ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE MODELOS DE MEMBRANAS CELULARES E DERIVADOS DE CALIXARENOS E PORFIRÍNICOS PELA TÉCNICA LANGMUIR-BLODGET

Milena P. da Luz (PIBIC/CNPq), Ellen C. Wrobel, Karen Wohnrath (Orientador)
e-mail: karen.woh@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Ciências Exatas e da Terra e Química

Palavras-chave: Calixarenos, modelos de membrana celular, monocamadas de Langmuir, atividade antifúngica, citotoxicidade.

Resumo

Os calixarenos são compostos macrocíclicos, os quais, em geral são biocompatíveis e não-citotóxicos, tal como o derivado de calixareno *para-terc*-butilcalix[4]areno (Calix4) que é eficiente contra os fungos *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Baseado nessa informação, neste trabalho estudou-se a interação do Calix4 com modelos de membrana celular a partir de filmes de Langmuir de fosfolipídios, cujo meio é eficaz de se compreender o mecanismo de ação de drogas antifúngicas e o efeito em membranas de células saudáveis. Em vista disso, avaliou-se a interação do Calix4 com o lipídio 1,2-dipalmitoil-snglicero-3-fosfocolina (DPPC) e ergosterol (Erg), os quais são compostos majoritários em membranas celulares de fungos, pelas isotermas de pressão e potencial *vs* área por molécula, assim como medidas de compressibilidade. Dos cálculos termodinâmicos inferiu-se que o mecanismo de ação deste do Calix4 pode estar relacionado com a interação deste com a membrana celular do fungo.

Introdução

Os fungos são alguns dos patógenos mais negligenciados em termos de descoberta de novas drogas. A paracoccidiodomicose, uma micose sistêmica causada pelos fungos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* é endêmica da América do Sul. O uso frequente e indiscriminado de compostos antifúngicos comerciais levou ao surgimento de fungos resistentes a tratamentos usados atualmente, sendo que estes apresentam citotoxicidade razoável frente às células saudáveis, e eficácia limitada. Então, o desenvolvimento de novos antifúngicos de amplo espectro de ação, que iniba o crescimento de espécies é necessário [1]. Em estudos de Oliveira e colaboradores o derivado de calixareno *para-terc*-butilcalix[4]areno (Calix4) foi o composto mais eficiente contra os fungos *P. brasiliensis e P. lutzii*, e o que exibiu menor toxicidade para células de mamíferos, dentre os derivados avaliados, sendo estes os *p-terc*-butilcalix[n]arenos, designados por CX1, CX3 e CX5 (n = 4, 6 e 8 unidades fenólicas, respectivamente). [2]

As membranas celulares são sistemas complexos, pois apresentam composição variada e dinâmica própria. Os principais constituintes da membrana celular são os lipídios, os quais podem ser alcanos lineares, ácidos graxos, esteróis, acilgliceróis, fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios e lipopolissacarídeos. [3] Dentre os modelos de membrana celular, as monocamadas de Langmuir de fosfolipídios se destacam, os quais representam a metade de uma membrana, possibilitando o controle da composição, estado de compactação e estruturação das monocamadas. [4] A maioria dos estudos com as monocamadas de Langmuir são

realizadas com materiais anfifílicos, os quais são moléculas com uma região hidrofílica (alta interação com meio aquoso) e uma região hidrofóbica (baixa interação com meio aquoso). Essas moléculas apresentam uma estrutura perfeita para a obtenção de filmes monomoleculares porque em subfase aquosa as moléculas se organizam espontaneamente em monocamadas altamente estáveis. [4,5]

Baseado no fato de que o Calix4 exibiu menor toxicidade para células de mamíferos, o objetivo deste trabalho é estudar a interação do Calix4 com modelos de membrana de células saudáveis e células de fungos pela técnica de Langmuir, visando compreender o mecanismo de ação desta promissora droga antifúngica.

