GLAUCIO VALDAMERI

EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL

Dissertação apresentada ao Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora:
Profª. Drª. Maria Eliane Merlin Rocha

Co-orientadora:
Profª. Drª. Glaucia Regina Martinez

Curitiba
2008

GLAUCIO VALDAMERI

EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL

Dissertação apresentada ao Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora:
Prof[a]. Dr[a]. Maria Eliane Merlin Rocha

Co-orientadora:
Prof[a]. Dr[a]. Glaucia Regina Martinez

Curitiba
2008

Dedico este trabalho a minha família e amigos;

Minha mãe Dorilde Valdameri

Meu pai Ildo Valdameri

Meu irmão Claucus Valdameri e minha cunhada Ionara Valdameri

Ao meu sobrinho e afilhado Davi Valdameri

A todos meus amigos que me apoiaram nessa jornada.

A todos vocês minha imensa gratidão por tanto amor...

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

À Prof. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha, antes apenas orientadora, agora amiga, obrigado pela paciência, pela atenção e dedicação ao trabalho.

À Prof. Dra. Glaucia Regina martinez pela co-orientação e principalmente pela amizade criada.

À Prof. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena pela ajuda nos momentos mais difíceis, pelos conselhos dados em conversas informais dentro do laboratório e principalmente pelas palavras de motivação.

À Prof. Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri pelo conhecimento passado principalmente nas disciplinas, as quais foram fundamentais para esse trabalho e também pelas sugestões dadas durante todo esse caminho.

À grande amiga Tatiana Herrerias, sem ela não sei como seria, mas com certeza os dias de trabalho não seriam tão alegres. Desde o primeiro dia até o último sempre esteve presente, obrigado!

Aos grandes amigos que com certeza serão para a vida toda: Stélia Caroline que deixava os dias de trabalho no laboratório mais alegres e sempre estava disposta a ajudar quando eu precisei, obrigado! Ao Paulo Worfel pelas conversas e conselhos, ao Danilo que sempre esteve junto, desde o nivelamento até a defesa, ao prof. André pela ajuda. As amigas, Carol Valente, Rosilene, Sílvia Romão e a Amanda que sempre foram prestativas, muito obrigado!

Aos colegas de mestrado, principalmente pelos momentos vivido durante o nivelamento, obrigado a todos!

Aos amigos da GB3, pensão onde morei durante este tempo.

“The Imagination is more important than knowledge” A. Einstein

RESUMO

Flavonóides são compostos polifenólicos que possuem várias atividades biológicas, incluindo: antiinflamatória, anticarcinogênica, propriedade antioxidante entre outras. A flavona (2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona) utilizada neste trabalho é encontrada principalmente em grãos de cereais e possui várias atividades biológicas, incluindo: aumento da atividade de enzimas responsáveis pela metabolização de drogas em fígados de rato; indução da ativação de caspases e inibição de propriedades oxidativas em mitocôndria de planta. Entretanto, seu efeito sobre o metabolismo mitocondrial hepático ainda não é conhecido. Neste trabalho foi avaliado o efeito da flavona (25 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) sobre o metabolismo de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os experimentos polarográficos utilizando a flavona (200 $\mu mol.L^{-1}$) e mitocôndrias isoladas de fígado de rato oxidando glutamato ou succinato mostraram que para ambos os substratos ocorreu: i) diminuição da velocidade respiratória no estado 3; ii) estímulo da velocidade respiratória no estado 4; iii) diminuição do coeficiente de controle respiratório e; iv) diminuição da razão ADP/O. A análise das atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória demonstrou que a flavona tem como seu principal sítio de ação a região entre os complexos I e III. A flavona nas doses de (75 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) diminui o inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e nitrato de potássio sugerindo indiretamente que a flavona pode provocar alterações em propriedades da membrana mitocondrial. A flavona reduziu o potencial elétrico transmembrana nas doses de 100, 150 e 200 $\mu mol.L^{-1}$. Os resultados acima sugerem que a inibição dos sistemas enzimáticos mitocondriais aliados aos efeitos sobre membrana promovidos pelo flavonóide podem ser responsáveis por efeitos citotóxicos da flavona.

ABSTRACT

Flavonoids are a group of polyphenolic compounds which have multiple biological activities including: antiinflammatory, anticarcinogenic, antioxidant and others. The flavone (2-phenyl-4H-1-benzopyran-4one) used in this work is found in some cereal grains and have several biological activities, including: increased activity of drug-metabolizing enzymes in rat liver, induction of caspases activation and inhibition of oxidative properties of plant mitochondria. However, the flavone effects on the mitochondrial hepatic metabolism are yet unknown. In this work we evaluated the effect of flavone (25 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) on the metabolism of mitochondria isolated from rat liver. Polarographic experiments using flavone (200 $\mu mol.L^{-1}$) and rat liver mitochondria oxidizing glutamate or succinate showed that for both substrates occur: i) reduction of respiratory rate in state 3; ii) stimulation of respiratory rate in state 4; iii) reduction of respiratory control coefficient; and iv) reduction of the ADP/O ratio. The analysis of the activity of enzymatic complexes in the respiratory chain showed that flavone acts between complexes I and III. Flavone at doses of (75 - 200 $\mu mol.L^{-1}$) reduced the swelling of mitochondria in the presence of valinomycin and KNO_3, suggesting indirectly that flavone could induce some changes in the properties of the mitochondrial membrane. Flavone reduced the membrane electric potential at the doses of 100, 150 and 200 $\mu mol.L^{-1}$. The above mentioned results suggest that the inhibition of mitochondrial enzyme systems together with the effects on membrane provoked by the flavonoid may be responsible for its citotoxic effects.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - BIOSSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES ----------15
FIGURA 2 - ESTRUTURA DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C. ----------16
FIGURA 3 – ESQUEMA DA SÍNTESE DAS FLAVONAS----------23
FIGURA 4 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA HISPIDULINA ----------26
FIGURA 5 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA EUPAFOLINA ----------28
FIGURA 6 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA FLAVONA----------29
FIGURA 7 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA UTILIZANDO SAFRANINA O----------42
FIGURA 9 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA NO ESTADO 3 UTILIZANDO-SE GLUTAMATO OU SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS----------45
FIGURA 10 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA NO ESTADO 4 UTILIZANDO-SE O GLUTAMATO OU SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS----------46
FIGURA 11 - EFEITO DA FLAVONA SOBRE A RAZÃO ADP/O UTILIZANDO GLUTAMATO OU SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS----------47
FIGURA 12 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO (CCR) UTILIZANDO GLUTAMATO E SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS----------48
FIGURA 12 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO KNO_3 ----------56
FIGURA 13: EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO TRANSMEMBRANA ($\Delta\Psi$) -------58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXEMPLOS DE ALGUNS FLAVONÓIDES E SUAS FONTES ----------17
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE FLAVONÓIDES ENCONTRADOS EM ALGUNS ALIMENTOS ----------18
TABELA 3 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE OS PARÂMETROS RELACIONADOS AO CONSUMO DE OXIGÊNIO QUANDO UTILIZADO O GLUTAMATO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL----------49
TABELA 4 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE OS PARÂMETROS RELACIONADOS AO CONSUMO DE OXIGÊNIO QUANDO UTILIZADO O SUCCINATO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL----------50
TABELA 5 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATORIA----------52
TABELA 6 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ATPASE EM MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS E INTACTAS (NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE FCCP)----------53
TABELA 7 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO KNO_3 ----------55
TABELA 8 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO TRANSMEMBRANA ($\Delta\Psi$) -------58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP - adenosina 5’ difosfato

ADP/O – quociente entre quantidade de ADP (nmol) e oxigênio consumido (nmol) durante o estado 3

ATP – adenosina 5’ trifosfato

BSA – albumina de soro bovino

CCR – coeficiente de controle respiratório

DCPIP – 2,6-diclorofenolindofenol

DMSO – dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

EGTA – ácido etilenoglicol bis (éter 2-aminoetil) N, N, N’, N’, tetracético

FCCP – carbonil cianeto de p-trifluormetoxifenilhidrazona

HEPES – ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1

NAD^+ - nicotinamida adenina dinucleotídio (forma oxidada)

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida)

Pi – fosfato inorgânico

PMS – fenazina metassulfato

TCA – ácido tricloroacético

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

RESUMO ---- 6

ABSTRACT ---- 7

LISTA DE FIGURAS ---- 8

LISTA DE TABELAS ---- 9

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ---- 10

1. INTRODUÇÃO ---- 13

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ---- 15

2.1 Estrutura e biossíntese dos Flavonóides ---- 15

2.2 Classificação ---- 16

2.3 FLAVONÓIDES NA ALIMENTAÇÃO ---- 18

2.4 relação da estrutura dos flavonóides com suas Atividades biológicas ---- 19

2.5 Flavonas ---- 22

2.5.1 Efeitos biológicos das flavonas ---- 24

2.5.2 Efeitos da hispidulina sobre o metabolismo energético mitocondrial e sobre células tumorais ---- 26

2.5.3 Efeitos da eupafolina sobre o metabolismo energético mitocondrial e sobre células tumorais ---- 27

2.5.4 Flavona ---- 28

3. OBJETIVOS ---- 31

4. MATERIAIS E MÉTODOS ---- 32

4.1. REAGENTES ---- 32

4.2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE FLAVONA ---- 32

4.3. ANÁLISES DOS EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL ---- 33

4.3.1. Animais ---- 33

4.3.2. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato para determinação do consumo de oxigênio, atividades enzimáticas e potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) ---- 33

4.3.3. Determinação do consumo de oxigênio ---- 34

4.3.4. Preparo de mitocôndrias rompidas para determinação das atividades enzimáticas mitocondriais ---- 34

4.3.5. Determinação da atividade das enzimas relacionadas com a cadeia respiratória mitocondrial ---- 35

4.3.5.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase) ---- 35

4.3.5.2. NADH-Desidrogenase (EC 1.6.5.3 - NADH: Ferricianeto Óxido-redutase) ---- 35

4.3.5.3. Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase) ---- 36

4.3.5.4. Succinato Citocromo *c* Redutase (EC 1.3.99.1 - Succinato: Ferrocitocromo *c* Óxido - Redutase) ---- 36

4.3.5.5. Succinato Desidrogenase (EC 1.3.5.1 - Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido-Redutase) ----------37
4.3.5.6. Citocromo *c* Oxidase (EC 1.9.3.1 - Ferrocitocromo *c*: Oxigênio Óxido-Redutase) ----------37
4.3.6. Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias intactas na presença e ausência do desacoplador FCCP ----------38
4.3.7. Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias Rompidas ----------39
4.3.8. Determinação do inchamento (*swelling)* mitocondrial induzido por valinomicina em meio contendo KNO_3 ----------39
4.3.9. Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial Interna (ΔΨ) ----------40
4.3.9.1 Curva de calibração para potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial Interna (ΔΨ)----------40
4.3.10. Determinação da concentração de proteínas mitocondriais----------42
4.3.11. Análise estatística dos dados experimentais ----------42

5. RESULTADOS ---------- 44

5.1. ANÁLISE DOS EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO ----------44

5.2. EFEITO DA FLAVONA SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA ----------51

5.3. EFEITO DA FLAVONA SOBRE ATIVIDADE Da atpase ----------52

5.4 EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O INCHAMENTO (SWELLING) MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO KNO_3----------54

5.5 EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO TRANSMEMBRANA (ΔΨ), UTILIZANDO SUCCINATO COMO SUBSTRATO ----------56

6. DISCUSSÃO ---------- 59

7. CONCLUSÕES ---------- 66

REFERÊNCIAS ---------- 68

1. INTRODUÇÃO

O uso empírico de plantas medicinais para combater as mais diversas patologias já era utilizado nos primórdios da humanidade e hoje serve como guia para apoiar a descoberta de novos fármacos. A cura de doenças através do uso de fármacos oriundos de plantas pode amenizar vários problemas atuais como: a disponibilidade e o custo destes fármacos. Técnicas modernas estão sendo empregadas para que se tenha uma maior compreensão da eficácia e mecanismo de ação destes fármacos, pois sabe-se que as respostas benéficas propiciadas por essas plantas são devido aos constituintes químicos ativos, porém, como estes efeitos são gerados, ainda não está bem elucidado (BUENZ *et al*., 2004).

Um dos principais grupos de compostos fenólicos encontrados em plantas são os flavonóides. Sabe-se há muitos anos que flavonóides tem potencial bioativo, mas apenas recentemente surgiram informações a respeito de sua biodisponibilidade e destino metabólico. Muitos flavonóides são encontrados em alimentos de origem vegetal. O interesse a respeito destes compostos aumentou na década de 1990, devido ao seu potencial antioxidante *in vitro* e também seu envolvimento na proteção contra doenças cardiovasculares (MARTENS; MITÖFER, 2005).

Os flavonóides desempenham funções na prevenção de patologias, melhorando a função e integridade celular, através da atenuação de danos oxidativos, efeitos antiproliferativos, promoção de diferenciação e indução de apoptose (DUTHIE *et al*., 2000; MIDDLETON *et al*., 2000; Di CARLO *et al*., 1999). Além disso, vários flavonóides têm demonstrado serem capazes de inibir a síntese de melanina, o que os tornam importantes para a medicina e indústria de cosméticos (KIM; UYAMA, 2005).

Estas funções biológicas dos flavonóides dependem das suas estruturas. Os flavonóides são divididos em classes de acordo com sua estrutura química e entre elas encontramos a classe das flavonas. Existem várias flavonas que apresentam atividades biológicas importantes, como: antioxidante, antiinflamatória, antiviral, antiaterosclerótica e antitumoral sobre vários tipos celulares (MIDDLETON *et al*., 2000).

As flavonas podem ser encontradas em todas as partes das plantas, sendo abundantes em nossa dieta diária, em frutas, sementes e bebidas como sucos e chás e

também são encontradas em plantas medicinais utilizadas comumente como *Scutellaria baicalensis*, mais conhecida como Solidéu-de-baical (CHOI *et al*., 2002). Anteriormente, em nosso laboratório, foram estudados dois flavonóides representantes da classe das flavonas, a hispidulina (6-metoxi-5,7,4'-trihidroxiflavona) e a eupafolina (6-metoxi-5,7,3',4'-trihidroxiflavona). Estas flavonas provocaram inibições das atividades de enzimas da cadeia respiratória e diminuição da velocidade respiratória do estado 3 (HERERRIAS *et al*., 2007; DABAGHI-BARBOSA *et al*., 2005).

Em nosso trabalho utilizamos a flavona (2-fenil-4H-1-benzopirano), que é um flavonóide pertencente à classe das flavonas. A flavona que foi objeto deste estudo apresenta efeitos sobre a metabolização de xenobióticos, sendo capaz de afetar atividades de algumas enzimas envolvidas com citocromos P450 (CANIVENC-LAVIER *et al*., 1996). Como o fígado é o principal órgão envolvido na metabolização de drogas este fato torna importante o estudo também de possíveis efeitos da flavona sobre outras atividades relacionadas com o metabolismo hepático.

Contudo, apesar de existirem estudos que relatam efeitos de outras flavonas substituídas (ex: hispidulina e eupafolina), os efeitos da flavona relacionados com o metabolismo energético mitocondrial hepático ainda não são conhecidos. Portanto, nosso trabalho teve intuito de verificar os efeitos provocados por este flavonóide sobre o metabolismo energético mitocondrial e de estudar seu mecanismo de ação. Além disso, os efeitos observados foram comparados com os promovidos pela hispidulina e eupafolina, com a finalidade de se verificar a influência dos substituintes no anel da flavona sobre seus efeitos biológicos, o que pode colaborar nos estudos de desenvolvimento de novos fármacos derivados dos flavonóides.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA E BIOSSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES

Vários compostos polifenólicos são encontrados em plantas medicinais, entre eles podemos citar: flavonóides, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, ligninas e quinonas (CAI *et al*., 2005). Os flavonóides fazem parte do metabolismo secundário de algumas plantas, entre elas encontramos algumas plantas medicinais (HARBORNE; BAXTER 1999).

A FIGURA 1 mostra um esquema da formação dos flavonóides que são derivados da estrutura da chalcona (MARTENS; MITHÖFER, 2005).

