporar o álcool. Após a estabilização da massa das resinas, os frascos contendo o

extrato etanólico de própolis (EEP) foram hermeticamente fechados e mantidos em freezer (-20° C) para sua utilização.

3.3. Fracionamento do extrato etanólico de própolis (EEP)

O EEP foi fracionado em quatro solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e água) para a realização dos ensaios bioguiados (Figura 3.1). Para isso, 1 grama do EEP foi adicionado em 40 mL de uma mistura MeOH:H₂O (90:10 v/v), levado para um funil de separação (Figura 3.1-A). Posteriormente, 30 mL de hexano foi adicionado à mistura e, após leve agitação resultando em separação de fase, a solução hexânica foi coletada e transferida para um frasco. Uma nova mistura de 15 mL de clorofórmio adicionada na solução remanescente foi realizada, e, após novo agito, a solução clorofórmica foi coletada e transferida para um frasco. O metanol foi removido da solução remanescente com um auxílio de um rotaevaporador e, após a total eliminação do solvente orgânico, 20 mL de acetato de etila foi adicionado na solução e coletado após agitação e consequente separação de fase. A solução restante foi liofilizada e utilizada como fração aquosa. Todo processo de fracionamento (Figura 3.1-B) foi repetido três vezes. Os solventes orgânicos das separações foram evaporados e os subprodutos obtidos tiveram suas massas estabelecidas. Os fracionamentos foram obtidos no Laboratório de Resíduos e Contaminantes, EMBRAPA Meio-Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil.



Figura 3.1. A) Funil de separação contendo extrato resinoso da própolis verde em uma mistura bifásica contendo MeOH/H₂O (90:10 v/v) e hexano; B) Extrato resinoso da própolis verde fracionado em quatro solventes de diferentes polaridades (da esquerda para direita): hexano, acetato de etila, clorofórmio e água.

3.4. Fracionamento de compostos bioativos através de ensaios bioguiados

Os subprodutos fracionados nos diferentes solventes, a partir da fração etanólica da própolis, foram submetidos à atividade contra o patógeno em estudo. A fração bioativa resultante foi submetida a um novo fracionamento, utilizando-se a cromatografia de coluna (Figura 3.2). Para isso, o subproduto bioativo foi macerado juntamente ao constituinte da fase estacionária (Figura 3.2-A), que neste caso foi utilizado sílica gel (60-200 Merck). Uma coluna de vidro foi preenchida com o constituinte da fase estacionária e, na parte superior, foi inserida a mistura (sílica gel + subproduto). A fase móvel percorreu a coluna em gradiente de polaridade (Figura 3.2-B), partindo de hexano 100% (100 mL), hexano/acetato (v/v, 1000 mL), acetato/metanol (v/v, 1000 mL) e por último metanol 100% (500 mL). As frações obtidas foram coletadas, concentradas em rotaevaporador e os seus constituintes avaliados utilizando a técnica de cromatografia de camada delgada, CCD, visualizada com luz UV (254 e 366 nm), como mostrado pela Figura 3.2-C. Baseado no perfil obtido pela técnica, as frações que continham as mesmas distribuições de compostos foram unidas. As novas partições foram solubilizadas e diluídas em metanol para obter as concentrações de trabalho nos bioensaios. A partir de novos testes de atividade de inibição do crescimento do patógeno, as subfrações bioativas foram submetidas a uma nova separação, utilizando-se a coluna cromatográfica e a CCD em placa preparativa.

Para a separação através da CCD, foi utilizada uma placa preparativa de vidro (20 cm²) contendo sílica sobre a superfície, utilizada como fase estacionária. Através da aplicação da solução formada pela subfração bioativa na borda inferior da placa, como ilustrado pela Figura 3.3, a mesma é introduzida numa cuba de vidro, contendo a fase móvel composta pela mistura de acetato de etila:diclorometano:hexano (45:35:20 v/v/v), a mesma utilizada para a preparação da solução do subproduto. A placa foi deixada na cuba até o solvente, subindo por capilaridade, atingir um limite próximo à extremidade superior da placa. Nessa ascensão, o solvente carrega consigo os compostos, separando-os de acordo com sua polaridade. As análises das linhas de separação de cada subproduto obtido pela técnica foram investigadas através de uma câmera de UV (254 e 366 nm).

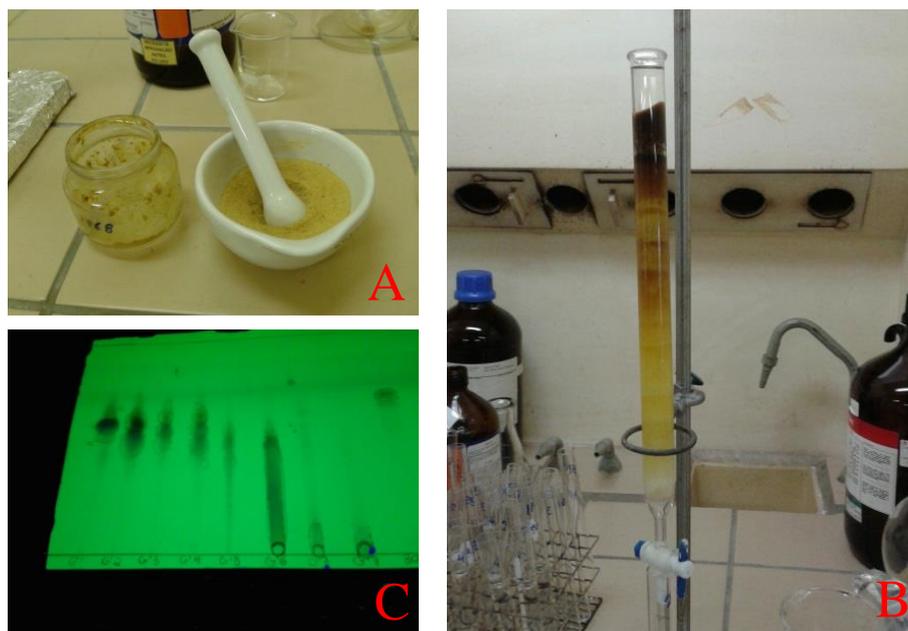


Figura 3.2. A) Extrato resinoso da própolis macerado com sílica gel; B) Coluna cromatográfica para separação dos compostos pertencentes à fração bioativa do extrato resinoso de própolis; C) CCD visualizada por luz UV.

Para a extração dos compostos da placa (Figura 3.3-A), foi realizada uma raspagem da fase estacionária relacionada a cada subfração determinada, posteriormente adicionadas em frascos (Figura 3.3-B). Após a adição de MeOH nestes recipientes (Figura 3.3-C), a sílica foi decantada e o sobrenadante constituído da solução metanólica dos subprodutos retirado do frasco para a posterior evaporação do solvente e pesagem das massas. Uma nova análise de atividade contra a difusão do patógeno foi realizada, tanto para as subfrações obtidas pela coluna quando pela placa preparativa e, os que tiveram atividade, foram injetados num espectrômetro de massas para a identificação da composição molecular final. Os fracionamentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais, EMBRAPA Meio-Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil.



Figura 3.3. A) Fracionamento do extrato resinoso da própolis verde através da placa de CCD preparativa; B) Raspagem da fase estacionária relacionada às subfrações determinadas; C) Subfrações resultantes após a coleta do sobrenadante.

3.5. Avaliação do potencial antifúngico contra a espécie *Pythium aphanidermatum*

A atividade antifúngica foi avaliada pela técnica de difusão em ágar, utilizando-se discos de papel (diâmetro ¼ IN) autoclavados e impregnados com 5 µL de uma solução 5 mg.mL⁻¹ dos extratos contra discos de 5 mm, dispersos pela placa do fitopatógeno em Ágar Dextrose Batata (BDA), 28° C, dentro de um período de 24 h (Figura 3.4).

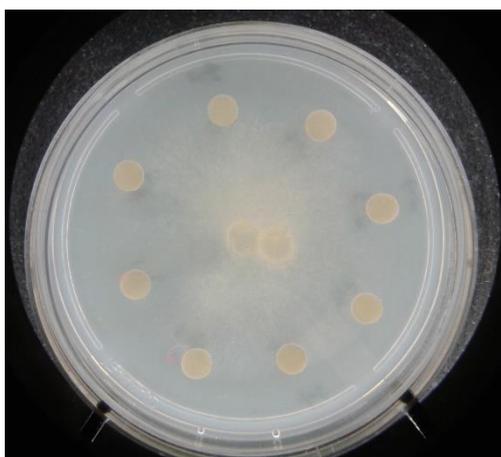


Figura 3.4. Placa utilizada para análise da difusão do fitopatógeno, na presença de extratos resinosos de própolis verde impregnados em discos de papel.

Após este período foi observado se houve ou não a formação dos halos de inibição. Como controle, utilizamos um mesmo sistema de placas, porém com filtros impregnados apenas com o solvente utilizado na solubilização dos produtos. Os experimentos, bem como as culturas do micro-organismo em estudo, foram obtidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental, EMBRAPA Meio-Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil.

3.6. Preparação de vesículas fosfolipídicas

3.6.1. Preparação de vesículas multilamelares (MLVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Vesículas multilamelares (MLVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs) foram preparadas a partir de filmes finos de fosfolípidios de DOPC, DMPC, DPPC e da mistura ternária DOPC/DPPC/colesterol (23:47:30 mol/mol) nas concentrações de 40 mmol.L⁻¹ para a técnica de SAXS, 10 mmol.L⁻¹ para DSC, 5 mmol.L⁻¹ para ITC e 1 mmol.L⁻¹ para medidas de potencial zeta. Para a formação do filme, os lípidios foram dissolvidos em 200 µL de clorofórmio e a solução final inserida em tubos de vidro de fundo arredondado, seguido de evaporação deste solvente sob o fluxo de N₂. O filme resultante, totalmente seco sob vácuo durante no mínimo de uma hora, foi então hidratado pela adição de 1 mL de água milli-Q ou tampão fosfato (10 mM, pH 7,4), em temperatura acima da temperatura de transição do lípidio, controlada por um termopar durante todo o processo. Após a hidratação, as suspensões contendo as MLVs foram obtidas a partir da agitação do tubo por no mínimo dois minutos. A obtenção da suspensão contendo LUVs foi obtida pelo processo de extrusão, a partir da adição da suspensão de MLVs em uma seringa, que, posteriormente, foi injetada em um dos lados de um miniextrusor adquirido da Avanti Lipids (Alabaster, AL). No outro extremo foi colocada uma seringa vazia, para que recebesse a suspensão após a passagem por um filtro interno, formado por uma membrana de policarbonato de poros de 0,1 µm. A passagem foi realizada no mínimo de 21 vezes, onde a última preencheu a segunda seringa, reduzindo a contaminação com as partículas maiores que podem ter permanecido na primeira seringa. Para os experimentos de DSC e SAXS, alíquotas da solução metanólica contendo a concentração desejada de Artepillin C foram adicionadas

à solução clorofórmica contendo os lipídios, antes do processo de formação dos filmes, enquanto que para os experimentos de potencial zeta, alíquotas de Artepillin C foram adicionadas nas suspensões contendo as vesículas já formadas.

3.6.2. Preparação de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

As vesículas unilamelares gigantes (GUVs) foram preparadas de acordo com o método da eletroformação⁶¹, utilizando-se fios de platina – (para os experimentos de microscopia confocal de fluorescência) e placas com filmes de óxido de índio dopado com estanho (ITO) – (para os experimentos de microscopia de fluorescência e contraste de fase). Os dois sistemas de formação estão representados na Figura 3.5.

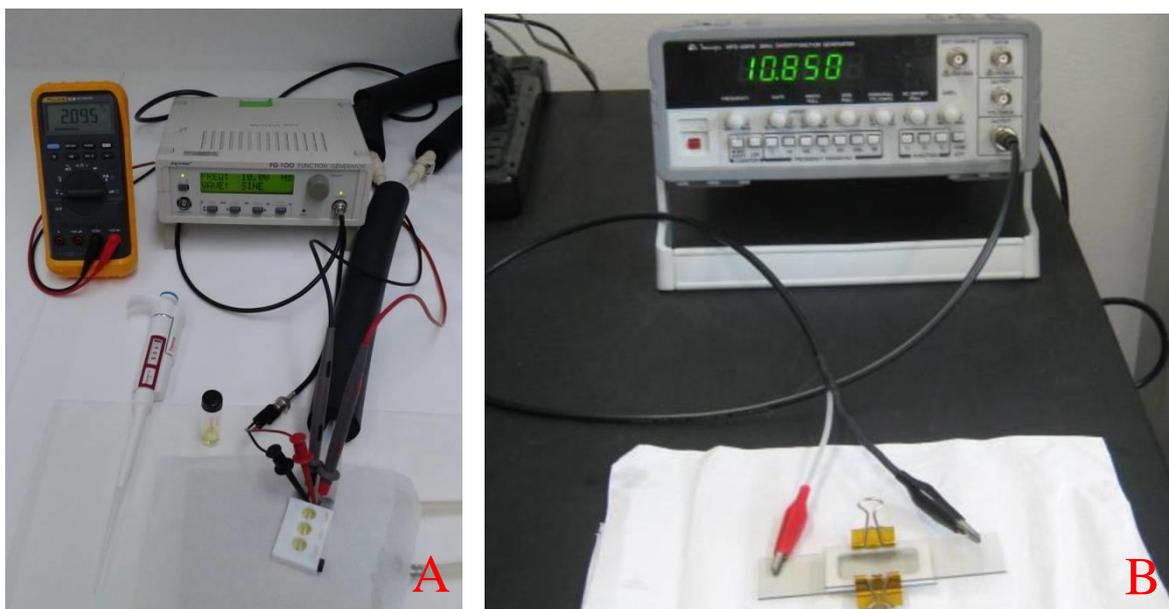


Figura 3.5. Representação dos métodos de preparação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs) pela técnica de eletroformação, utilizando-se: A) fios de platina e B) placa condutora de ITO (adaptado de: [62]).

No caso da eletroformação através do fio de platina (Figura 3.5-A), soluções lipídicas ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) nas composições desejadas, com adição dos fluoróforos DiIC₁₈ ou LAURDAN na razão molar 0,5 e 2 mol%, respectivamente, foram depositadas em cada eletrodo de Pt ($4 \mu\text{L}$ em cada), e o solvente foi removido sob vácuo por no mínimo

1 hora. Após a remoção do solvente orgânico, a câmara foi preenchida por solução de sacarose em água milli-Q (200 mmol.L^{-1}) e submetida a uma corrente alternada, criada através de um gerador de função com uma amplitude de 1,3 V e frequência de 10 Hz. A eletroformação foi realizada por 60 minutos, numa temperatura acima da temperatura de transição dos lipídios. Após as amostras atingirem temperatura ambiente, foi checada a concentração final da solução de sacarose utilizando-se um osmômetro crioscópico (Figura 3.6) e, conseqüentemente, a suspensão contendo as GUVs formadas ($50 \mu\text{L}$) foram transferidas para uma solução de glicose iso-osmolar ($200 \mu\text{L}$), colocadas num poço especial para realização das medidas, adquiridas da Ibidi (Munique, Alemanha). A diferença na densidade entre o interior e exterior das GUVs levam as vesículas a assentarem e permanecerem imobilizadas na superfície inferior do poço. As medidas foram realizadas 10 minutos após a suspensão final ser inserida no poço de medida. Particularmente para as medidas de vazamento de fluorescência, $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da sonda Alexa Fluor foi inserida na solução contendo sacarose, antes do processo de eletroformação. Estes experimentos foram realizados junto ao grupo *Membrane Biophysics and Biophotonics/Center for Biomembrane Physics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Dinamarca*.



Figura 3.6. Osmômetro crioscópico utilizado para determinação da osmolalidade das soluções de glicose e sacarose (após preparo das GUVs).

No caso da eletroformação realizada utilizando-se placas de ITO (Figura 3.5-B), 5 μL da solução clorofórmica contendo DOPC foi espalhado na superfície condutora de duas placas, deixadas posteriormente por no mínimo 1 hora sob vácuo para a evaporação do solvente orgânico. Em seguida, as faces condutoras de ambas as placas foram posicionadas uma em direção à outra, espaçadas por uma estrutura de teflon, com espessura de 2 mm. Uma solução contendo 200 mmol.L^{-1} de sacarose foi inserida entre as placas condutoras, que foram conectadas a um gerador de função, passando-se uma corrente alternada a 2 volts e 10 Hz, por 60 minutos, em temperatura ambiente. Após a eletroformação, as GUVs foram coletadas e estocadas num tubo de plástico para a realização dos experimentos utilizando-se a microscopia de fluorescência e contraste de fase. Estas medidas foram realizadas no laboratório de Biomembranas, Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

3.7. Medidas de absorção óptica

As medidas realizadas em um espectrofotômetro envolvem uma fonte que emite luz em diversos comprimentos de onda e um monocromador que a seleciona e a transmite em um comprimento de onda específico. Uma fração da luz que não é absorvida pela amostra, passa através de uma cubeta de caminho óptico (l) de 1 cm. A outra fração, que é absorvida, depende da concentração dos cromóforos, onde obtemos a absorção referente à amostra inserida no espectrofotômetro. Esta técnica foi utilizada para o cálculo do coeficiente de absorção molar do composto bioativo Artepillin C nas diferentes soluções estudadas neste trabalho utilizando-se a lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad (1)$$

onde A é o valor da absorbância, ε o coeficiente de absorção molar, b o caminho óptico da cubeta e C a concentração do composto.

O equipamento utilizado para estas medidas foi o espectrômetro Amersham Ultrospec 2100 pro, disponível no laboratório de Fotobiofísica, no Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) - Universidade de São Paulo. O equipamento permite medidas em intervalos de

comprimento de onda de 190 nm a 900 nm, com largura de banda de 3 nm e intervalos de absorvância de 0 a 3.

3.8. Medidas de espectroscopia de fluorescência do estado estacionário

O espectrofluorímetro fundamentalmente baseia-se na obtenção de um espectro de emissão produzido por uma fonte de luz após atingir uma amostra que contém fluoróforos. As fendas contidas no interior do equipamento foram ajustadas com abertura de 5 nm, controlando a magnitude e a resolução, limitando a luz transmitida. Estas medidas foram realizadas no espectrofluorímetro Hitachi F-7000, que possui uma lâmpada de xenônio de 150 W como fonte de luz de excitação, podendo varrer o intervalo de comprimento de onda de excitação e emissão de 200 nm a 900 nm. A técnica de espectroscopia de fluorescência do estado estacionário foi utilizada para investigar os espectros de emissão de fluorescência da Artepillin C nas diferentes soluções estudadas. Este equipamento, assim como o espectrofotômetro, encontra-se disponível no laboratório de Fotobiofísica, FFCLRP-USP.

3.9. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A análise quantitativa da interação do composto bioativo com as vesículas fosfolipídicas de DOPC foi realizada utilizando-se a técnica de calorimetria de titulação isotérmica, que fornece parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo de ligação intermolecular⁶³. Nesse caso, a técnica foi empregada para verificar a constante de ligação do composto bioativo em vesículas fosfolipídicas de DOPC, tanto em suspensão formada por água milli-Q ou tampão fosfato (10 mM, pH 7,4). Um microcalorímetro VP-ITC (Microcal, Northampton, MA) foi utilizado, adicionando-se 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da solução contendo o composto bioativo em sua cela. A suspensão contendo as vesículas, inserida numa seringa, foi injetada na cela num intervalo de 10 minutos, liberando-se em cada injeção 5 μL da suspensão, a uma temperatura de 25 °C. A análise de dados foi realizada utilizando o programa Microcal Origin, fornecido pela Microcal e os ajustes das curvas de acordo com a isoterma de adsorção de Langmuir:

$$\theta_i = \frac{\sum \Delta H_i}{\Delta H_{max}} = \frac{k_b \cdot c_f}{1 + k_b \cdot c_f} \quad (2)$$

onde θ_i é i-ésima injeção lipídica, ΔH_i o calor acumulado pela i-ésima injeção, ΔH_{max} o calor total produzido durante a titulação, k_b a constante de ligação e c_f a concentração de lipídios livres no sistema, calculado a partir da concentração total de lipídios (c_t), quantidade do sítios de ligação (N) e da concentração lipídica (c_l), de acordo com a expressão:

$$c_f = c_t - N\theta c_l \quad (3)$$

As medidas foram realizadas junto ao grupo do laboratório de Biomembranas, Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

3.10. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As propriedades termotrópicas das bicamadas lipídicas na presença e ausência do composto bioativo foram investigadas através da técnica de DSC, que fornece parâmetros relacionados às transições de fases termicamente induzidas⁶³. Experimentos de DSC foram realizados utilizando-se um calorímetro VPN-DSC (Microcal, Northampton, MA), adicionando-se no capilar do equipamento suspensões desaeradas contendo vesículas, na presença e ausência do composto bioativo na razão Artepillin C:lipídio (1:100, 5:100 e 10:100 mol/mol). Para todos os experimentos realizados, a taxa de varredura foi 0.5 °C/min. A subtração da linha de base e a análise de dados foram realizadas utilizando o programa Microcal Origin, fornecido pela Microcal. Pelo menos 7 varreduras foram obtidas para cada sistema, realizados em triplicata. As medidas de calorimetria diferencial de varredura foram realizadas no *Department of Chemical Engineering and Chemistry, Eindhoven University of Technology*, Eindhoven, Holanda.

3.11. Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS)

Experimentos de difração de raio-X foram realizados para examinar as propriedades estruturais das vesículas fosfolipídicas, através do perfil de densidade eletrônica, na ausência e presença do composto bioativo em estudo⁶⁴. As medidas foram realizadas utilizando-se a técnica de difração de raio-X a baixo ângulo através do equipamento SAXSLAB GANESHA 300 XL SAXS, equipado com uma fonte geradora de raios-X GeniX 3D Cu, de comprimento de onda $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ e baixa divergência (Figura 3.7). A distância da amostra ao detector de 713 mm foi utilizada para acessar a faixa de q $0,15 \leq q \leq 4,47 \text{ nm}^{-1}$, onde

$$q = 4\pi/\lambda(\sin \theta/2) \quad (4)$$

sendo q o valor do vetor de espalhamento, θ o ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda do raio-X. Suspensões contendo 40 mmol.L^{-1} de lipídios, na ausência e presença de 10 mol% do composto bioativo, foram contidas em capilares de quartzo (Hilgenberg, Germany) e inseridas para a aquisição das medidas, durante o tempo de seis horas.



Figura 3.7. Equipamento SAXSLAB GANESHA 300 XL SAXS, utilizado para aquisição das curvas de espalhamento de raio-X a baixo ângulo, instalado no *Institute for Complex Molecular Systems, Eindhoven University of Technology, Eindhoven – Holanda*.

Medidas do sinal de espalhamento da água também foram realizadas, a fim de subtraí-lo das curvas de espalhamento das amostras. O tempo de aquisição dos dados para cada amostra foi de seis horas. O ajuste dos dados experimentais foi realizado utilizando o Programa de análise global (GAP), versão 1.3, fornecido pelo Dr. Georg Pabst, do *Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Graz, Áustria*. O modelo utilizado para o ajuste dos diagramas foi seguido de acordo com a teoria de Caillé modificada (MCT). Este ajuste permitiu a obtenção de parâmetros relacionados ao perfil de densidade eletrônica das cabeças polares e das cadeias acíclicas dos lipídios nas vesículas, além da porcentagem de vesículas unilamelares e multilamelares no sistema, utilizando-se a seguinte expressão^{64,65}:

$$I(q) = (1 - N_{diff}) \frac{S(q)|F(q)|^2}{q^2} + N_{diff} \frac{|F(q)|^2}{q^2} \quad (5)$$

onde N_{diff} está relacionado à fração de partículas não correlacionadas (ou seja, vesículas unilamelares), $S(q)$ o fator de estrutura relacionado à interação inter-partículas, $F(q)$ o fator de forma que reflete no perfil de densidade eletrônica das bicamadas lipídicas. A partir dos parâmetros que descrevem a região da cabeça polar, foi possível calcular a espessura da membrana (d_B) através da seguinte equação⁶⁶:

$$d_B = 2(z_H + 2\sigma_H) \quad (6)$$

onde z_H é a posição da cabeça polar, medida a partir do centro da bicamada, e σ_H corresponde à largura da gaussiana da distribuição da densidade eletrônica sobre a região da cabeça polar.

As medidas de difração de raio-X foram realizadas no *Institute for Complex Molecular Systems, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, Holanda*.

3.12. Monocamadas de Langmuir

Experimentos utilizando-se como modelo biomimético de membranas monocamadas de Langmuir, formadas pelo fosfolipídio DMPC, foram realizados para verificar possíveis alterações na pressão superficial do sistema pela interação e inserção

do composto bioativo⁶⁷. Para isso, 1 mmol.L⁻¹ de solução clorofórmica do lipídio foi espalhada numa cuba de Langmuir, de 216 cm² (Insight-Brasil), localizado no Laboratório de Físico-Química de Superfícies, Departamento de Química – FFCLRP, USP. Após a evaporação do solvente, uma barreira foi movida a uma taxa constante de 0,041 cm.s⁻¹ para a formação da monocamada lipídica na interface ar/água. Soluções de água milli-Q na ausência e presença do composto bioativo foram utilizadas como subfase. Isotermas da pressão superficial vs área (π -A) foram obtidas a 25 ± 1 °C. O modulo compressional de superfície (C_s^{-1}) foi calculado a partir das isotermas, utilizando-se a seguinte equação:

$$C_s^{-1} = -A \frac{d\pi}{dA} \quad (7)$$

onde A representa o valor da área superficial e π a pressão superficial.