Material e Métodos

O *para-terc*- butilcalix[4]areno (Calix4) foi sintetizado pelo Prof. Dr. Márcio Lazzarotto (DQ-UFRS), o 1,2- dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) e Ergosterol (Erg) foram adquiridos da *Avanti Polar Lipids e Sigma-Aldrich* respectivamente. Os modelos de membrana celular foram estudados em uma cuba de Langmuir (KSV Nima KN2001), disponível no GDEM-UEPG. As monocamadas mistas foram obtidas pelo gotejamento de diferentes volumes de soluções estoque de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, (DPPC), ergosterol e Calix4, ($5{,}0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) em $CHCl_3$ sobre subfase de água ultrapura. Obteve-se filmes mistos de DPPC/Calix4, ergosterol/Calix4 e (DPPC-erg 13%)/Calix4 com diferentes proporções de Calix4 (χ_{Calix4} = 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 0,9). Após 15 minutos para a evaporação do solvente, as monocamadas foram comprimidas na velocidade de 10 mm min^{-1}. As monocamadas foram caracterizadas pelas técnicas de Pressão de Superfície (π-A), Módulo de Compressão (Cs^{-1}) e Potencial de Superfície (ΔV-A) e através da análise termodinâmica pelos parâmetros de área em excesso (ΔA^E), energia livre em excesso (ΔG^E) e energia livre da mistura (ΔG^M).

Resultados e Discussão

Inicialmente estudou-se as isotermas **π**-A dos compostos isolados. A partir da isoterma **π**-A do DPPC observou-se as fases referentes à formação do filme com área molecular de ~61 $Å^2$ em seu nível de maior ordenamento. A fase líquido-expandida (LE) é observada entre 0 e 4 mN m^{-1} e com a subsequente compressão, observa-se um patamar entre 4 e 6 mN m^{-1}, o qual está de acordo com a coexistência das fases líquido-expandida/líquido-condensada (LE-LC). Ao aumentar a pressão de superfície, a monocamada atinge a fase líquido-condensada, na qual as moléculas estão bem empacotadas e orientadas. Com a contínua compressão, a monocamada chega ao colapso, o qual ocorre em pressões superiores a 53 mN m^{-1}. Pela técnica de Módulo de Compressão nota-se que o DPPC apresenta duas transições de fase: gasosa para líquido-expandida e líquido-expandida para líquido condensada. A fase LE é constatada em **π**= 2 mN m^{-1} com Cs^{-1} = 22 mN m^{-1} e a fase LC em **π** = 36 mN m^{-1} tem Cs^{-1}= 191 mN m^{-1}. Na isoterma ΔV-A também se evidencia as transições de fase, e o potencial máximo é de 0,57 V. A isoterma **π**-A do ergosterol apresentou menor área (40 $Å^2$) e o processo de colapso ocorre em pressões maiores de 48 mN m^{-1}. Pelos dados de Cs^{-1} observam-se as fases gasosa (**π** = 0 mN m^{-1}), líquido-expandida (**π** = 5-20 mN m^{-1}) e a líquido-condensada (**π**>20 mN m^{-1}) e com Cs^{-1} máximo de 242 mN m^{-1}. Pelas isotermas de ΔV-A observa-se um potencial máximo em 0,41 V.

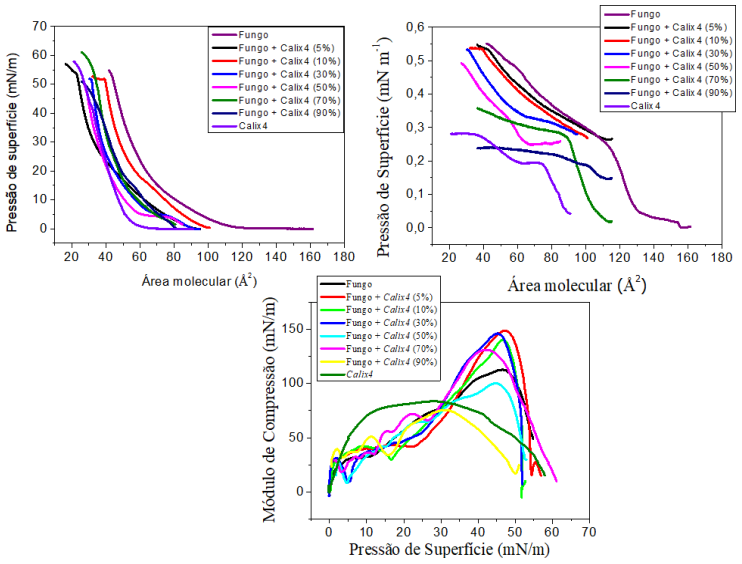
Para as monocamadas de Calix4 a área em seu nível de maior ordenamento é 52 $Å^2$ e o processo de colapso ocorre em pressões maiores de 57 mN m^{-1}. O Cs^{-1}

máximo em 30 mN m^{-1} é 83 mN m^{-1}, o qual está de acordo com a formação de uma monocamada líquido-expandida. Já o potencial máximo é de 0,28 V.