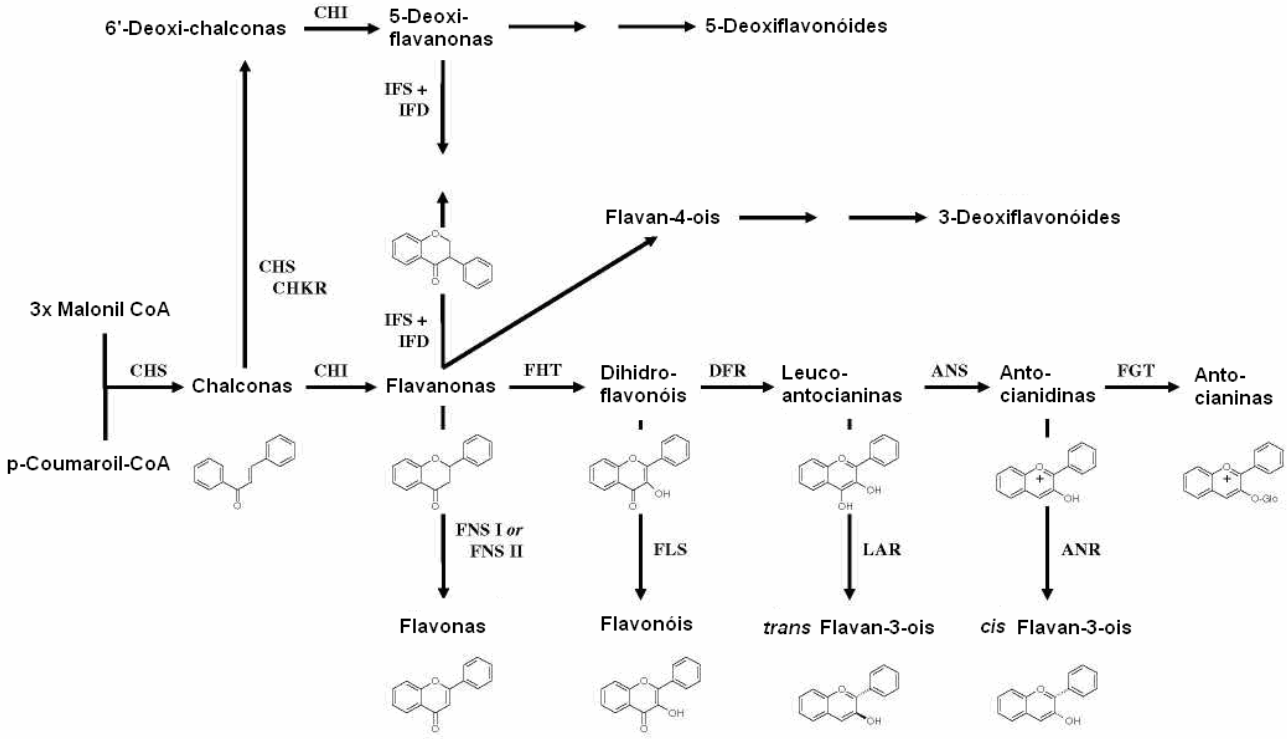


FIGURA 1 - BIOSSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES

FONTE: MARTENS e MITHÖFER (2005)

NOTA: Esquema mostrando a síntese dos flavonóides. As abreviações contidas no esquema são das seguintes enzimas: chs – chalcona sintase, chkr – chalcona policetide redutase, chi – chalcona isomerase, fht – flavanona 3-β-hidroxilase, dfr – dihidroflavonol 4-redutase, ans – antocianidina sintetase, fgt – flavonóide glicosiltransferase, fns – flavona sintase, fls – flavonol sintase, lar – leucoantocianidina redutase, anr – antocianidina redutase, ifs – isoflavona sintase, ifd – isoflavona desidratase.

Segundo Harborne e Baxter (1999), cerca de 9000 estruturas de flavonóides já foram identificadas.

Nas plantas, os flavonóides estão envolvidos na pigmentação e também são fatores de grande importância no crescimento, desenvolvimento e imunidade (IELPO, 2000), podendo atuar também como antioxidantes e sinalizadores (TREUTTER, 2006).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

Os flavonóides são divididos em classes de acordo com seus substituintes, sendo que as propriedades químicas e biológicas destes subgrupos podem ser completamente diferentes de acordo com suas estruturas. A estrutura dos flavonóides é baseada em dois anéis benzênicos (A e B), os quais estão conectados por um terceiro anel (C), um anel pirano contendo oxigênio. Na FIGURA 2 é mostrado um exemplo de flavonóide com anel C (ERLUND, 2004).

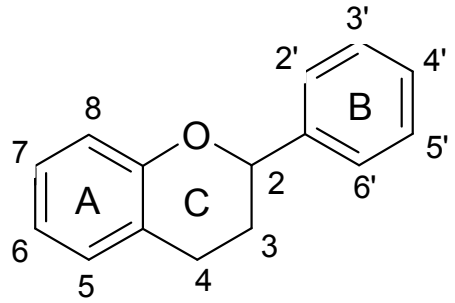
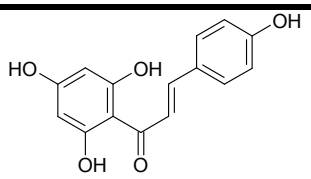
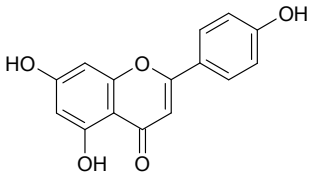
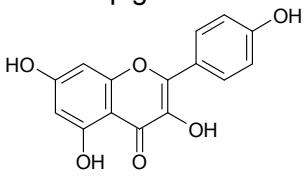
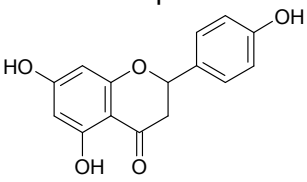
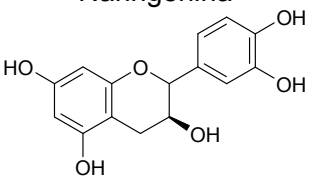
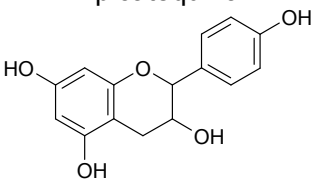
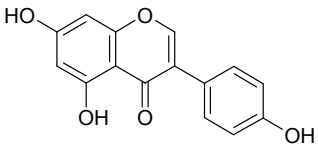


FIGURA 2 - ESTRUTURA DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C.

A partir deste esqueleto básico, várias combinações estruturais aparecem principalmente com hidroxilas e metoxilas em sua estrutura. As classes dos flavonóides incluem: flavonas, chalconas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, antocianidinas e isoflavonas. Na TABELA 1 podemos verificar alguns exemplos de flavonóides pertencentes a estas classes, suas fontes e estruturas (MOON; WANG; MORRIS, 2006; HODEK; TREFIL; STIBOROVA, 2002). Os flavonóides podem ainda ser encontrados de duas formas, sem grupamentos açúcar (agliconas) ou com resíduos de açúcares ligados (glicosídicas) (PETERSON; DWYNER, 1998).

TABELA 1 - EXEMPLOS DE ALGUNS FLAVONÓIDES E SUAS FONTES

CLASSE	ESTRUTURA	EXEMPLOS	FONTE
Chalcona	 Chalcona	Chalcona	Lúpulo, cerveja
Flavona	 Apigenina	Apigenina Luteolina Acacetina Baicaleína Crisina Tangeritina	Salsa, tomilho, aipo, pimentão vermelho, mel, propolis
Flavonol	 Kaempferol	Kaempferol Galangina Morina Miricetina Quercetina	Cebola, brócolis, maça, cereja, framboesa, chá, vinho tinto
Flavanone	 Naringenina	Naringenina Eriodictiol Hesperetina Homoeridictiol	Citrus
Flavanol	 Epicatequina	Epicatequina Catequina Proantocianidinas	Cacau, chá verde, chocolate, vinho tinto e algumas ervas
Antocianidina	 Cianidina	Cianidina	Cereja, uva, framboesa
Isoflavona	 Ginesteina	Ginesteína Daidzeína	Alfafa, soja e alguns legumes

FONTE: MOON, WANG e MORRIS (2006)

2.3 FLAVONÓIDES NA ALIMENTAÇÃO

O valor estimado de flavonóides ingeridos em nossa dieta diária varia de aproximadamente 23 a 1000 mg/dia (IELPO *et al*., 2000; KUHNAU 1976). Alguns estudos demonstram que dietas ricas em frutas e vegetais podem diminuir a incidência de algumas doenças (BRAVO 1998; BESTWICK *et al*., 2003). Uma vez que os flavonóides são abundantes em frutas, verduras e em bebidas como vinho e chás (TABELA 2) torna-se importante destacar suas principais fontes e quantidades.

TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE FLAVONÓIDES ENCONTRADOS EM ALGUNS ALIMENTOS

FLAVONÓIDES	**FONTE**	**QUANTIDADE (mg/Kg)**
Quercetina 3-4’ glucosídeo	Cebola	284 – 486
Rutina	Chá preto	10 – 25
Luteolina –7- apiosilglucosídeo	Pimenta vermelha	7 – 14
Hesperidina	Suco de laranja	116 – 201
Narirutina	Suco de laranja	15 – 42
Genisteína -7- glucosídeo	Soja	480

FONTE: ERLUND (2004).

2.4 RELAÇÃO DA ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES COM SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Entre as várias atividades biológicas relatadas para os flavonóides podemos citar: antioxidante, antialergênica, antiflamatória, antiviral, anticarcinogênica, vasoprotetora, antimicrobiana e anti-hepatotóxica (DUTHIE *et al*., 2000; MIDDLETON *et al*., 2000; Di CARLO *et al*., 1999; AFANAS`EV *et al*., 1989).

Os mecanismos geradores dos efeitos antioxidantes dos flavonóides foram os primeiros a serem estudados. Entre estes se encontra a atividade seqüestradora de radicais livres. Esta atividade é importante porque muitos estudos tem associado a produção excessiva destes radicais com a geração de várias doenças, entre elas o câncer (BRAVO 1998).

Alguns flavonóides podem gerar seus efeitos protetores contra radicais livres em sistemas biológicos através também de sua propriedade quelante de metais (HEIM *et al*., 2002). Segundo Verstraeten (2003), flavan-3-ols e procianidinas podem prevenir modificações oxidativas de membranas limitando a propagação da peroxidação lipídica.

Segundo Van Acker *et al*. (1996), os flavonóides interferem tanto nas reações de propagação de radicais livres, quanto na formação destes e geralmente esta atividade depende do número e posições dos grupos hidroxila, de outros substituintes e ainda da presença de glicosilação. A glicosilação de flavonóides geralmente diminuiu sua atividade antioxidante quando comparado com moléculas agliconas (CAI *et al*., 2005). Alguns flavonóides que não possuem radicais hidroxilas não apresentam atividade seqüestradora de radicais, ao contrário de flavonóides que apresentam em sua estrutura o anel catecol (estrutura orto-dihidroxi), os quais possuem alta capacidade antioxidante. Esta atividade aumenta nas seguintes classes: isoflavonas < flavanonas < flavonas < chalconas < flavonols, porém, individualmente alguns compostos destas classes não seguem esta ordem (CAI *et al*., 2005).

Certos flavonóides também podem apresentar atividades citotóxicas e carcinogênicas (MICHELS *et al*., 2005).

Contudo, propriedades antioxidantes ou pró-oxidantes proporcionadas pelos flavonóides dependem também da dose utilizada no sistema celular e não somente da

sua estrutura química. Os radicais hidroxila, gerados nos processos de auto-oxidação e ciclo redox dos flavonóides, podem desencadear a peroxidação lipídica em membranas celulares, podendo assim induzir indiretamente o estresse oxidativo na célula (MICHELS *et al*., 2005).

Quanto ao efeito da concentração, de acordo com Laughton (1989), alguns flavonóides (ex: quercetina) apresentam atividade pró-oxidante quando em altas concentrações e na presença de Fe^{3+}, aumentando a formação de radical hidroxila. Bestwick (2003) também relata atividade pró-oxidante de alguns flavonóides e argumenta que esta atividade contribui para citotoxidade e danos à integridade celular, podendo também induzir a morte celular por apoptose.

Desta forma, estas informações devem ser levadas em consideração antes da suplementação alimentar com flavonóides, pois estes compostos podem assumir tanto um papel benéfico à saúde quanto, em altas doses, podem provocar efeitos indesejáveis (MICHELS *et al*., 2005).

Dados na literatura mostram também que os flavonóides têm uma grande capacidade de inibir enzimas como: fosfodiesterases, aldose redutase, ATPases, succinato oxidase mitocondrial, NADH oxidase, entre outras (BROWN, 1980; HAVSTEEN, 1983; HODNICK *et al*., 1986)

Alguns flavonóides têm demonstrado interferir em sistema de enzimas do citocromo P450, promovendo indução, ativação ou ainda inibição destas enzimas. As enzimas do citocromo P450 são conhecidas por estarem envolvidas na metabolização de drogas e outros compostos, portanto ao alterar esse sistema enzimático o metabolismo de xenobióticos pode ser afetado, produzindo efeitos farmacológicos e tóxicos importantes (WOOD *et al*., 1986).

Certos flavonóides têm demonstrado afetar a fosforilação oxidativa em mitocôndrias de plantas e animais. A atividade desaclopadora dos flavonóides sobre a cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de plantas é dependente principalmente da sua lipofilicidade (RAVANEL, 1985).

De acordo com Trumbeckaite *et al*. (2007), o extrato de folhas de *Ginkgo biloba*, possui como principais substâncias ativas os flavonóides: rutina, quercetina e quercetrina. Este extrato apresenta um efeito desacoplador da fosforilação oxidativa em

mitocôndrias de coração de rato causando um estímulo da velocidade respiratória do estado 4, porém sem afetar a velocidade respiratória do estado 3. Quando estudados os efeitos destes flavonóides separadamente, observou-se que a rutina possui um efeito desacoplador mais pronunciado que os outros flavonóides porém, ainda menor que o visto com o extrato de *Ginkgo biloba*. Os autores sugerem que estes efeitos estejam relacionados com a possível capacidade dos flavonóides aumentarem a permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons.

Segundo Dorta *et al*. (2005), alguns flavonóides afetam a respiração mitocondrial, promovendo inibição da velocidade respiratória no estado 3, como a quercetina, ou promovendo estímulo na velocidade respiratória do estado 4 como a galangina, dissipando significantemente o potencial elétrico da membrana.

Alguns flavonóides que possuem um grupo catecol no anel B são capazes de inibir a atividade da succinato oxidase mitocondrial. Os flavonóides que inibem com maior potência esta enzima são os que possuem três hidroxilas adjacentes no anel B e aqueles com grupo catecol, seguidos pelos que apresentam no anel B as seguintes configurações: meta-hidroxil, monohidroxil e não hidroxilados. A presença do grupo cetona no anel C mostrou ser também essencial para essa atividade de inibir a succinato-oxidase (HODNICK *et al*., 1986).

De acordo com Abdalla *et al*. (1988), metilações múltiplas na estrutura dos flavonóides podem reduzir o efeito destas moléculas em parâmetros relacionados à respiração mitocondrial, conseqüentemente aumentando seu potencial farmacológico contra processos patológicos relacionados ao estresse oxidativo. Porém, de acordo com Mora *et al*. (1990), metoxilas no anel A podem atuar revertendo o efeito positivo provocado pela estrutura catecol no anel B dos flavonóides.

Segundo Hodnick *et al*. (1986) o fato de certos flavonóides serem capazes de inibir enzimas mitocondriais pode contribuir para sua atividade antineoplásica e sua citotoxicidade.

Flavonóides podem também interferir em vias metabólicas por ligarem-se a um grande número de proteínas, incluindo proteínas quinase A e C e topoisomerases. Além disso, podem afetar ATPase mitocondrial e interagir com a mitocôndria pela modulação

do poro transição de permeabilidade mitocondrial, o qual controla a liberação de citocromo *c* durante a apoptose entre outras funções (WILLIAMS, 2004).

2.5 FLAVONAS

Kostanecki e Tambor foram alguns dos primeiros pesquisadores a estudarem as estruturas dos flavonóides, sendo o termo flavona usado pela primeira vez por eles em 1895 (MARTENS; MITHÖFER, 2005).

As flavonas são classificadas em subgrupos, principalmente pela apresentação de uma ou mais destas características estruturais: i) hidroxilação, ii) *O*-metilação, iii) *C*-metilação ou iv) isoprenilação. Pela grande diversidade de combinações de estruturas que as flavonas possuem, o número de diferentes exemplares é enorme (MARTENS; MITHÖFER, 2005). Harborne e Baxter (1999), já listaram mais de 300 flavonas sem resíduos de açúcar e 500 flavonas glicosiladas.

Mais de 70 famílias de plantas superiores produzem flavonas, podendo ser encontradas em várias partes da planta, podendo estar nas folhas, sementes, raízes, flores, frutos, caule e até em resinas (HARBONE; BAXTER, 1999).

As fontes de maior abundância das flavonas são grãos e ervas. Uma erva comumente usada na culinária, a salsa, contém apigenina (5,7,4'-triidroxiflavona) e crisoeriol (3'-*O*-metilluteolina). A apigenina é encontrada em várias frutas e verduras, como cebola, salsa, laranja, chás, camomila e ainda em alguns temperos (DUTHIE; CROZIER, 2000). Apigenina e seus glicosídeos são encontrados freqüentemente em grãos de cereais, ervas e alguns vegetais. A luteolina (5,7,3',4'-tetraidroxoflavona) está presente em cereais e ervas e a luteolina glicosilada é encontrada em folhas de vegetais (HERMAN, 1976). Ainda a luteolina está presente em algumas verduras utilizadas com freqüência em nossa dieta como brócolis, cebola e cenoura (MIEAM; MOHAMED, 2001).

Segundo Erlund (2004) as duas flavonas mais abundantes na dieta humana são apigenina e luteolina, porém a ingestão delas na dieta é baixa devido às pequenas concentrações destes compostos em plantas consumidas corriqueiramente, sendo a pimenta vermelha e o aipo as mais importantes fontes destas flavonas.

Algumas flavonas têm propriedades relacionadas com o sabor de alguns alimentos, como por exemplo, a nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona), sinensetina (5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona) e tangeritina (5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona), as quais são não glicosiladas e altamente metoxiladas, e contribuem para o sabor amargo das frutas cítricas (HOROWITZ, 1986).

Nas plantas superiores, a síntese da flavona é realizada por duas vias enzimáticas completamente diferentes, mas usando o mesmo substrato. As duas principais enzimas envolvidas na síntese são flavona sintase I (FNS I) e flavona sintase II (FNS II), (FIGURA 3).