3.13. Potencial Zeta (ζ)

A mobilidade eletroforética das vesículas de DMPC na ausência e presença do composto bioativo (Artepillin C/DMPC 2:100, 5:100, 7.5:100, 15:100 and 20:100 mol/mol) foi medido para encontrar o valor do potencial zeta, obtido através da relação de igualdade entre a força elétrica aplicada no sistema contendo as vesículas, que são consideradas como esferas não interagentes, e a força de atrito viscoso, de acordo com a expressão:

$$\overrightarrow{F_{el}} = \overrightarrow{F_{at}} \rightarrow q \cdot \overrightarrow{E} = -b \cdot \overrightarrow{v} \quad (8)$$

onde q é a carga da esfera, \overrightarrow{E} a intensidade do campo elétrico, b o coeficiente de atrito viscoso da partícula do meio e \overrightarrow{v} sua velocidade, que tem seu módulo dado por:

$$v = \frac{q \cdot E}{b} \quad (9)$$

A razão q/b relaciona-se à mobilidade eletroforética da partícula (μ) na suspensão, onde, no caso para uma esfera, $b = 6\pi\eta R$, o que resulta em:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta R} \quad (10)$$

onde η é a viscosidade do solvente e R o raio da esfera. Considerando-se o potencial da superfície da esfera e igualando-se os termos $q/\pi R$ com o da expressão 10, o potencial zeta é obtido utilizando-se a equação de Smoluchowski⁶⁸:

$$\zeta = \frac{3\mu\eta}{2\varepsilon_0} \quad (11)$$

onde ε_0 é a constante dielétrica. As medidas foram realizadas utilizando-se o equipamento Nano Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K), que utiliza a técnica microeletroforese Doppler a laser, num largo ângulo (178°). As amostras foram contidas em cubetas especiais (DTS1060 cells), equipadas com eletrodos de ouro (Malvern Instruments). A realização das medidas de potencial-zeta foi feita no Laboratório de Físico-Química de Superfícies, Departamento de Química – FFCLRP, USP.

3.14. Microscopia de fluorescência e contraste de fase

A visualização das GUVs através da microscopia de fluorescência e contraste de fase foi realizada utilizando-se o microscópio Zeiss Axiovert 200, com objetivas de 40X e 63X, acoplada a uma lâmpada de mercúrio HBO 103W e câmera sCMOS PCO.edge 4.2 (Kelheim, Alemanha). A sonda DiIC₁₈, representada pela Figura 3.8, foi inserida nas GUVs na razão sonda/lipídio 0,5 mol% para a observação pelo modo da fluorescência, utilizando-se filtros de excitação 540-553 nm e emissão 575-640 nm. A visualização através do contraste de fase foi possível pela diferença nos índices de difração da glicose e sacarose, contidas no volume externo e interno das GUVs, respectivamente. Para as observações das GUVs, soluções de glicose na presença e ausência do composto bioativo foram inseridas em poços criados nas lamínulas e, conseqüentemente, a suspensão contendo as vesículas foi adicionada e a amostra observada no tempo desejado, utilizando-se o programa *Micro-Manager*. A análise das imagens foram

analisada ajustando-se a potência das fontes de laser e o ganho do detector para que não houvesse saturação da fotomultiplicadora. Todas as imagens foram analisadas utilizando-se o programa *ImageJ*. Os experimentos foram realizados no *Center for Biomembrane Physics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Dinamarca*.

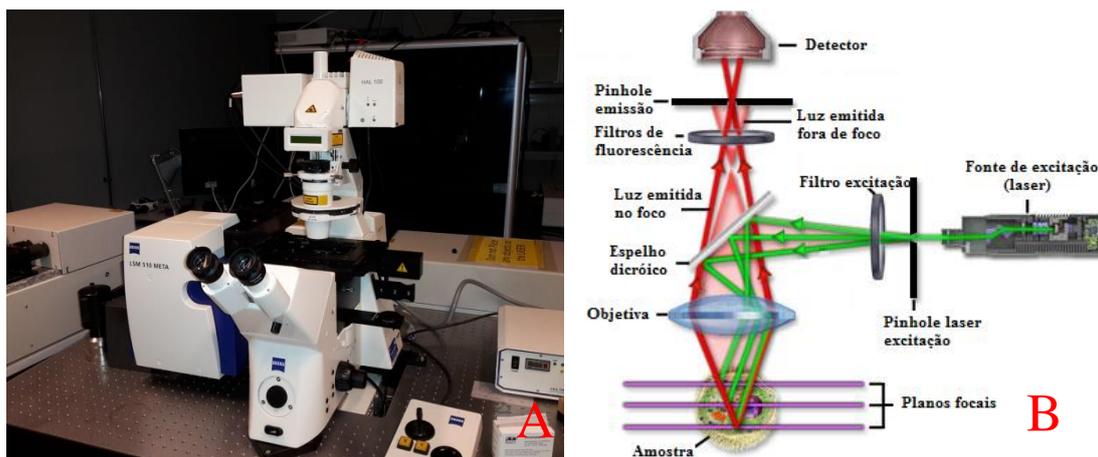


Figura 3.9. A) Microscópio Zeiss LSM 510 Meta, utilizado para a realização das medidas de fluorescência confocal, localizado no *Center for Biomembrane Physics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense – Dinamarca*.; B) Representação do caminho óptico necessário para obtenção das medidas de fluorescência confocal (Adaptado de [69]).

3.16. Medidas de LAURDAN-GP por microscopia confocal de fluorescência com excitação 2-fótons

A polarização generalizada do LAURDAN (LAURDAN-GP) denota a relação da posição entre os comprimentos de onda do espectro de emissão da sonda^{70,71}. As propriedades de emissão da sonda fluorescente LAURDAN (Figura 3.10) dependem da polaridade no ambiente em que é inserido.

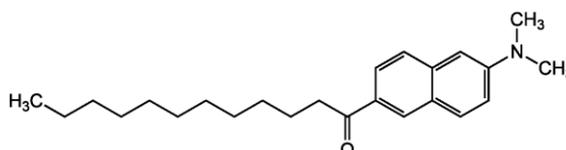


Figura 3.10. Estrutura molecular da sonda fluorescente LAURDAN.

Em agregados fosfolipídicos, o espectro de emissão dessa sonda é sensível à presença e mobilidade de moléculas de água próximo à região do glicerol, onde ela se encontra⁷². Se o empacotamento lipídico é pouco ordenado, ou seja, quando os lipídios encontram-se na fase líquido-cristalina (L_{α}), o processo de reorientação das moléculas de água ao longo do momento de dipolo do estado excitado do LAURDAN possui uma grande influência em sua emissão da fluorescência; essa situação não é significativa em meios em que os lipídios possuem uma organização lateral mais rígida, como no caso da fase gel (L_{β}). Com isso é atribuída uma relação entre a intensidade de emissão do LAURDAN em comprimentos de onda próximos a 440 nm, quando o acesso à água é limitado, pois os lipídios possuem um maior ordenamento nas membranas, e a intensidade em 490 nm, quando o espectro reflete a influência da interação dipolar com a água na emissão da sonda fluorescente (Figura 3.11)⁷³. Essa relação é conhecida como Polarização Generalizada do LAURDAN (LAURDAN-GP),

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (12)$$

onde I_{440} e I_{490} são as intensidades de emissão de fluorescência da sonda nos comprimentos de onda 440 nm em 490 nm, respectivamente. O parâmetro obtido contém informações relacionadas à penetração e mobilidade da água na interface do agregado lipídico. A dependência da emissão de fluorescente da sonda LAURDAN com o grau de empacotamento lipídico pode auxiliar no entendimento das mudanças de rigidez das bicamadas lipídicas produzidas pela interação com compostos que possuem afinidade por membranas celulares.

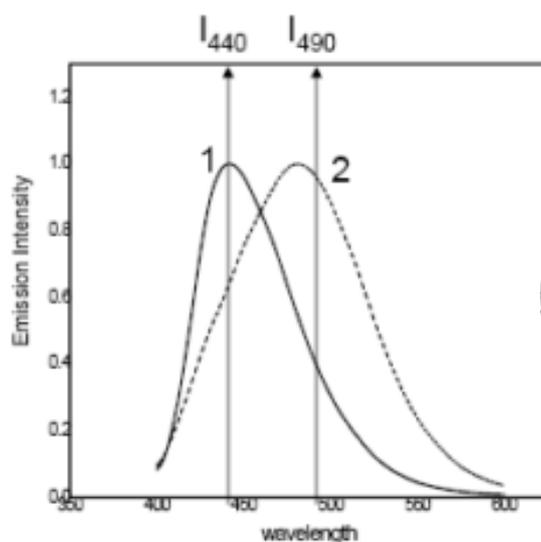


Figura 3.11. Representação dos espectros de emissão do LAURDAN nas fases fluida (2) e gel (1) de bicamadas lipídicas, com o máximo de emissão em 490 e 440 nm, respectivamente.

As medidas de LAURDAN-GP trazidas neste trabalho foram realizadas utilizando-se o microscópio de excitação multifóton construído pelo acoplamento do microscópio Olympus IX70 a uma fonte de laser pulsado Ti:Sa (Broadband Mai Tai XF-W2S, Spectra Physics, Mountain View, CA), potência de 10W e faixa de comprimento de onda de excitação ajustável de 710 a 980 nm, onde, no nosso caso, foi utilizado $\lambda_{exc} = 780$ nm. A objetiva utilizada para as medidas foi 60X, imersão em água e NA 1,2. As medidas foram obtidas através da coleta do sinal de emissão da fluorescência, que inicialmente foi dividido em dois caminhos ópticos através de um espelho divisor dicromático (475 nm) e, posteriormente, selecionado os comprimentos de onda por filtros passa-banda de 438 ± 12 nm e 494 ± 10 nm. A intensidade de fluorescência foi coletada por fotomultiplicadoras (Hamamatsu H7422P-40). O equipamento foi controlado pelo programa *SimFCS*, desenvolvido pelo “*Laboratory for Fluorescence Dynamics*”, *University of California*, Irvine – EUA. As suspensões contendo as GUVs foram observadas durante o tempo desejado e as imagens coletadas para o posterior cálculo de GP. Para isso, uma calibração do fluoróforo LAURDAN foi realizada devido à relação entre as intensidades dos canais de emissão azul (filtro 438 ± 12 nm) e vermelho (filtro 494 ± 10 nm). Esta calibração, similar à realizada para o cálculo da polarização clássica nas medidas de anisotropia de fluorescência, é necessária

para serem obtidos valores absolutos do LAURDAN-GP⁷⁴. Para isso, o fator de calibração (fator G) é calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$G = \frac{I_A(1-GP_C)}{I_V(GP_C+1)} \quad (13)$$

onde I_A é a intensidade de fluorescência obtida no canal contendo o filtro 438 ± 12 nm, I_V a intensidade obtida no canal contendo o filtro 494 ± 10 nm e GP_C o cálculo do valor GP obtido para o LAURDAN através da medida de espectroscopia de fluorescência estática, através da equação 12. A relação final para o cálculo do LAURDAN-GP corrigido é dada através da seguinte expressão:

$$GP = \frac{I_A - (G \times I_V)}{I_A + (G \times I_V)} \quad (14)$$

Os experimentos foram realizados no *Center for Biomembrane Physics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Dinamarca*.

3.17. Simulações de dinâmica molecular

Simulações por dinâmica molecular foram realizadas para sistemas contendo uma bicamada lipídica de DMPC com diferente proporção de Artepillin C na forma desprotonada. A membrana foi preparada previamente utilizando-se CHARMM-GUI e simulada até atingir a estabilidade de área por lipídio, comparando-se o resultado com os dados experimentais⁷⁵. Os parâmetros para o campo de força referentes à Artepillin C foram obtidos por comparação com outras moléculas pelo programa CgenFF^{76,77}. A etapa seguinte foi a construção dos sistemas DMPC-Artepillin C: para isso, o software packmol⁷⁸, foi utilizado criando-se duas razões moleculares distintas ArtepillinC/DMPC 5:128 e 10:128. A neutralização das cargas do sistema foram realizadas com a adição de íons de sódio. As simulações foram realizadas aplicando-se o campo de força CHARMM36⁷⁹, com ensemble NPT (313 K, 1 bar). A temperatura e a pressão dos banhos foram controladas pela Dinâmica de Langevin e Nosé-Hoover Langevin

respectivamente. As interações eletrostáticas de longo alcance foram controladas pelo método de PME e truncadas em 1,2 nm. O tempo total de simulação foi de 500 ns para cada sistema. Os resultados e imagens foram analisados utilizando o programa VMD⁸⁰ e LOOS.v2.2.5⁸¹. A simulação foi executada pela colaboração com o M.Sc. Danilo da Silva Olivier, aluno de doutorado do nosso grupo de pesquisa, utilizando-se o *cluster BlueGene Q – Rice University*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Ensaio bioguiado para identificação de molécula(s) bioativa(s) de própolis contra o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum*

Um dos objetivos propostos neste trabalho relaciona-se à investigação da ação do material resinoso obtido através da purificação da própolis coletada na região de Bambuí, MG, pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* contra a espécie *Pythium aphanidermatum*, um fitopatógeno da classe dos oomicetos resistente a fungicidas comuns. Pela análise da difusão do *P. aphanidermatum* pela placa de ágar, foi observado que próximo às regiões contendo discos de papel impregnados com 5 mg.mL⁻¹ do produto resinoso estudado, houveram formações de halos devido à inibição no desenvolvimento do fitopatógeno (figura não mostrada). A fim de identificar quais os compostos que estão neste extrato e que possuem atividade contra este fitopatógeno, foi feito o fracionamento deste produto em quatro solventes de diferentes polaridades (Tabela 4.1) e, novamente, uma análise de difusão do fitopatógeno pela placa de ágar, contendo filtros com cada fração obtida, como mostrado pela Figura 4.1.

Tabela 4.1. Valores de constante dielétrica (ϵ_D) dos solventes utilizados para o fracionamento do extrato etanólico da própolis verde

Solvente	Constante Dielétrica (ϵ_D)
Hexano	1,88
Clorofórmio	4,81
Acetato de Etila	6,02
Água	80,1

A atividade contra o pseudofungo foi significativa pelo grupo de moléculas separadas na fração clorofórmica, identificada através da criação de um halo de inibição na região contendo o filtro impregnado com o subproduto. Como continuação do ensaio bioguiado para identificar o(s) compostos(s) bioativos(s) contidos(s) na fração de maior atividade, esta foi separada por cromatografia de acordo com a metodologia apresentada no subtópico 3.4. Este processo resultou em oito novos subgrupos a partir da fração

bioativa, identificados de G1 a G8, como mostrado na Figura 4.2. Uma nova análise de difusão e inibição do *P. aphanidermatum* foi testada contra discos de papel impregnados com estes subprodutos e que foram dispersos em uma nova placa de ágar.

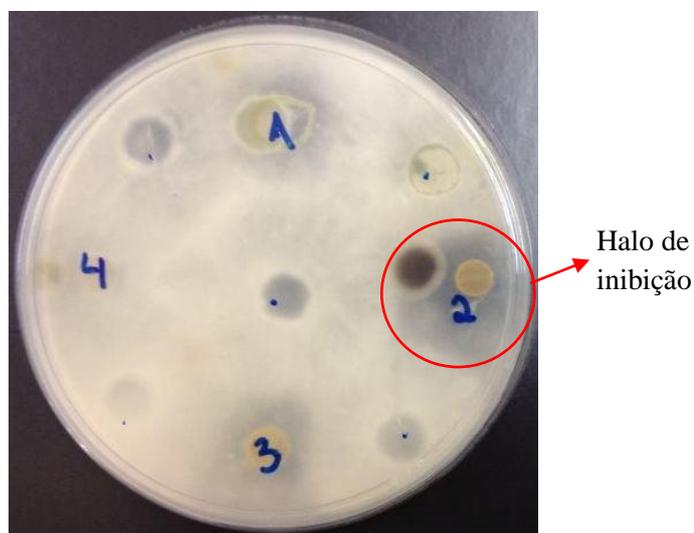


Figura 4.1. Análise da inibição da difusão do fitopatógeno da espécie *P. aphanidermatum* pela placa de ágar, na presença de compostos resinosos coletados na região de Bambuí, MG, pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, fracionados em solventes de diferentes polaridades. A difusão do fitopatógeno é comprometida principalmente próxima à fração clorofórmica (2), criando-se um halo de inibição nesta região. As outras frações foram separadas em hexano (1), acetato de etila (3) e água (4).

Dos oito grupos, apenas o G2 e G3 apresentaram um halo de inibição no crescimento do microrganismo, como mostrado na Figura 4.3, indicando que o(s) composto(s) bioativo(s) foram direcionados de acordo com a polaridade destas partições.



Figura 4.2. Oito subgrupos obtidos (G1 a G8) pela partição da fração clorofórmica através de ensaio cromatográfico. A fração clorofórmica foi obtida inicialmente pelo fracionamento do extrato etanólico de própolis verde.

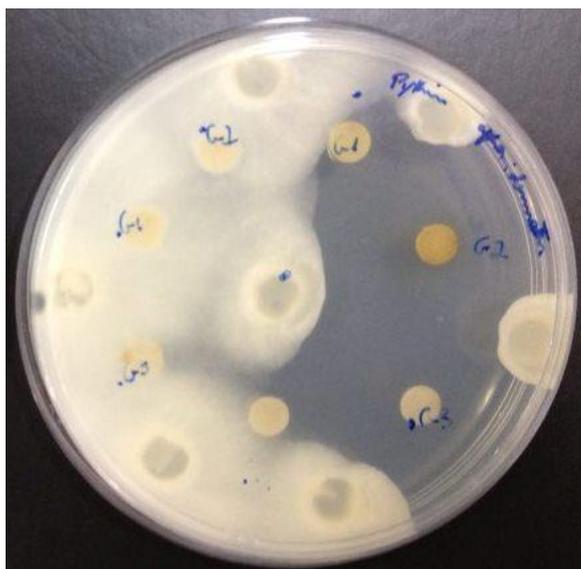


Figura 4.3. Fitopatógeno da espécie *P.aphanidermatum* difundido pela placa de ágar, mostrando uma formação de halo próximo aos grupos G2 e G3 obtidos pela separação molecular da fração clorofórmica em coluna de sílica.

Dois novos fracionamentos foram realizados a partir destes dois grupos ativos, sendo o G2 submetido a uma nova coluna cromatográfica e o G3 separado através de placa preparativa. A coluna para o fracionamento do grupo G2 tinha sílica como fase estacionária e a fase móvel em gradiente crescente de polaridade, partindo de hexano 100% (50 mL) hexano/acetato de etila (v/v, 2000 ml), hexano/acetato de etila/metanol

(v/v/v, 100 ml), acetato de etila/metanol (v/v, 200 ml) e por último metanol 100% (100 ml). Dos seis novos subgrupos, apenas os três primeiros mantiveram atividade contra o fitopatógeno em estudo, indicando que a(s) principal(is) molécula(s) desta fração são de baixa a média polaridade. Pela partição através da placa preparativa corrida com solução acetato de etila/diclorometano/hexano (45/35/20 v/v), foram obtidos outros seis agrupamentos, seguindo como compostos bioativos contra o *P. aphanidermatum* as moléculas pertencentes aos grupos 3 e 4.

Para investigar a qualidade da partição e o número mínimo de compostos por cada grupo bioativo, foi realizada cromatografia de camada delgada dos agrupamentos obtidos tanto pela coluna quanto pela placa preparativa, constatando que apenas o subgrupo bioativo 2, particionado do G2 através da coluna, tinha uma quantidade reduzida de compostos (dados não mostrados). A identificação dos compostos foi analisada por espectrometria de massa, onde a partir dos grupos injetados, foi possível obter suas massas moleculares e identificar se estes já são compostos conhecidos e registrados. Pelo perfil do espectro de massa (Figura 4.4), identificamos alguns picos que referem-se a diferentes compostos dentro deste subgrupo analisado, porém, levamos em consideração apenas o pico de maior intensidade, relacionado ao composto majoritário deste subproduto. Pela análise do valor da massa encontrada (Tabela 4.2), podemos concluir que o pico refere-se ao composto Artepillin C (CAS: 72944-19-5), molécula já identificada na própolis verde e que possui outras atividades biológicas conhecidas.

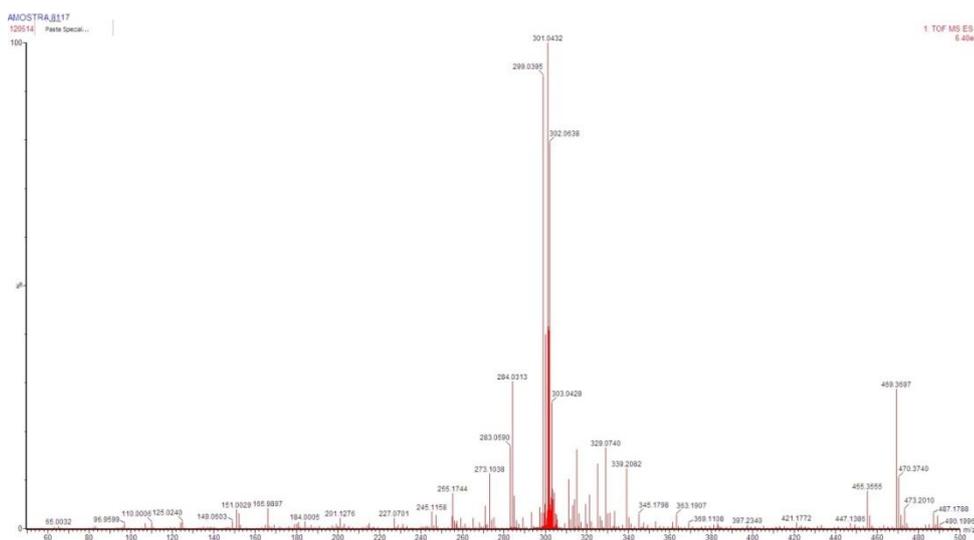


Figura 4.4. Espectro de massas obtido através da injeção do subgrupo 2 em um TOF/MS. O pico de alta intensidade é referente à presença majoritária do composto Artepillin C no produto injetado.

Tabela 4.2. Identificação por TOF/MS do constituinte majoritário do subgrupo 2, obtido pelo fracionamento em coluna do grupo bioativo G2, pertencente à fração clorofórmica da própolis verde

Substância	CAS	(m/z) ⁻	(m/z) ⁻ Ms ²	Peso molecular
Artepillin C	72944-19-5	299,0540	284,0312	300,39

4.2. Bioatividade do composto majoritário Artepillin C contra o fitopatógeno *P. aphanidermatum*

Uma vez identificado o composto Artepillin C como constituinte majoritário no grupo bioativo da própolis coletada na região de Bambuí, MG, este foi obtido no mercado, isolado e em alto grau de pureza, com a finalidade de se realizar novos bioensaios para testar sua atividade contra a difusão do *P. aphanidermatum* e compará-la com a ação daquele subgrupo bioativo em que se encontra a Artepillin C. Para estes testes foram utilizadas concentrações de 50 µg.mL⁻¹ até 10 mg.mL⁻¹ do composto em solução metanólica, que foram aplicadas na placa logo após a inserção do *P. aphanidermatum* (Figura 4.5). A análise de difusão do fitopatógeno foi realizada em quatro períodos diferentes: 17, 20, 24 (tempo ideal de análise da inibição) e, por último, 30 horas após o período de aplicação. No tempo de 17 horas foi observado um

retardamento na difusão do microrganismo quando este atinge a região da concentração de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (o termo retardamento foi utilizado pela perda na atividade da Artepillin C, nesta concentração, na análise de 20 horas) e um atraso da difusão quase desprezível próximo ao disco contendo $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do composto, desconsiderando-se a atividade para esta concentração. Para concentrações maiores que $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a atividade inibitória foi significativa e continuada até o período de 24 horas, indicando que a Artepillin C nessas concentrações é uma droga resistente à difusão do *Pythium aphanidermatum* no tempo ideal de análise. No período de 30 horas, apenas concentrações superiores a $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ continuaram com atividades significativas.

Comparando-se as atividades da Artepillin C isolada e dos subgrupos bioativos (G2 e G3), podemos inferir que por mais que a Artepillin C isolada iniba a difusão do *P. aphanidermatum* de maneira significativa, pode haver um sinergismo entre os compostos que estão presentes no subproduto bioativo, possivelmente derivados do ácido cinâmico com a Artepillin C como substância majoritária, potencializando essa atividade, uma vez que o halo de inibição criado quando são analisadas as placas que contém as subfrações refletem numa alta atividade contra o fitopatógeno em estudo, como mostrado pela Figura 4.3.

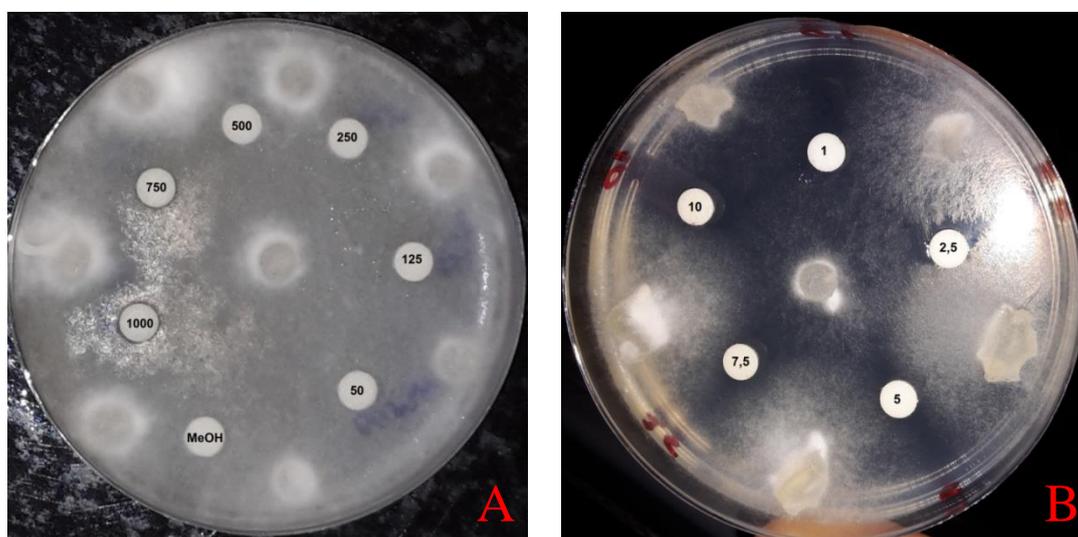


Figura 4.5. Fitopatógeno da espécie *P.aphanidermatum* difundido em ágar após 30 horas de sua aplicação em placas com discos de papel impregnados com diferentes concentrações do composto Artepillin C. A) Concentrações de 50 a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do composto e metanol (MeOH) aplicado como controle – halos de inibição foram mantidos próximos aos discos de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. B) Concentrações de 1 mg.mL^{-1} a 10 mg.mL^{-1} – halos de inibição mantidos para todas as concentrações.