Com a contínua compressão das monocamadas dos três compostos puros (DPPC, Calix4 e ergosterol) um decréscimo da área molecular é evidenciado, sendo o ergosterol o que possui menor área molecular de 40 $Å^2$ indicando que este derivado forma filmes mais organizados. As pressões de colapso tiveram valores semelhantes, e estes estão relacionados com o grau de empacotamento das moléculas. A partir de dados de módulo de compressão, Cs^{-1}, podem-se obter informações sobre a rigidez da monocamada, sendo o Calix4 que teve o menor valor, 83 mN m^{-1}, indicando alta elasticidade interfacial.

Nas membranas celulares das moléculas de *Calix4* na presença da membrana de fungo DPPC/erg13%, composta de DPPC (87%) e ergosterol (13%), nota-se que com a inclusão do *Calix4* ocorreu uma diminuição da área molecular (Figura 1a) da mistura demostrando que o calixareno afetou significativamente as propriedades da monocamada mista da membrana de fungo. Dessa forma, a interação e miscibilidade entre os dois compostos foi comprovada.

Figura 1 – (a) Isotermas de pressão de superfície e **(b)** potencial de superfície para os filmes mistos de Langmuir DPPC/ergosterol/*Calix4* em diferentes proporções de *Calix4* (0, 5, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %), obtidas sobre subfase de água ultrapura.**(c)** Módulo de compressão *vs* pressão de superfície.



Fonte: a autora

O *Calix4* afetou também nas propriedades elétricas da monocamada, sendo que ocorre uma diminuição do potencial de superfície máximo à medida que se aumenta a proporção de *Calix4*, evidenciando que a interação entre estes afetou na organização e orientação dos dipolos das moléculas da mistura (DPPC/erg13%). O módulo de compressão aumentou significativamente indicando uma mudança no empacotamento das moléculas da membrana. A interação entre as moléculas na interface ar-água leva a uma significativa diminuição da elasticidade, uma vez que o módulo de compressão máximo é menor para as monocamadas mistas em comparação a membrana de fungo pura, indicando que a presença do *Calix4* auxilia na formação de monocamadas mais expandidas e menos compressíveis.

Diferente das outras misturas estudadas neste trabalho, a caracterização termodinâmica das monocamadas mistas indicou que preferencialmente ocorrem interações atrativas entre as moléculas nos filmes, uma vez que os parâmetros de

área e energia em excesso são preferencialmente negativos indicando que o modo de interação do Calix4 depende da composição do modelo de membrana.

Conclusão

As propriedades das monocamadas da membrana celular de fungo são afetadas pelo Calix4, o qual pode interagir tanto com as moléculas de DPPC quanto com as de ergosterol. Sendo assim, o mecanismo de ação deste promissor composto antifúngico está relacionado com a interação do *Calix4* com a membrana celular, o que pode estar relacionado à atividade antifúngica do calixareno.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa concedida, ao Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados (GDEM-UEPG).

Referências

[1] COIMBRA DE OLIVEIRA, Marcilene et al. **Synthesis and anti-Paracoccidioides activity of calix[n]arenes**. Letters in Drug Design & Discovery, v. 9, n. 1, p. 30-36, 2012.

[2] DE OLIVEIRA, M. C.; REIS, F. S.; DE FÁTIMA, A.; MAGALHÃES, T. F. F.; DA SILVA, D. L.; PORTO, R. R.; WATANABE, G. A.; MARTINS, C. V. B.; DA SILVA, D. L.; RUIZ, A. L. T. G.; FERNANDES, S. A.; DE CARVALHO, J. E.; DE RESENDESTOIANOFF, M. A. **Synthesis and Anti-Paracoccidioides Activity of Calix[n]arenes.** *Letters in Drug Design & Discovery*, 2012, **9**, 30-36.

[3] STEFANIU, C.; BREZESINSKI, G.; MÖHWALD, H. **Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces.** Advances in Colloid and Interface Science, v. 208, p. 197-213, 2014.

[4] PETTY, M. C. **Langmuir-Blodgett Films: An introduction**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 1996.

[5] ROBERTS, G. **Langmuir-Blodgett Films**. New York: Plenum Press, 1990, 435 p.