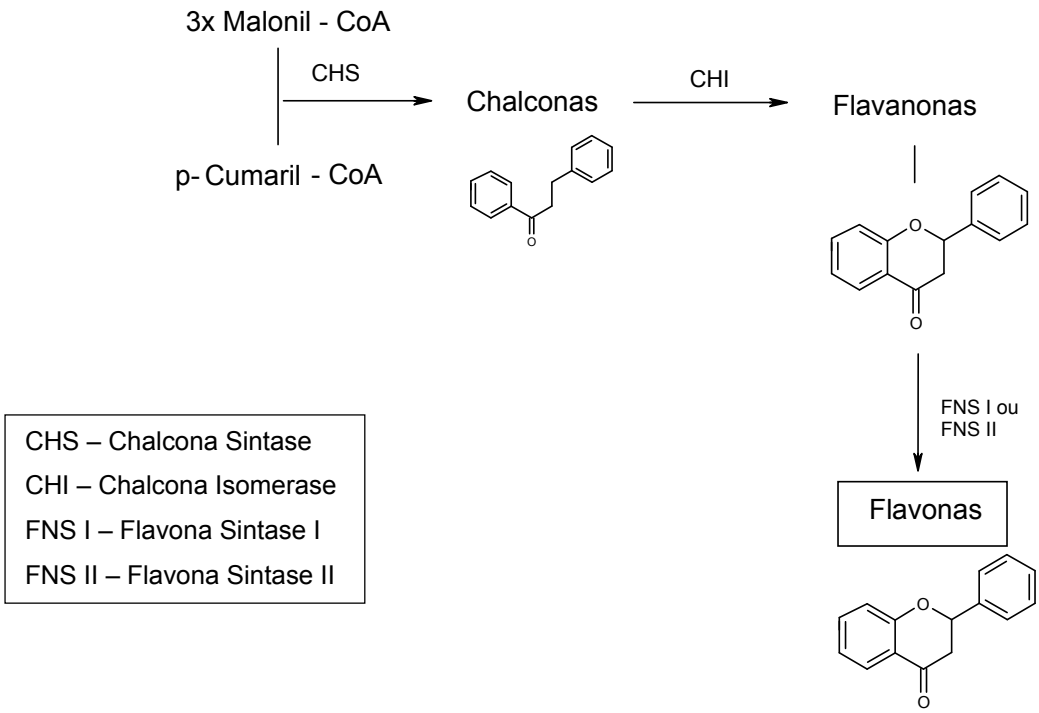


FIGURA 3 – ESQUEMA DA SÍNTESE DAS FLAVONAS

FONTE: MARTENS e MITHÖFER (2005)

NOTA: Esquema modificado, onde mostra a síntese da flavona.

2.5.1 Efeitos biológicos das flavonas

Esta classe de flavonóides possui atividades bioquímicas e farmacológicas incluindo, efeitos antioxidante, anticarcinogênico, antiinflamatório, antiproliferativo, antiangiogênico e antiestrogênico. Estudos em animais sugerem que uma dieta contendo flavonas pode prevenir algumas doenças humanas e reduzir o risco de vários tipos de cânceres, doenças coronárias, inflamação crônica e osteoporose (HAVSTEEN, 2002).

O extrato de *Scutellaria baicalensis,* popularmente chamado de solidéu-de-baical, possui como principais constituintes quatro flavonas: wogonina (5,7-diidroxi-8-metoxiflavona), baicaleína (5,6,7-triidroxiflavona), skullcapflavona I (5,2'-diidroxi-7,8-dimetoxiflavona) e skullcapflavona II (5,6'-diidroxi-6,7,8,2'-tetrametoxiflavona). Este extrato provocou um aumento na sobrevivência de células neuronais quando expostas a estresse oxidativo. A princípio, os efeitos antioxidantes observados com estas células poderiam ser devido a uma inibição na formação de espécies reativas de oxigênio ou por um aumento de mecanismos antioxidantes celulares. Os autores sugeriram que as flavonas poderiam seqüestrar as espécies reativas de oxigênio diretamente. As flavonas de *Scutellaria baicalensis*, promoveram também um efeito na prevenção da apoptose pelo aumento na razão Bcl-2/Bax e fosforilação de Bcl-2 (CHOI *et al*., 2002).

Segundo Zanden (2005), algumas flavonas inibem a atividade da proteína de resistência a multidroga, como é o caso da 3,3',4'-trihidroxiflavona, apigenina e a luteolina sendo as inibições desta atividade de 26, 47 e 53% respectivamente.

A luteolina possui algumas atividades biológicas bem descritas, como: atividade antioxidante (BROWN; RICE-EVANS, 1998), propriedades antialérgicas (KIMATA *et al*., 2000) e inibidora da topoisomerase I (CHOWDHURY *et al*., 2002). A luteolina possui um caráter citotóxico em células de hepatoma de rato, onde a morte celular ocorre por apoptose. Esta flavona entra rapidamente na célula causando danos ao DNA, sendo que após esta etapa, ocorre a ativação da cascata das caspases que vai resultar na morte por apoptose (MICHELS *et al*., 2005). Já Horváthová *et al*. (2005) demonstraram que a luteolina promove um efeito protetor contra danos ao DNA induzidos por H_2O_2.

A apigenina possui várias atividades biológicas descritas, incluindo antiinflamatória, anticarcinogênica e a propriedade de seqüestrar radicais livres em sistemas *in vitro* (KIM; AHN; WOO, 1998). Estudos ainda mostram que a apigenina na dose de 80 $\mu mol.L^{-1}$ possui a capacidade de inibir o crescimento de variados tipos de células de câncer humano, como o câncer de cólon (WANG *et al*., 2000), pele (CALTAGIRONE *et al*., 2000), tireóide e células com leucemia (FOTSIS *et al*., 1998).

Dados recentes mostram que a apigenina em baixas concentrações (10 $\mu mol.L^{-1}$) promove redução na proliferação de células de câncer de próstata humano, porém quando utilizada em altas concentrações (30 a 50 $\mu mol.L^{-1}$), promove a apoptose, sugerindo que esta flavona pode ser utilizada na prevenção e terapia de doença proliferativa prostática (BEKTIC *et al*., 2006).

Peterson e Dwyner (1998) verificaram que algumas flavonas, como apigenina, luteolina, nobiletina e tangeritina, possuem atividades antimutagênica e de inibição do crescimento celular de algumas células cancerosas, como no carcinoma de células escamosas.

Os efeitos de seis flavonas sobre a atividade de enzimas mitocondriais foram investigados por Hodnick, Duval e Pardini (1994). Estas flavonas foram capazes de inibir a atividade das enzimas NADH-oxidase e succinato-oxidase, sendo que foram mais potentes inibidores da atividade NADH-oxidase do que succinato-oxidase, sugerindo que o sítio de ação primário das flavonas esteja localizado no complexo I. A ordem de potência de inibição promovida pelas flavonas sobre a atividade da NADH-oxidase foi: robinetina (3,3',4',5',7-pentahidroxiflavona) > ramnetina (3,3',4',5-tetrahidroxi-7-metoxiflavona) = eupatorina (3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona) > baicaleína (5,6,7-trihidroxiflavona) > 7,8-dihidroxiflavona = norwogonina (5, 7, 8-trihidroxiflavona).

Coleman *et al*. (1984) estudaram os efeitos de duas flavonas hispidulina (6-metoxi-5,7,4'-trihidroxiflavona) e eupafolina (6-metoxi-5,7,3',4'-trihidroxiflavona) extraídos do extrato de *Geigeria burkei* sobre os parâmetros mitocondriais somente na dose de 40 $\mu mol.L^{-1}$. Nesta dose, a hispidulina promoveu um desacoplamento da fosforilação oxidativa sugerindo que a hidroxila na posição 3 seria necessária para inibição do estado 3. Ainda de acordo com estes autores, a eupafolina possui a

propriedade de diminuir a velocidade respiratória estimulada por ADP quando utilizado os substratos glutamato e succinato. Estas flavonas também são encontradas em outras plantas medicinais como *Artemísia frigida* a qual é conhecida como carqueja (YONG-LONG *et al*., 1981) e *Arnica montana* L., (SANTOS *et al*., 1998).

Em trabalho realizado nos últimos anos em nosso laboratório foram estudadas a hispidulina e eupafolina extraídas de folhas de *Eupatorium litoralle,* que é uma planta arbustiva da família Asteraceae comum no litoral do Paraná, sobre o metabolismo oxidativo de mitocôndrias isoladas de fígado de rato (DABAGHI-BARBOSA *et al*., 2005; HERRERIAS *et al*., 2007).

2.5.2 Efeitos da hispidulina sobre o metabolismo energético mitocondrial e sobre células tumorais

Em relação aos efeitos provocados pela hispidulina (6-metoxi-5,7,4'-trihidroxiflavona) (FIGURA 4) sobre os parâmetros respiratórios em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos, foi observado que esta flavona é capaz de reduzir a velocidade respiratória no estado 3 nas doses de (50 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) com os substratos glutamato ou succinato, estimular a velocidade respiratória no estado 4 nas doses de (150 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) quando o glutamato foi o substrato e nas doses de (75 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) quando o substrato foi o succinato. Esta flavona também promoveu uma diminuição no coeficiente de controle respiratório nas doses de (50 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) com ambos os substratos. Foi observada redução também na razão ADP/O nas doses de (150 – 200 $\mu mol.L^{-1}$), quando glutamato foi utilizado como substrato e nas doses de (100 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) quando succinato foi utilizado como substrato (DABAGHI-BARBOSA *et al*., 2005).

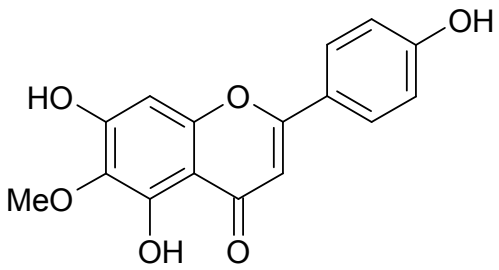


FIGURA 4 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA HISPIDULINA

Ainda de acordo com os resultados obtidos por Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005), o provável sítio de ação da hispidulina fica entre os complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial, podendo ser classificada como inibidora do transporte de elétrons. Também foi observado efeito desacoplador da fosforilação oxidativa e de inibição do inchamento mitocondrial induzido por acetato de Na^+ na presença de substrato. Porém, a hispidulina não afetou o inchamento induzido por valinomicina e K^+ na ausência de substrato. Os resultados sugerem que esses efeitos sobre o metabolismo mitocondrial promovidos pela hispidulina podem ser os responsáveis pela sua citotoxicidade e efeitos biológicos.

2.5.3 Efeitos da eupafolina sobre o metabolismo energético mitocondrial e sobre células tumorais

Herrerias *et al*. (2007) observou os efeitos promovidos pela eupafolina (6-metoxi-5,7,3',4'-trihidroxiflavona) (FIGURA 5) sobre os parâmetros respiratórios, utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato e constatou que esta flavona diminui a velocidade respiratória no estado 3 nas doses de (25 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) com os substratos glutamato e succinato. Provoca um estímulo na velocidade respiratória no estado 4 a partir da dose de 100 $\mu mol.L^{-1}$, quando o succinato foi utilizado como substrato e na dose de 200 $\mu mol.L^{-1}$ quando o glutamato foi utilizado. Ainda promove uma diminuição no coeficiente de controle respiratório nas doses de (25 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) com os substratos glutamato e succinato. A razão ADP/O é diminuída nas doses de (25 – 200 $\mu mol.L^{-1}$) quando o substrato utilizado foi o succinato, porém quando foi utilizado o glutamato não verificou-se efeito. Esta flavona também tem seu sítio de ação entre os complexos I e III da cadeia respiratória e provocou uma redução na amplitude do inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e K^+ na ausência de substrato, sugerindo um possível efeito da eupafolina sobre a fluidez da membrana mitocondrial.

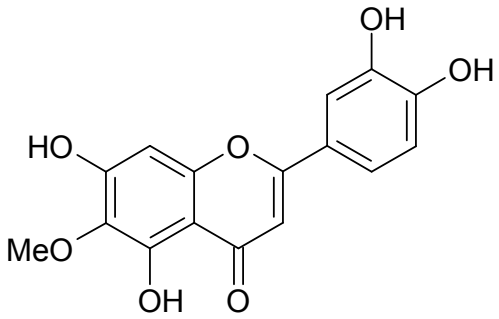


FIGURA 5 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA EUPAFOLINA

Em estudo realizado em nosso laboratório, tanto a hispidulina quanto a eupafolina na concentração de 100 μmol.L^{-1} diminuem cerca de 40% da viabilidade de células de carcinoma uterino humano (Hela). Em células de melanoma murino (B16-F10) a hispidulina não teve efeito na viabilidade celular, porém a flavona e a eupafolina na concentração de 200 μmol.L^{-1} diminuiram 40 e 80% da viabilidade destas células, respectivamente (HERRERIAS *et al*., 2008, não publicado).

De acordo com Abe *et al*. (2002), a eupafolina inibe o crescimento de três linhagens tumorais: MK-1 (adenocarcinoma gástrico humano), HeLa (carcinoma uterino humano) e B16-F10 (melanoma murino) com valores de GI_{50} (dose responsável pela inibição de 50% do crescimento) de 29, 6 e 16 μmol.L^{-1} respectivamente.

Cabe ressaltar que a presença do anel catecol na estrutura da eupafolina faz com que ela possa sofrer processo de autoxidação gerando espécies reativas de oxigênio, o que pode contribuir para seus efeitos biológicos.

Os efeitos da eupafolina e da hispidulina sobre o metabolismo mitocondrial foram comparados com os observados utilizando a flavona não substituída que é o objeto de estudo deste trabalho.

2.5.4 Flavona

O flavonóide utilizado em nosso estudo é a flavona (2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona) (FIGURA 6). Este flavonóide é encontrado em plantas como em grãos de cereais e endro (MARTENS; MITHÖFER, 2005).

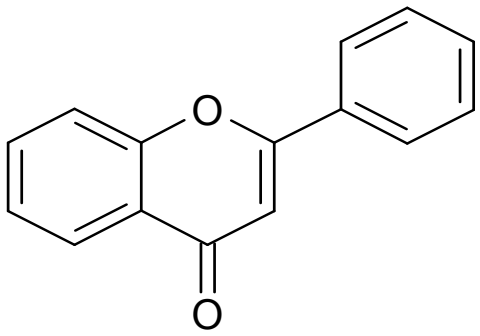


FIGURA 6 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA FLAVONA

Segundo Jeon *et al*. (2007) a flavona é capaz de inibir a contração vascular de músculo liso, provocando um efeito inibitório pela diminuição na fosforilação da miosina fosfatase.

De acordo com Wenzen *et al*. (2000) a flavona pode promover uma elevada indução da apoptose em células de câncer cólon-retal e segundo Martens e Mithöfer (2005) induz a ativação de várias caspases e diminui a expressão de proteína anti-apoptótica mitocondrial Bcl-2.

Zanden (2005) verificou que a flavona (25 $\mu mol.L^{-1}$) inibe a atividade de proteínas de resistência a multidroga 1 em 36%. Estas proteínas de membrana estão envolvidas com a defesa do organismo contra compostos tóxicos e este flavonóide poderia comprometer este sistema de defesa (BORST; ELFERINK, 2002).

A flavona é capaz de afetar também algumas enzimas responsáveis pela metabolização de xenobióticos, tendo sido relatados efeitos indutores sobre as enzimas glutationa S-transferase, UDP-glucoronosiltransferase 1 e isoformas 1A e 2B do citocromo P450 (CANIVENC-LAVIER *et al*.,1996).

Como descrito anteriormente, são conhecidas várias propriedades biológicas de flavonas e de alguns derivados com diferentes substituintes, contudo, ainda não são conhecidos os efeitos da flavona não substituída sobre o metabolismo mitocondrial. Como a flavona possui vários efeitos sobre o metabolismo hepático, metabolização de drogas e sobre o processo de ativação da apoptose, torna-se importante o estudo dos seus efeitos sobre parâmetros relacionados ao metabolismo energético mitocondrial hepático. Desta forma torna-se possível a comparação dos seus efeitos com aqueles

obtidos com outras flavonas substituídas já estudadas em nosso laboratório (hispidulina e eupafolina).

3. OBJETIVOS

Como descrito anteriormente, sabe-se que a flavona interfere no metabolismo hepático, na biotransformação de drogas e no processo de ativação da apoptose, porém, não são conhecidos seus efeitos sobre o metabolismo energético mitocondrial. Desta forma, é importante a realização deste estudo que tem como objetivo avaliar os efeitos da flavona sobre o metabolismo energético mitocondrial hepático, buscando entender seu mecanismo de ação.

Para tanto tivemos como objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos da flavona sobre os seguintes parâmetros mitocondriais:
    1. Consumo de oxigênio;
    2. Atividade das enzimas da cadeia respiratória;
    3. Inchamento mitocondrial na presença de valinomicina e KNO_3;
    4. Potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$);
- Comparar os efeitos observados aos já descritos para flavonas já estudadas em nosso laboratório (hispidulina e eupafolina).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

Glutamato de sódio, succinato de sódio, NADH, ATP, ADP, EGTA, EDTA, FCCP, rotenona, D-manitol, sacarose, HEPES, BSA, fosfoenolpiruvato, valinomicina, oligomicina, citocromo *c*, DCPIP, PMS, DMSO, cianeto de potássio, fosfoenolpiruvato, piruvato quinase, antimicina, Tris e flavona foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Hidróxido de potássio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, heptamolibdato de amônio foram adquiridos da Merck® do Brasil.

Os demais reagentes utilizados foram do melhor grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água deionizada através de sistema purificador Millipore Milli Q®.