4.3. Caracterização espectroscópica da Artepillin C

Medidas de espectroscopia de absorção óptica e emissão de fluorescência estática foram realizadas para identificar o perfil espectroscópico da Artepillin C em metanol e solução aquosa, além do coeficiente de absorção molar e os diferentes efeitos destes solventes em soluções contendo até $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. Em metanol, o pico de máxima absorção permanece inalterado no comprimento de onda 314 nm e o valor da absorbância do composto no pico aumenta em função da concentração, atingindo valores próximos a 2.5 para $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, como mostrado pela Figura 4.6-A. Ainda, na Figura 4.6-B podemos observar um comportamento linear da absorbância em função da concentração em toda a faixa de concentrações estudadas. Por mais que este comportamento tenha sido obedecido para o intervalo de 0 a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, os valores de coeficiente de absorção molar obtidos neste trabalho (Tabela 4.3) foram calculados através do ajuste da linearidade apenas para valores de absorbância abaixo de 1.0 devido aos possíveis desvios, mesmo que mínimos, na lei de Lambert-Beer (equação 1) para soluções muito concentradas.

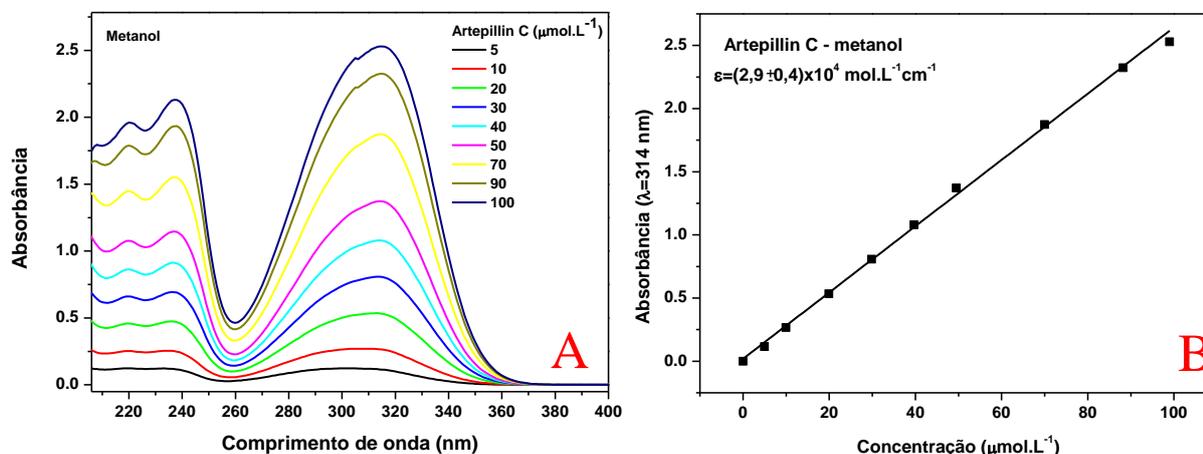


Figura 4.6. A) Espectros de absorção óptica do composto Artepillin C obtidos em metanol, nas concentrações compreendidas entre 5 e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$; B) Absorbância em 314 nm, em função da concentração de Artepillin C, para o cálculo do coeficiente de absorção molar pela lei de Lambert-Beer (equação 1).

Tabela 4.3. Valores de coeficiente de absorção molar (ϵ) da Artepillin C em solução metanólica e tampão fosfato

Solução	ϵ (mol.L ⁻¹ .cm ⁻¹)
Metanol	(2,9±0,4)x10 ⁴
Tampão	(3,1±0,3)x10 ⁴

Para o estudo da solubilidade da Artepillin C em solução aquosa, foram investigadas duas situações, sendo a primeira referente à solução da Artepillin C apenas em água milli-Q e a segunda em tampão fosfato, pH 7,4 (variação da concentração em ambas as soluções compreendida entre 5 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Comparando-se os espectros de absorção óptica da Artepillin C obtidos em soluções aquosas (Figuras 4.7 e 4.8) com os espectros da solução em metanol (Figura 4.6), é perceptível que em baixas concentrações, o pico de máxima absorbância desloca-se para um comprimento de onda de menor valor tanto em água milli-Q como em tampão. Ainda, este pico em água milli-Q apresentou um deslocamento para o vermelho com o aumento da concentração de Artepillin C (Figura 4.7), enquanto os espectros obtidos em solução tampão mantiveram o pico inalterado no comprimento de onda correspondente a 290 nm (Figura 4.8-A), com o valor do coeficiente de absorção molar próximo ao valor encontrado para a solução da Artepillin C em metanol (Tabela 4.3). Estes resultados indicam que as interações físico-químicas no sistema formado para as soluções de Artepillin C em metanol e em tampão permanecem inalteradas mesmo com o aumento de sua concentração no sistema, mantendo-se em sua forma monomérica.

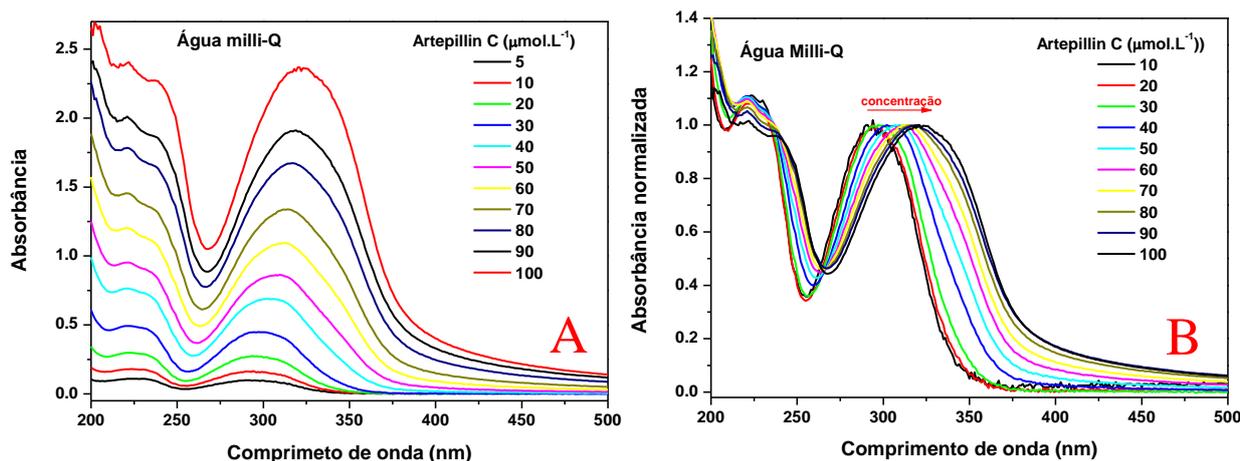


Figura 4.7. A) Espectros de absorção óptica do composto Artepillin C obtidos em água milli-Q, nas concentrações compreendidas entre 5 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. B) Espectros de absorção normalizados, mostrando o deslocamento para o vermelho com o aumento da concentração de Artepillin C no sistema.

Para a solução da Artepillin C em água milli-Q, o deslocamento do pico de máxima absorbância a partir de 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ indica que as interações físico-químicas no sistema são alteradas pela possível formação de agregados do composto.

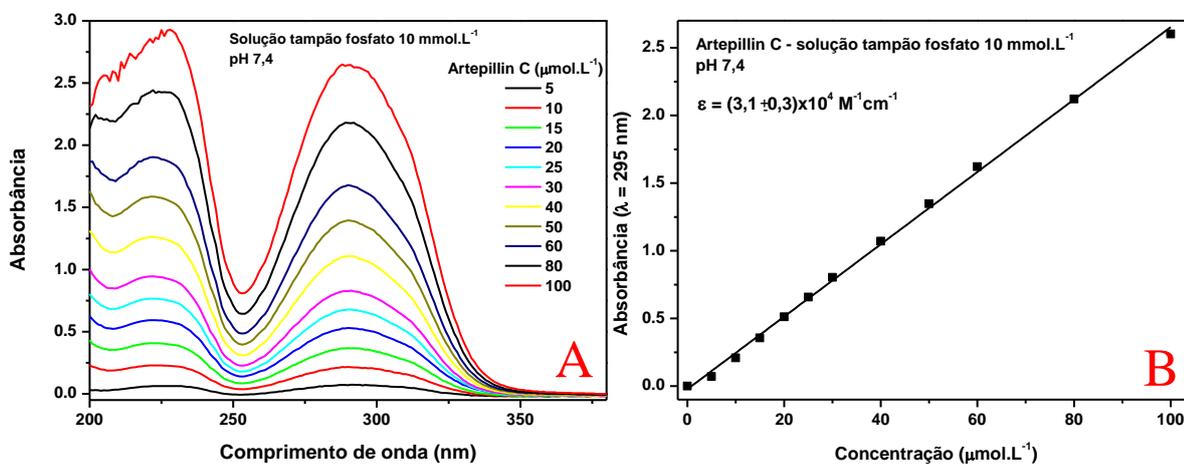


Figura 4.8. A) Espectros de absorção óptica do composto Artepillin C obtidos em solução tampão fosfato (10 mmol.L^{-1}), nas concentrações compreendidas entre 5 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; B) Absorbância em 295 nm, em função da concentração de Artepillin C, para o cálculo do coeficiente de absorção molar pela lei de Lambert-Beer.

Medidas de espectroscopia de fluorescência estática também foram realizadas para a Artepillin C em metanol, água milli-Q e em tampão fosfato. Pelos espectros de emissão obtidos para as soluções em tampão, observamos um comportamento com

tendência linear da intensidade no pico de máxima emissão em função da concentração de Artepillin C (numa variação de 10 a 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), mantidos no comprimento de onda 390 nm (Figura 4.9-B). Também não foram observados deslocamentos espectrais para as soluções em metanol (Figura 4.9-A) e milli-Q (Figura 4.9-C), mantidos em 386 e 406 nm, respectivamente. Porém, a intensidade de emissão em função da concentração de Artepillin C em ambas as soluções não apresentaram comportamentos com tendência linear (Figura 4.9-D). Como já observado pelas medidas de absorção óptica, a solução em metanol não apresentou desvios na lei de Lambert-Beer mesmo em altas concentrações, indicando que o efeito de desvio da linearidade observado em pode estar relacionado aos efeitos de alta concentração do composto na amostra, resultando na atenuação da emissão de fluorescência e consequente detecção. Porém, em água milli-Q, as alterações nas propriedades físico-químicas do sistema que refletiram no deslocamento do espectro de absorção do composto, podem ter contribuído no desvio do comportamento linear da intensidade de fluorescência em função da concentração da Artepillin C. Ainda, os efeitos de alta concentração de Artepillin C na amostra também podem estar vinculados a esta atenuação na intensidade de fluorescência, assim como mostrado para o caso da solução do composto em metanol.

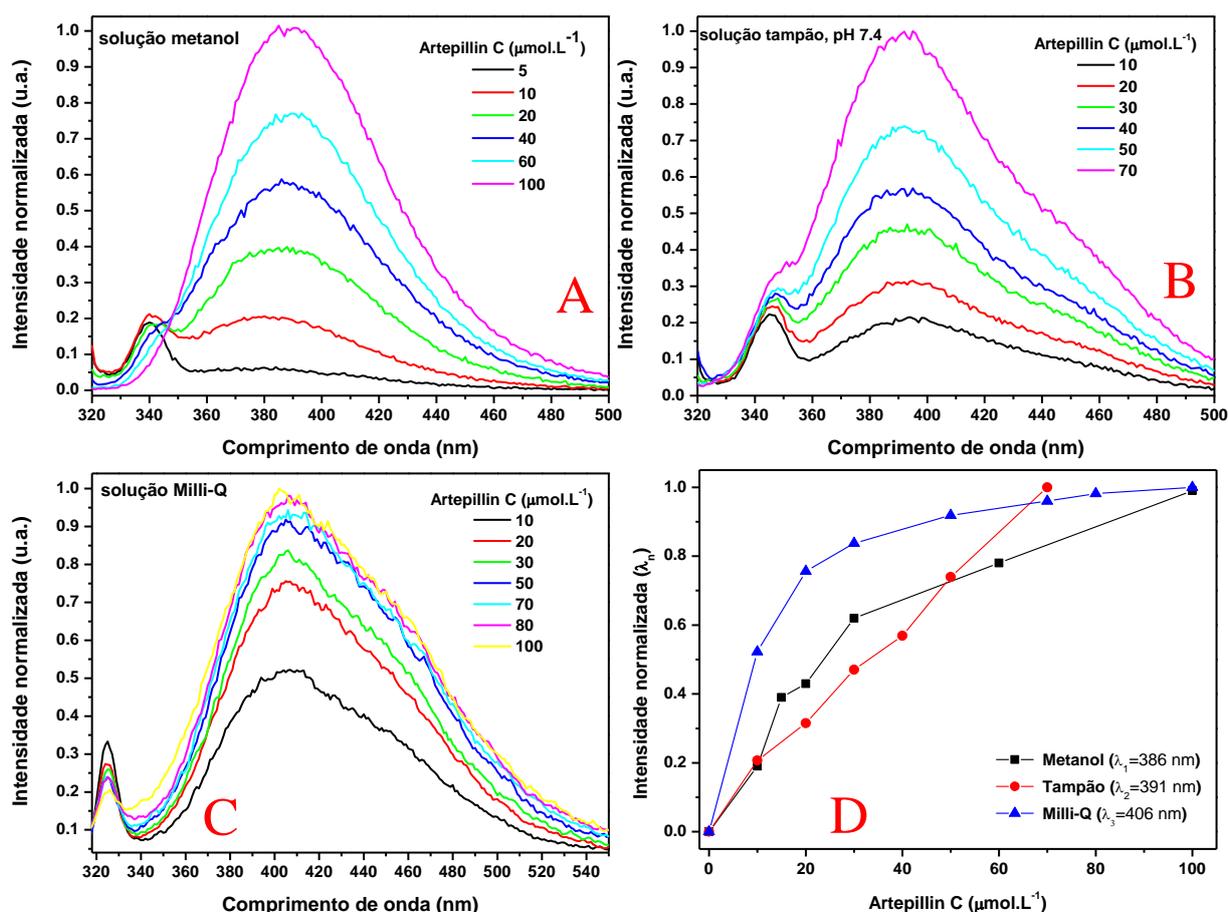


Figura 4.9. Espectros de emissão de fluorescência do composto Artepillin C em metanol (A), tampão fosfato (B) e em água milli-Q (C). O comprimento de onda de excitação foi 290 nm para água e 310 para as soluções metanol e tampão. As intensidades máximas de emissão de fluorescência do composto em metanol, tampão e água milli-Q foram, respectivamente, 386 nm, 391 nm e 406 nm, normalizadas e plotadas em função da concentração de Artepillin C (D).

4.4. Estudo da interação da Artepillin C com sistemas miméticos de membranas celulares

Os resultados apresentados nesta seção 4.4 são referentes à investigação da interação e atividade da Artepillin C em vesículas fosfolipídicas, utilizadas como membranas modelo. Para isso, diferentes sistemas constituídos por i) vesículas fosfolipídicas insaturadas, compostas pelo fosfolipídio DOPC; ii) vesículas fosfolipídicas saturadas, compostas por DMPC ou DPPC e iii) vesículas formadas por uma mistura ternária entre DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol) foram estudados e estão distribuídos em subtópicos dentro dessa seção, como segue:

4.4.1. Efeitos da Artepillin C em vesículas fosfolipídicas de DOPC

4.4.1.1. Termodinâmica do processo de ligação

Medidas de ITC foram realizadas para investigar a termodinâmica de interação da Artepillin C com membranas modelo. Para isso, alíquotas da suspensão de LUVs de DOPC (10 mmol.L^{-1}) foram inseridas em solução contendo $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto bioativo, tanto em solução tampão quanto em água milli-Q. A Figura 4.10 mostra a energia gerada pela titulação das vesículas na solução e os valores de entalpia a eles associados, obtidos pelo cálculo da integral de cada pico. O processo de interação nos dois casos é um processo exotérmico devido aos valores negativos observados nas titulações, porém, em tampão há ainda uma pequena contribuição de processo endotérmico de acordo com o aumento de vesículas de DOPC no sistema. Para a titulação das vesículas de DOPC em solução da Artepillin C em água milli-Q, observa-se que o calor gerado pela titulação é apenas exotérmico e mais pronunciado do que o observado para solução tampão, diminuindo continuamente até o momento em que não há mais geração de energia pela adição de vesículas no sistema, indicando que todas as moléculas de Artepillin C presentes no sistema são totalmente ligadas às bicamadas lipídicas.

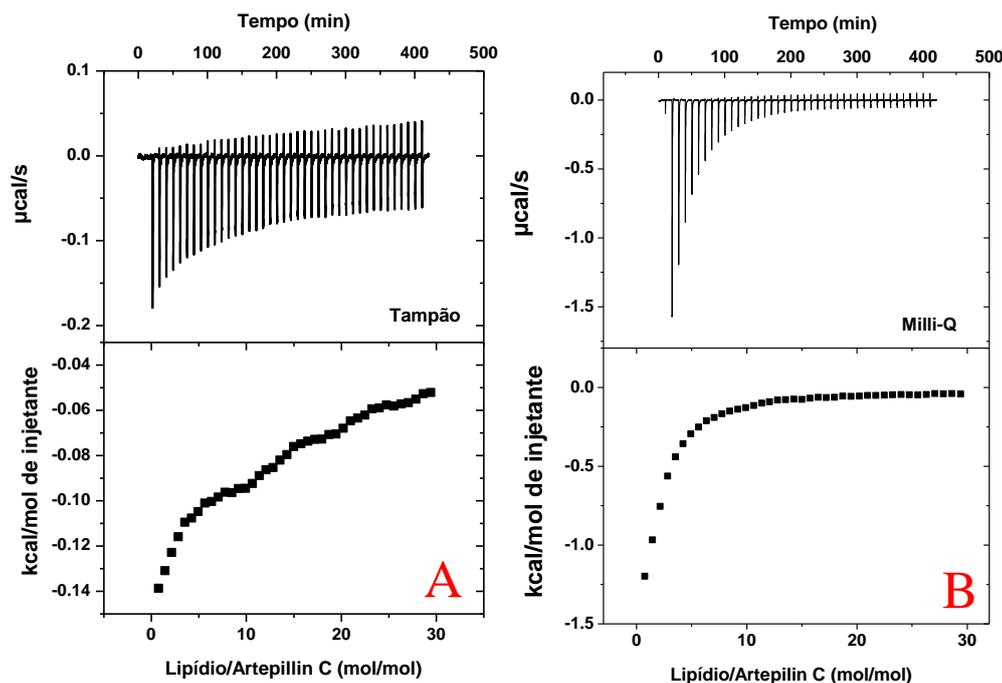


Figura 4.10. Titulação de dispersão fosfolipídicas contendo LUVs de DOPC (10 mmol.L^{-1}) em soluções tampão (A) e água milli-Q (B), na presença de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. Os diagramas superiores mostram o calor gerado nos sistemas para cada titulação. Abaixo se encontram as curvas da integral da entalpia em função da razão lipídio/Artepillin C nos sistemas estudados.

Os processos termodinâmicos de interação da Artepillin C com as vesículas de DOPC são dependentes do ambiente no qual eles ocorrem, como observado pelas diferenças encontradas para as suspensões em tampão e água milli-Q. Na seção anterior, foi mostrado através dos espectros de absorção óptica que a Artepillin C pode agregar-se em água a partir de uma concentração próxima a $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e manter sua forma monomérica em tampão em toda a faixa de concentração estudada, o que explicaria uma preferência da ligação do composto nas vesículas quando o mesmo encontra-se em seu estado agregado. Para tanto, através da integral da entalpia em função da razão molar lipídio/Artepillin C, foram calculadas as constantes de ligação para as duas situações em termos da isoterma de adsorção de Langmuir (equação 1) devido ao comportamento monoexponencial de ambas as curvas, como mostrado pela Figura 4.11. Os valores das constantes de ligação, bem como da entalpia do processo, são apresentados na Tabela 4.4.

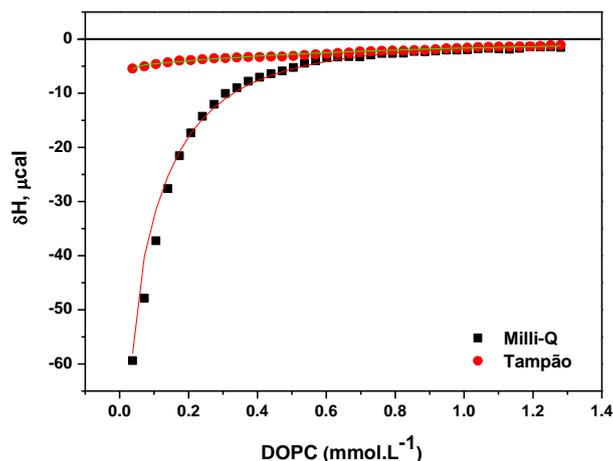


Figura 4.11. Isotermas de ligação de Artepillin C em vesículas de DOPC. As constantes de ligação para os sistemas em água milli-Q e tampão foram calculadas através dos ajustes em termo da isoterma de adsorção de Langmuir.

Tabela 4.4. Valores de constante de ligação (k_b) e entalpia (ΔH) dos processos termodinâmicos de titulação de vesículas de DOPC (10 mmol.L^{-1}) em solução de Artepillin C ($50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) em tampão e água milli-Q, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$

DOPC/Artepillin C	Constante de ligação (k_b) M^{-1}	Entalpia (ΔH) Kcal/mol
Tampão	$0,3 \times 10^3$	-1,44
Água milli-Q	$5,0 \times 10^3$	-4,80

Os valores obtidos das constantes de ligação mostram que a ligação da Artepillin C nas bicamadas lipídicas é aproximadamente 17 vezes maior em meio aquoso, na ausência de outros solutos. A partir desta conclusão, os experimentos realizados para a análise dos efeitos do composto bioativo em membranas modelo de diferentes composições são referentes às suspensões lipídicas obtidas em água milli-Q.

4.4.1.2. Investigação nas mudanças estruturais das bicamadas lipídicas

Medidas de difração de raio-X foram realizadas para analisar possíveis alterações estruturais das bicamadas lipídicas pela interação da Artepillin C, numa razão molar Artepillin C/DOPC 1:10. Nessa razão, quase todas as moléculas de Artepillin C ligam-se às vesículas de DOPC, como mostrado pela titulação obtida através das medidas de ITC, onde o calor gerado pela ligação é bastante reduzido se comparado a maiores proporções lipídio:Artepillin C.

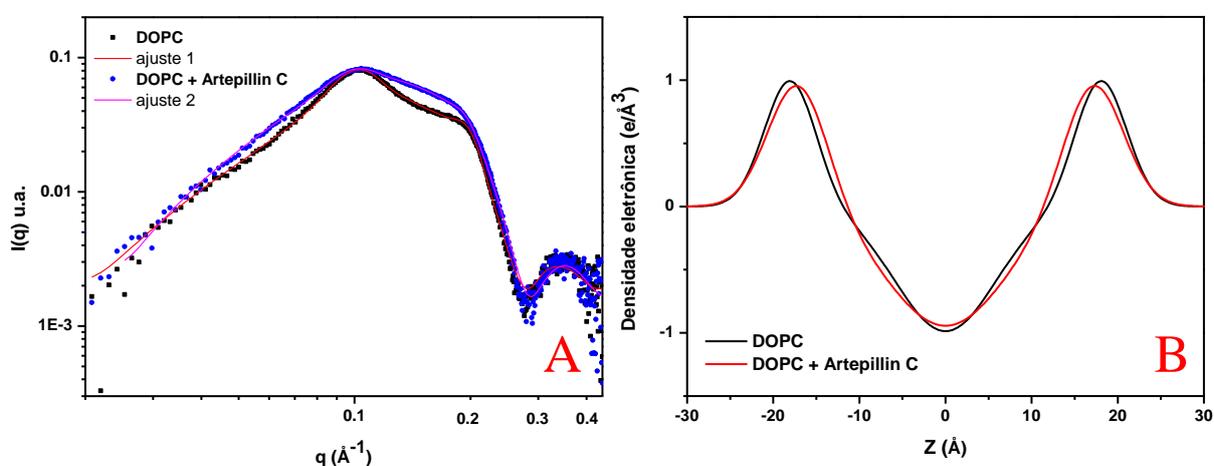


Figura 4.12. Diagramas de SAXS (A) e perfil da densidade eletrônica de vesículas de DOPC (B) na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/DOPC 1:10), a 25 °C.