4.2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE FLAVONA

Para o preparo da solução estoque a flavona foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO). Nos experimentos polarográficos as concentrações de flavona utilizadas foram aquelas determinadas em experimentos preliminares: 25, 50, 75, 100, 150 e 200 μmol.L^{-1}. Para o restante dos experimentos apenas a dose de 25 μmol.L^{-1} não foi utilizada, porque os efeitos provocados nesta dose estavam muito próximos da dose de 50 μmol.L^{-1}. Para a realização de cada experimento, as mitocôndrias foram incubadas por 2 minutos com as diferentes concentrações da flavona. Foram realizados em todos os experimentos controles usando o solvente (DMSO).

4.3. ANÁLISES DOS EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL

4.3.1. Animais

Para o isolamento de mitocôndrias, foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, machos, pesando 200 a 300 g, mantidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas permitindo-se o consumo de água.

Este trabalho recebeu aprovação (Processo 23075026484/2007-23 de 21/06/2007 Certificado n°233) do Comitê de Ética em Experimentação Animal, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

4.3.2. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato para determinação do consumo de oxigênio, atividades enzimáticas e potencial elétrico de membrana (ΔΨ)

Os animais foram mortos por decapitação, e o fígado rapidamente retirado e colocado no meio de isolamento, sendo mantido em banho de gelo durante todo o processo. Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por Voss *et al*. (1961), utilizando como meio de isolamento: Sacarose 250 $mmol.L^{-1}$, Tris-HCl 10 $mmol.L^{-1}$ (pH 7,4), EDTA 0,5 $mmol.L^{-1}$ e soroalbumina bovina (BSA) 0,05 g%. O fígado foi picado com tesoura em pequenos pedaços, lavado pelo menos três vezes com o mesmo meio e homogeneizado utilizando-se o homogeneizador van Potter-Elvehjem por três vezes com o pistilo frouxo e duas vezes com o pistilo normal, sucessivamente. O homogeneizado obtido foi então centrifugado em centrífuga Hitachi Himac CR21E refrigerada entre 2ºC – 4ºC a 2500g por cinco minutos. Nesta primeira etapa de centrifugação, desprezou-se o sedimento, que possui restos de células intactas, membranas e núcleos e o sobrenadante que contém as mitocôndrias foi novamente centrifugado a 12500 g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso com meio de isolamento e centrifugado a 10000 g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Por fim, foi obtida a suspensão mitocondrial, com

concentração protéica final variando de 20 a 100 mg.mL^{-1}. A suspensão mitocondrial obtida foi conservada em banho de gelo e utilizada imediatamente.

4.3.3. Determinação do consumo de oxigênio

Foram utilizadas mitocôndrias de fígado de rato (1mg) isoladas segundo método de Voss *et al*. (1961) (descrito no item 4.3.2) e meio de incubação contendo: tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} (pH 7,4), EGTA 0,1 mmol.L^{-1}, manitol 125 mmol.L^{-1}, KCl 65 mmol.L^{-1} e suplementadas com glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1} ou succinato de sódio 3 mmol.L^{-1}, Pi 1,6 mmol.L^{-1} e ADP 0,16 mmol.L^{-1}.

Os experimentos foram realizados em volume final de 1,3 mL, sob agitação constante em câmara termostatizada a 28°C (VOSS *et al*., 1961). O consumo de O_2 por mitocôndrias intactas nas diferentes situações foi determinado polarograficamente em oxígrafo Gilson, utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), acoplado a um registrador. Os resultados foram expressos em nanomol de O_2 consumidos.min^{-1}.mg^{-1} de proteína considerando-se a solubilidade do O_2 na água, na temperatura 28°C a 1 atm de 235 µmol.L^{-1} (ESTABROOK, 1967). A velocidade de consumo de oxigênio relativa ao controle foi normalizada a 100%. O coeficiente de controle respiratório (CCR) foi obtido da relação entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado 3) e a velocidade após o consumo de ADP (estado 4). A razão ADP/O foi avaliada considerando a razão entre a concentração molar de ADP adicionado ao sistema e a quantidade de oxigênio consumido durante todo o estado 3 (CHANCE; WILLIAMS, 1955; ESTABROOK, 1967).

4.3.4. Preparo de mitocôndrias rompidas para determinação das atividades enzimáticas mitocondriais

Mitocôndrias foram isoladas de acordo com o método de Voss *et al*. (1961), foram congeladas em nitrogênio líquido após o isolamento e apenas retiradas antes do seu uso, quando foram rompidas, por choque térmico (congelamento e descongelamento de 3 a 5 vezes) e mantidas em banho de gelo durante os ensaios.

Foram obtidos fragmentos de membrana com os componentes da cadeia respiratória , sendo estes utilizados para a avaliação das atividades enzimáticas mitocondriais.

4.3.5. Determinação da atividade das enzimas relacionadas com a cadeia respiratória mitocondrial

A atividade das enzimas ligadas à cadeia respiratória foi determinada espectrofotometricamente em um sistema de espectofotômetro modelo UV – 2450PC ou polarograficamente em oxígrafo Gilson, utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), acoplado a um registrador.

4.3.5.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade da NADH oxidase foi determinada espectofotometricamente pelo método de Singer (1974) através do monitoramento da velocidade de oxidação do NADH (reação 1) a 340 nm.

$$NADH + 1/2O_2 + H^+ \rightarrow NAD^+ + H_2O \quad (1)$$

O sistema de reação foi composto por tampão fosfato 80 mmol.L^{-1} (pH 7,4), EDTA 50 mmol.L^{-1}, NADH 0,17 mmol.L^{-1} e 0,5 mg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu em temperatura controlada de 28ºC, em volume final de 1 mL, sendo iniciada pela adição de NADH (T_0), sendo acompanhada por 2 minutos.

Para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar ε_{340nm}= 6220 $cm^{-1}.M^{-1}$. Os resultados foram expressos em nmol de NADH oxidado. $min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína mitocondrial.

4.3.5.2. NADH-Desidrogenase (EC 1.6.5.3 - NADH: Ferricianeto Óxido-redutase)

A atividade da NADH-desidrogenase foi determinada pelo método espectrofotométrico de Singer (1974), usando o ferricianeto como aceptor artificial de elétrons na presença da rotenona e a reação foi monitorada a 420 nm (Reação 2).

$$NADH + H^+ + 2 \text{ ferricianeto} \rightarrow NAD^+ + 2\,H^+ + 2 \text{ ferrocianeto} \quad (2)$$

O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4), EDTA 2,0 mmol.L^{-1}, NADH 0,15 mmol.L^{-1}, ferricianeto 600 μmol.L^{-1}, rotenona 1 μmol.L^{-1}, NaCN 1 mmol.L^{-1} e 40 µg de proteína mitocondrial, as mitocôndrias foram incubadas por 2 minutos com cada concentração da flavona. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 mL, sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos. O cálculo da velocidade da reação foi realizado utilizando-se o coeficiente de extinção molar ε_{420nm}= 1040 $cm^{-1}.M^{-1}$. Os resultados foram expressos em nanomol de ferricianeto reduzido.min^{-1}.mg^{-1} de proteína mitocondrial (CREUTZ; SUTIN, 1973).

4.3.5.3. Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade enzimática da succinato oxidase foi determinada polarograficamente pelo método de Singer (1974). O sistema de reação em volume final de 1,3 ml foi constituído de: Tampão fosfato 80 mmol.L^{-1} (pH 7,4), EDTA 50 µmol.L^{-1}, rotenona 1 µmol.L^{-1}, succinato de sódio 10 mmol.L^{-1} e 1 mg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu em temperatura controlada de 28ºC, em volume final de 1,3 mL, e foi iniciada pela adição de succinato de sódio 10 mmol.L^{-1} . Os resultados foram expressos em nanomol de oxigênio consumido.min^{-1}.mg^{-1} de proteína, considerando a solubilidade do O_2 em água, a 1 atm e a 28ºC de 235 µmol.L^{-1} (ESTABROOK, 1967).

4.3.5.4. Succinato Citocromo *c* Redutase (EC 1.3.99.1 - Succinato: Ferrocitocromo *c* Óxido - Redutase)

A atividade desta enzima foi determinada pelo método de Somlo *et al*. (1965), medindo-se a redução do citocromo *c*, após o bloqueio da cadeia respiratória com NaCN 1 mmol.L^{-1} e rotenona 1 μmol.L^{-1}. A velocidade de redução do citocromo *c* foi acompanhada a 550 nm.

O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4), EDTA 2 mmol.L^{-1}, NaCN 1 mmol.L^{-1}, succinato de sódio 5 mmol.L^{-1}, rotenona 1 μmol.L^{-1} e 20 µg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 28°C, por 2 min, em volume final

de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 40 μmol.L^{-1} de citocromo c (T_0). Para calcular a velocidade da reação foi utilizado o coeficiente de extinção molar ε_{550nm}= 19.000 $cm^{-1}.M^{-1}$. A atividade enzimática resultante foi expressa em micromol de citocromo *c* reduzido.$min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína mitocondrial.

4.3.5.5. Succinato Desidrogenase (EC 1.3.5.1 - Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido-Redutase)

A atividade da succinato desidrogenase foi determinada pelo método de Singer (1974), utilizando-se DCPIP e PMS como aceitadores artificiais de elétrons. A velocidade de redução do DCPIP foi monitorada em 600 nm.

O sistema de reação em volume final de 1 mL foi constituído de: tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4), succinato de sódio 20 mmol.L^{-1}, EDTA 2 mmol.L^{-1}, NaCN 1 mmol.L^{-1}, rotenona 1 mmol.L^{-1}, PMS 1 mmol.L^{-1} e 30 μg de proteína mitocondrial. Os reagentes presentes no sistema, exceto o PMS e o DCPIP, foram incubados por 10 min a 28°C. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 mL, e foi iniciada pela adição de DCPIP 180 μM (T_0), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos. Os resultados foram expressos em micromol de DCPIP reduzido.$min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar ε_{550nm}= 19.000 $cm^{-1}.M^{-1}$ para o DCPIP reduzido (SINGER, 1974).

4.3.5.6. Citocromo *c* Oxidase (EC 1.9.3.1 - Ferrocitocromo *c*: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade da citocromo *c* oxidase foi determinada segundo método espectrofotométrico de Mason *et al*. (1973). A velocidade de oxidação do citocromo *c* foi acompanhada a 550 nm.

O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4), EDTA 2 mmol.L^{-1}, citocromo *c* reduzido 30 μmol.L^{-1} e 20 μg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 mL, e foi iniciada pela adição do citocromo *c* reduzido (T_0), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos.

Para calcular a velocidade da reação foi utilizado o coeficiente de extinção molar ε_{550nm}= 19.000 $cm^{-1}.M^{-1}$. Os resultados foram expressos em micromol citocromo *c* oxidado.$min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína mitocondrial.

Obtenção do Ferrocitocromo *c* : Citocromo *c* oxidado foi reduzido usando ditionito de sódio ($Na_2S_2O_4$) como agente redutor. O ferrocitocromo *c* foi separado do excesso de ditionito por cromatografia em coluna de Sephadex G-25® médio (YONETANI; RAY, 1965). A concentração do citocromo c reduzido foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar ε_{550nm}= 27.700 $cm^{-1}.mol^{-1}$ para a hemoproteína reduzida. O ferrocitocromo *c* preparado por este método contém menos de 5% da proteína oxidada.

4.3.6. Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias intactas na presença e ausência do desacoplador FCCP

A atividade da F_1F_o ATPase (ATP fosfohidrolase) em mitocôndrias intactas na presença e ausência de FCCP foi determinada dosando – fosfato inorgânico (Pi) decorrente da hidrólise de ATP, segundo o método descrito por Pullman *et al*. (1960). O ensaio foi realizado a 28°C, em sistema de reação constituído por: sacarose 50 $mmol.L^{-1}$, tampão Tris-HCl 12 $mmol.L^{-1}$ (pH 7.4), KCl 50 $mmol.L^{-1}$ e proteína mitocondrial na quantidade de 2 mg. Nos experimentos na presença de FCCP, o mesmo foi adicionado na concentração de 1 $\mu mol.L^{-1}$. O volume final da reação foi de 1 mL e a temperatura mantida em 28°C. A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 $mmol.L^{-1}$ (T_0) e mantida sob constante agitação, sendo interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 5%. O material foi centrifugado a 10000 x g por 1 minuto, sendo então o fosfato inorgânico do sobrenadante dosado pelo método de Sumner (1944). A atividade da ATPase foi expressa em micromol de Pi liberado.$min^{-1}.mg^{-1}$ proteína.

4.3.7. Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias Rompidas

A atividade da F_1F_o ATPase (ATP fosfohidrolase) em mitocôndrias rompidas por ciclos congelamento/descongelamento foi determinada dosando-se o fosfato inorgânico decorrente da hidrólise de ATP, segundo o método descrito por Pullman *et al*. (1960). Neste método, usa-se um sistema regenerador de ATP.

O sistema de reação em volume final de 1 mL foi constituído de tampão Tris-HCl 50 $mmol.L^{-1}$ (pH 7,4), $MgSO_4$ 3 $mmol.L^{-1}$, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 $\mu mol.L^{-1}$, 10 unidades de piruvato quinase (1 unidade de piruvato quinase converte 1µmol de PEP a piruvato por min) e proteína mitocondrial na quantidade de 100 $\mu g.\ mL^{-1}$. Após adição do meio de reação e da piruvato quinase, os tubos foram incubados por 10 minutos, a 28ºC. A reação foi iniciada pela adição de ATP 4 $mmol.L^{-1}$ T_0), e interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 5%. O material foi centrifugado a 10.000.g por 1 minuto, sendo então o fosfato inorgânico do sobrenadante dosado pelo método de Sumner (1944). A atividade da ATPase foi expressa em µmol Pi liberado.min^{-1}.mg^{-1} proteína.

4.3.8. Determinação do inchamento (*swelling)* mitocondrial induzido por valinomicina em meio contendo KNO_3.

O inchamento mitocondrial devido à entrada de K^+ e NO^-_3 na matriz, mediada pela valinomicina, foi avaliado de acordo com o método descrito por Moreno e Madeira (1990). As variações na absorbância foram acompanhadas em espectrofotômetro modelo UV – 2450PC, no comprimento de onda de 546 nm.

O meio de reação foi composto de nitrato de potássio 135 $mmol.L^{-1}$, HEPES-KOH 5 $mmol.L^{-1}$ (pH 7,2), EDTA 0,1 $mmol.L^{-1}$, rotenona 2 $\mu mol.L^{-1}$, antimicina A 2 $\mu g.mL^{-1}$ e 0,2 mg de proteína mitocondrial, num volume final de 1 mL. O meio contendo a suspensão mitocondrial foi incubado por 2 minutos com a droga antes da adição de valinomicina 1,5 µg. Os resultados foram expressos como porcentagem relativa ao controle (100%).

4.3.9. Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial Interna (ΔΨ)

O potencial elétrico transmembrana (ΔΨ) foi determinado em espectrofluorímetro modelo RF-5031PC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.) analizando-se a variação de fluorescência promovida pela captação de safranina *O* (ÅKERMAN; WIKSTRÖM, 1976). O comprimento de onda de excitação e de emissão utilizado foi 495 e 585 nm, respectivamente, e as aberturas das fendas de excitação e emissão utilizadas foram de 3 nm (WEICKOWSKI; WOJTCZAK, 1998). A reação ocorreu à 28°C num volume final de 2 mL. O meio foi constituído de: sacarose 250 mmol.L^{-1}, tampão HEPES 20 mmol.L^{-1}, pH 7,2, mitocôndrias (0,5 mg.mL^{-1}), safranina *O* 5 µmol.L^{-1}, succinato de sódio 3 mmol.L^{-1}, NaH_2PO_4 2 mmol.L^{-1}, e rotenona 1 µmol.L^{-1} .

4.3.9.1 Curva de calibração para potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial Interna (ΔΨ)

As curvas de calibração foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Åkerman e Wikström (1976), na qual se mediu o potencial transmembrana desenvolvido pela difusão de K^+ na presença de valinomicina (0,2 µg.mL^{-1}). O potencial foi calculado utilizando a equação de Nernst (equação 1), como descrito por Rossi e Azzone (1969).

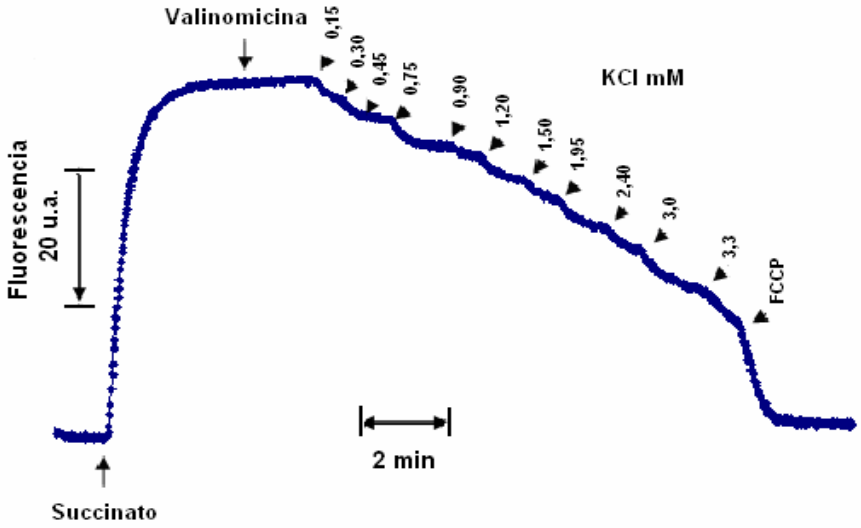
Equação 1: Equação de Nernst

$$\Delta\psi = 60 \cdot \log \left[\frac{K^+ (in)}{K^+ (out)} \right] \qquad \text{onde } K^+ (in) = 120 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$$

A adição de succinato de sódio ao meio da reação livre de K^+, contendo mitocôndrias de fígado de rato e valinomicina, um ionóforo para o K^+, induziu um aumento na diferença de fluorescência do corante no par de comprimentos de onda 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão) (FIGURA 7). Esta variação na fluorescência indica o empilhamento das moléculas do corante na face interna da membrana

mitocondrial interna (ZANOTTI; AZZONI, 1980) e corresponde ao estabelecimento de um potencial de membrana (ÅKERMAN e WIKSTRÖM, 1976). Adições sucessivas de íons K^+ , na presença de valinomicina, resultam na diminuição progressiva da fluorescência da safranina *O* (FIGURA 7), pois a entrada do cátion na matriz mitocondrial neutraliza cargas internas negativas e consequentemente promove uma diminuição no potencial elétrico de membrana. Desta forma menos moléculas de safranina estarão empilhadas à membrana. Uma relação linear foi obtida entre o grau de mudança induzido na faixa de 80 a 175 mV (FIGURA 7) (ÅKERMAN; WIKSTRÖM, 1976).

(A)



(B)

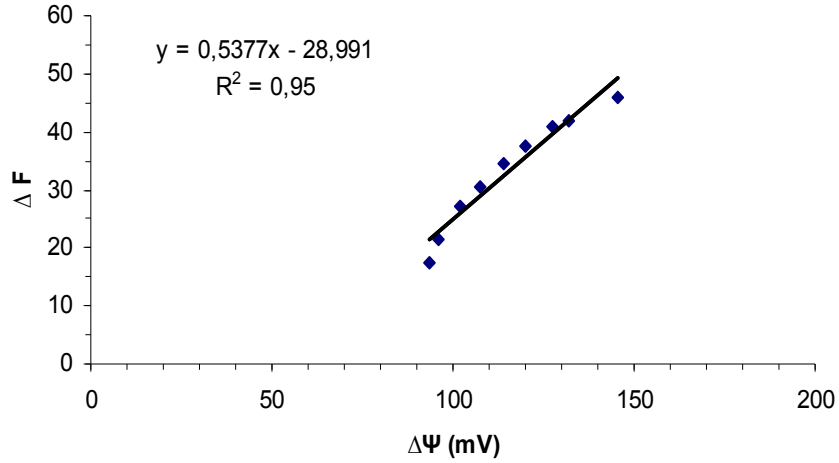


FIGURA 7 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA UTILIZANDO SAFRANINA O

NOTA: (A) refere-se as alterações na intensidade de fluorescência da safranina induzidas pelo potencial de difusão de potássio e (B) refere-se à curva de calibração em função das variações de fluorescência da safranina O. O sistema de reação foi constituído de: sacarose 250 mmol.L^{-1}, tampão HEPES 20 mmol.L^{-1}, pH (7,2), mitocôndrias (0,5 mg.mL^{-1}), safranina O 5 µmol.L^{-1}, rotenona 1 µmol.L^{-1}, NaH_2PO_4 2 mmol.L^{-1} e succinato de sódio 3 mmol.L^{-1}. As adições de valinomicina (0,2 mg.mL^{-1}), de KCl e FCCP (1 µmol.L^{-1}) foram feitas como indicado na figura.

4.3.10. Determinação da concentração de proteínas mitocondriais

A concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Lowry *et al*. (1951), em 700 nm utilizando-se albumina de soro bovino como padrão em espectrofotômetro modelo UV – 2450PC.

4.3.11. Análise estatística dos dados experimentais

Os dados experimentais foram expressos como sendo a média ± desvio padrão (média ± DP), submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para a comparação das médias de experimentos independentes. Valores de $p \leq 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos. Foi realizada a regressão linear para

verificar a existência de uma relação linear dos efeitos promovidos em relação à dose de flavona utilizada.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DOS EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO

A oxidação de substratos pela cadeia respiratória gera um fluxo de elétrons, reduzindo componentes da cadeia transportadora de elétrons. Esta cadeia é formada por complexos enzimáticos que promovem a transferência de elétrons de acordo com seu potencial redox até a redução do oxigênio a água (NICHOLLS e FERGUSON, 2002). Segundo Hodnick *et al*. (1987), os flavonóides são compostos que possuem a capacidade de afetar este transporte de elétrons e o consumo de oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial.

Para verificar a hipótese de a flavona (2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona) afetar a respiração mitocondrial, inicialmente foram realizadas as análises polarográficas dos efeitos da flavona sobre parâmetros relacionados ao consumo de oxigênio, utilizando glutamato ou succinato de sódio como substratos (FIGURA 9, 10, 11 e 12).

Os resultados mostraram que a flavona promove uma redução na velocidade respiratória no estado 3 da respiração com ambos os substratos nas concentrações acima de 75 $\mu mol.L^{-1}$ (FIGURA 9). Quando o glutamato foi utilizado, a diminuição ocorreu de maneira dose-dependente (r^2=0,97) e foi mais acentuada que a diminuição observada quando o succinato foi utilizado como substrato. As reduções foram de 52 e 26% na dose máxima de flavona (200 $\mu mol.L^{-1}$) quando utilizou-se glutamato ou succinato como substratos, respectivamente.

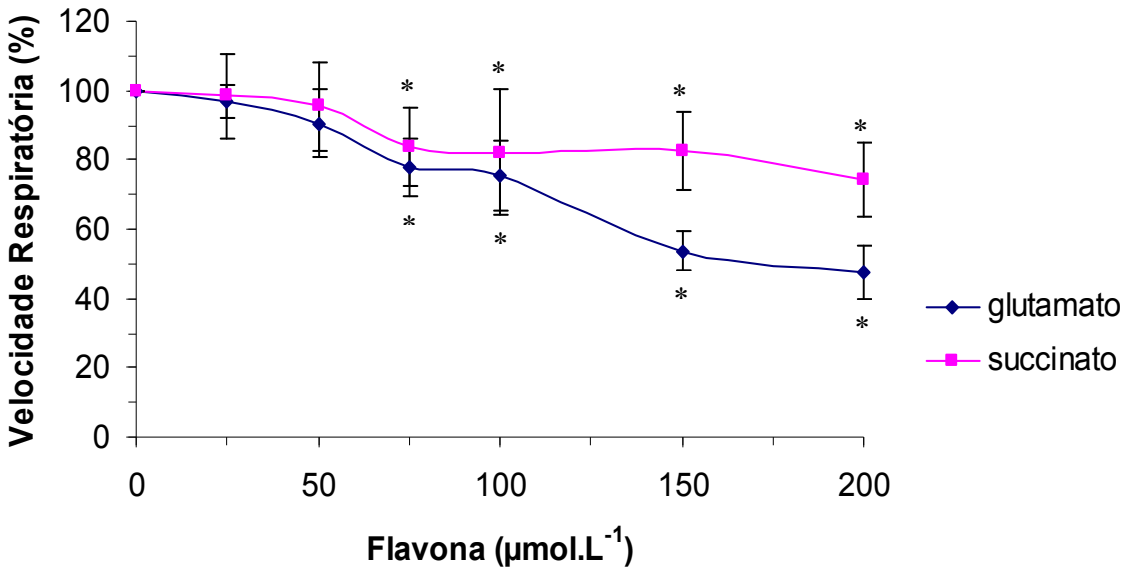


FIGURA 9 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA NO ESTADO 3 UTILIZANDO-SE GLUTAMATO OU SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O sistema de reação foi composto por: D-manitol 125 mmol.L^{-1} ,KCl 65 mmol.L^{-1}, tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), BSA 0,05%, EGTA 0,1 mmol.L^{-1}, Pi 1,6 mmol.L^{-1}, ADP 0,16 mmol.L^{-1}, 1mg de proteína mitocondrial e glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1}. Quando foi utilizado succinato 3 mmol.L^{-1}, acrescentou-se rotenona 2 µmol.L^{-1}, em um volume final de 1,3 mL, na temperatura de 28°C. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas e estão expressos em porcentagem relativa ao controle (100%), para velocidade respiratória do estado 3. Controle (100%) corresponde a 54,9 ± 11,5 nanomol de oxigênio consumido.$min.^{-1}mg^{-1}$ de proteína quando se utilizou o glutamato como substrato e 54,3 ± 15,2 nanomol de oxigênio consumido.$min.^{-1}mg^{-1}$ de proteína quando se utilizou o succinato. * Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

Quando analisamos a velocidade respiratória no estado 4, observamos que nas doses de 25 - 75 µmol.L^{-1} não foram verificadas alterações estatisticamente significativas (FIGURA 10). Nas doses de 150 e 200 µmol.L^{-1} verificou-se um estímulo nesta velocidade respiratória, quando o substrato utilizado foi o glutamato e nas doses de 100, 150 e 200 µmol.L^{-1}, quando o substrato utilizado foi o succinato. Quando

utilizou-se os substratos glutamato e succinato na presença de flavona 200 μmol.L^{-1} observou-se os estímulos de 21 e 25%, respectivamente (FIGURA 10).

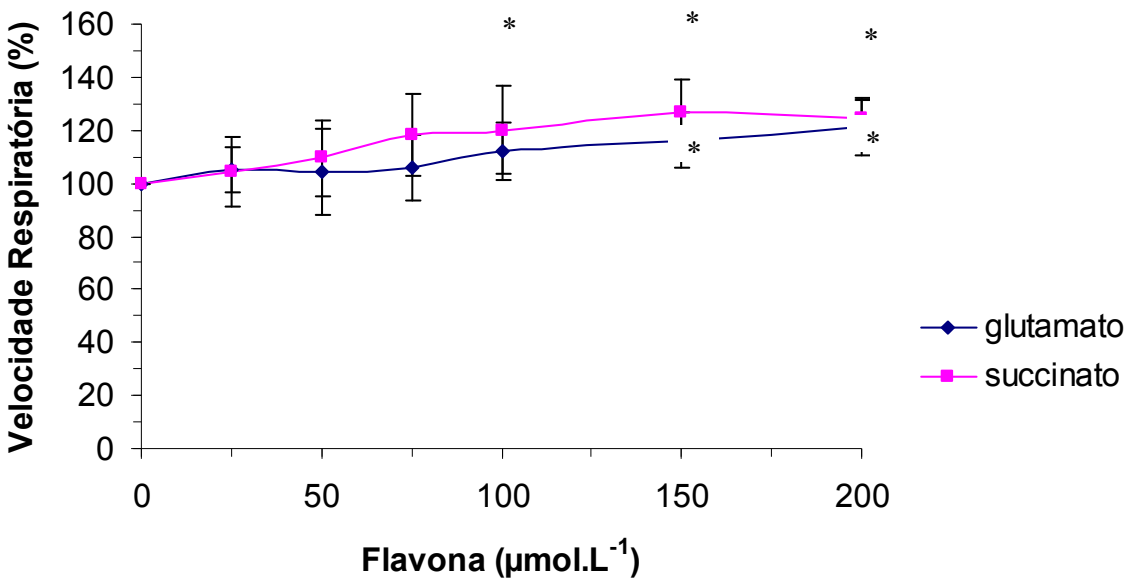


FIGURA 10 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA NO ESTADO 4 UTILIZANDO-SE O GLUTAMATO OU SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O sistema de reação foi composto por: D-manitol 125 mmol.L^{-1} ,KCl 65 mmol.L^{-1}, tampão Hepes 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), BSA 0,05%, EGTA 0,1 mmol.L^{-1}, Pi 1,6 mmol.L^{-1}, ADP 0,16 mmol.L^{-1}, 1mg de proteína mitocondrial e glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1}. Quando foi utilizado succinato 3 mmol.L^{-1}, acrescentou-se rotenona 2 μmol.L^{-1}, em um volume final de 1,3 mL, na temperatura de 28°C. Os resultados representam à média ± desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados em duplicatas ou triplicatas e estão expressos em porcentagem relativa ao controle de 100%, para velocidade respiratória do estado 4. Controle (100%) corresponde a 12,9 ± 2,4 nanomol de oxigênio consumido.min.$^{-1}$mg^{-1} de proteína quando se utilizou o glutamato como substrato e 14,5 ± 3,9 nanomol de oxigênio consumido.min.$^{-1}$mg^{-1} de proteína o succinato. *Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

Ao verificar os efeitos da flavona sobre a razão ADP/O (FIGURA 11), quando usado glutamato como substrato, observou-se que apenas nas doses de 150 e 200 μmol.L^{-1} ocorreram diferenças significativas, sendo que na dose de 200 μmol.L^{-1} foi observada uma diminuição de aproximadamente 16% em relação ao controle. Quando

o substrato utilizado foi o succinato, ocorreu uma diminuição deste parâmetro nas doses de 75 - 200 μmol.L^{-1} chegando a 21% quando foi utilizada a maior dose (FIGURA 11).

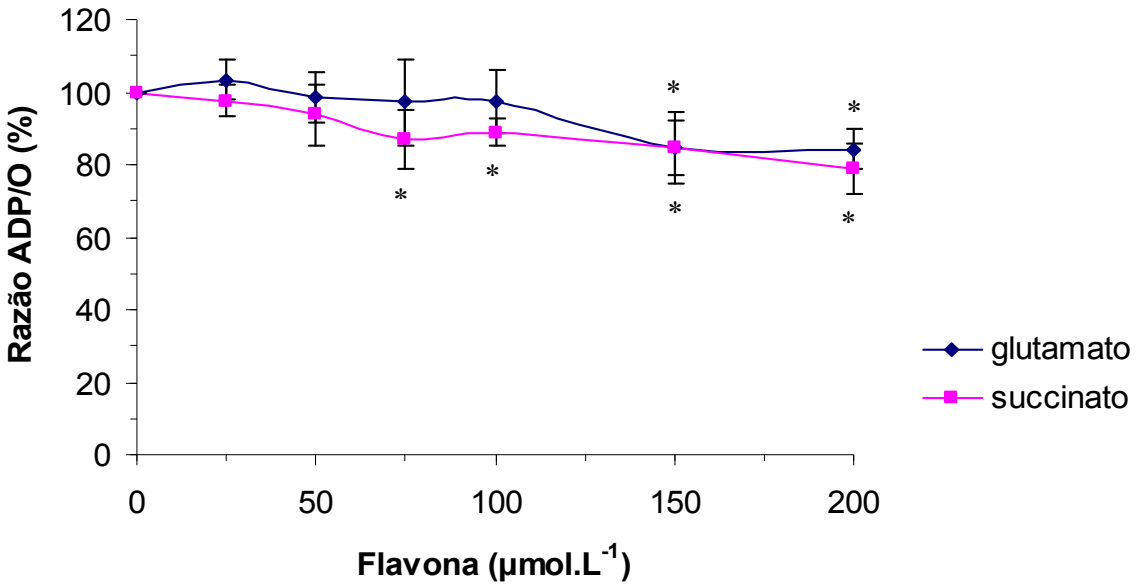


FIGURA 11 - EFEITO DA FLAVONA SOBRE A RAZÃO ADP/O UTILIZANDO GLUTAMATO OU SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O sistema de reação foi composto por: D-manitol 125 mmol.L^{-1} ,KCl 65 mmol.L^{-1}, tampão Hepes 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), BSA 0,05%, EGTA 0,1 mmol.L^{-1}, Pi 1,6 mmol.L^{-1}, ADP 0,16 mmol.L^{-1}, 1mg de proteína mitocondrial e glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1}. Quando foi utilizado succinato 3 mmol.L^{-1}, acrescentou-se rotenona 2 μmol.L^{-1}, em um volume final de 1,3 mL, na temperatura de 28°C. Os resultados representam à média ± desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas e estão expressos em porcentagem relativa ao controle de 100%, para a razão ADP/O. Controle (100%) corresponde a uma relação ADP/O de 2,1 ± 0,3 quando se utilizou o glutamato como substrato e de 1,7 ± 0,1 quando se utilizou o succinato. * Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

A flavona promoveu uma diminuição significativa nos valores de coeficiente de controle respiratório de maneira dose-dependente nas doses acima de 50 μmol.L^{-1} (FIGURA 12). Quando glutamato foi utilizado como substrato a flavona (200 μmol.L^{-1}) promoveu uma diminuição de 59% no valor do coeficiente de controle

respiratório, sendo esta redução mais pronunciada que a observada quando succinato foi utilizado como substrato, que foi de 37% (FIGURA 12).