Dois importantes aspectos podem ser visualizados por este experimento: os diagramas obtidos pelas medidas de SAXS (Figura 4.12) são característicos de vesículas unilamelares, que refletem em curvas alargadas devido às diferenças entre as densidades eletrônicas da parte interna das bicamadas e do solvente⁸². Porém, é possível observar principalmente para a medida do sistema na ausência da Artepillin C um pico ligeiramente pronunciado próximo a $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ seguido de um ombro por volta de $0,2 \text{ \AA}^{-1}$, que se refere ao pico de difração de Bragg. Essa característica reflete a presença de estruturas multilamelares no sistema, sendo sua forma menos pronunciada típica de sistemas contendo estruturas oligolamelares, ou seja, constituídas por poucas lamelas, mesmo após o processo de extrusão para obtenção apenas de vesículas unilamelares⁸³. Esse fato geralmente ocorre em situações em que as suspensões contêm apenas lipídios zwitteriônicos, onde não há contribuição de interação e repulsão eletrostática entre as

lamelas nas vesículas multilamelares. Na presença da Artepillin C, o diagrama de SAXS é ligeiramente alterado principalmente pelo alargamento deste pico próximo a $0,1 \text{ \AA}^{-1}$, indicando que sua presença contribui para um pequeno aumento no número de vesículas unilamelares no sistema. Esse efeito é atribuído pela presença de uma carga negativa na estrutura da Artepillin C, mais especificamente no grupo carboxila do ácido cinâmico, que possui um valor de $pK_a = 4,4^{84}$, e que encontra-se no estado desprotonado em água milli-Q. Essa propriedade introduz uma repulsão eletrostática entre as lamelas e favorece a formação espontânea das vesículas unilamelares.

Pelos ajustes das curvas de SAXS (Figura 4.12 A) é possível observar que a introdução da Artepillin C nas vesículas de DMPC causam uma alteração na densidade eletrônica das bicamadas lipídicas (Figura 4.12 B), estreitando as gaussianas que representam a posição média das cabeças polares e modificando a distribuição da densidade eletrônica referente às cadeias acílicas. A Tabela 4.5 exhibe os valores encontrados para os ajustes dos diagramas obtidos pelo SAXS através da equação 5 e o cálculo da espessura da bicamada lipídica de DOPC na presença e ausência da Artepillin C, pela equação 6.

Tabela 4.5. Parâmetros de ajuste dos diagramas de SAXS obtidos para medidas de vesículas de DOPC na ausência e presença de Artepillin C, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. *espaçamento-d*: distância compreendida entre espessura da bicamada lipídica e camada de água entre as lamelas, para as vesículas oligolamelares; z_H : centro da distribuição gaussiana referente à cabeça polar dos lipídios; σ_H : distribuição média de z_H ; ρ_C : amplitude da gaussiana relativa à σ_H ; σ_C : distribuição média da região das cadeias acílicas; %ULVs: porcentagem de vesículas unilamelares no sistema; d_B : espessura calculada das bicamadas lipídicas

	espaçamen to-d (Å)	z_H (Å)	σ_H	ρ_C	σ_C	% ULVs	d_B (Å)
DOPC	$62,6 \pm 0,1$	$18,0 \pm 0,1$	3*	$-0,98 \pm 0,03$	$5,7 \pm 0,2$	56 ± 1	$48,0 \pm 0,2$
DOPC+Artepillin C	$63,6 \pm 0,1$	$17,1 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3$	$-0,94 \pm 0,03$	7 ± 1	74 ± 1	48 ± 2

*o valor de σ_H calculado no caso de vesículas fosfolipídicas na ausência de outros compostos é 3 \AA^{85}

Por mais que o efeito da Artepillin C nas vesículas de DOPC tenham refletido na alteração da distribuição da densidade eletrônica das bicamadas lipídicas, o valor médio calculado da espessura em ambos os casos permaneceu o mesmo, indicando que modificações estruturais ocorreram sem a alteração da espessura média das bicamadas lipídicas.

4.4.1.3. Estudo dos efeitos da Artepillin C em GUVs de DOPC por microscopia confocal de fluorescência

Imagens da projeção 3D sobre o plano-Z das vesículas unilamelares gigantes (GUVs) de DOPC foram obtidas através da técnica de microscopia confocal de fluorescência pela inserção da sonda fluorescente DiIC₁₈ nas bicamadas lipídicas, numa razão molar sonda/DOPC 1:200 mol/mol. Concentrações de Artepillin C foram adicionadas na suspensão lipídica e o comportamento das GUVs pelo efeito do composto foi observado ao longo do tempo, como representado pela Figura 4.13. Não foram observadas alterações nas estruturas das vesículas nos primeiros 15 minutos, pela inserção de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C (Figura 4.13 – 15 minutos). Desse modo, o dobro da concentração inicial do composto foi adicionado ao sistema, para a visualização de possíveis efeitos a partir de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C nas GUVs. No tempo de 17 minutos, ou seja, 2 minutos após injetar o dobro da concentração do composto na amostra, foi possível observar a liberação de um segmento de estruturas lipídicas, que definimos neste trabalho como cordões lipídicos, criados a partir de uma região específica da bicamada lipídica principal, como pode ser visualizado pela Figura 4.13 – 23 minutos. Um efeito consequente na perda da intensidade fluorescência da sonda DiIC₁₈, distribuída na bicamada lipídica, é observado seguido da criação de regiões específicas com alta intensidade de fluorescência, que coexistem com os cordões lipídicos (Figura 4.13 – 28 minutos). Num equilíbrio final do sistema, onde modificações já não são mais perceptíveis, os pontos com maior intensidade de fluorescência permanecem distribuídos nas vesículas na ausência dos cordões lipídicos (Figura 4.13 – 32 minutos). Estes efeitos podem estar vinculados a possíveis mudanças na curvatura espontânea das vesículas a partir de uma dada concentração da Artepillin C no sistema, resultando numa liberação dos lipídios em excesso e, conseqüentemente, em regiões de alta densidade lipídica na superfície das GUVs. Essas regiões são criadas a partir de localizações específicas da Artepillin C nas bicamadas, refletindo nos pontos de fluorescência mais intensos observados na Figura 4.13 pelo acúmulo da sonda fluorescente juntamente aos agregados lipídicos formados. Ainda, a diminuição da intensidade de fluorescência do DiIC₁₈ distribuído na bicamada lipídica pode ser

explicada por uma possível preferência da sonda fluorescente nestas regiões de alta densidade lipídica, conferindo um aumento ainda maior da intensidade de fluorescência nestes pontos.

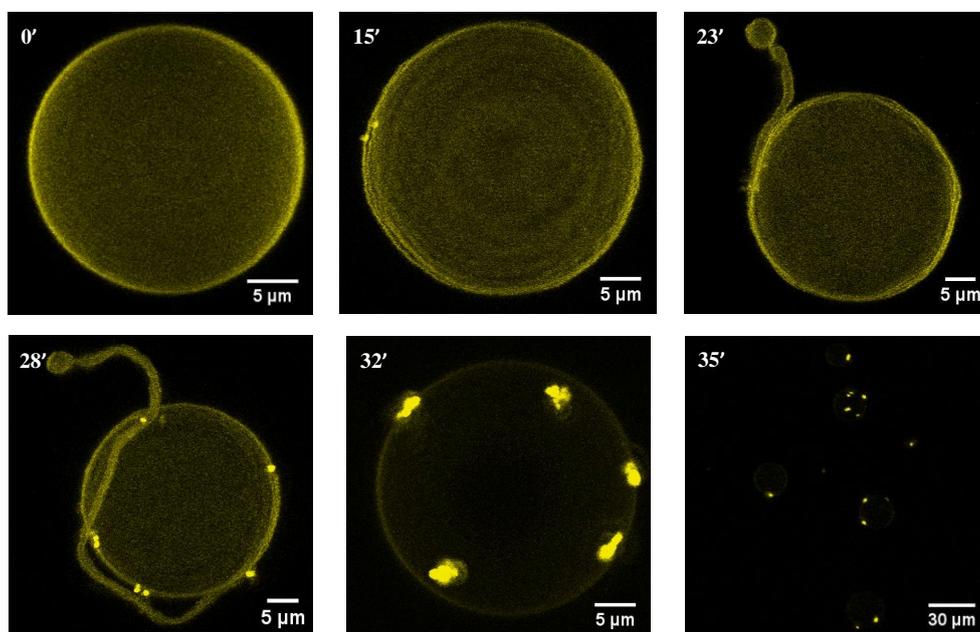


Figura 4.13. Imagens da projeção 3D sobre o plano-Z de GUVs constituídas por DOPC, obtidas por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram coletadas na ausência e na presença de Artepillin C no sistema, acompanhadas no tempo.

4.4.1.4. Estudo dos efeitos da Artepillin C em GUVs de DOPC por microscopia de fluorescência e contraste de fase

Efeitos causados por diferentes concentrações de Artepillin C em GUVs formadas por DOPC foram investigados pela técnica de microscopia de fluorescência e contraste de fase. Assim como para a microscopia confocal, a sonda DiIC₁₈ foi inserida nas GUVs para a aquisição das imagens por fluorescência. No entanto, para estas medidas, alíquotas da suspensão lipídica contendo GUVs foram adicionadas em soluções aquosas, na ausência e presença de Artepillin C nas concentrações 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. É importante ressaltar que para esta metodologia, os efeitos da Artepillin C causados nas GUVs ocorrem num tempo muito menor que para os experimentos realizados pela técnica confocal, onde, inversamente, alíquotas da solução estoque de

Artepillin C foram adicionadas nas suspensões lipídicas após um dado período para obter o tempo de assentamento das GUVs na superfície da lamínula, possibilitando assim a aquisição 3D das imagens no plano-Z. A Figura 4.14 mostra a aquisição de imagens de GUVs após 60 segundos da inserção das vesículas na solução contendo as diferentes concentrações de Artepillin C.

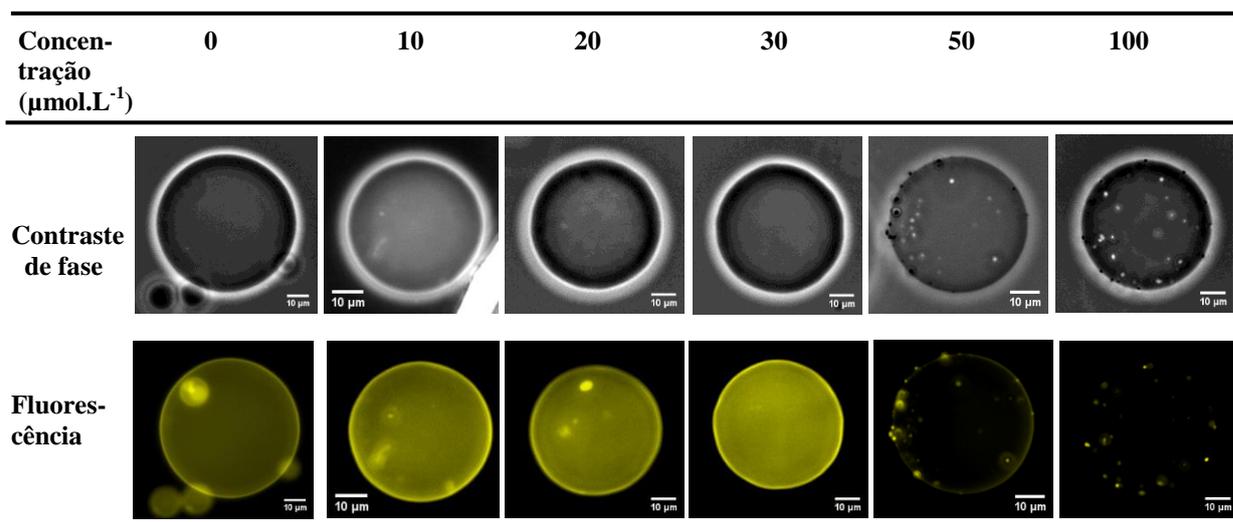


Figura 4.14. Imagens coletadas por microscopia de contraste de fase (acima) e fluorescência (abaixo) de GUVs de DOPC na ausência e presença de concentrações de Artepillin C.

Para concentrações de até $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C em solução não foram observadas quaisquer alterações nas vesículas, tanto por fluorescência quanto por contraste de fase. A partir de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o contraste de fase para algumas GUVs foi perdido ou diminuído, indicando que algum efeito causado pela Artepillin C contribuiu para trocas entre a parte interna e externa destas GUVs. Ainda, as imagens mostraram a criação de regiões que refletem num aumento de contraste de fase bem como no aumento da intensidade de fluorescência em pontos distribuídos pelas GUVs. Esses efeitos corroboram com os obtidos através das medidas de microscopia confocal: a interação da Artepillin com as GUVs causa um desequilíbrio na curvatura espontânea das vesículas, fazendo-se necessária a criação de regiões com alta densidade lipídica. Devido à rapidez na ocorrência destes agregados lipídicos, nessas medidas não foram visualizadas as formações dos cordões como observados através da microscopia confocal.

Outro aspecto importante notado nos estudos do efeito da Artepillin C nas GUVs de DOPC refere-se à forma com que o composto se encontra na solução aquosa, verificado pelas medidas de espectroscopia óptica. A criação de agregados de Artepillin C, representado pelo deslocamento do espectro de absorção, acontece em concentrações acima de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Essa análise indica que os efeitos causados pela interação do composto bioativo nas vesículas acontecem preferivelmente quando este se encontra na forma de agregados, como já discutido através de medidas de ITC.

As alterações morfológicas das GUVs de DOPC pelo efeito da Artepillin C nas concentrações 50 e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram acompanhadas em função do tempo, como mostrado pela Figura 4.15. Dois diferentes efeitos podem ser observados no tempo de 10 segundos para estas duas concentrações: quando as GUVs são adicionadas em solução de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C, elas sofrem mudanças relacionadas à curvatura espontânea resultando na perda do formato esférico. Pouco tempo depois, como observado para as imagens coletadas após 30 segundos, o sistema alcança um equilíbrio e a vesícula retorna ao seu formato esférico, porém, com a formação das regiões de alta intensidade de fluorescência, que refletem os agregados de alta densidade lipídica já verificados. Para as GUVs que são inseridas na solução contendo Artepillin C numa concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, a criação destas regiões de alta densidade lipídica é prontamente observada após 10 segundos, indicando que perturbações que acarretam nas mudanças conformacionais das vesículas tenham ocorrido antes mesmo do tempo observado. Ainda, dois fatos importantes podem ser discutidos dentro dessas análises: a maior concentração de Artepillin C acarreta na criação de mais regiões de alta densidade lipídica na superfície das GUVs, seguidos de uma maior intensidade de fluorescência. Porém, independente dessas concentrações estudadas, o contraste de fase após um determinado tempo de interação Artepillin C/GUVs (300 segundos para solução $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e 350 segundos para solução $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) não foi completamente perdido, indicando que a criação destes agregados lipídicos, por mais que sejam dependentes da concentração de Artepillin C, não afetam na perda total do contraste de fase das vesículas.

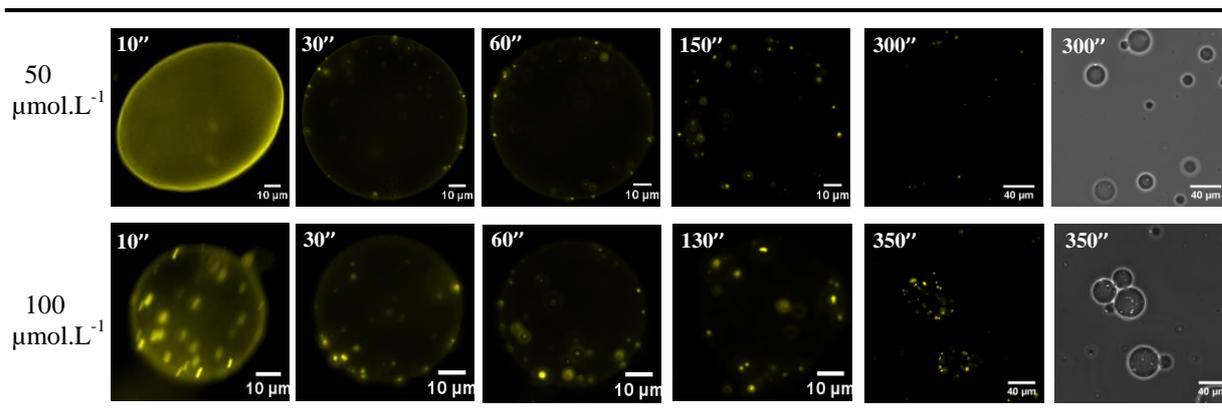


Figura 4.15. Imagens de GUVs de DOPC coletadas por microscopia de fluorescência ao longo do tempo, na presença de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (acima) e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (abaixo) de Artepillin C. Análise das GUVs por microscopia de contraste de fase foi feita para os tempos finais.

4.4.1.5. Extravasamento por microscopia confocal

Medidas de extravasamento do corante Alexa Fluor 488 a partir do interior de GUVs de DOPC, monitoradas por microscopia confocal de fluorescência, foram realizadas para verificarmos mudanças na permeabilidade das membranas pelo efeito da Artepillin C. Para isso, analisamos a porcentagem de liberação da sonda fluorescente a partir do interior das GUVs. Como mencionado, este experimento foi realizado através da microscopia confocal de fluorescência, ou seja, neste momento voltamos à metodologia em que alíquotas da solução estoque de Artepillin C são inseridas em suspensões contendo as vesículas, retardando os efeitos causados pelo composto como já observado pelas medidas de microscopia confocal apresentadas anteriormente. A intensidade calculada e representada no eixo Y, como mostrado através da Figura 4.16-A, refere-se à intensidade média de fluorescência da sonda Alexa Fluor-488 no interior das GUVs, em função do tempo. A intensidade medida é perdida significativamente para as duas concentrações de Artepillin C estudadas, enquanto um pequeno efeito é observado devido a processos de *photobleaching* e pela inserção de metanol na razão volumétrica 1:100 MeOH/água (v/v) ao longo das medidas. Os resultados obtidos indicam que a Artepillin C afeta a bicamada lipídica resultando na mudança de sua permeabilidade, possivelmente pela abertura de poros que permitem a passagem das moléculas de Alexa Fluor 488 para o ambiente externo das GUVs. O tempo

correspondente para este processo de vazamento foi medido ao longo de vários minutos, e, mesmo após todo o tempo medido, não foi observado vazamento total da sonda fluorescente, indicando que esse efeito pode estar vinculado a pequenos poros que impossibilitariam a rápida passagem das sondas fluorescentes do meio interno para o externo, tornando o tempo do vazamento total maior do que o medido. Isso também acarretaria a impossibilidade da perda total de contraste de fase das GUVs, como mostrado na seção anterior, mesmo que o tempo total do processo da formação das regiões contendo os agregados lipídicos tenha sido mais curto. Ainda, pela fluorescência da sonda DiIC₁₈, verificamos que o processo da formação dos cordões lipídicos e da criação das regiões de alta densidade lipídica foram observados em tempos comparáveis ao processo de diminuição da intensidade de fluorescência da sonda Alexa Fluor no interior das vesículas de DOPC, mostrando que o vazamento da fluorescência ocorre concomitantemente às alterações morfológicas das GUVs.

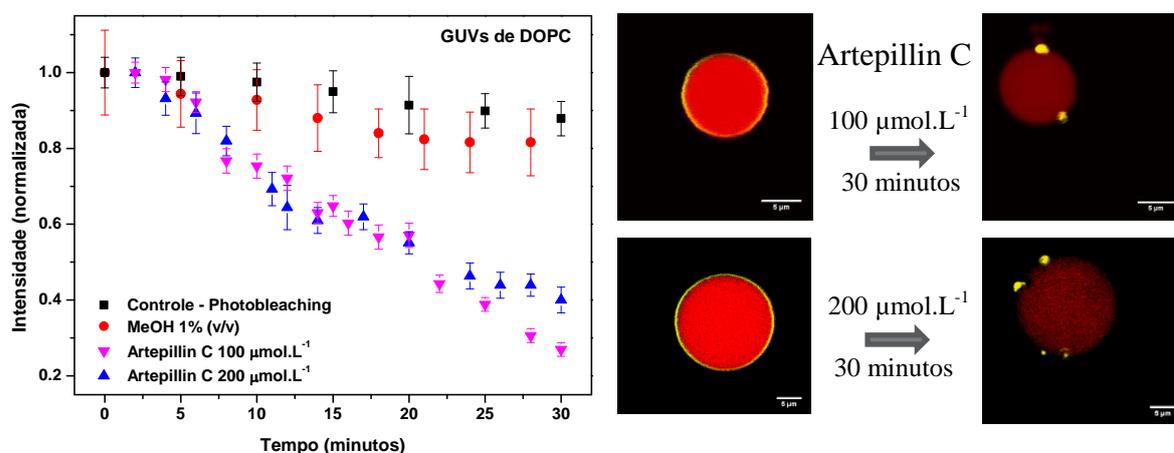


Figura 4.16. Extravasamento da sonda fluorescente Alexa Fluor 488 a partir do interior de GUVs de DOPC por medidas de microscopia confocal. Esquerda: Intensidade de fluorescência da sonda no interior das GUVs de DOPC em função do tempo. Direita: Imagens coletadas das GUVs de DOPC antes e depois da inserção de 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C na suspensão.

4.4.1.6. Análises da fluidez das GUVs de DOPC por medidas de LAURDAN-GP

Os estudos de alteração na fluidez das bicamadas lipídicas foram realizados através de medidas de polarização generalizada do LAURDAN (também

conhecida como LAURDAN-GP, equação 12). Para esse experimento, utilizamos um microscópio com uma fonte de laser de excitação por dois fótons ($\lambda_{exc} = 780$ nm), possibilitando a obtenção de imagens pela microscopia confocal. Assim como para as medidas realizadas pela microscopia confocal com excitação por um fóton (estudo da estrutura morfológica das GUVs e medidas de extravasamento), alíquotas da solução estoque de Artepillin C foram adicionadas nas suspensões lipídicas contendo as vesículas. Para as medidas de LAURDAN-GP em sistemas contendo lipídios insaturados, como é o caso do DOPC, devemos levar em consideração o princípio da fotosseleção devido à polarização do laser de excitação. Esse fato leva à obtenção de imagens com duas regiões de diferentes valores de polarização generalizada do LAURDAN: uma que corresponde de fato à mobilidade da sonda no ambiente em que é inserida e que depende da fluidez da bicamada lipídica (região de mais baixo valor de LAURDAN-GP, indicada pela seta na Figura 4.17, a qual faz referência ao histograma do valor médio calculado) e a outra relacionada às mudanças da fluidez, porém, levando em consideração a orientação da sonda no plano da membrana. Como pode ser observado através da Figura 4.17, o valor médio encontrado do LAURDAN-GP para as GUVs de DOPC na ausência da Artepillin C foi $-0,10 \pm 0,07$. Este valor negativo é esperado devido ao alto desordenamento dos lipídios insaturados nas vesículas. Pela adição de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto na suspensão contendo as GUVs, ainda sem a visualização de qualquer defeito na superfície da bicamada lipídica, observamos que o valor médio encontrado para o LAURDAN-GP aumentou para $0,03 \pm 0,09$ após dois minutos da inserção. Esse efeito é seguido de uma diminuição na intensidade da fluorescência do LAURDAN distribuída nas vesículas, que corrobora com o observado para os experimentos onde utilizamos a sonda fluorescente DiIC₁₈. De acordo com o aumento do tempo de interação, o efeito na diminuição da intensidade de fluorescência ainda é perceptível, porém, os valores de LAURDAN-GP diminuem até alcançar valores próximos ao encontrado na ausência da Artepillin C. Esses resultados indicam que a interação do composto bioativo inicialmente modula as bicamadas lipídicas causando um ordenamento lipídico, levando ao aumento do valor de LAURDAN-GP. Esse processo é seguido de uma instabilidade na curvatura da bicamada lipídica das vesículas no sistema, resultando no processo de liberação de lipídios a partir da membrana principal, como observado através das imagens obtidas pela reconstrução 3D mostrada pelos estudos morfológicos. Um novo equilíbrio na curvatura das

membranas leva a organização lipídica ao mesmo empacotamento inicial encontrado na ausência da Artepillin C, refletindo os baixos valores de LAURDAN-GP encontrados, próximos ao valor encontrado na ausência do composto. Finalmente, as regiões de alta intensidade fluorescente que representam as agregações lipídicas distribuídas ao longo das vesículas são criadas, e, como esperado, devido ao aumento da densidade lipídica, os valores de LAURDAN-GP encontrados nestas regiões refletem um alto ordenamento dos lipídios.

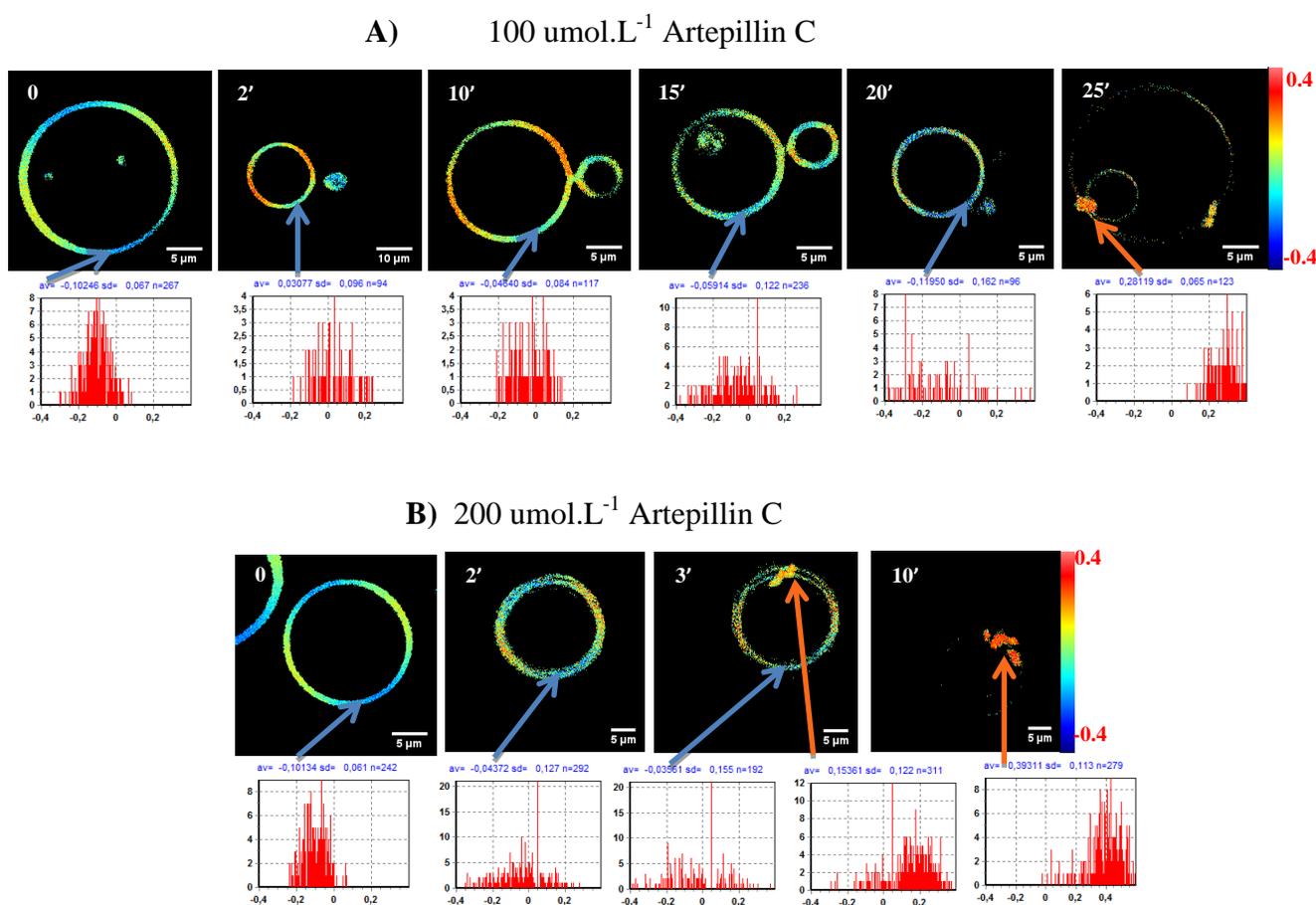


Figura 4.17. Imagens de GUVs constituídas de DOPC, obtidas através da microscopia confocal com excitação 2 fótons ($\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$), utilizando-se a técnica LAURDAN-GP. As imagens são acompanhadas dos seus respectivos histogramas de valor LAURDAN-GP, calculados na ausência e na presença de: A) 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C e B) 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C, ambos em função do tempo.