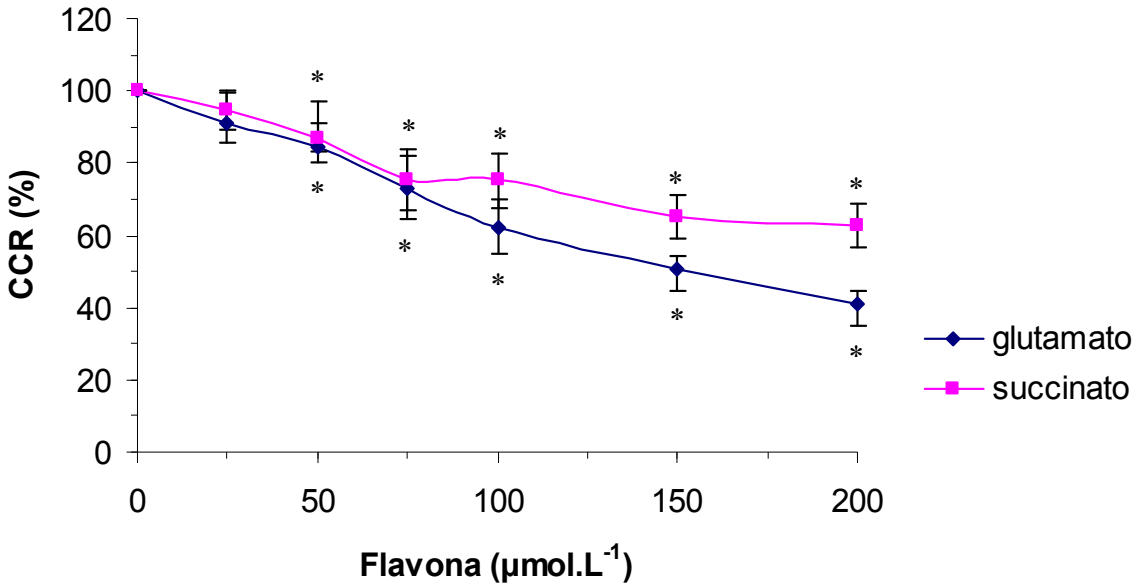


FIGURA 12 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO (CCR) UTILIZANDO GLUTAMATO E SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O sistema de reação foi composto por: D-manitol 125 mmol.L^{-1} ,KCl 65 mmol.L^{-1}, tampão Hepes 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), BSA 0,05%, EGTA 0,1 mmol.L^{-1}, Pi 1,6 mmol.L^{-1}, ADP 0,16 mmol.L^{-1}, 1 mg de proteína mitocondrial e glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1}. Quando foi utilizado succinato 3 mmol.L^{-1}, acrescentou-se rotenona 2 µmol.L^{-1}, em um volume final de 1,3 mL, na temperatura de 28°C. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas e estão expressos em porcentagem relativa ao controle de 100%, para o coeficiente de controle respiratório. Controle (100%) corresponde a um coeficiente de controle respiratório de 4,3 ± 0,7 quando se utilizou o glutamato como substrato e de 3,9 ± 0,4 quando se utilizou o succinato. * Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

Os resultados das análises polarográficas mostrando os efeitos da flavona sobre parâmetros relacionados ao consumo de oxigênio, utilizando glutamato ou succinato estão resumidos nas TABELAS 3 e 4.

TABELA 3 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE OS PARÂMETROS RELACIONADOS AO CONSUMO DE OXIGÊNIO QUANDO UTILIZADO O GLUTAMATO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL

Flavona ($\mu mol.L^{-1}$)	**Estado 3 (%)**	**Estado 4 (%)**	**ADP/O (%)**	**CCR (%)**
0	100,0	100,0	100,0	100,0
25	96,7 ± 4,7	104,9 ± 8,7	103,5 ± 5,5	90,8 ± 8,7
50	90,5 ± 9,7	104,3 ± 14,9	98,6 ± 6,7	84,4 ± 12,8*
75	77,9 ± 8,5*	106,1 ± 12,5	97,2 ± 11,7	73,1 ± 8,7*
100	75,7 ± 10,1*	112,1 ± 10,9	97,2 ± 8,7	62,3± 7,8*
150	53,7 ± 5,7*	116,1 ± 10,5*	84,8 ± 9,9*	50,6 ± 3,8*
200	47,5 ± 7,8*	121,4 ± 11,0*	84,3 ± 5,4*	40,9 ± 4,0*

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O sistema de reação foi composto por: D-manitol 125 $mmol.L^{-1}$,KCl 65 $mmol.L^{-1}$, tampão Hepes 10 $mmol.L^{-1}$ (pH 7,2), BSA 0,05%, EGTA 0,1 $mmol.L^{-1}$, Pi 1,6 $mmol.L^{-1}$, ADP 0,16 $mmol.L^{-1}$, 1 mg de proteína mitocondrial e glutamato de sódio 5 $mmol.L^{-1}$ em um volume final de 1,3 mL, na temperatura de 28°C. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas e estão expressos em porcentagem relativa ao controle de 100%, para a velocidade respiratória do estado 3 e 4, razão ADP/O e coeficiente de controle respiratório. * Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

TABELA 4 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE OS PARÂMETROS RELACIONADOS AO CONSUMO DE OXIGÊNIO QUANDO UTILIZADO O SUCCINATO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL

Flavona ($\mu mol.L^{-1}$)	**Estado 3 (%)**	**Estado 4 (%)**	**ADP/O (%)**	**CCR (%)**
0	100,0	100,0	100,0	100,0
25	98,5 ± 12,3	104,1 ± 13,0	97,4 ± 4,3	94,7 ± 5,2
50	95,4 ± 12,9	109,4 ± 14,2	93,7 ± 8,5	87,1 ± 4,0*
75	83,7 ± 11,1*	118,1 ± 15,4	87 ± 8,3*	75,2 ± 8,4*
100	82,2 ± 16,9*	120,1 ± 16,6*	88,9 ± 3,9*	75,1 ± 7,3*
150	82,4 ± 11,2*	126,4± 13,1*	84,6 ± 7,6*	65,3 ± 5,9*
200	74,2 ± 10,71*	124,5 ± 6,8*	79 ± 7,0*	62,7 ± 6,1*

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O sistema de reação foi composto por: D-manitol 125 $mmol.L^{-1}$,KCl 65 $mmol.L^{-1}$, tampão Hepes 10 $mmol.L^{-1}$ (pH 7,2), BSA 0,05%, EGTA 0,1 $mmol.L^{-1}$, Pi 1,6 $mmol.L^{-1}$, ADP 0,16 $mmol.L^{-1}$, 1mg de proteína mitocondrial, succinato 3 $mmol.L^{-1}$ e rotenona 2 $\mu mol.L^{-1}$, em um volume final de 1,3 mL, na temperatura de 28°C. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas e estão expressos em porcentagem relativa ao controle de 100%, para a velocidade respiratória do estado 3 e 4, razão ADP/O e controle respiratório. * Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

Portanto, podemos sugerir a princípio que os efeitos provocados pela flavona sobre os parâmetros da respiração mitocondrial, poderiam ser conseqüência de alguns aspectos como:

a) Uma restrição parcial no fluxo de elétrons através da cadeia respiratória gerado por inibição das atividades de enzimas da cadeia respiratória;
b) Inibição da síntese de ATP;
c) Redução da metabolização de substratos, restringindo o fornecimento de elétrons na cadeia respiratória;
d) Alteração da fluidez da membrana mitocondrial.

Considerando as hipóteses citadas à cima, passamos a avaliar inicialmente os possíveis efeitos da flavona sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória.

5.2. EFEITO DA FLAVONA SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

Na TABELA 5 verificamos os efeitos da flavona sobre as atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial.

A flavona provocou uma inibição na atividade da NADH oxidase em todas as doses utilizadas. Na dose máxima a inibição desta atividade enzimática foi de 61%, resultado este que está de acordo com a diminuição da velocidade respiratória do estado 3 obtido quando o substrato utilizado foi o glutamato (52%) (FIGURA 3).

Quando analisamos os efeitos da flavona sobre a atividade da succinato oxidase, observamos que ela afetou significativamente esta atividade nas doses de 75 - 200 $\mu mol.L^{-1}$. A inibição desta atividade enzimática ocorreu de forma dependente da dose, sendo que a flavona na dose de 200 $\mu mol.L^{-1}$ inibiu 32% da atividade. Este resultado também está de acordo com a diminuição da velocidade respiratória do estado 3 obtido quando foi utilizado o succinato como substrato oxidável (26%).

A atividade da succinato citocromo *c* redutase foi inibida pela flavona em todas as doses utilizadas, sendo que esta inibição ocorreu de forma dose-dependente chegando a 53% na maior dose utilizada.

A flavona não provocou efeito significativo em nenhuma das doses utilizadas para a atividade das enzimas NADH desidrogenase, succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase. Desta forma, os resultados sugerem que o sítio de ação da flavona está localizado também entre os complexos I e III da cadeia respiratória. Estes efeitos provocados pela flavona sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória concordam com os resultados vistos no consumo de oxigênio e ainda com os efeitos provocados por outras flavonas (hispidulina e eupafolina) estudas em nosso laboratório (DABAGHI-BARBOSA *et al*., 2005; HERRERIAS *et al*., 2007).

TABELA 5 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATORIA

Flavona ($\mu mol.L^{-1}$)	Atividade Enzimática (%)					
	NADH Oxidase	NADH Desidroge-nase	Succinato Oxidase	Succinato Desidroge-nase	Succinato Citocromo *c* Redutase	Citocromo *c* Oxidase
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
50	64,7 ± 11,8*	100,1 ± 4,4	90,3 ± 9,2	95,7 ± 8,6	78,3 ± 6,1*	101,7 ± 13,1
75	50,7 ± 8,9*	103 ± 3,1	86,9 ± 10,3*	96,5 ± 8,4	72,3 ± 10,9*	101,2 ± 16,3
100	45,8 ± 6,8*	99,4 ± 2,0	80,6 ± 9,8*	89,5 ± 10,8	68,3 ± 8,5*	98,9 ± 12,9
150	38,2 ± 10,4*	102,2 ± 9,1	73,1 ± 6,7*	89,3 ± 11,9	56,4 ± 7,9*	108,1 ± 8,3
200	38,8 ± 6,4*	103,5 ± 3,6	67,7 ± 6,3*	91,6 ± 12,3	47,4 ± 9,3*	106,1 ± 6,6

FONTE: O autor (2008)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 6.2.5 da seção de Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos em Atividade Enzimática em % relativa ao controle. Controle 100% corresponde a atividade das enzimas: NADH oxidase = 40,66 nmol de NADH oxidado.min^{-1}.mg^{-1} de proteína; NADH desidrogenase = 1,68 µmol de ferricianeto reduzido.min^{-1}.mg^{-1} de proteína; Succinato oxidase = 10,5 $\pm$ 4,6 nanoátomos de oxigênio consumido.$min.^{-1}mg^{-1}$ de proteína mitocondrial; Succinato Desidrogenase = 85 nmol de DCPIP reduzido.min^{-1}.mg^{-1} de proteína mitocondrial; Succinato citocromo *c* Redutase = 71,05 nmol de citocromo c reduzido por min^{-1}. mg^{-1} de proteína; Citocromo *c* Oxidase = 5,06 nmol de citocromo c oxidado.min^{-1}.mg^{-1} de proteína. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle $\pm$ desvio padrão, de no mínimo quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ($p < 0,05$).

5.3. EFEITO DA FLAVONA SOBRE ATIVIDADE DA ATPase

O gradiente eletroquímico de prótons formado pelo fluxo de elétrons através da cadeia respiratória é utilizado pela ATP sintase para síntese de ATP a partir de ADP e Pi. Substâncias que desfazem esse gradiente eletroquímico como desacopladores, que atuam dissipando a força próton motriz afetam a síntese de ATP (NICHOLLS; FERGUSON, 1982).

A velocidade de hidrólise do ATP é baixa em mitocôndrias acopladas e alta em mitocôndrias tratadas com agente desacoplador, neste trabalho avaliamos os efeitos da

flavona sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas na presença e ausência do desacoplador FCCP e em mitocôndrias rompidas, para verificar a influência deste flavonóide diretamente sobre esta enzima.

Quando utilizamos mitocôndrias acopladas, podemos verificar indiretamente possíveis efeitos da flavona sobre a permeabilidade da membrana a prótons, bem como um possível efeito desacoplador que pudesse afetar a síntese de ATP. Quando adicionamos o desacoplador FCCP, a flavona possui a barreira da membrana, porém neste caso a membrana interna encontra-se permeável a prótons.

Os resultados dos efeitos da flavona sobre a atividade da ATPase estão mostrados na (TABELA 6), onde se observou que a flavona nas doses utilizadas não afeta a capacidade hidrolítica da ATPsintase em nenhuma das condições experimentais citadas acima.

TABELA 6 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ATPase EM MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS E INTACTAS (NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE FCCP)

Flavona ($\mu mol.L^{-1}$)	Atividade enzimática (%)		
	ATPase Rompida	ATPase Intacta sem FCCP	ATPase Intacta com FCCP
0	100	100	100
50	104 ± 8	94 ± 9	100 ± 3
75	108 ± 5	96 ± 9	99 ± 5
100	103 ± 10	97 ± 10	101 ± 10
150	107 ± 4	98 ± 12	99 ± 11
200	107 ± 6	102 ± 11	97 ± 6

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Todos os ensaios foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos, no item 4.3.6 e 4.3.7. Os resultados estão expressos em Atividade Enzimática em % relativa ao controle. Controle 100% corresponde à atividade dos controles: ATPase de mitocôndrias rompidas = 1,93 $\pm$ 0,2 μmol de Pi liberado.min^{-1}.mg^{-1} proteína; ATPase de mitocôndrias intactas = 56 $\pm$ 0,1 nmol de Pi liberado.min^{-1}.mg^{-1} proteína; ATPase de mitocôndrias desacopladas com FCCP = 90 $\pm$ 0,23 nmol de Pi liberado.min^{-1}.mg^{-1} proteína. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle $\pm$ o desvio padrão de quatro experimentos independentes.

Ainda de acordo com as considerações sobre os possíveis efeitos da flavona sobre a respiração mitocondrial, na seqüência foram avaliados os possíveis efeitos da flavona sobre parâmetros relacionados à fluidez da membrana mitocondrial.

5.4 EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O INCHAMENTO (SWELLING) MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO KNO_3

As membranas biológicas são compostas basicamente por bicamadas lipídicas, que se tornam barreiras naturais impedindo a passagem de algumas espécies carregadas. Porém, sob certas condições as membranas podem se tornar permeáveis. É o caso quando se utiliza ionóforos que agem como indutores da permeabilidade da membrana a certos íons, como: K^+,Cs^+, Rb^+ e NH_4^+. Esse transporte de íons através da membrana mitocondrial interna provoca um aumento no volume da matriz, fenômeno chamado de "*swelling"* ou inchamento mitocondrial (NICHOLLS; FERGUSON, 1982).

Um método simples para verificar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna é monitorando o aumento da luz transmitida durante o processo de inchamento mitocondrial. O ionóforo utilizado nesta análise foi a valinomicina, que facilita a transferência do K^+ através da membrana mitocondrial interna. Este K^+ que é liberado na matriz mitocondrial é o responsável pelo inchamento mitocondrial, caracterizando então o inchamento mitocondrial desenergizado (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

Neste trabalho o inchamento mitocondrial foi induzido por valinomicina na presença de KNO_3, método que pode avaliar indiretamente os possíveis efeitos da flavona sobre parâmetros relacionados à elasticidade, permeabilidade e fluidez de membrana.

Na FIGURA 12 e TABELA 7 pode-se verificar que a flavona provocou uma discreta diminuição na amplitude e velocidade do inchamento mitocondrial nas doses de 75 - 200 $\mu mol.L^{-1}$, chegando nesta última a uma redução de aproximadamente 27%. Na dose de 200 $\mu mol.L^{-1}$ de flavona observou-se uma redução de aproximadamente cerca de 27% e 35% na amplitude e velocidade, respectivamente. As diminuições

provocadas pela flavona na amplitude e velocidade apresentam-se muito semelhantes em todas as doses utilizadas.

Esses resultados sugerem que a flavona possui um provável efeito sobre membrana, sugerindo que a droga pode estar interferindo no transporte de K^+ na presença de valinomicina e, portanto na fluidez da membrana mitocondrial interna. Este efeito sobre membrana, aliado as inibições enzimáticas (TABELA 5) observadas na cadeia respiratória, está de acordo com os efeitos observados sobre o consumo de oxigênio nas análises polarográficas (TABELA 3 e 4).

TABELA 7 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO KNO_3

Flavona ($\mu mol.L^{-1}$)	Amplitude (%)	Velocidade (%)
0	100,0	100,0
50	93,0 ± 8,2	90,7 ± 4,3
75	86,4 ± 8,6*	83,3 ± 6,4*
100	80,5 ± 13,9*	74,9 ± 10,5*
150	81,4 ± 10,2*	75,2 ± 11,5*
200	72,9 ± 7,0*	64,9 ± 6,2*

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Todos os ensaios foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos, no item 4.3.8. Os resultados estão expressos em % relativa ao controle. Controle 100% corresponde à atividade dos controles. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle ± o desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

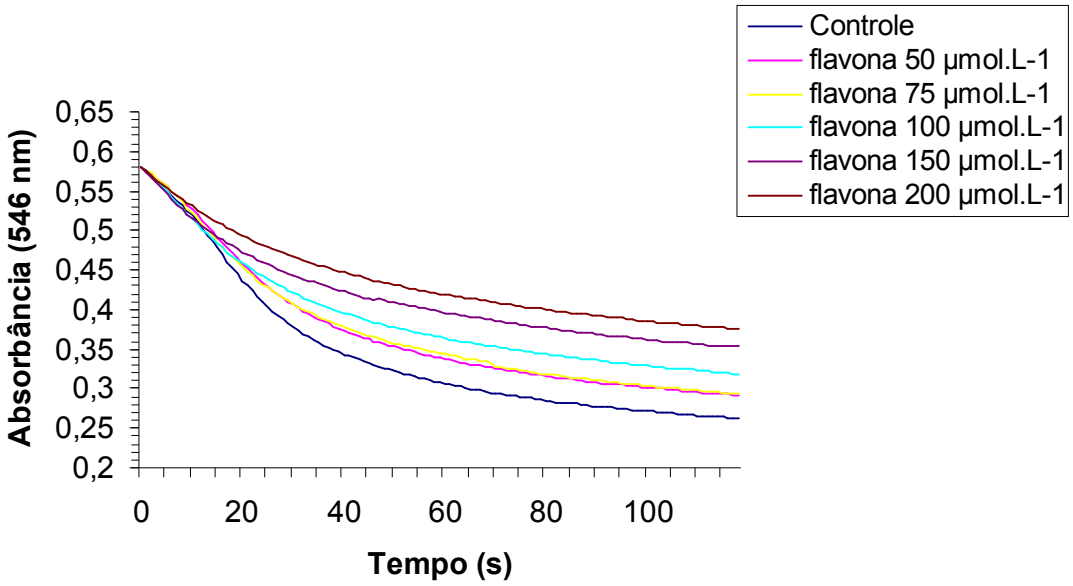


FIGURA 12 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO KNO_3

FONTE: o autor (2008)

NOTA: O sistema de reação foi constituído de nitrato de potássio 135 mmol.L^{-1}, HEPES 5 mmol.L^{-1} (pH 7,2), EDTA 0,1 mmol.L^{-1}, rotenona 2 µ mol.L^{-1}, antimicina A 2 µg.ml^{-1} e 0,2 mg de proteína mitocondrial em um volume final de 1 mL, suplementado com flavona conforme o indicado, conforme procedimento descrito em materiais e métodos, item 4.3.8. O controle (100%) constituiu-se somente de sistema de reação. Os traçados são representativos de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

Considerando os efeitos promovidos pela flavona sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória, pode-se sugerir que o potencial elétrico de transmembrana (ΔΨ) pode também estar sendo afetado. No intuito de analisar esta hipótese os possíveis efeitos da flavona sobre este parâmetro foram analisados a seguir utilizando succinato como substrato oxidável.

5.5 EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO TRANSMEMBRANA (ΔΨ), UTILIZANDO SUCCINATO COMO SUBSTRATO

O potencial elétrico transmembrana (ΔΨ) é gerado pela diferença de cargas entre dois compartimentos aquosos separados pela membrana mitocondrial interna.

Sendo que a manutenção deste gradiente eletroquímico é essencial para o equilíbrio das funções mitocondriais (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

O monitoramento do potencial transmembrana (ΔΨ) pode ser feito pelo uso de sondas fluorescentes. Neste trabalho utilizou-se a Safranina *O* para análise do potencial transmembrana. A Safranina *O* é uma sonda catiônica permeável à membrana, que provoca mudanças espectrais dependentes de sua concentração. Estas mudanças causam um fenômeno chamado *quenching*, que ocorre na matriz mitocondrial, devido à molécula possuir cargas positivas que se associam aos sítios aniônicos na porção hidrofóbica da membrana mitocondrial interna (ÅKERMAN; WIKSTRÖM, 1976).

Para medir estas variações na fluorescência e estimar o valor do potencial foi realizada uma curva de calibração utilizando succinato como substrato (FIGURA 7). Valinomicina, que funciona como um ionóforo foi adicionada ao meio, permitindo a entrada de K^+ através da membrana interna. A diferença no ΔΨ foi induzida por adições subseqüentes e seqüenciais de K^+, as quais provocam em cada adição uma pequena despolarização devido ao movimento eletroforético dos íons. Esta mudança espectral devido à entrada de K^+ promovida pela valinomicina induz uma variação no potencial elétrico de membrana de forma linear, calculado usando-se a equação de Nernst (ÅKERMAN; WIKSTRÖM, 1976).

Os resultados na FIGURA 13 e TABELA 8 mostram os efeitos promovidos pela flavona sobre os valores de ΔΨ em mitocôndrias quando utilizando o succinato como substrato. Na FIGURA 13 o experimento controle (traçado a) possui um potencial de aproximadamente 175 mV. Os efeitos provocados pela flavona quando incubada por 2 minutos e que foram estatisticamente significativos foram nas doses de 100, 150 e 200 $\mu mol.L^{-1}$, onde o potencial diminuiu para aproximadamente 164, 158 e 154 mV nas respectivas doses.

TABELA 8 - EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO TRANSMEMBRANA (ΔΨ)

Flavona ($\mu mol.L^{-1}$)	Potencial (ΔΨ) (%)
0	100,0
50	96,7 ± 3,1
75	95,4 ± 3,1
100	93,6 ± 5,0*
150	90,5 ± 6,0*
200	88,5 ± 5,4*

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Todos os ensaios foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos, no item 4.3.9. Os resultados estão expressos em % relativa ao controle. Controle 100% corresponde à atividade dos controles. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle ± o desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

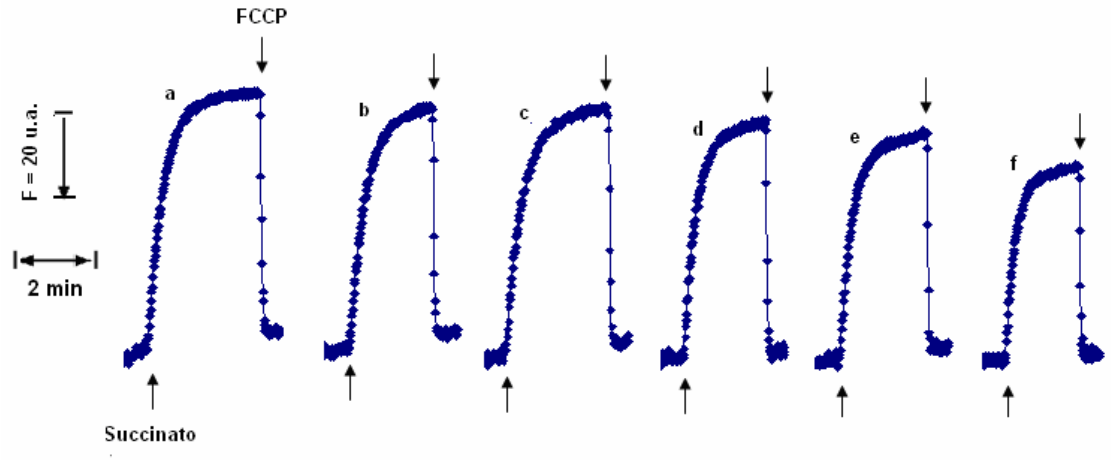


FIGURA 13: EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO TRANSMEMBRANA (ΔΨ)

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O sistema de reação foi constituído de sacarose 250 $mmol.L^{-1}$, HEPES 20 $mmol.L^{-1}$, pH 7,2, NaH_2PO_4 2 $mmol.L^{-1}$, rotenona 1 $\mu mmol.L^{-1}$, safranina 5 $\mu mmol.L^{-1}$ e 0,5 $mg.mL^{-1}$ de proteína mitocondrial. (a) controle sem flavona. Após 2 min de incubação com flavona (b) 50; (c) 75; (d) 100; (e) 150; (f) 200 $mmol.L^{-1}$ foi adicionado succinato de sódio 3 $mmol.L^{-1}$ como indicado. A figura representa os traçados de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

6. DISCUSSÃO

Quando comparamos os resultados promovidos pela flavona sobre o metabolismo energético mitocondrial, com aquelas duas flavonas estudadas anteriormente em nosso laboratório (hispidulina e eupafolina), observamos que para a velocidade respiratória do estado 3, os efeitos provocados pela flavona estão de acordo com os obtidos por Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005), que observou que a hispidulina na dose de 200 $\mu mol.L^{-1}$ provocou uma diminuição da velocidade respiratória no estado 3 de 42% e 27% quando foram utilizados os substratos glutamato e succinato, respectivamente. Entretando, Herrerias *et al*. (2007) verificaram que a eupafolina na concentração de 200 $\mu mol.L^{-1}$ possuiu capacidade de reduzir a velocidade respiratória no estado 3 em 80% e 65% respectivamente quando os substratos glutamato e succinato foram utilizados. Desta forma, podemos constatar que as reduções promovidas pelas três flavonas foram maiores quando o glutamato era o substrato oxidável, porém, com a eupafolina eles foram mais intensas.

Sobre a velocidade respiratória do estado 4, os resultados observados por Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005) mostraram que a hispidulina na concentração de 200 $\mu mol.L^{-1}$ provocava um maior estímulo sobre esse parâmetro do que o observado para a flavona, sendo de 65% para ambos os substratos glutamato e succinato. Os resultados observados por Herrerias *et al*. (2007) mostraram que a eupafolina não apresentou efeito significativo nas doses inferiores a 100 $\mu mol.L^{-1}$ com ambos os substratos, glutamato e succinato, porém quando o substrato utilizado foi o succinato, a eupafolina na dose de 100 $\mu mol.L^{-1}$ provocou um estímulo de 30% na velocidade respiratória do estado 4, valor este que é semelhante ao verificado para a flavona. Na concentração de 200 $\mu mol.L^{-1}$ a eupafolina provocou desacoplamento e redução da velocidade respiratória com ambos os substratos.

Quando comparamos os efeitos sobre a razão ADP/O, de acordo com Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005), a hispidulina apresentou uma redução de 30% e 40% de diminuição da razão ADP/O na dose de 200 $\mu mol.L^{-1}$ com os substratos glutamato e succinato respectivamente. Contudo, Herrerias *et al*. (2007) observaram que a eupafolina não afetou significativamente a razão ADP/O quando utilizado glutamato

como substrato. Porém, quando o substrato utilizado foi o succinato a eupafolina reduziu a razão ADP/O em todas as doses utilizadas, sendo que na dose de 100 μmol.L^{-1} a redução foi de 25%, não sendo possível obter valor para dose de 200 μmol.L^{-1}.

Segundo Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005), a hispidulina na dose de 200 μmol.L^{-1} foi capaz de diminuir o coeficiente de controle respiratório em aproximadamente 60% com ambos os substratos (glutamato e succinato), resultado semelhante ao observado com a flavona quando o glutamato foi utilizado como substrato. Contudo, Herrerias *et al*. (2007) observaram que a eupafolina na dose de 100 μmol.L^{-1} é capaz de diminuir o coeficiente de controle respiratório em 75% e 65% com os substratos glutamato e succinato, respectivamente, já na dose de 200 μmol.L^{-1} não foi possível determinar o valor real devido ao desacoplamento.

Estas reduções mais elevadas provocadas pela eupafolina provavelmente ocorreram devido às diferenças estruturais, principalmente a presença do anel catecol nesta molécula, que não é observado nas estruturas da flavona e hispidulina.

Para a atividade da NADH oxidase, de acordo com Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005) e Herrerias *et al*. (2007), tanto a hispidulina quanto a eupafolina foram capazes de inibir esta atividade em todas as doses utilizadas, resultado também observado pela flavona. A hispidulina na dose de 200 μmol.L^{-1}, inibiu cerca de 43% esta atividade. A eupafolina nesta dose mostrou um efeito mais pronunciado, sendo a inibição da atividade de 76%. A flavona inibiu essa atividade em 61%.

Quando comparamos os efeitos promovidos por estes flavonóides sobre a atividade da succinato oxidase, de acordo com Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005) a hispidulina promove uma inibição da atividade da succinato oxidase nas concentrações de 75 - 200 μmol.L^{-1}, porém um pouco menos acentuadas que as obtidas com a flavona, chegando a aproximadamente 18% na maior dose 200 μmol.L^{-1}. A inibição provocada pela eupafolina na atividade desta enzima foi semelhante a da hispidulina, sendo que na dose de 200 μmol.L^{-1} esta atividade foi inibida aproximadamente em 23% (HERRERIAS *et al*., 2007).

Comparando os efeitos provocados pela flavona sobre a atividade da succinato citocromo *c* redutase, verificamos que ele é intermediário aos efeitos observados com a

hispidulina e eupafolina, pois a hispidulina na dose de 200 μmol.L^{-1} provocou uma inibição de aproximadamente 22% (DABAGHI-BARBOSA *et al*., 2005), já a eupafolina afetou de forma significativa todas as doses testadas sendo que na de 200 μmol.L^{-1} a atividade foi inibida 82% (HERRERIAS *et al*., 2007). Este efeito mais acentuado provocado pela eupafolina, provavelmente está relacionado à presença do anel catecol em sua estrutura e a geração de espécies reativas de oxigênio a partir da sua oxidação (HERRERIAS *et al*., 2007).

Segundo Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005) e Herrerias *et al*. (2007) tanto a hispidulina quanto a eupafolina inibiram a atividade da NADH desidrogenase em todas as doses utilizadas, porém os efeitos inibitórios observados pela eupafolina (60%) foram mais acentuados que os vistos com a hispidulina (15%) na maior dose utilizada. A hispidulina não apresentou efeito sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase, resultado que esta de acordo com os observados quando a flavona foi utilizada. Entretanto a eupafolina inibiu essa atividade em todas as doses utilizadas, chegando esta inibição a 49% na maior dose testada. Tanto a hispidulina quanto a eupafolina não afetaram a atividade da enzima citocromo *c* oxidase, resultado que esta em concordância com o observado com a flavona.

Algumas flavonas como a robinetina, ramnetina, baicaleína entre outras, possuem a capacidade de inibir as enzimas NADH-oxidase e succinato-oxidase da cadeia respiratória (HODNICK; DUVAL; PARDINI, 1994).

Para a atividade da ATPase, os resultados promovidos pela flavona estão de acordo com os encontrados por Herrerias *et al*. (2007), que observaram que a eupafolina também não afeta a atividade da ATPase nas mesmas condições experimentais. Contudo, Dabaghi-Barbosa *et al*. (2005), observaram inibições da atividade ATPasica em mitocôndria rompida e intacta na ausência de desacoplador, porém, na presença de FCCP a hispidulina também foi incapaz de provocar efeitos.

Os resultados provocados pela flavona no inchamento mitocondrial induzido por valinomicina na presença de KNO_3, estão de acordo com os 30% de redução na amplitude provocados pela eupafolina (200 μmol.L^{-1}) (HERRERIAS, 2005). Porém ainda de acordo com Herrerias (2005) a eupafolina não possui efeito sobre a velocidade do inchamento mitocondrial nas mesmas condições experimentais. Já a hispidulina não

provocou efeito sobre a amplitude nem velocidade do inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e potássio nas concentrações utilizadas (DABAGHI-BARBOSA *et al*., 2005).

Desta forma, pode-se sugerir que os efeitos da flavona observados sobre o consumo de oxigênio, podem ser reflexos tanto das inibições das atividades enzimáticas da cadeia respiratória quanto de seus efeitos sobre membrana. Pode-se sugerir também que parte dos efeitos observados com a hispidulina e eupafolina podem estar relacionados com o anel da flavona, visto que vários parâmetros foram afetados de forma semelhante para as três flavonas (flavona, hispidulina e eupafolina). Os efeitos da flavona foram em geral mais próximos daqueles observados com a hispidulina (ex: diminuição da velocidade respiratória no estado 3 e redução na razão ADP/O nas maiores doses utilizadas). Contudo, os efeitos observados com a eupafolina foram em geral maiores que os promovidos pelas outras flavonas, o que pode estar relacionado com a presença do anel catecol, já que a eupafolina diminuiu a velocidade respiratória do estado 3 e inibiu a atividade de algumas enzimas como a NADH-oxidase de maneira mais acentuada quando comparado com a flavona e hispidulina.

As diferenças observadas com a eupafolina que possui o anel catecol na sua estrutura são importantes, porque se sabe que algumas atividades promovidas pelos flavonóides, como a capacidade de seqüestrar radicais livres, é atribuída primariamente a alta reatividade dos substituintes hidroxila dispostos na molécula, sendo que os grupos hidroxilas presentes no anel-B dos flavonóides são os mais significativos para o seqüestro de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (PANNALA *et al*., 2001; HAENEN, *et al*., 1997; BURDA; OLESZEK, 2001; KERRY; RICE-EVANS, 1999).

Além disso, os grupos hidroxila presentes no anel-B dos flavonóides são capazes de doar um hidrogênio e um elétron para os radicais hidroxil, peroxil e peroxinitrito, assim estabilizando estes e originando um radical flavonóide relativamente estável. Entre os representantes da classe das flavonas, o seqüestro de radicais hidroxil e peroxil aumenta linearmente de acordo com o número total de grupos hidroxila presentes na molécula (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997). Grupos hidroxilas no anel-B são os primeiros a estarem envolvidos em alguns efeitos promovidos pelos flavonóides como, por exemplo, o anel catecol proporciona um forte aumento da inibição da

peroxidação lipídica provocada por flavonóides (MORA *et al*., 1990; RATTY; DAS, 1988; DUGAS *et al*., 2000). Contudo, a oxidação do grupo catecol no anel-B pode produzir um radical *orto*-semiquinona razoavelmente estável e espécies reativas de oxigênio que podem oxidar outras moléculas promovendo danos (MORA *et al*., 1990). Flavonas que não possuem o grupo catecol em sua estrutura formam radicais relativamente instáveis e são fracos seqüestradores de radicais (PANNALA *et al*., 2001; BURDA; OLESZEK, 2001; GAO *et al*., 1999).

Segundo Cao; Sofic e Prior (1997) a atividade pró-oxidante promovida pelos flavonóides é também diretamente proporcional ao número de grupos hidroxila presentes nestes compostos. Estes efeitos pró-oxidantes são responsáveis por efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos promovidos por vários flavonóides presentes em ervas medicinais (UEDA *et al*., 2002; ISMAIL; ALAM, 2001). Em nosso laboratório têm sido observados efeitos citotóxicos promovidos pela eupafolina (HERRERIAS, 2005).

Além disso, a significância de outras configurações de grupos hidroxila nos anéis A e C ainda não é muito clara, mas sabe-se que interferem acentuando algumas atividades biológicas como na atividade antioxidante, porém não de forma tão intensa (CHOLBI, PAYA, ALCARAZ, 1990).

Apesar dos efeitos da flavona sobre o metabolismo energético mitocondrial serem em muitos casos semelhantes aos da hispidulina (ex: diminuição da velocidade respiratória no estado 3), em outros foi possível ver diferenças (ex: estímulo da velocidade respiratória no estado 4) que podem ser atribuídas à presença de seus substituintes, entre eles ao grupo metoxi.

Os flavonóides que possuem grupos metoxi em sua estrutura ao invés de grupos hidroxila, apresentam principalmente diferenças de hidrofobicidade e planaridade (MATTHIESEN; MALTERUD; SUND, 1997), o que pode afetar significativamente sua passagem por membranas e consequentemente seus efeitos. Também vários grupos metoxi presentes no anel-A podem reverter efeitos positivos, como a atividade antioxidante promovida pelos flavonóides que possuem o grupo catecol no anel-B (MORA *et al*., 1990).