Os efeitos de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C na suspensão de GUVs de DOPC acontecem em tempo relativamente menor, quando comparado com as medidas de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$: o equilíbrio do sistema, que resulta na criação dos agregados lipídicos

distribuídos na superfície das vesículas, acontece em torno de três minutos após a inserção do composto bioativo seguido de um leve decréscimo no valor do LAURDAN-GP. Pelas imagens obtidas no tempo de 10 minutos, é possível observar que houve um aumento da região na GUV correspondente ao agregado lipídico, indicando que um número maior de lipídios aumenta sua densidade lipídica, refletindo assim no aumento dos valores de LAURDAN-GP de acordo com o tempo nestas regiões.

4.4.2. Efeitos da Artepillin C em vesículas fosfolipídicas zwitteriônicas saturadas

4.4.2.1. Medidas de calorimetria diferencial de varredura

Vesículas fosfolipídicas de DMPC e DPPC, ambos fosfolipídios saturados, apresentam temperaturas de transição da fase gel ($L_{\beta'}$) para a fase fluida (L_{α}), com picos bem definidos, em 23,89 °C e 41,42 °C, respectivamente, associados a entalpias que correspondem a 7,2 Kcal/mol e 8,6 Kcal/mol. Ainda, ambos apresentam picos de pré-transição resultante da mudança conformacional das cadeias de carbono da fase gel para a fase *ripple*, que ocorrem, respectivamente, nas temperaturas de 14,32 °C e 34,97 °C, com a variação de entalpia de 1,26 Kcal/mol e 1,30 Kcal/mol (Figura 4.18). Na adição de 1 mol% da Artepillin C em suspensões lipídicas formadas por DMPC e DPPC (10 mmol.L⁻¹), a cooperatividade dos lipídios nas vesículas é alterada resultando em ligeiras mudanças nos picos de transição principal para ambos os sistemas, associados a uma variação positiva da entalpia. As mudanças mais significativas são observadas nos picos de pré-transição de ambos os sistemas, que se tornam menos definidos e são deslocados para temperaturas mais baixas, com decréscimo nos valores das entalpias associadas (Tabela 4.6). Adicionando concentrações mais altas de Artepillin C, 5 ou 10 mol%, os picos de pré-transição dos sistemas contendo as vesículas fosfolipídicas desaparecem completamente e os que refletem as transições principais de ambos, são alargados e deslocados para menores temperaturas, seguidos na diminuição dos valores das entalpias associadas. Esses dados confirmam que ambos os sistemas contendo vesículas que diferem quanto ao tamanho da cadeia de hidrocarboneto são afetados de forma similar pela presença do composto bioativo, porém, as alterações nos parâmetros termodinâmicos do DMPC são mais significativas, indicando que a Artepillin C tem

maior eficiência em sistemas contendo fosfolipídios com cadeias de hidrocarboneto de menor comprimento, possivelmente pela sua localização mais próxima à região da cabeça polar.

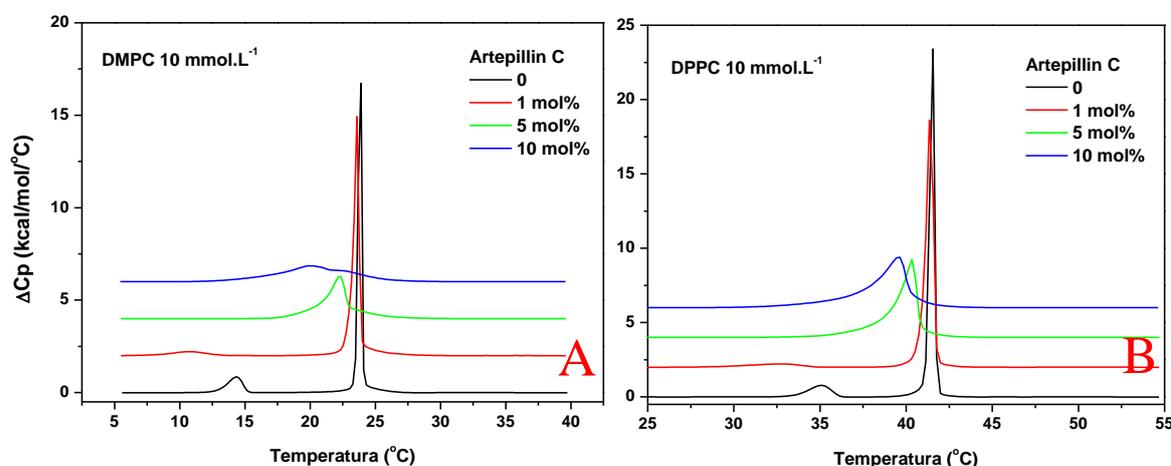


Figura 4.18. Curvas DSC de dispersão lipídica (10 mmol.L⁻¹) de vesículas multilamelares de DMPC (A) e DPPC (B), na ausência e presença de concentrações de Artepillin C, nas razões molares Artepillin C:lipídio 1:100, 5:100 e 10:100. O intervalo de temperatura medido para o sistema contendo DMPC varia de 5 °C a 40 °C, enquanto para o DPPC varia de 25 °C a 55 °C.

Os dados termotrópicos obtidos a partir da análise das curvas obtidas pela técnica de DSC mostram que, para o DMPC, a temperatura de transição é por volta de 10 °C abaixo da transição principal, enquanto que para o DPPC essa variação é em torno de 7 °C. Independente do sistema estudado, o processo que reflete o surgimento do pico de pré-transição (com largura a meia altura do pico na faixa de 1 °C) é consideravelmente menos cooperativo quando comparado à transição principal (largura a meia altura próximo a 0,05 °C). Como já mencionado, mesmo na mais baixa concentração de Artepillin C adicionada nas suspensões fosfolipídicas de DMPC e DPPC (razão Artepillin C/lipídio 1:100 mol/mol), as mudanças em relação ao processo de pré-transição são significativas (deslocamento de T_p para menores temperaturas e diminuição no valor de ΔH_p), enquanto que o processo de transição de fase que reflete o surgimento do pico de transição principal das vesículas fosfolipídicas é pouco modificado. Essas mudanças podem estar associadas à localização da Artepillin C próxima à interface lipídio/água da bicamada lipídica, interagindo com as biomembranas e afetando propriedades da região da cabeça polar dos lipídios, como já estudado para outros compostos^{30,86,87,88}.

Um modelo que explica as alterações nas propriedades estruturais devido às mudanças nos parâmetros termotrópicos de bicamadas lipídicas obtidos por DSC foi apresentado por Heimberg⁸⁸, considerando tanto a pré- quanto a transição principal como parte da perda na rigidez das cadeias de hidrocarboneto nas vesículas vinculada à formação de *ripples* periódicos na superfície da membrana. Esses *ripples* são referentes à formação de domínios fluidos que surgem como defeitos lineares na fase gel nas monocamadas individuais, que, devido às restrições geométricas e topológicas, são forçados a permanecerem em arranjos periódicos na superfície. Seguindo a linha deste modelo, a perda do processo de pré-transição pela adição da Artepillin C causa uma desestruturação na formação destes defeitos lineares, tornando-os como defeitos pontuais que contribui para as alterações dos parâmetros termotrópicos das vesículas fosfolipídicas.

Tabela 4.6. Parâmetros termodinâmicos obtidos através da análise das curvas de DSC, medidas para a suspensão de vesículas multilamelares formadas por DMPC e DPPC, na ausência e presença de concentrações de Artepillin C. T_p = temperatura de pré-transição; ΔH_p = variação de entalpia correspondente ao pico de pré-transição; T_m = temperatura da transição principal; ΔH_m = variação de entalpia correspondente ao pico de transição principal

Artepillin C (mol%)	DMPC 10 mmol.L ⁻¹				DPPC 10 mmol.L ⁻¹			
	T_p (°C)	ΔH_p (Kcal/mol)	T_m (°C)	ΔH_m (Kcal/mol)	T_p (°C)	ΔH_p (Kcal/mol)	T_m (°C)	ΔH_m (Kcal/mol)
0	14,32	1,26±0,03	23,89	7,2±0,1	34,97	1,3±0,1	41,42	8,6±0,5
1	10,70	0,68±0,02	23,55	8,3±0,2	32,47	0,81±0,03	41,18	10,1±0,4
5	-	-	22,33	5,7±0,2	-	-	40,34	9,2±0,2
10	-	-	20,10	5,7±0,2	-	-	39,55	8,5±0,4

4.4.2.2. Investigação nas mudanças estruturais das bicamadas lipídicas em vesículas de DMPC e DPPC

Assim como para as vesículas fosfolipídicas constituídas por DOPC, as medidas de difração de raio-X foram realizadas para investigar se a Artepillin C, na razão 10:100 mol/mol, causa alteração estrutural das bicamadas lipídicas de DMPC e DPPC em temperaturas que correspondem à fase gel e fluida das vesículas. Como mostrado para o

experimento realizado para o DOPC, as curvas de SAXS para as vesículas constituídas por ambos os fosfolipídios, na ausência da Artepillin C, também apresentam um padrão de vesículas unilamelares com uma pequena contribuição de estruturas oligolamelares, refletindo a presença do pico de Bragg próximo a $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ e um ombro próximo a $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ (Figura 4.19).

Na presença da Artepillin C, ambos os sistemas contendo as vesículas fosfolipídicas são afetados e a formação espontânea de vesículas unilamelares ocorre significativamente, desaparecendo assim o pico referente à presença das estruturas oligolamelares. O efeito que ocorre é similar ao atribuído para o sistema contendo DOPC: a presença da carga negativa na estrutura da Artepillin C introduz uma repulsão eletrostática entre as lamelas e favorece a formação espontânea das vesículas unilamelares. Ainda, através do perfil de densidade eletrônica obtido pelo ajuste das curvas (Figura 4.20), foi possível comparar os padrões das curvas de SAXS das vesículas de DMPC e DPPC com o padrão obtido para o DOPC na presença do composto bioativo.

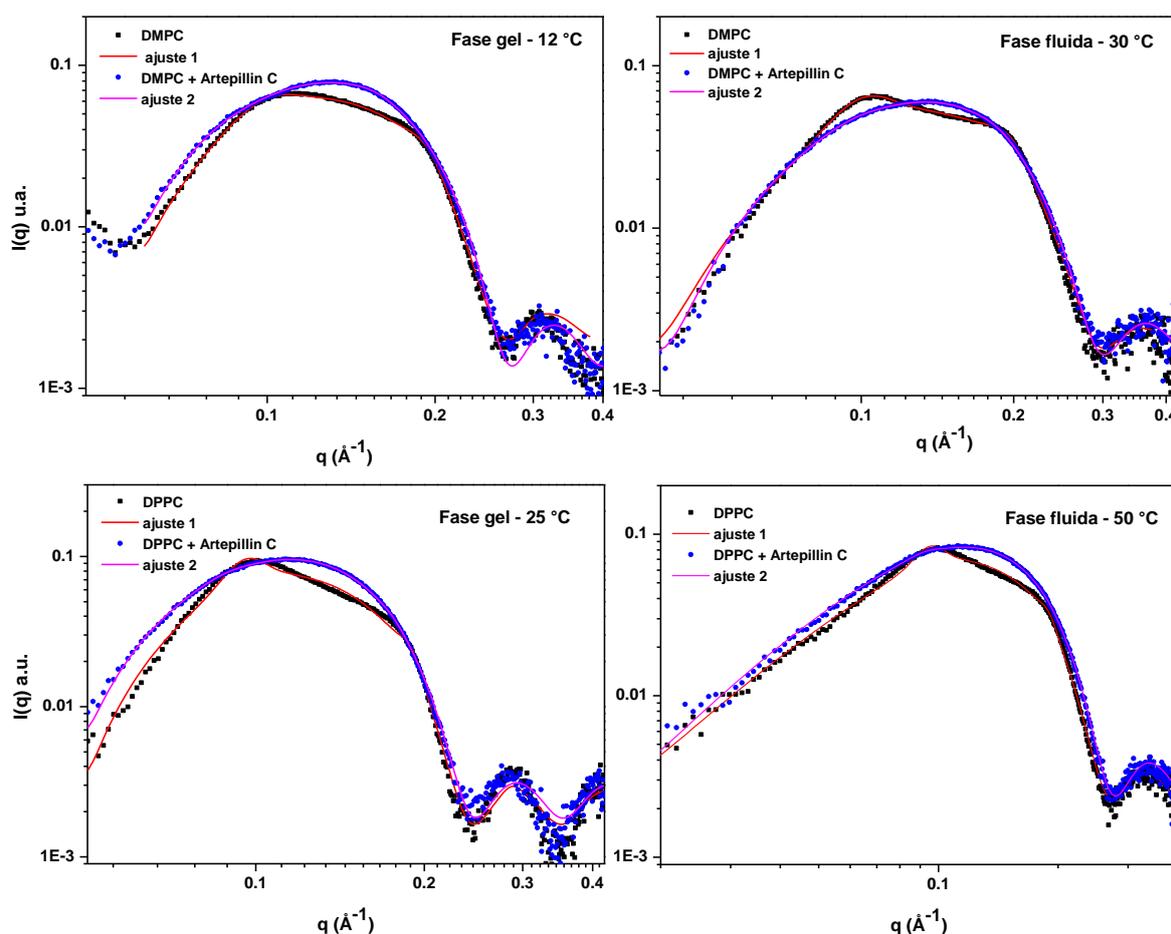


Figura 4.19. Diagramas de SAXS de vesículas de DMPC (acima) e DPPC (abaixo), nas fases gel (esquerda) e fluida (direita), na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/lipídio 1:10).

Nesta análise, observamos que para ambos os sistemas contendo fosfolipídios de cadeias saturadas o processo de formação espontânea das vesículas unilamelares é mais pronunciado, resultando na formação em torno de 96-97% de vesículas unilamelares (Tabela 4.7), enquanto que para o sistema contendo vesículas de DOPC, a quantidade é em torno de 74%. Essa característica deve-se à presença de instaurações nas cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios de DOPC, onde o empacotamento lipídico nas bicamadas aumenta, permitindo que a Artepillin C tenha acesso a regiões mais abaixo da cabeça polar, diminuindo o efeito de repulsão eletrostática e consequentemente a formação espontânea de vesículas unilamelares.

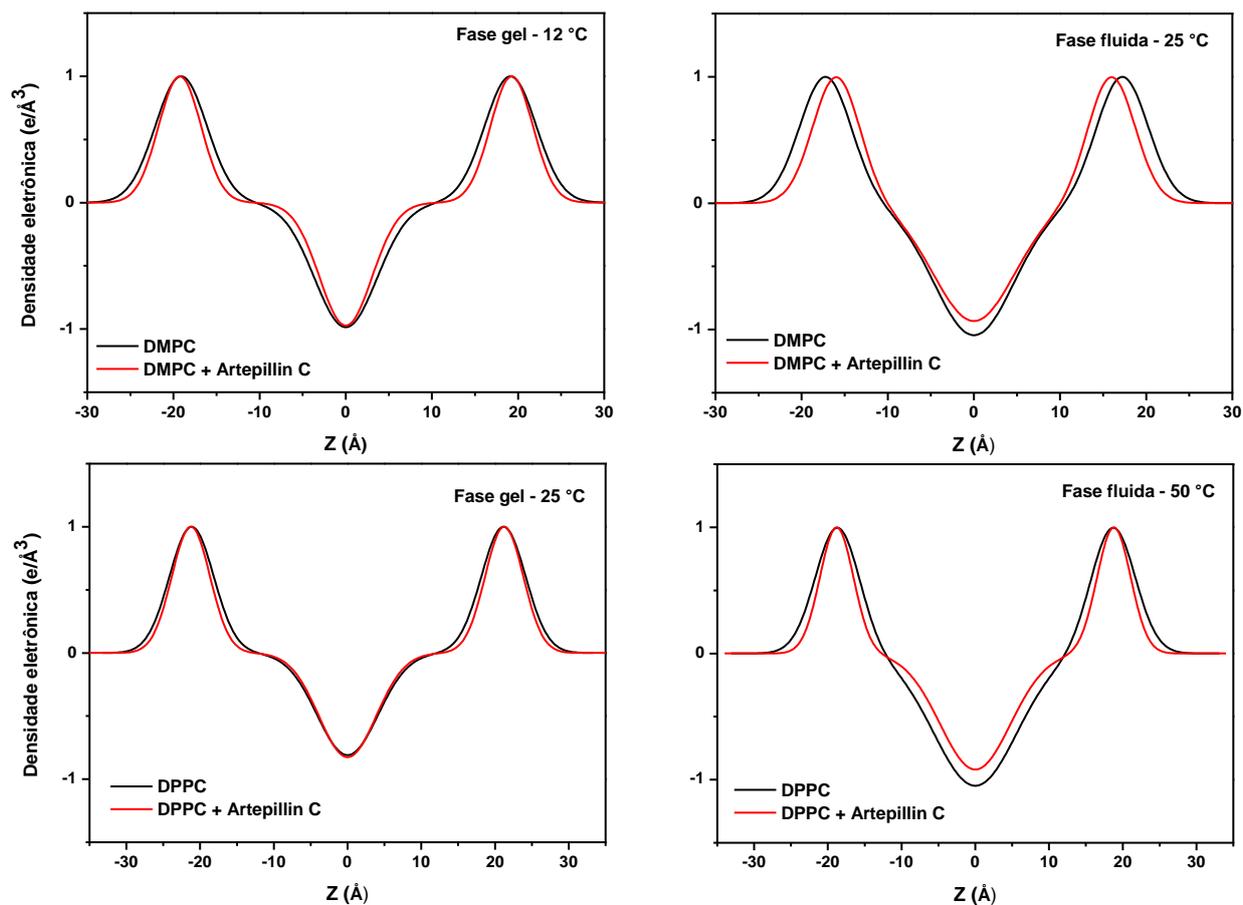


Figura 4.20. Perfis de densidade eletrônica obtidos através do ajuste dos diagramas de SAXS de vesículas de DMPC (acima) e DPPC (abaixo), nas fases gel (esquerda) e fluida (direita), na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/lipídio 1:10).

Uma análise qualitativa destas formações espontâneas de vesículas unilamelares foi feita adicionando-se Artepillin C (na razão 1:10 mol/mol) nas suspensões lipídicas não extrusadas, ou seja, contendo vesículas multilamelares de DMPC, DPPC e DOPC (fase fluida). Os padrões de espalhamento obtidos, como podem ser observados pela Figura 4.21, mostram a diminuição da contribuição dos picos de Bragg e o surgimento de uma curva representativa de vesículas unilamelares principalmente para as suspensões contendo lipídios saturados, confirmando que o grupo carregado da Artepillin C localiza-se em regiões mais próximas à interface para estes tipos de lipídios.

Tabela 4.7. Parâmetros de ajuste dos diagramas de SAXS obtidos para medidas de vesículas de DMPC e DPPC (nas fases gel e fluida), na ausência e presença de Artepillin C, a 25 °C. *espaçamento-d*: distância compreendida entre espessura da bicamada lipídica e camada de água entre as lamelas, para as vesículas oligolamelares; z_H : centro da distribuição gaussiana referente à cabeça polar dos lipídios; σ_H : distribuição média de z_H ; ρ_C : amplitude da gaussiana relativa à σ_H ; σ_C : distribuição média da região das cadeias acílicas; %ULVs: porcentagem de vesículas unilamelares no sistema; d_B : espessura calculada das bicamadas lipídicas

	Fase	espaçamento-d	z_H (Å)	σ_H (Å)	ρ_C	σ_C (Å)	% ULVs	d_B (Å)
DMPC	gel	65,8±0,1	19,1±0,1	3*	-0,90±0,05	4,2±0,3	82	50,2±0,2
DMPC+Artepillin C		71,4±0,5	19,2 ± 0,1	2,4±0,3	-0,97±0,05	3,1±0,3	97	48,0±1,0
DMPC	fluida	64,2±0,3	17,2 ± 0,2	3*	-1,0±0,2	4,6±0,8	64	46,4±0,4
DMPC+Artepillin C		66,9±0,4	16,9 ± 0,2	2,9±0,2	-0,93±0,02	4,9±0,3	97	45,4±0,6
DPPC	gel	66,5±0,1	21,2±0,1	3*	-0,80±0,02	4,1±0,1	63	54,4±0,2
DPPC+Artepillin C		71,2±0,5	21,2±0,1	2,6±0,1	-0,82±0,02	3,9±0,1	96	52,8±0,3
DPPC	fluida	66,2±0,1	18,7±0,1	3*	-1,0±0,03	4,1±0,1	63	49,4±0,2
DPPC+Artepillin C		68,0±0,3	18,8±0,1	2,3±0,1	-0,91±0,03	4,8±0,2	96	46,8±0,6

*o valor de σ_H calculado no caso de vesículas fosfolipídicas na ausência de outros compostos é 3 Å⁸⁵

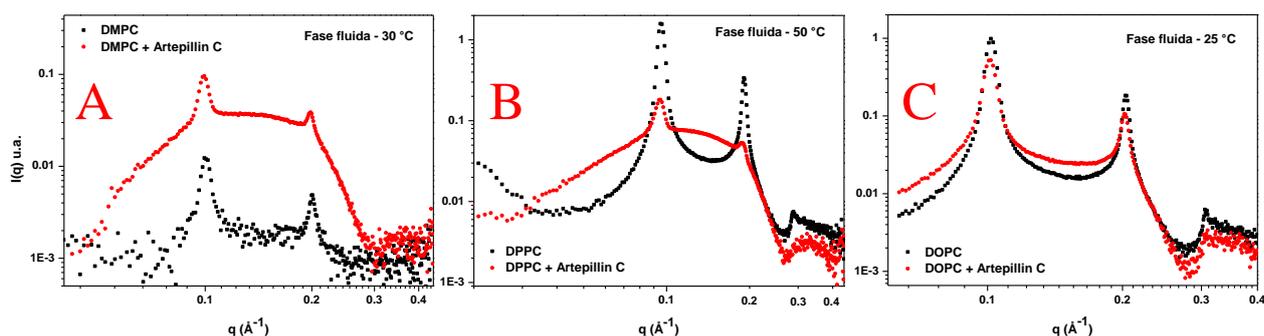


Figura 4.21. Diagramas de SAXS de vesículas de DMPC (A), DPPC (B) e DOPC (C), na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C:lipídio 1:10).

Ainda, os parâmetros da Tabela 4.7 que refletem os perfis de densidade eletrônica indicam que a introdução da Artepillin C, tanto em sistemas contendo vesículas de DMPC quanto de DPPC, causa um estreitamento das gaussianas que representam a posição e distribuição média das cabeças polares e modifica a distribuição da densidade eletrônica referente às cadeias acílicas. Estas alterações resultam no afinamento das bicamadas, como indicado pelo parâmetro d_B para os dois sistemas de lipídios saturados estudados, em ambas as fases.

4.4.2.3. Influência da Artepillin C em monocamadas de DMPC

Devido à similaridade dos efeitos causados pela Artepillin C em sistemas contendo lipídios saturados de DMPC e DPPC, mostrados até agora a partir dos estudos termodinâmicos e estruturais, escolhemos o DMPC para investigar a interação da Artepillin C em monocamadas constituídas por lipídios saturados, estudando alterações em área ocupada por lipídio e também na pressão superficial do sistema, obtendo curvas que refletem a compressão da monocamada de Langmuir a uma temperatura constante. A isoterma de DMPC foi primeiramente obtida com subfase aquosa na ausência de Artepillin C, comprimida de 0 mN.m^{-1} até seu colapso, na pressão superficial de 47 mN.m^{-1} (Figura 4.22-A, curva em preto). A área molecular média do DMPC, determinado pela tangente da curva correspondente à fase líquido-condensada, foi próximo a 80 \AA^2 . A isoterma tornou-se mais expandida quando a Artepillin C foi adicionada à subfase (Figura 4.22-A, curva em vermelho). Neste sistema, a área molecular média do DMPC passou a ser 85 \AA^2 , aumentando em relação à área molecular calculada na ausência do composto bioativo, confirmando que este interage e é inserido na monocamada lipídica. Além da expansão na isoterma, a Artepillin C altera a pressão superficial de colapso da monocamada de DMPC, atingindo valores próximo a 50 mN.m^{-1} .

A área ocupada pela Artepillin C, calculada pela subtração da área ocupada por lipídio na presença e na ausência de Artepillin C, é alterada de acordo com o aumento da pressão superficial (Figura 4.22-B). A compressão da monocamada, resultando no aumento da pressão superficial, expulsa a Artepillin C da interface até aproximadamente $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$. Após este valor, a área alcança um valor constante próximo a 2 \AA^2 , correspondendo à área ocupada pela Artepillin C no máximo empacotamento lipídico. Outro importante parâmetro obtido através das isotermas refere-se ao módulo de compressão máxima (C_s^{-1}): o valor encontrado deste parâmetro para a monocamada de DMPC na ausência de Artepillin C foi próximo a 120 mN.m^{-1} .

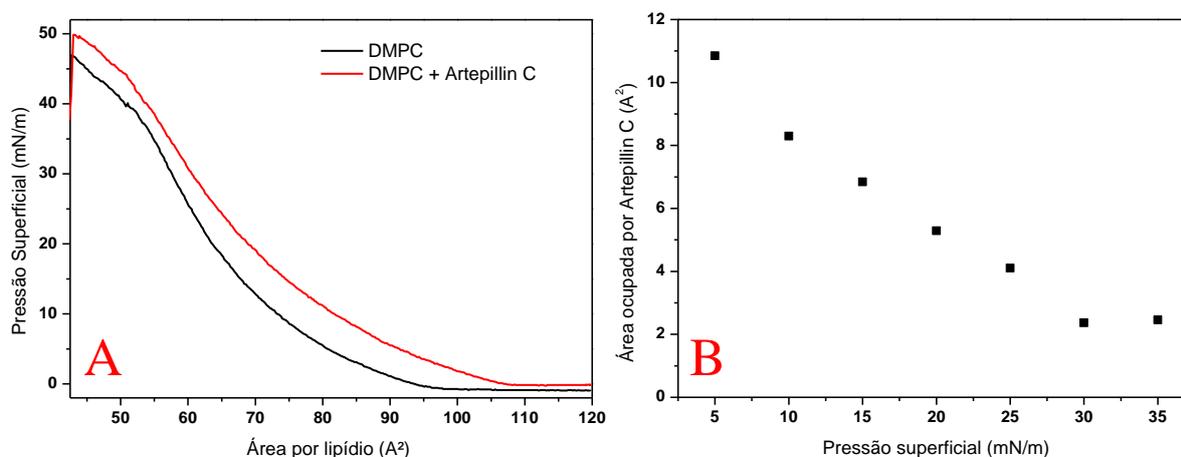


Figura 4.22. A) Isotermas de monocamadas de DMPC na ausência (curva em preto) e presença (curva em vermelho) de Artepillin C, obtidas a 25 °C. B) Área ocupada por Artepillin C na monocamada, em função da pressão superficial.

O valor diminuído para $100 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ quando o composto bioativo está presente na subfase infere que este interage com a monocamada causando um aumento em sua fluidez.

A pressão superficial necessária para que a monocamada na presença da Artepillin C seja colapsada é consistente com o efeito de superfície promovido pelo composto, que contribui para o aumento da carga negativa na interface água/lipídio. Esse efeito leva à necessidade de pressões mais altas para vencer a repulsão eletrostática entre as cargas imposta pela Artepillin C, diferentemente do que ocorre nas monocamadas constituídas apenas pelo DMPC.

4.4.2.4. Medidas de potencial zeta em vesículas de DMPC

A Figura 4.23 mostra as mudanças do potencial zeta na superfície das bicamadas lipídicas pela inserção da Artepillin C no sistema. Apesar da neutralidade elétrica dos lipídios de DMPC, um potencial negativo ($-4,19 \text{ mV}$) é detectado na suspensão lipídica na ausência da Artepillin C devido à carga negativa do grupo fosfatidil do DMPC. Um ligeiro decréscimo no potencial é observado quando 2,5 mol% de Artepillin C interage com as vesículas de DMPC. À medida que a razão molar Artepillin C/DMPC aumenta,

como mostrado pelos pontos a partir de 5 mol%, o potencial zeta é reduzido significativamente, atingindo valores próximos à -16,73 mV quando 20 mol% do composto interage com as vesículas. Estes resultados confirmam o que foi discutido até agora: a Artepillin C é inserida nas bicamadas lipídicas promovendo modificações na densidade de carga negativa da superfície devido sua preferência pela região próxima à interface água/lipídio.

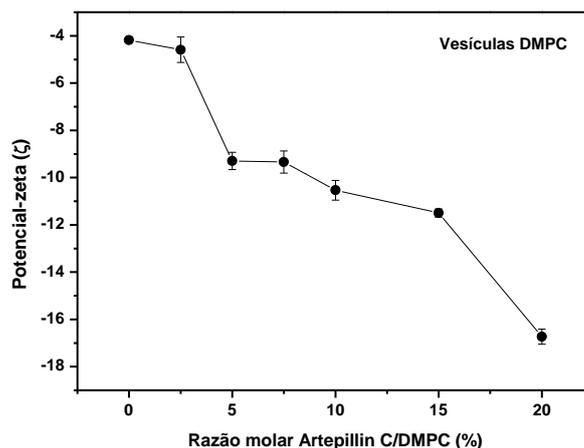


Figura 4.23. Valores de potencial zeta medidos para vesículas de DMPC na ausência e presença de Artepillin C, a 25 °C.

4.4.2.5. Investigação da interação da Artepillin C com bicamada lipídica de DMPC por simulação de dinâmica molecular

Para melhor entender a interação entre a Artepillin C com o sistema formado por bicamadas lipídicas de DMPC, realizamos simulações de dinâmica molecular atomística. Duas diferentes razões moleculares Artepillin C/DMPC, 5/128 e 10/128 foram investigadas. Todas as moléculas de Artepillin C foram posicionadas no bulk na configuração inicial e as simulações foram realizadas durante 500 ns. Após este tempo, as moléculas de Artepillin C direcionaram-se espontaneamente dentro da bicamada lipídica (Figura 4.24-F). A dinâmica das moléculas de Artepillin C, tanto antes quanto depois da entrada na bicamada lipídica, pôde ser avaliada pela contagem de contato entre elas mesmas e elas com outras moléculas do sistema (lipídios e água). A Figura 4.24-B mostra que todas as moléculas de Artepillin C no sistema agregam-se antes de atingir a bicamada lipídica. Pelo mapa de contato referente à interação Artepillin C-

Artepillin C (Figura 4.25-A, acima), é possível observar um aumento nas contagens de contato nos primeiros 100 ns, indicando que a formação dos agregados ocorre logo no início da simulação. O estado de agregação é promovido devido a efeitos hidrofóbicos da Artepillin C em água, que favorece a posterior inserção da Artepillin C dentro da bicamada lipídica. Esse fato auxilia no entendimento dos resultados obtidos ainda nos estudos com o DOPC, onde a maior interação e efeitos causados pela Artepillin C nas bicamadas lipídicas foi a partir de certa concentração de agregação, alcançado apenas em solução aquosa na ausência de qualquer outro soluto, tal como o sal na solução tamponada.

O contato da Artepillin C com as moléculas de DMPC e água (Figura 4.25-A, abaixo) revela a dinâmica da entrada do composto na bicamada lipídica: nos primeiros 100 ns, devido ao posicionamento das moléculas de Artepillin C no *bulk*, o contato existe apenas entre elas mesmas e elas com moléculas de água, ainda sem contato algum com as moléculas de DMPC até o momento em que atingem seu estado de agregação. De 100 a 300 ns, as moléculas de Artepillin C começam a dinâmica de entrada na bicamada lipídica (Figura 4.24 – C, D e E), aumentando assim a porcentagem de contato médio com as moléculas de DMPC e, concomitantemente, diminuindo o contato com a água. Esse processo é acompanhado de um estado de desagregação das moléculas de Artepillin C, observado mesmo antes da entrada destas moléculas na bicamada. Em 300 ns de simulação, a porcentagem de contato médio da Artepillin C com moléculas de água e lipídio é invertida: nesse momento, todas as moléculas de Artepillin C encontram-se dentro da bicamada lipídica, mantendo seu estado desagregado. Ainda, a dinâmica molecular corrobora na afirmação de que as moléculas de Artepillin C localizam-se próximas à interface água/lipídio, permanecendo com uma porcentagem de contato constante com as moléculas de água nos últimos 200 ns de simulação.

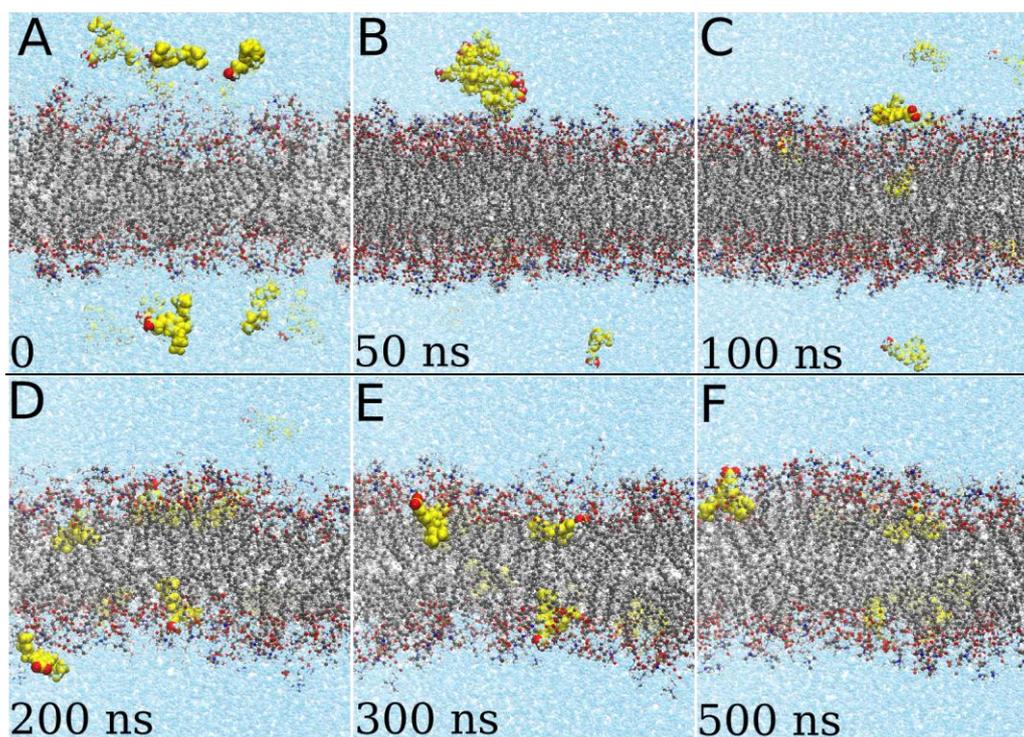


Figura 4.24. Interação entre Artepillin C e bicamada lipídica de DMPC: imagens coletadas através de simulações de dinâmica molecular ao longo de 500 ns.

Ainda foi possível verificar através da simulação parâmetros que auxiliam nas alterações estruturais causadas nas bicamadas lipídicas de DMPC a partir da entrada da Artepillin C. Os dados revelam que a área ocupada por lipídio aumentou ao longo da dinâmica, independente da concentração de Artepillin C estudada (Figura 4.25-B): a área média de $61,9 \pm 1,3 \text{ \AA}^2$, ocupada por lipídio nas bicamadas na ausência do composto, alterou no final da simulação para $64,6 \pm 1,0 \text{ \AA}^2$ e $66,3 \pm 1,1 \text{ \AA}^2$, na presença de 5 e 10 moléculas de Artepillin C no sistema, respectivamente. Esse aumento na área ocorre no momento inicial da interação do composto com a bicamada, sugerindo que a perturbação causada pela Artepillin C na membrana ocorre logo a partir do seu estado de desagregação e consequente entrada na bicamada. Estes resultados concordam com o observado experimentalmente para as monocamadas de Langmuir, onde a presença de Artepillin C afeta no acréscimo de área ocupada por lipídeo em 2 \AA^2 , aproximadamente o mesmo valor encontrado na simulação.

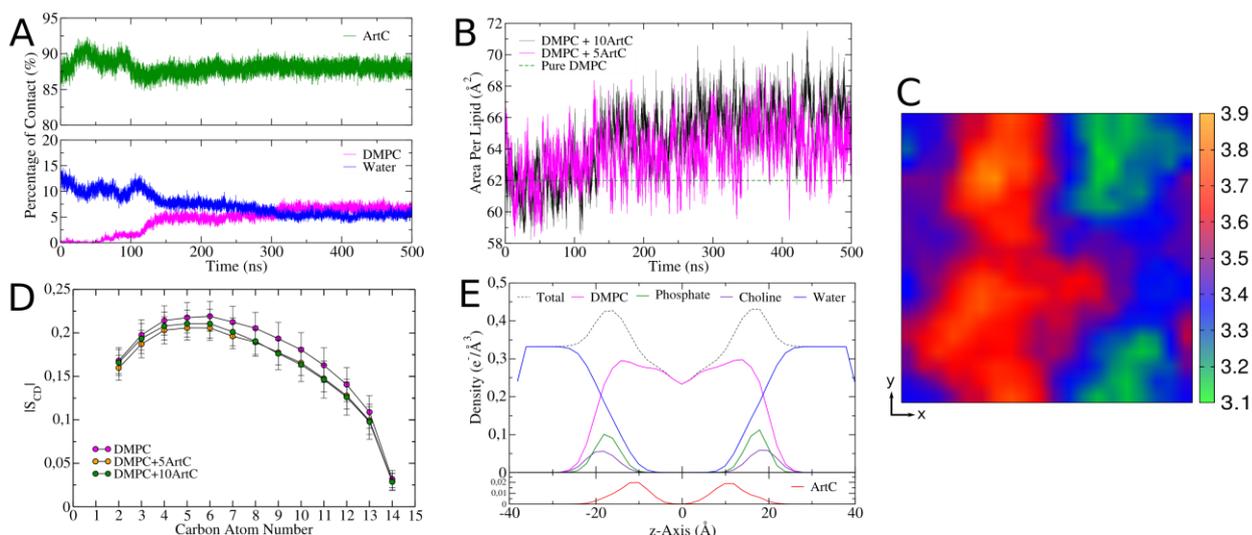


Figura 4.25. A) Mapa de contato em função do tempo de simulação; B) Área ocupada por lipídios em função do tempo de simulação; C) Mapa de contorno da espessura da bicamada lipídica para os últimos 10 ns de simulação (scala de cor representa a espessura da bicamada ao longo da direção normal da superfície); D) Parâmetro de ordem das cadeias acílicas do DMPC; E) Perfil de densidade eletrônico obtido nos últimos 10 ns de simulação.

Análises na espessura média da bicamada nos últimos 10 ns de simulação revela que a Artepillin C causa um ligeiro afinamento na membrana, diminuindo cerca de 2,2%, passando de 3,56 nm no sistema de DMPC puro para $3,48 \pm 0,14$ nm, quando 10 moléculas de Artepillin C interagem com a bicamada lipídica. Os valores teóricos encontrados da espessura da bicamada lipídica de DMPC em fase fluida, através da simulação computacional, não foram os mesmos revelados pela técnica de SAXS neste mesmo sistema estudado. Na simulação a espessura é calculada pela distância média entre os átomos do grupo fosfato das camadas interna e externa da membrana, enquanto que os valores experimentais levam em conta a posição média da cabeça polar (z_H) e sua largura (σ_H). Apesar da diferença entre os valores das espessuras médias encontradas tanto experimentalmente quanto teoricamente, o efeito de afinamento de cerca de 2,2% da bicamada lipídica pela Artepillin C foi similar em ambos os casos.

Outro aspecto interessante encontrado pela dinâmica molecular relaciona-se ao afinamento não homogêneo da bicamada lipídica, como mostrado pela figura 4.25-C, que representa um mapa de espessura da bicamada lipídica durante os últimos 10 ns de simulação. A região representada pela cor verde revela que a região da bicamada que circunda a Artepillin C tem sua espessura diminuída, contribuindo para o afinamento da espessura da membrana como um todo.

As análises de espessura foram seguidas do estudo da densidade eletrônica das bicamadas lipídicas no período final da simulação, revelando que o posicionamento preferencial da Artepillin C na bicamada lipídica é próximo ao grupo fosfato, afetando as regiões da cabeça polar e também dos carbonos que conferem o início da cadeia de hidrocarboneto. As moléculas são igualmente distribuídas nas camadas interna e externa da membrana, posicionando-se com seus grupos prenilados voltados para a cadeia de hidrocarboneto e o grupo que confere a carga negativa mais próximo à interface água/lipídio, como revelado pelo esquema ilustrativo obtido através da simulação (Figura 4.26).

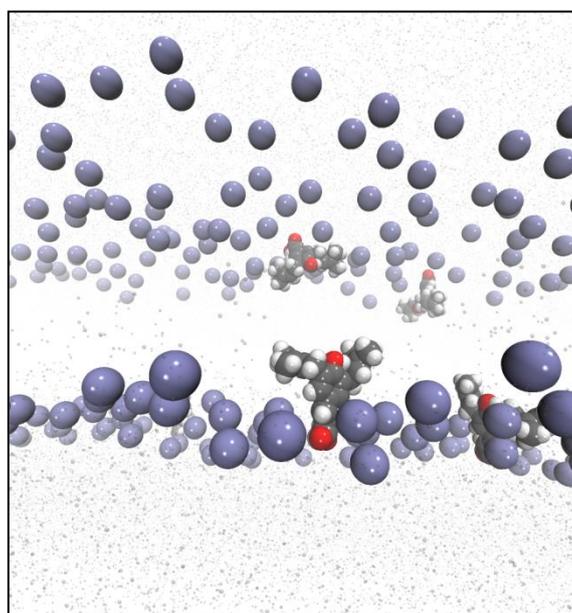


Figura 4.26. Ilustração esquemática de moléculas de Artepillin C inseridas na bicamada lipídica. A carga negativa no oxigênio (vermelho), localizado no ácido carboxílico, posiciona-se voltado para a interface água/lipídio, representada aqui pelos átomos de fosfato (roxo) e água (pontos azuis), enquanto os grupos prenilados estão voltados para a região hidrofóbica.

A terceira análise estrutural investigada é revelada pelo parâmetro de ordem das cadeias de hidrocarboneto das bicamadas de DMPC. Pela Figura 4.25-D é possível observar que a inserção das moléculas de Artepillin C diminui, quantitativamente, o parâmetro de ordem das cadeias hidrofóbicas. Apesar das mudanças estruturais e termotrópicas das membranas de DMPC causadas pela Artepillin C mostradas através de experimentos e da dinâmica molecular, a ligeira alteração no parâmetro de ordem, revelada pelos valores médios equivalentes, infere que estas alterações estruturais afetam minimamente a mobilidade das cadeias acíclicas (Figura 4.25-D), sugerindo que

as alterações que mostram o aumento da área ocupada por lipídio é seguida de pequenas mudanças no parâmetro de ordem. A Figura 4.25-D também revela que as maiores mudanças no parâmetro de ordem ocorrem entre o carbono 5 da cadeia e o carbono 11. Estas mudanças reveladas pelo parâmetro de ordem são contrárias a alguns efeitos observados para outras pequenas moléculas: para o colesterol, álcool e DMSO, em suas interações com membranas modelo constituídas por fosfatidilcolina, o aumento na área ocupada por lipídio implica num aumento do parâmetro de ordem⁸⁹⁻⁹¹.

4.4.2.6. Estudo dos efeitos da Artepillin C em GUVs de DPPC por microscopia confocal de fluorescência

O estudo morfológico de membranas modelo formadas por lipídios saturados foi realizada utilizando-se GUVs de DPPC na fase gel devido ao estudo posterior das vesículas constituídas pela mistura de DOPC, DPPC e colesterol, para investigar se este último composto influencia nos efeitos da Artepillin C nas vesículas. Assim como para o estudo do DOPC, mostrado neste trabalho, as imagens das GUVs foram obtidas utilizando-se a microscopia confocal de fluorescência, inserindo-se a sonda fluorescente DiIC₁₈ no sistema, na razão molar DiIC₁₈/DPPC 1:200 mol/mol. Seguindo-se a mesma metodologia apresentada para o experimento com o DOPC, concentrações de Artepillin C foram adicionadas na suspensão lipídica e o comportamento das GUVs pelo efeito do composto foi observado ao longo do tempo, como representado pela Figura 4.27.

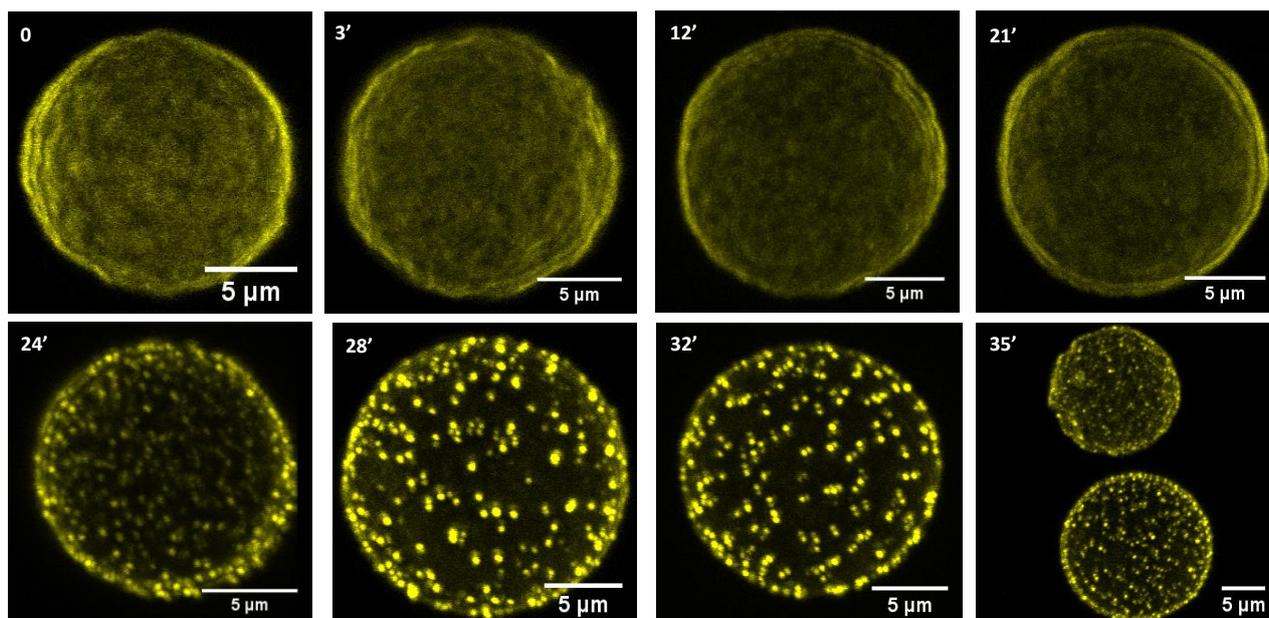


Figura 4.27. Imagens da projeção 3D no plano-Z de GUVs constituídas por DPPC, obtidas por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram coletadas na ausência e na presença de Artepillin C no sistema em função do tempo, a 25 °C.

Não foram observadas alterações morfológicas nas estruturas das vesículas nos primeiros 20 minutos, pela inserção de até $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C (Figura 4.27D - 21 minutos). Neste instante, foi adicionado mais $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e em pouco tempo após esta inserção, como observado no tempo de 24 minutos, houve uma redistribuição na intensidade de fluorescência do DiIC₁₈, resultando em pontos espalhados nas GUVs com maior intensidade. Essas regiões, assim como mostrados nos experimentos realizados para as GUVs de DOPC, podem estar vinculadas a localizações específicas da Artepillin C nas bicamadas, refletindo nos pontos de fluorescência mais intensos pelo acúmulo da sonda fluorescente juntamente aos agregados lipídicos formados. Diferentemente do observado para as vesículas constituídas por DOPC, para o experimento com o DPPC não foram visualizados as liberações de lipídios a partir da membrana principal, indicando apenas a ocorrência da criação dos pontos fluorescentes distribuídos nas vesículas.

4.4.2.7. Extravasamento por microscopia confocal

A Figura 4.28-esquerda mostra a diminuição na intensidade de fluorescência da sonda Alexa Fluor 488 no interior das GUVs constituídas pelo DPPC na fase gel. As curvas são referentes às medidas realizadas na ausência e presença de Artepillin C ao longo do tempo. A intensidade medida, assim como já observado para o experimento realizado com as GUVs de DOPC, é perdida em até 20% devido a processos de *photobleaching* e pela inserção de MeOH na razão volumétrica (1:100 MeOH/água) ao longo das medidas. Para a concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C inserida na suspensão, o efeito do vazamento de fluorescência é bem próximo ao observado para o experimento realizado na ausência do mesmo, indicando que nessa concentração a Artepillin C não induz abertura de poros ou mudanças na permeabilidade de vesículas de DPPC na fase gel. Ainda, como observado através da fluorescência do DiIC₁₈ na bicamada lipídica, essa concentração estudada não afeta a morfologia da vesícula (Figura 4.28-direita). No caso de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C inserido na suspensão, a intensidade do Alexa Fluor 488 no interior da GUV diminui em até 50% ao longo de 30 minutos e a sua estrutura é alterada, indicando que os efeitos do composto bioativo para as vesículas de DPPC ocorrem em altas concentrações.