Outras características químicas encontradas nas flavonas podem também ser importantes para seus efeitos. A dupla ligação existente entre C-2 e C-3 aliado ao grupo

carbonila em C-4 aumentam a atividade antioxidante dos flavonóides. Embora outros elementos estruturais possam ser considerados, a capacidade de seqüestrar radicais livres promovidas pelos flavonóides que possuem essas duas características é importante, devido ao aumento significativo desta atividade (CHOLBI; PAYA; ALCARAZ, 1990; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Todavia, de acordo com Cao; Sofic e Prior (1997) a insaturação entre C-2 e C-3 aliado ao grupo carbonila em C-4, presente nas flavonas pode promover a formação de espécies reativas de oxigênio induzida por cobre divalente na presença de oxigênio. Estas informações sugerem que alguns dos mesmos atributos estruturais citados acima que são capazes de otimizar a capacidade antioxidante, por exemplo, podem também exacerbar o estresse oxidativo e promover danos à estrutura e funções celulares (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Segundo Hodnick *et al*. (1987) duas características estruturais dos flavonóides são de extrema importância para inibição da atividade da NADH-oxidase, primeiro a dupla ligação entre C-2 e C-3, e em segundo, o grupo carbonila em C-4. Estas características estruturais são observadas nas flavonas estudadas e poderiam estar colaborarando com as inibições verificadas da NADH-oxidase.

De acordo com Hodnick *et al*. (1986) o número e a localização dos grupos hidroxila presentes nos flavonóides são também muito importantes para a inibição da atividade da succinato oxidase e ainda a carbonila em C-4 é essencial para essa atividade, também o número e a configuração de grupos hidroxila no anel-B são importantes para esta atividade. Esses dados encontrados na literatura estão em concordância com os resultados encontrados em nosso laboratório, pois explicam as maiores inibições das enzimas da cadeia respiratória e também a maior redução na velocidade respiratória no estado 3 promovida pela eupafolina, que possui o grupo catecol no anel-B, quando comparadas com as demais flavonas em estudo.

Desta forma podemos verificar que as flavonas anteriormente estudadas no laboratório, hispidulina e eupafolina e agora a flavona, mostraram vários efeitos semelhantes como, por exemplo, o sítio de ação destas flavonas sobre a cadeia respiratória, bem como possíveis efeitos sobre a fluidez de membrana, que podem estar

relacionados com características estruturais comuns nas três estruturas como a dupla ligação em C-2 e C-3, juntamente com o grupo carbonila em C-4.

7. CONCLUSÕES

- A flavona promove uma diminuição na velocidade respiratória no estado 3 com ambos os substratos nas doses de 75 - 200 $\mu mol.L^{-1}$.
- A flavona promove um discreto estímulo sobre a velocidade respiratória do estado 4 com ambos os substratos, sendo significativo nas doses de 150 e 200 $\mu mol.L^{-1}$ quando o glutamato foi utilizado como substrato e nas doses de 100 - 200 $\mu mol.L^{-1}$ quando foi utilizado succinato.
- A relação ADP/O foi reduzida pela flavona nas doses de 150 e 200 $\mu mol.L^{-1}$ quando foi utilizado o glutamato como substrato e nas doses de 75 - 200 $\mu mol.L^{-1}$ quando o succinato foi utilizado como substrato.
- O coeficiente de controle respiratório foi diminuído nas doses de 50 - 200 $\mu mol.L^{-1}$ com ambos os substratos, porém esta diminuição ocorreu de forma um pouco mais acentuada quando o glutamato foi utilizado como substrato.
- O sítio de ação da flavona sobre as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial provavelmente esta localizado entre o complexo I e III.
- A flavona não afetou significativamente a atividade da ATPase em nenhuma das doses utilizadas.
- A flavona reduziu a amplitude e velocidade do inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e potássio nas doses de 75 - 200 $\mu mol.L^{-1}$, sugerindo que a flavona possui um provável efeito sobre fluidez de membrana.
- A flavona reduziu discretamente o potencial elétrico transmembrana nas doses de 100, 150 e 200 $\mu mol.L^{-1}$.
- Os resultados observados sugerem que parte dos efeitos provocados por flavonas sobre o metabolismo mitocondrial estejam relacionados à sua estrutura básica, os dois anéis benzênicos ligados ao anel pirano, pois as três flavonas mostraram efeitos semelhantes sobre vários parâmetros do metabolismo mitocondrial. Sendo que os efeitos provocados pela flavona e hispidulina assemelham-se muito, já a eupafolina promove efeitos mais acentuados na

maioria dos parâmetros estudados, provavelmente por apresentar as hidroxilas na posição C-3’ e C-4’ (anel catecol).

REFERÊNCIAS

ABDALLA, S. *et al*., Effects of hispidulina, a flavone isolated from *Inula viscose*, on isolated guinea-pig smooth muscle. **General pharmacology**, New York, v. 19, n. 4, p. 559-563, 1988.

ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of Llippia dulcis and Lippia canescens. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. Tokyo, v. 25, n.7, p.920-922, 2002.

AFANAS`EV, I. B. *et al*., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 11, p. 1763-1769, 1989.

ÅKERMAN, K.; WIKSTRÖM, M. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 68, p.191-197, 1976.

BEKTIC, J. *et al*., The flavonoid apigenin inhibits the proliferation of prostatic stromal cells via the MAPK-pathway and cell-cycle arrest in GI/S. **Maturitas**, Shannon, v. 558, p. 837-846, 2006.

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 8834-8839, 1992.

BESTWICK, S. C *et al.,* The effect of short-term kaempferol exposure on reactive oxygen levels and integrity of human (HL-60) leukaemic cells. **Biochimica et biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1740, p. 340-349, 2005.

BORST, P.; ELFERINK, R. O. *et al*., Mammalian abc transporters in health and disease. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 71, p. 537-592, 2002.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 56, p. 317-333, 1998.

BROWN, J. E.; RICE-EVANS, C. A. Luteolin-rich artichoke extract protects low lipoprotein from oxidation in vitro. **Free Radical Research**, New York, v. 3, p. 247-255, 1998.

BROWN, J. P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 75, p. 243-277, 1980.

BUENZ *et al*., Techiques: bioprospecting historical herbal texts by hunting for new in old tomes. **Trends in Pharmacological Sciences**, Oxon, v. 25, p. 494-498, 2004.

BURDA S.; OLESZEK W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.

CAI, Yi-ZHONG. *et al*., Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, New York, v. 78, p. 2872-2888, 2005.

CALTAGIRONE, S. *et al*., Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastic potential. **International Journal of Cancer**, New York, v. 87, p. 595-600, 2000.

CANIVENC-LAVIER, M-C *et al*., Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. **Toxicology**, Shannon, v. 114, p. 19-27, 1996.

CAO, G; SOFIC, E; PRIOR, L, D. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 22, p. 749-760, 1997.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I kinectis of oxygen utilization. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 217, n. 1, p. 383-393, 1955.

CHOI, J. *et al*., Flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuate apoptosis and protein oxidation in neuronal cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1571, p. 201-210, 2002.

CHOLBI, M. R.; PAYA, M.; ALCARAZ, M. J. Effects of phenolic compounds on CCl_4-induced microssomal lipid peroxidation. **Experientia.** Basel, v. 47, p. 195-199, 1990.

CHOWDHURY, A. R. *et al*., Luteolin, an emerging anticancer flavonóide, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. **Biochemical Journal**, London, v. 366, p. 653-661, 2002.

COLEMAN, P. C. *et al*., Flavonoids of Geigeria. **Phytochemistry**. Oxon, v. 23, n. 5, p. 1202 –1203, 1984.

CREUTZ, C.; SUTIN, N. Reduction of ferrycytochrome *c* by dithionitenion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 6, p. 1701-1703, 1973.

DABAGUI-BARBOSA, P. D *et al*., Hispidulina: Antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. **Free Radical Research**, New York, v. 39. p. 1305-1315, 2005.

Di CARLO, G. *et al*., Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, New York, v. 65, p. 337-353, 1999.

DORTA, J, D. *et al*., The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. **Chemico-biological interactions**, Shannon, v. 152, p. 67-78, 2005.

DUARTE, J. *et al*., Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth nuscle. Structure-activity relationships. **General Pharmacology**, New York, v. 24, p. 857-862, 1993.

DUGAS, A. J. *et al*., Evaluation of the total peroxyl radical-lscavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **Journal of natural products.** Downers Grove, v. 63, p. 327-331, 2000.

DUTHIE, G.; CROZIER, A. Plant-derived phenolic antioxidants. **Current Opinion in Lipidology**, london, v. 11, p. 43-47, 2000.

DUTHIE, G. G. *et al*., Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Ressearch**, New York, v. 13, p. 79-106, 2000.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperitin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, New York, v. 24, p. 851-874, 2004.

ESTABROOK R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 10, p. 41-47, 1967.

FOTSIS, T. *et al*., Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. **Bailliere's Clinical Endocrinology Metabolism**, London, v. 12, p. 649-666, 1998.

GAO, Z. *et al*., Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis Georgi*. **Biochimica et biophysica acta.** Amsterdam, v. 472, p. 643-650, 1999.

GUNTER, T. E.; PFEIFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. American. **Journal Physiology**, Cambridge, v. 258, p.755-C786, 1990.

HAENEN, G. R. *et al*., Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochemical and biophysical research communications,** Orlando, v. 236, p. 591-593, 1997.

HARBORNE, J. B; BAXTER, H. **Handbook of Natural Flavonoids**. 2 vols. Wiley, Chichester, 1999.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 32, p.1141-1148, 1983.

HAVSTEEN, B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, New York, v. 96, p. 67-202, 2002.

HEIM K. E.; TAGLIAFERRO A. R.; BOBILYA D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, p. 572-584, 2002.

HERMAN, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. **Journal of Food Technology**, oxford, v. 11, p. 433-448, 1976.

HERRERA, M. D. *et al.* Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: Structure-activity relationships. **General Pharnacology**, New York, v. 27, p. 273-277, 1996.

HERRERIAS, T. *et al*., **Estudo do mecanismo de ação da eupafolina sobre o metabolismo energético mitocondrial e viabilidade celular de células HELA.** Curitiba, 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HERRERIAS, T. *et al*., Eupafolin: Effects on mitochondrial energetic metabolism. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 2007.

HERRERIAS, T. *et al*., **Efeitos de flavonóides sobre o metabolismo mitocondrial e suas implicações na viabilidade e apoptose de células de melanoma**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVA, M. Flavonoids potent and versatile biologically active compounds interecting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, Shannon, v. 139, p. 1-21, 2002.

HODNICK, W. F *et al*., Inhibition of mitochondrial NADH-oxidase (NADH-coenzime Q oxido-redutase) enzyme system by flavonoids: a structure-activity. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 36, n. 17, p. 2873-2874, 1987.

HODNICK, W. F *et al*., Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 35, No 14, p. 2345-2357, 1986.

HODNICK W. F.; DUVAL D. L; PARDINI R. S. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. **Biochemical Pharmacology**. New York, v. 47, n.3, p. 573-580, 1994.

HOROWITZ, R. M. Taste effects of flavonoids. **Progress in Clinical and Biological Research**, New York, v. 213, p. 163-175, 1986.

HORVÁTHOVÁ, K. *et al*., Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 565, p. 105-112, 2005.

IELPO, M. T. L *et al*., Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 71, p. 101-109, 2000.

ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel cytotoxic flavonóide glycoside from P*hysalis angulata*. **Fitoterapia.** Amsterdam, v. 72, p. 676-679, 2001.

JEON, S. B. *et al*., Flavone inhibits vascular contraction by decreasing phosphorytaion of the myosin phosphatase target subunit. **Clinical and experimental Pharmacology and Physiology**, Carlton South, v. 34, p. 1116-1120, 2007.

KERRY, N.; RICE-EVANS, C. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonóide and phenolic antioxidants and their structural relationships. **Journal of neurochemistry.** Hagerstown, v. 73, p. 247-253, 1999.

KHOKHAR, S; APENTEN, K, O, R. Iron binding caracteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. **Food Chemistry**, Exeter, v. 81, p. 133-140, 2002.

KIM, Y. J.; AHN, J. J.; WOO, B. H. The effect of cytokine mediators on prostaglandin inhibition by human decidual cells. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 179, p. 146-149, 1998.

KIMATA, M. *et al*., Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reactions. **Planta Medica**, Krefeld, v. 66, p. 25-29, 2000.

KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Review of Nutrition Dietetics**, Basel, v. 24, p. 117-91, 1976.

LAUGHTON, M. J. *et al*., Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myrecetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 38, p. 2859-2865, 1989.

LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. C.; RANDALL R. J. Protein measurement with the polyphenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

LOTITO, S. B. *et al*., Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 276, p. 945-951, 2000.

LOTITO, S. B; FREI, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 41, p. 1727-1746, 2006.

LIU, L. et al., Effects of flavones from Saussurea involucrate on DNA synthesis by cancer cells. **Lanzhou Daxue xuebao**. Ziran Kexueban, v. 21, p. 80-83, 1985.

MARTENS, S; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases, **Phytochemistry**, Oxon, v. 66, p. 2399-2407, 2005.

MASON T.L.; POYTON R.O.; WHARTO D.C.; SCHATZ G. Cytocrome *c* oxidase from bakers yeast. Isolation and properties. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 248, n. 4, p. 1346-1354, 1973.

MATHIESEN L.; MALTERUD K. E.; SUND R. B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 2, p. 307-311, 1997.

McBRIDE, H. M; NEUSPIEL, M; WASIAK, S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. **Current Biology**, London, v. 16, p. 551-560, 2006.

MICHELS, G. *et al*., Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. **Toxicology**, Shannon, v. 206, p. 337-348, 2005.

MIDDLETON, E. *et al*. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 52, p. 673 – 751, 2000.

MIESN, K. H.; MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Wasshington, v. 6, p. 3106-3112, 2001.

MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in vitro**, Oxon, v. 20, p. 187-210, 2006.

MORA, A. *et al*., Structure-activity relationships of polymethoxi-flavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymatic lipid peroxidation. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 40, p. 793-797, 1990.

MORENO, A. J. M. e MADEIRA, V. M. C. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdan, v. 1015, p. 361-367, 1990.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioemergetics 2.** 3ª edição. San Diego: Academic Press, 255 p., 2002.

PANNALA, A, S. *et al*., Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and biophysical research communications,** Orlando, v. 282, p. 1161-1168, 2001.

PETERSON, J; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, New York, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PULLMAN M. E.; PENEFSKY H. S.; DATTA A.; RACKER E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. **Journal of Biological Chemisty,** Bethesda, v. 235, n. 11, p. 3322-3329, 1960.

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochemical medicine and metabolic biology.** Orlando, v. 39, p. 69-79, 1988.

RAVANEL, P. Uncoupling activity of a series of flavones and flavonols on isolated plant mitochondria. **Phytochemistry**, Oxon, v. 25, p. 1015-1020, 1986.

ROSSI, A.; AZZONI, G. F. Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K^+ translocation. **European Journal of Biochemistry**, Paris, v. 7, p. 418-426, 1969.

SANTOS A. C. *et al*., Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 9, p. 1455-1461, 1998.

SINGER T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α-glicerophosphate dehydrogenase. **Methods in Biochemical Analasis**, Weinheim, v. 22, p. 123-175, 1974.

SUMNER, J, B. Specific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phodphorus. **Science**, Washington, v. 100, p. 3322-3329, 1960.

SURVESWARAN, S. *et al*., Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants fron 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, Exeter, v. 102, p. 928-953, 2006.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry letters**, Heidlberg, v. 4, p. 147-157, 2006.

TRUMBECKAITE *et al*., Effect of *Ginkgo biloba* extract on the rat heart mitochondrial function. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon, v. 111, p. 512-516, 2007.

VAN ACKER *et al*., A quantum chemical explanations of the antioxidant activity of flavonoids. **Chemical Research in Toxicology,** Washington, v. 9, p. 1305-1312, 1996.

VERSTRAETEN, S. V. *et al*., Flavan-3-ols and procyanidins protect lipossomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 34, n. 1, p. 84-92, 2003.

VOSS, O. D.; CAMPELO A.P.; BACILA M. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 4, n. 1, p. 48-51, 1961.

UEDA, S. *et al*., Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Molecular Immunology.** Oxon, v. 38, pp. 781-791, 2002.

YONETANI T., RAY G. S. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome *c* by cytochrome c oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 240, n. 7, p. 3392-3398, 1965.

YONG-LONG LIU; MABRY, T. J. Flavonoids from *Artemisia Frigida*. **Phytochemistry**, Oxon, v. 20, No. 6, pp. 1389-1395, 1981.

WANG, W. *et al*., Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. **Molecular Carcinogenesis**, New York, v. 28, p. 102-110, 2000.

WEICKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Fatty acid-induced uncopling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 423, p. 339-342, 1998.

WENZEL, U. *et al*., Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Research**, Phladelphia, v. 60, p. 3823-3831, 2000.

WILLIAMS, R. J; SPENCER, J. P. E; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidant or signaling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 36, No. 7, p. 838-849, 2004.

WOOD, C. K. *et al*., Effects of flavonoids on the metabolism of xenobiotics. **Progress in Clinical and Biological Research**, New York, v. 213, p. 195-210, 1986.

ZANOTTI, A.; AZZONE, G. F. Safranine as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Archieves of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 201, p. 255-265, 1980.

ZANDEN, J. J Van *et al*., Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 69. p. 699-708, 2005.