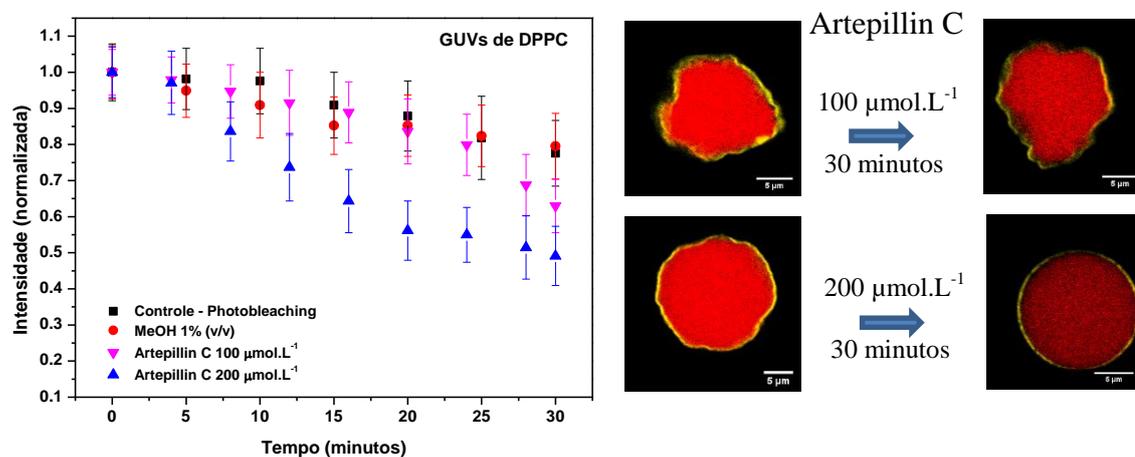


Figura 4.28. Extravasamento da sonda fluorescente Alexa Fluor 488 a partir do interior de GUVs de DPPC por medidas de microscopia confocal. Esquerda: intensidade de fluorescência da sonda no interior das GUVs de DPPC em função do tempo. Direita: imagens coletadas das GUVs de DPPC antes e depois da inserção de 100 e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C na suspensão.

4.4.2.8. Análises da fluidez das bicamadas lipídicas em GUVs de DPPC por medidas de LAURDAN-GP

As medidas analisadas até agora pela técnica de microscopia confocal com excitação 1-fóton, tanto no estudo morfológico da GUV quanto no efeito da criação de poros e mudança na permeabilidade, revelam que das duas concentrações de Artepillin C estudadas, apenas a de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ afeta significativamente suas propriedades. Com base nesse conhecimento, neste tópico estão apresentados os resultados referentes à análise do LAURDAN-GP na GUV de DPPC, na fase gel, na ausência e presença de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. Independente do tempo de análise observa-se, através da Figura 4.29, que o valor $0,53 \pm 0,05$ obtido para a GUV na ausência de Artepillin C altera ligeiramente, aumentando para $0,55 \pm 0,05$ após cinco minutos da inserção do composto, porém, ainda dentro do valor médio encontrado no primeiro instante. Isso também ocorre ao longo dos 20 minutos de medida, tempo em que os efeitos da Artepillin C causados para este sistema já haviam sido observados no estudo realizado pela microscopia confocal de um fóton. Estes resultados indicam que, por mais que sejam observados efeitos relacionados à mudança estrutural das bicamadas ou a alterações em sua permeabilidade, o empacotamento lipídico permanece inalterado, mantendo a rigidez da fase gel da vesícula de DPPC.

$200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Artepillin C

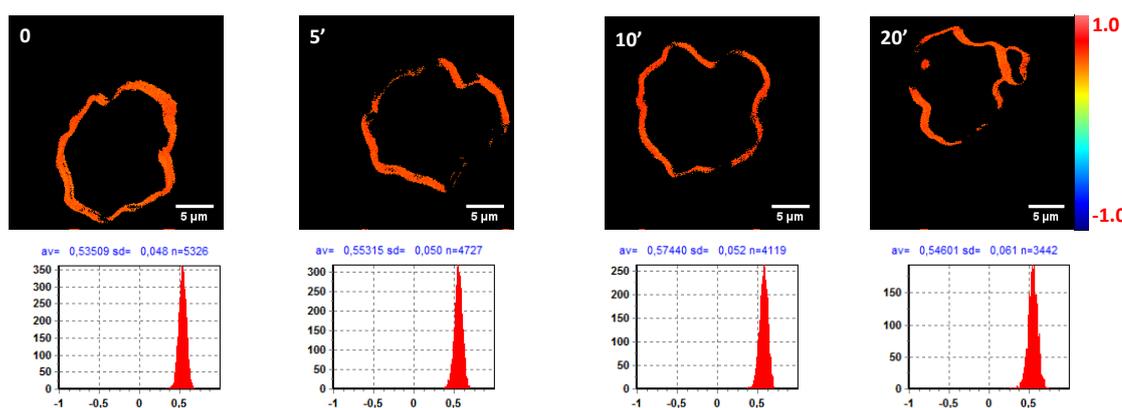


Figura 4.29. Imagens de GUVs constituídas de DPPC, obtidas através da microscopia confocal com excitação 2 fótons ($\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$), utilizando-se a técnica LAURDAN-GP. As imagens são acompanhadas dos histogramas do valor obtido, calculados na ausência e na presença de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C em função do tempo.

4.4.3. Efeitos da Artepillin C em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol

Os tópicos já trazidos nesta seção de resultados, relacionados aos estudos dos efeitos da Artepillin C em vesículas constituídas por lipídios insaturados (DOPC) e saturados em fase fluida e gel (DMPC e DPPC), revelam que este composto interage principalmente com as vesículas fosfolipídicas a partir de certa concentração de formação de agregados, e, como conferido pelos resultados de dinâmica molecular, os efeitos causados ocorrem quando estas moléculas desagregam e afetam principalmente a região mais próxima à interface água/lipídio.

Neste último tópico, os resultados apresentados são referentes à interação da Artepillin C em um sistema de mistura composta pelos fosfolipídios DPPC e DOPC, além do colesterol, resultando num sistema ternário que formam duas fases: líquido-ordenada (l_o) e líquido-desordenada (l_d). Em temperatura ambiente, a razão molar da mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol 23:47:30 resulta numa vesícula cuja as frações de área correspondentes às fases l_o e l_d coexistem e são, respectivamente, em termos de porcentagem, 67,5% e 32,5% da área total, como representado pelo diagrama de fases (Figura 4.30). A principal investigação nesta parte do trabalho é analisar se o composto pertencente à família dos esteróis afeta as propriedades de interação da Artepillin C nestes sistemas fosfolipídicos. Os resultados são mostrados nos subtópicos que seguem.

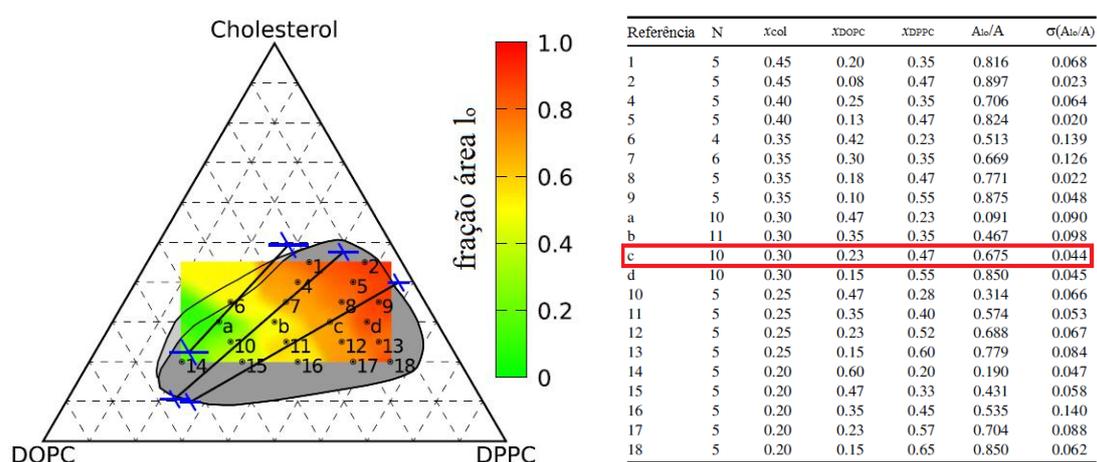


Figura 4.30. Diagrama de fases representando as frações de área da fase l_o dependente da razão molar da mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol. A tabela ao lado representa as referências marcadas no diagrama. A mistura ternária do trabalho corresponde à letra c. Adaptado de [92].

4.4.3.1. Medidas de calorimetria diferencial de varredura em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol

A Figura 4.31 mostra as curvas obtidas para o sistema contendo vesículas formadas pela mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol na razão molar 23:47:30, no intervalo de 5 °C a 55 °C. Devido ao DOPC ter uma transição de fase próxima a -20 °C, é importante ressaltar que neste intervalo de temperatura medido obtemos apenas a transição de fase da fase líquido ordenada, que consiste na mistura DPPC/Colesterol. Esta mistura apresenta o pico de transição próximo a 32,6 °C, na ausência de Artepillin C, indicando que a presença de colesterol reduz a temperatura de transição do DPPC cerca de 9 °C e alarga o pico referente à sua transição, diminuindo a variação de entalpia do processo. Estas alterações refletem na fluidificação dos lipídios de DPPC. A presença de 1 mol% de Artepillin na suspensão causa um pequeno aumento no valor da temperatura de transição sem uma mudança significativa na variação de entalpia (Tabela 4.8). Nas concentrações de 5 e 10 mol% de Artepillin C, a fase l_o das vesículas sofre uma alteração que reflete ainda mais no aumento da temperatura de transição, porém, mantendo-se a variação de entalpia do processo de acordo com o encontrado para as vesículas na ausência de Artepillin C. Ainda, é possível notar que as curvas obtidas para estes sistemas contendo as mais altas concentrações de Artepillin C tem o pico de transição compreendido num intervalo de temperatura maior em comparação com o dado trazido para estas vesículas na ausência do composto, indicando que sua presença auxilia na perda de cooperatividade lipídica desta fase, mesmo mantendo-se constante a entalpia necessária para que ocorra a transição.

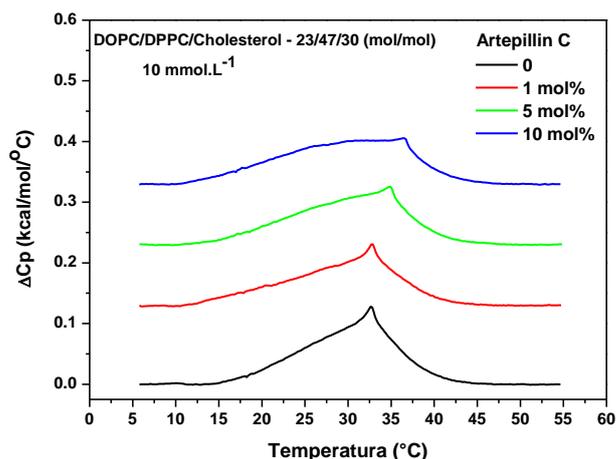


Figura 4.31. Curvas DSC de dispersão lipídica (10 mmol.L^{-1}) de vesículas multilamelares de DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), na ausência e presença de concentrações de Artepillin C nas razões molares Artepillin C:lipídio 1:100, 5:100 e 10:100. O intervalo de temperatura medido para o sistema varia de $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 4.8. Parâmetros termodinâmicos obtidos através da análise das curvas de DSC, medidas para a suspensão de vesículas multilamelares formadas pela mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), na ausência e presença de concentrações de Artepillin C. T_C = temperatura da transição principal; ΔH_C = variação de entalpia correspondente ao pico de transição principal

DOPC/DPPC/Colesterol (23/47/30 mol/mol - 10 mmol.L^{-1})		
Artepillin C (mol%)	T_C ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_C (Kcal/mol)
0	32,6	$1,4 \pm 0,3$
1	32,6	$1,2 \pm 0,4$
5	34,9	$1,3 \pm 0,3$
10	36,5	$1,4 \pm 0,3$

4.4.3.2. Investigação nas mudanças estruturais das bicamadas lipídicas em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol

Medidas de difração de raio-X foram realizadas para analisar possíveis alterações nas membranas constituídas pela mistura ternária, causadas pela Artepillin C. Assim como já observado principalmente para as suspensões contendo vesículas saturadas, a presença do composto em suspensões de vesículas formadas pela mistura ternária também auxilia no aumento do número de vesículas unilamelares no sistema,

refletindo no desaparecimento do pico pronunciado próximo a $0,2 \text{ \AA}$ no diagrama de SAXS obtido para a suspensão na ausência de Artepillin C (Figura 4.32-A). O parâmetro referente à porcentagem de vesículas unilamelares no sistema, como mostrado na Tabela 4.9, mostra que a presença de Artepillin C influenciou num aumento de 52% para 87% destas vesículas no sistema, mais que a quantidade formada para a suspensão contendo vesículas de DOPC e por volta de 10% menos que a porcentagem obtida para bicamadas formadas pelos lipídios saturados, tanto na fase gel quanto fluida. Levando em conta que a repulsão eletrostática entre as camadas destas estruturas oligolamelares dependem do posicionamento da Artepillin C nas bicamadas lipídicas, podemos inferir que a presença de colesterol na região do DPPC afeta a sua fluidez e permite que a Artepillin C tenha acesso a regiões mais abaixo da interface água/lipídio, diminuindo o potencial eletrostático que auxilia na formação espontânea de vesículas unilamelares. Ainda, a possível presença de colesterol na fase l_d pode criar um efeito de enrijecimento do DOPC⁹³, impedindo que a Artepillin C acesse regiões abaixo da cabeça polar como mostrado na análise da interação do composto com as vesículas formadas apenas por DOPC. Medidas complementares de SAXS para sistemas contendo vesículas multilamelares da mistura ternária foram realizadas para investigar a influência do composto bioativo na formação espontânea de vesículas unilamelares (Figura 4.32-B). De acordo com os diagramas, a presença do composto auxilia no pronunciamento discreto da curva que reflete a presença de vesículas unilamelares, corroborando com o que foi encontrado nas medidas com as suspensões extrusadas.

Com relação às propriedades estruturais das membranas, os parâmetros de ajuste obtidos através do ajuste do perfil de densidade eletrônica das vesículas (Figura 4.33) indicam que a Artepillin C altera o perfil de densidade eletrônica das vesículas, afetando minimamente a espessura, como observado pelos valores médios calculados de d_B (Tabela 4.9). Estes resultados inferem que o colesterol influencia na ação da Artepillin C, impedindo que a ligeira alteração na espessura da membrana não ocorra nesta mistura ternária.

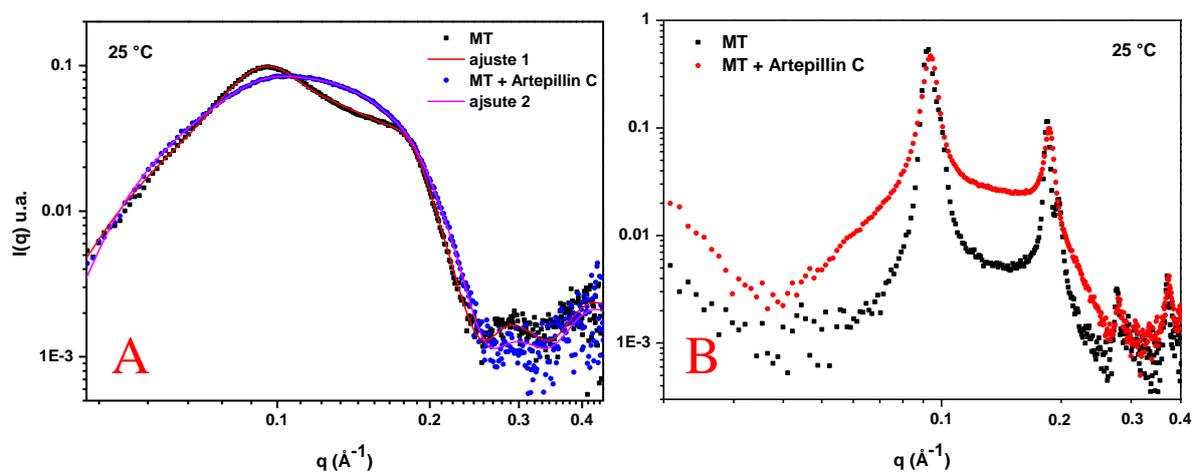


Figura 4.32. Diagramas de SAXS de vesículas extrusadas (A) e não-extrusadas (B), compostas da mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol, na razão molar 23:47:30, na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/lipídio 1:10), a 25 °C.

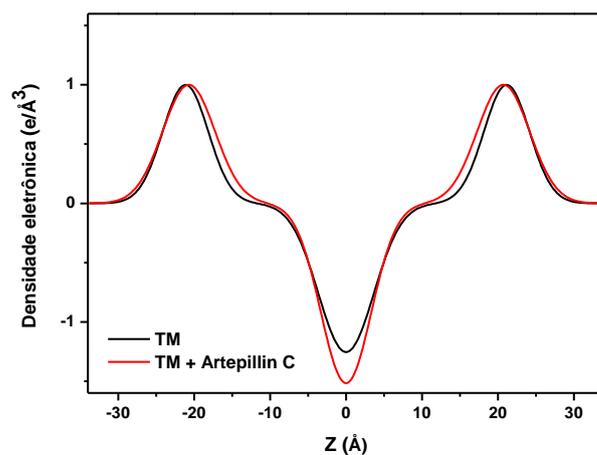


Figura 4.33. Perfil da densidade eletrônica de vesículas constituídas da mistura DOPC/DPPC/Colesterol na razão 23:47:30, na ausência e presença de Artepillin C (razão molar Artepillin C/lipídio 1:10), a 25 °C.

Tabela 4.9. Parâmetros de ajuste dos diagramas de SAXS obtidos para medidas de vesículas formadas por DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), na ausência e presença de Artepillin C, a 25 °C. *espaçamento-d*: distância compreendida entre espessura da bicamada lipídica e camada de água entre as lamelas, para as vesículas oligolamelares; z_H : centro da distribuição gaussiana referente à cabeça polar dos lipídios; σ_H : distribuição média de z_H ; ρ_C : amplitude da gaussiana relativa à σ_H ; σ_C : distribuição média da região das cadeias acílicas; %ULVs: porcentagem de vesículas unilamelares no sistema; d_B : espessura calculada das bicamadas lipídicas

	espaçamento-d	z_H	σ_H	ρ_C	σ_C	% ULVs	d_B (Å)
DOPC/DPPC/Col	65,8±0,1	19,1±0,1	3,0±0,1	-0,90±0,05	4,2±0,3	52	50,2±0,4
DOPC/DPPC/Col +Artepillin C	71,4±0,5	19,2 ± 0,1	2,4±0,3	-0,97±0,05	3,1±0,3	87	48,0±1,0

4.4.3.3. Visualização dos efeitos em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol por microscopia confocal de fluorescência

Vesículas constituídas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol) foram visualizadas através da microscopia confocal utilizando-se, como para os outros sistemas aqui estudados, a sonda fluorescente DiIC₁₈, que particiona-se preferencialmente com a fase l_d nessa mistura⁹³. A Figura 4.34 mostra a projeção 3D da GUV na suspensão, sendo a fase l_d representada pela região com maior intensidade de fluorescência e com menor área de ocupação na GUV. Os efeitos da Artepillin C nas vesículas foram observados ao longo do tempo, em duas condições: na primeira, pela adição de alíquotas do composto aumentando sua concentração ao longo do tempo, partindo de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e atingindo 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, num período de aproximadamente 90 minutos de observação (Figura 4.34). Na segunda condição, adicionando-se 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ diretamente na suspensão lipídica (Figura 4.35).

Não foram observadas alterações morfológicas nas GUVs a partir da adição de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C nos primeiros 20 minutos. Após este período, inserindo-se mais 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto na suspensão, totalizando 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, a separação de fase resultante da mistura lipídica foi desfeita após alguns minutos de observação, resultando-se na criação de regiões constituídas de DOPC distribuídas pela fase l_o (Figura 4.34 – 30 minutos).

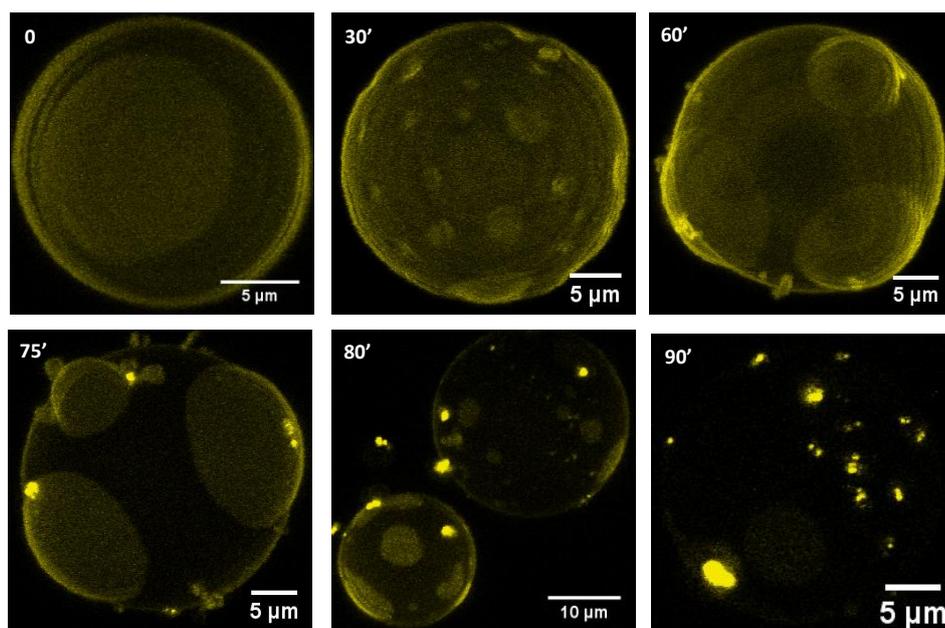


Figura 4.34. Imagens da projeção 3D de GUVs constituídas pela mistura DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), obtidas por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram coletadas na ausência e na presença de Artepillin C no sistema em função do tempo, a 25 °C.

Quando o tempo de observação atingiu 60 minutos, ou seja, 40 minutos após a adição de $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C na suspensão, efeitos relacionados à criação de excesso de área na GUV pôde ser visualizado (Figura 4.34 – 60 minutos). Após 15 minutos da observação de alterações na curvatura média da vesícula, foram adicionados mais $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C, totalizando $160 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto na amostra. Nesta concentração, verificamos que efeitos similares aos já observados para os outros sistemas estudados foram obtidos: regiões referentes a agregados lipídicos, representados por pontos distribuídos na GUV com alta intensidade de fluorescência, foram criados concomitantemente à perda significativa na intensidade de fluorescência da região líquido-ordenada (Figura 4.34 – 75 minutos). Após atingir a concentração de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin no sistema, ambas as regiões referentes às fases l_o e l_d sofreram perda na intensidade de fluorescência, seguido da criação de mais agregados lipídicos na vesícula (Figura 4.34 – 80 e 90 minutos).

Devido ao longo tempo de observação necessário para observar os efeitos causados pela Artepillin C nas vesículas constituídas pela mistura ternária, a segunda condição experimental imposta para estas medidas foi a análise da interação de 200

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C inserido diretamente nas vesículas, investigando se os mesmos efeitos observados ao longo dos 60 minutos são visualizados em um tempo menor, como representado pela Figura 4.35.

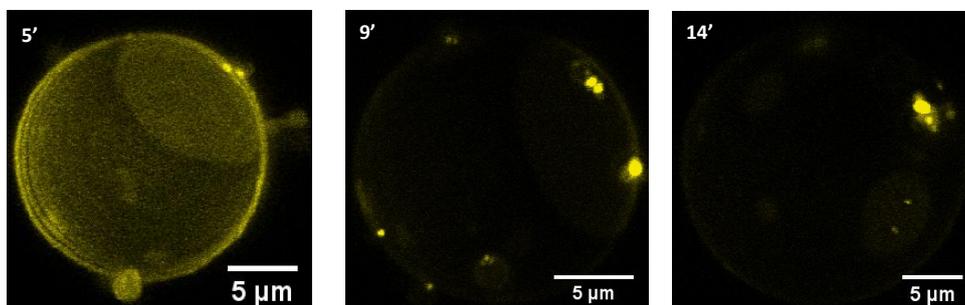


Figura 4.35. Imagens da projeção 3D de GUVs constituídas pela mistura DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), obtidas por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram coletadas na ausência e na presença de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C no sistema em função do tempo, a 25°C .

A primeira representação nesta série de imagens refere-se à projeção da GUV no plano-Z cinco minutos após o momento em que $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C foi inserido na suspensão lipídica (Figura 4.35 – 5 minutos). A separação de fases indicando a coexistência l_o/l_d pode ser observada com o ligeiro aparecimento de um ponto com alta intensidade de fluorescência na região l_d . Em nove minutos, a intensidade de fluorescência em ambas as fases diminuiu seguida do surgimento de mais pontos indicando a presença de agregados lipídicos distribuídos principalmente na fase l_d (Figura 4.35 – 9 minutos). Nenhuma diferença foi notada a partir do tempo de 14 minutos, onde os mesmos efeitos mostrados no tempo de 9 minutos seguiram com a criação de regiões constituídas de DOPC distribuídas pela fase l_o (Figura 4.35 – 14 minutos). Estes dados indicam que os efeitos causados pela Artepillin C nas vesículas constituídas pela mistura ternária são potencializados de acordo com o aumento da concentração.

4.4.3.4. Extravasamento por microscopia confocal

A análise do extravasamento da sonda fluorescente Alexa Fluor 488 a partir do interior das GUVs formadas pela mistura DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol) indica que, por mais que sejam observadas alterações morfológicas nas vesículas a partir da interação destas vesículas com a Artepillin C, estas não sofrem mudanças relacionadas às alterações em suas permeabilidades ou aberturas de poros. A intensidade de fluorescência da sonda Alexa Fluor 488 manteve-se acima de 80% dentro das GUVs durante todo o tempo de observação, tanto para os experimentos realizados na ausência ou na presença da Artepillin C (Figura 4.36), indicando que esta ligeira diminuição na intensidade de fluorescência pode ter ocorrido por efeitos de *photobleaching* e pela inserção de metanol na suspensão, na razão 1:100 MeOH:água (v/v). Este resultado obtido, diferentemente do encontrado para as análises de vesículas constituídas apenas por DPPC ou DOPC, indica que presença do colesterol na membrana auxilia na manutenção da sua permeabilidade, mesmo que estas bicamadas lipídicas sofram alterações morfológicas na presença da Artepillin C. As diferenças nos resultados encontradas para os experimentos de extravasamento, na ausência e presença do colesterol, permitem inferir que o modo de ação da Artepillin C contra o fitopatógeno *P. aphanidermatum* pode influenciar nas mudanças estruturais das membranas e na desintegração citoplasmática dos micélios e esporos do fitopatógeno. Contrariamente, já foi identificado que outros compostos bioativos não inibem a difusão de patógenos que possuem esteróis na composição de suas membranas citoplasmáticas, corroborando com o fato de que sua ausência influencia na atividade destes compostos, alterando a permeabilidade e desintegrando a membrana citoplasmática⁵⁰.

Ainda, as imagens coletadas da região equatorial das vesículas indicam o mesmo observado nas análises apresentadas no subtópico anterior: a sonda DiIC₁₈ inicialmente distribuída na bicamada lipídica perde a intensidade de fluorescência após a inserção de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C no sistema, restando apenas alguns pontos de alta intensidade fluorescente da sonda.

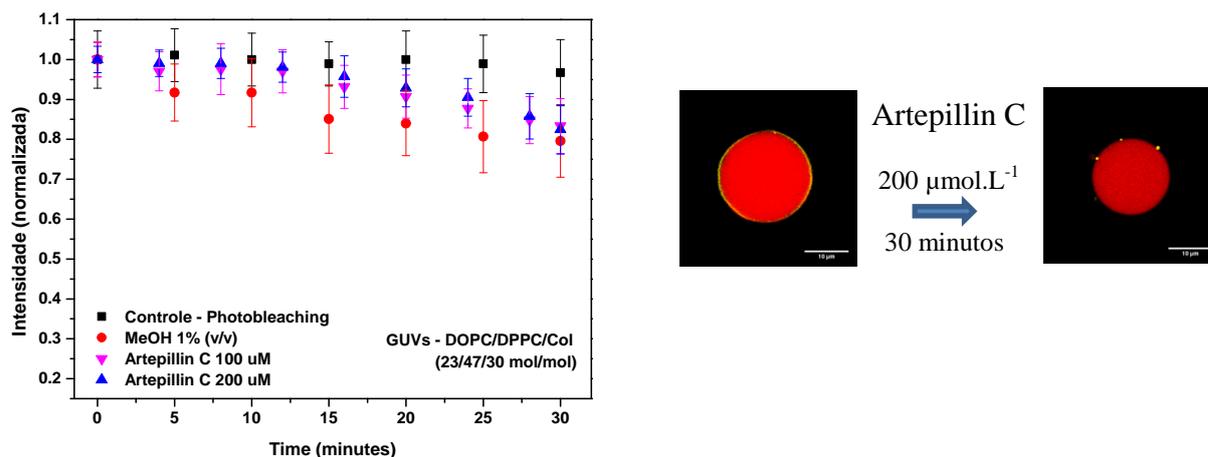


Figura 4.36. Extravasamento das sonda fluorescente Alexa Fluor 488 a partir do interior de GUVs formadas pela mistura DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol) por medidas de microscopia confocal. Esquerda: intensidade de fluorescência da sonda no interior das GUVs em função do tempo. Direita: imagens coletadas das GUVs constituídas pela mistura ternária antes e depois da inserção $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C na suspensão.

4.4.3.5. Análises da fluidez das bicamadas lipídicas em vesículas de mistura ternária DOPC/DPPC/Colesterol por medidas de LAURDAN-GP

A última análise dos efeitos de Artepillin C nas vesículas constituídas pela mistura ternária estudada neste trabalho é relacionada à mudança na fluidez através da técnica de LAURDAN-GP, inserindo-se duas diferentes concentrações do composto bioativo na suspensão lipídica: 100 e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os efeitos são observados nos primeiros minutos após a inserção da Artepillin C, mesmo em menor concentração: O valor de LAURDAN-GP calculado para a região da GUV referente à fase l_o , aumenta de $0,552 \pm 0,038$ para $0,635 \pm 0,056$ e $0,633 \pm 0,038$ para 100 e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C na suspensão, respectivamente, indicando que sua interação com as vesículas causa um enrijecimento lipídico desta fase (Figura 4.37). A intensidade de fluorescência do LAURDAN na fase l_d foi diminuída ao longo do tempo de observação para ambas as concentrações de Artepillin C nas suspensões lipídicas, principalmente para a amostra contendo $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, impossibilitando o cálculo de LAURDAN-GP para esta fase, nesta concentração. Na análise da interação de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C, essa diminuição na intensidade da fluorescência relacionada à fase l_d contribuiu para um aumento na incerteza no valor do LAURDAN-GP calculado, enquanto para a

suspensão contendo $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto bioativo, apenas foi possível obter os valores de LAURDAN-GP em pontos de alta intensidade de fluorescência criados e distribuídos nas GUVs, encontrados fora da região equatorial das GUVs. Nestas duas situações, os valores de LAURDAN-GP sofreram um aumento referente ao valor inicial encontrado na ausência de Artepillin C, inferindo que a região l_d sofre um aumento em sua rigidez a partir da interação do composto bioativo e que os pontos de alta intensidade de fluorescência refletem uma restrição no movimento lipídico devido à formação de agregados lipídicos, resultando no aumento do valor de LAURDAN-GP nestes pontos.

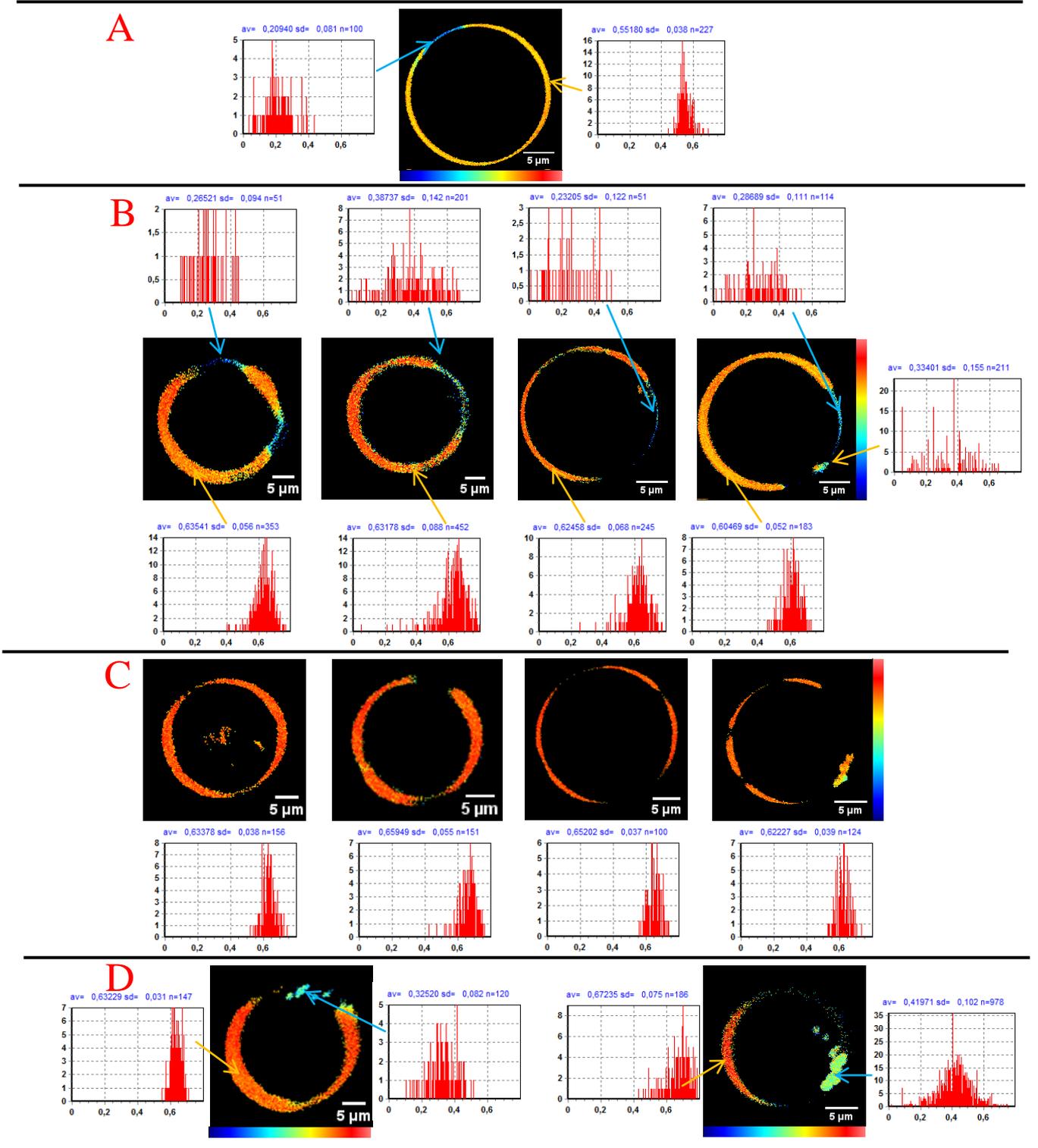


Figura 4.37. GUVs constituídas de DOPC/DPPC/Colesterol (23:47:30 mol/mol), obtidas através da técnica LAURDAN-GP. A) Valores de LAURDAN-GP calculados nas fases I_o/I_d ; B) GUVs obtidas em função do tempo, após interação de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. C) GUVs obtidas em função do tempo, após interação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C. D) Imagens de GUVs coletadas em plano focal diferente da região equatorial, após interação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Artepillin C.

5. CONCLUSÕES

A própolis verde, coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* na região do cerrado brasileiro possui atividades contra o fitopatógeno da espécie *Pythium aphanidermatum*, principalmente devido à presença da classe de compostos derivados do ácido cinâmico, revelado a partir dos ensaios bioguiados com o auxílio das técnicas cromatográficas e da espectrometria de massa empregadas neste estudo. Dentre os compostos pertencentes à fração bioativa, a Artepillin C foi identificada sendo o composto majoritário nestes produtos e bioativa contra o fitopatógeno em estudo, revelado através de testes realizados com este composto isolado numa faixa de concentração.

Análises dos espectros de absorção óptica da Artepillin C em solução contendo água milli-Q, tampão fosfato e metanol revelaram que as interações físico-químicas no sistema formado para as soluções de Artepillin C em metanol e em tampão permanecem inalteradas mesmo com o aumento de sua concentração no sistema, indicando uma manutenção em sua forma monomérica, enquanto que o sistema contendo água milli-Q como solvente revela o surgimento de agregados a partir da concentração de 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da Artepillin C.

Em relação aos experimentos realizados para investigar a interação da Artepillin C com os modelos miméticos de membranas biológicas, podemos concluir que o caráter anfifílico do composto, elevado pela presença dos grupos prenilados ligados ao ácido cinâmico, favorecem a inserção do composto nas vesículas, principalmente em seu estado agregado. Estas conclusões puderam ser inferidas devido às alterações nas propriedades das bicamadas lipídicas na presença da Artepillin C, podendo causar, especificamente para o caso de fitopatógenos como o *P. aphanidermatum*, perdas funcionais das proteínas de membranas, liberação de eletrólitos intracelulares e desintegração citoplasmática dos micélios e esporos.

Ainda, as diferentes composições lipídicas nas vesículas influenciam no modo de interação do composto com as bicamadas e consequentes alterações em suas estruturas, principalmente na presença do colesterol, que auxilia na manutenção da

permeabilidade da bicamada lipídica, que pode contribuir para a integridade do conteúdo citoplasmático da célula. De forma geral, a Artepillin C tende a:

i) permanecer próximo à região da interface água/lipídio, na região polar da membrana, com a carga negativa voltada para a água e orientação na direção normal à superfície;

ii) diminuir ligeiramente a espessura das bicamadas, principalmente quando estas são formadas por lipídios saturados;

iii) causar mudanças na curvatura espontânea das vesículas a partir de uma certa concentração, podendo resultar na liberação dos lipídios em excesso e na criação de regiões de alta densidade lipídica na superfície das vesículas;

iv) alterar a fluidez das vesículas, sobretudo causando um aumento em vesículas constituídas de fosfolipídios insaturados e da mistura ternária DPPC/DOPC/Colesterol na razão molar 23:47:30.

v) acarretar o aumento da permeabilidade das bicamadas lipídicas formadas pelos lipídios saturados e insaturados, com exceção das vesículas formadas pela coexistência de fases l_o e l_d , devido à presença do colesterol.

Estas informações são relevantes para entender os efeitos da Artepillin C em membranas modelo e ganhar conhecimentos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na atividade biológica do composto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruiz, M. D. P., Ordóñez, R. M., Isla, M. I. & Sayago, J. E. Activity and mode of action of *Parastrephia lepidophylla* ethanolic extracts on phytopathogenic fungus strains of lemon fruit from Argentine Northwest. *Postharvest Biol. Technol.* **114**, 62–68 (2016).
2. Naveed, R. *et al.* Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**, 265 (2013).
3. Acero, F. J. F. *et al.* Development of proteomics-based fungicides: New strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 795–816 (2011).
4. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. *WHO Publ.* 1–119 (2014).
5. Van Beelen, P. & Doelman, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* **34**, 455–499 (1997).
6. Postma, J., Clematis, F., Nijhuis, E. H. & Someus, E. Efficacy of four phosphate-mobilizing bacteria applied with an animal bone charcoal formulation in controlling *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici* in tomato. *Biol. Control* **67**, 284–291 (2013).
7. Postma, J., Willemsen-de Klein, M. J. & van Elsas, J. D. Effect of the Indigenous Microflora on the Development of Root and Crown Rot Caused by *Pythium aphanidermatum* in Cucumber Grown on Rockwool. *Phytopathology* **90**, 125–133 (2000).
8. Owen-Going, N., Sutton, J. C. & Grodzinski, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. *Can. J. Plant Pathol.* **25**, 155–167 (2003).
9. Garibaldi, A., Gilardi, G., Ortu, G. & Gullino, M. L. First Report of Damping-off Caused by *Pythium aphanidermatum* on Leaf Beet (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) in Italy. *Plant Dis.* **97**, 292 (2013).
10. Strange, R. N. & Scott, P. R. Plant disease: A threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 83–116 (2005).
11. Cheng, C.-S. *et al.* Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. *Biochemistry* **43**, 13628–36 (2004).
12. Bonvehí, J. S. & Gutiérrez, A. L. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1351–1358 (2012).
13. Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N. & Calder, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* **152**, 239–246 (1997).

14. Campos, J. F. *et al.* and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2015, 296186 (2015).
15. Soares, A. E. E. Própolis - um novo olhar: do campo ao interior da colmeia. *Mensagem Doce* (2012). Disponível em <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/119/artigo.htm>>. Acesso em 19 de janeiro de 2016.
16. de Sousa, J. P. B. *et al.* Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated *Baccharis dracunculifolia*. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2011**, 464289 (2011).
17. Sawaya, A. C. H. F., Barbosa da Silva Cunha, I. & Marcucci, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem. Cent. J.* **5**, 27 (2011).
18. Carvalho, A. A. *et al.* In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chem.* **126**, 1239–1245 (2011).
19. Yong K. Park, Severino M. Alencar, C. L. A. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2502–2506 (2002).
20. Machado, B. A. S. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One* **11**, e0145954 (2016).
21. Menezes, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol* **72**, 405–411 (2005).
22. Shimizu, K., Ashida, H., Matsuura, Y. & Kanazawa, K. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. *Arch. Biochem. Biophys.* **424**, 181–188 (2004).
23. Paulino, N. *et al.* Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artemillin C, in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.* **587**, 296–301 (2008).
24. Kimoto, T. *et al.* Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect. Prev.* **22**, 506–515 (1998).
25. Ota, A., Abramovič, H., Abram, V. & Poklar Ulrih, N. Interactions of p-coumaric, caffeic and ferulic acids and their styrenes with model lipid membranes. *Food Chem.* **125**, 1256–1261 (2011).
26. Scheidt, H. a., Pampel, A., Nissler, L., Gebhardt, R. & Huster, D. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1663**, 97–107 (2004).
27. Teixeira, S. *et al.* Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 1099–1108 (2005).
28. Alberts, B. *et al.* Biologia molecular da célula. *Biol. Mol. da Celula* 1269–1602 (2008).
29. Kučerka, N., Nieh, M. P. & Katsaras, J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 2761–2771 (2011).

30. Basso, L. G. M., Rodrigues, R. Z., Naal, R. M. Z. G. & Costa-Filho, A. J. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 55–64 (2011).
31. Ambroggio, E. E. & Bagatolli, L. A. Giant Unilamellar Vesicles, Fluorescence Microscopy and Lipid – Peptide Interactions. *Biochemistry* 169–192 (2009).
32. Sforcin, J. M. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 1–14 (2007).
33. de Sousa, J. P. B. *et al.* A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **30**, 2656–2665 (2007).
34. Magalha, L. G. *et al.* Antiprotozoal , Schistosomicidal , and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **7**, 993–1001 (2010).
35. de Sousa, J. P. B. Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida. Ribeirão Preto: FCFRP, 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
36. Munro, E. Brazilian Corn Conundrum - Huge Corn Production Potential Exists if Hurdles Can be Cleared. (2012). Disponível em <<http://cornandsoybeandigest.com/corn/brazilian-corn-conundrum-huge-corn-production-potential-exists-if-hurdles-can-be-cleared>>. Acesso em 02 de fevereiro de 2016.
37. Spring, O. *Advances in Botanical Research* **31**, (Elsevier, 2000).
38. Pereira, R. J. & Cardoso, M. D. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *J. Biotechnol. Biodivers.* **3**, 146–152 (2012).
39. Paviani, L. C. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. *Brazilian J. Chem. Eng.* **29**, 243–251 (2012).
40. Ahn, M.-R. *et al.* Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett.* **252**, 235–243 (2007).
41. Aga, H., Shibuya, T. & Sugimoto, T. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 945–946 (1994).
42. Sforcin, J. M. & Bankova, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* **133**, 253–260 (2011).
43. Dos Santos Pereira, a, Seixas, F. R. M. S. & Neto, F. R. D. Propolis: 100 years of research and future perspectives. *Quím. Nova* **25**, 321–326 (2002).
44. Burdock, G. a. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* **36**, 347–363 (1998).
45. WAGH, V. & BORKAR, R. Indian Propolis: a Potential Natural Antimicrobial and Antifungal Agent. *Ijppsjournal.Com* **4**, (2012).

46. Breyer, E. U. *Abelhas e saúde*. (Faculdade Estadual de Filosofia Ciências e Letras, 1980).
47. Santurio, J. M., Alves, S. H., Pereira, D. B. & Argenta, J. S. Pitiose : uma micose emergente. *Oceania* **34**, 1–14 (2006).
48. Latijnhouwers, M., de Wit, P. J. G. M. & Govers, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol.* **11**, 462–469 (2003).
49. Georgopapadakou, N. H. & Walsh, T. J. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**, 371–373 (1994).
50. Avis, T. J. & Bélanger, R. R. Specificity and Mode of Action of the Antifungal Fatty Acid cis -9-Heptadecenoic Acid Produced by *Pseudozyma flocculosa* Specificity and Mode of Action of the Antifungal Fatty Acid cis -9-Heptadecenoic Acid Produced by *Pseudozyma flocculosa*. **67**, 956–960 (2001).
51. Bahramisharif, A., Lamprecht, S. C., Spies, C. F. J., Botha, W. J. & McLeod, A. *Pythium cederbergense* sp. nov. and related taxa from *Pythium* clade G associated with the South African indigenous plant *Aspalathus linearis* (rooibos). *Mycologia* **105**, 1174–89 (2013).
52. Ben-Yephet, Y. & Nelson, E. B. Differential suppression of damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare*, and *P. myriotylum* in composts at different temperatures. *Plant Dis.* **83**, 356–360 (1999).
53. Calvano, T. P. *et al.* *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3710–3 (2011).
54. van West, P., Appiah, A. A. & Gow, N. A. R. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**, 99–113 (2003).
55. Tellier, A. & Brown, J. K. M. Polymorphism in multilocus host parasite coevolutionary interactions. *Genetics* **177**, 1777–90 (2007).
56. Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes. Thermal Biophysics of Membranes* (2007). doi:10.1002/9783527611591
57. Sezgin, E. & Schwille, P. Model membrane platforms to study protein-membrane interactions. *Mol. Membr. Biol.* **29**, 144–154 (2012).
58. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (80-.)*. **175**, 720–731 (1972).
59. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–72 (1997).
60. Edidin, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414–418 (2003).
61. Angelova, M. I. & Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81**, 303 (1986).
62. Sudbrack, T. P. Fotossensibilização de Vesículas Lipídicas Gigantes. São Paulo: Instituto de Física, 2011. 140 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

63. Jelesarov, I. & Bosshard, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **12**, 3–18 (1999).
64. Pabst, G., Rappolt, M., Amenitsch, H. & Laggner, P. Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: Full q -range fitting with high quality x-ray data. *Phys. Rev. E* **62**, 4000–4009 (2000).
65. Pabst, G. *et al.* Structural analysis of weakly ordered membrane stacks. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1378–1388 (2003).
66. Pabst, G. *et al.* Membrane thickening by the antimicrobial peptide PGLa. *Biophys. J.* **95**, 5779–5788 (2008).
67. Kaganer, V., Möhwald, H. & Dutta, P. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. *Rev. Mod. Phys.* **71**, 779–819 (1999).
68. Shaw, D. J. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry. Introduction to Colloid and Surface Chemistry* (Elsevier, 1992). doi:10.1016/B978-0-08-050910-5.50006-2
69. Disponível em <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/livecellimaging/techniques.html>>. Acesso em 25 de janeiro de 2016.
70. Sanchez, S. a, Tricerri, M. a, Gunther, G. & Gratton, E. Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope. *Mod. Res. Educ. Top. Microsc. Appl. Phys. Sci. Formatex Res. Center, Badajoz, Spain* 1007–1014 (2007).
71. Sanchez, S. a., Tricerri, M. a. & Gratton, E. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 7314–7319 (2012).
72. De Vequi-Suplicy, C. C., Benatti, C. R. & Lamy, M. T. Laurdan in fluid bilayers: Position and structural sensitivity. *J. Fluoresc.* **16**, 431–439 (2006).
73. Bagatolli, L. a. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 1541–1556 (2006).
74. Brewer, J., Bernardino de la Serna, J., Wagner, K. & Bagatolli, L. a. Multiphoton excitation fluorescence microscopy in planar membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 1301–8 (2010).
75. Kučerka, N., Nieh, M.-P. & Katsaras, J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 2761–71 (2011).
76. Vanommeslaeghe, K. *et al.* CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* **31**, 671–690 (2010).
77. Yu, W., He, X., Vanommeslaeghe, K. & MacKerell, A. D. Extension of the CHARMM General Force Field to sulfonyl-containing compounds and its utility in biomolecular simulations. *J. Comput. Chem.* **33**, 2451–68 (2012).

78. Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G. & Martínez, J. M. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **30**, 2157–2164 (2009).
79. Klauda, J. J. B. *et al.* Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B* **114**, 7830–43 (2010).
80. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
81. Romo, T.D., Grossfield, A. LOOS: An extensible platform for the structural analysis of simulations. in *31st Annual International Conference of the IEEE EMBS* 2332–2335 (2009).
82. Riske, K. a., Amaral, L. Q. & Lamy-Freund, M. T. Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1511**, 297–308 (2001).
83. Ristori, S., Di Cola, E., Lunghi, C., Richichi, B. & Nativi, C. Structural study of liposomes loaded with a GM3 lactone analogue for the targeting of tumor epitopes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 2518–2525 (2009).
84. Yu, J. Q. & Matsui, Y. Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. *J. Chem. Ecol.* **23**, 817–827 (1997).
85. Pabst, G., Katsaras, J., Raghunathan, V. A. & Rappolt, M. Structure and interactions in the anomalous swelling regime of phospholipid bilayers. *Langmuir* **19**, 1716–1722 (2003).
86. Wesolowska, O., Gąsiorowska, J., Petrus, J., Czarnik-Matusiewicz, B. & Michalak, K. Interaction of prenylated chalcones and flavanones from common hop with phosphatidylcholine model membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 173–184 (2014).
87. Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Viras, K., Wagner, M. & Demetzos, C. A DSC and Raman spectroscopy study on the effect of PAMAM dendrimer on DPPC model lipid membranes. *Int. J. Pharm.* **318**, 118–123 (2006).
88. Heimburg, T. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys. J.* **78**, 1154–1165 (2000).
89. Vermeer, L. S., de Groot, B. L., Réat, V., Milon, A. & Czaplicki, J. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with 2H NMR experiments. *Eur. Biophys. J.* **36**, 919–31 (2007).
90. Lee, B. W. *et al.* Structural effects of small molecules on phospholipid bilayers investigated by molecular simulations. *Fluid Phase Equilib.* **228-229**, 135–140 (2005).
91. Khajeh, A. & Modarress, H. Effect of cholesterol on behavior of 5-fluorouracil (5-FU) in a DMPC lipid bilayer, a molecular dynamics study. *Biophys. Chem.* **187-188**, 43–50 (2014).

92. Husen, P., Arriaga, L. R., Monroy, F., Ipsen, J. H. & Bagatolli, L. a. Morphometric image analysis of giant vesicles: A new tool for quantitative thermodynamics studies of phase separation in lipid membranes. *Biophys. J.* **103**, 2304–2310 (2012).
93. Scherfeld, D., Kahya, N. & Schwille, P. Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol. *Biophys. J.* **85**, 3758–3768 (2003).