

**TATIANA HERRERIAS**

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA  
EUPAFOLINA SOBRE O METABOLISMO  
ENERGÉTICO MITOCONDRIAL E  
VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha

**Curitiba  
2005**

## ***DEDICATÓRIA***

Aos meus filhos Ana Luíza e Augusto, este trabalho é para vocês.

Wilson, meu amor, meu companheiro, que tantas vezes ouviu e tentou entender sobre mitocôndrias e flavonóides, obrigada pelo apoio, incentivo e amor.

À minha mãe, Sally, e minha irmã, Thaisa, vocês duas sempre estiveram ao meu lado partilhando tristezas, alegrias, dificuldades, esta conquista é nossa.

Ao João Pedro, o meu filho do coração.

Ao meu pai, Pedro, pelo incentivo e pela base educacional que me proporcionou, pois sem ela eu não estaria aqui hoje.

À querida Tia Odette, pois tudo começou lá trás, onde você sempre acompanhou os meus primeiros progressos, muitas saudades....

À minha Vó Dorothy seu apoio, amor e orações sempre fizeram a diferença em minha vida.

À todos vocês o meu imenso Amor e Agradecimento

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha pela sua atenção, compreensão e principalmente pela sua grande preocupação com aqueles que a cercam, obrigada

À Prof. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira pois sua trajetória acadêmica é um exemplo para todos nós.

À Prof. Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri pelas sugestões e por todo carinho a mim dispensado.

À Prof. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena, pela valiosa troca de conhecimentos, por seu carinho e extrema gentileza no convívio com os alunos.

À Prof. Dra. Gláucia Regina Martinez pelo inestimável auxílio nos experimentos de citotoxicidade e por sua amizade e conselhos.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento pela realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Brás Heleno de Oliveira pela gentileza em ceder a eupafolina tão necessária para nossos experimentos.

À Marilza Lamour, secretária do Curso de Pós-Graduação pelo seu carinho e inestimáveis préstimos.

Ao colega Wellington Luciano Braguini pela sua inesgotável paciência e carinho em receber e ajudar seus novos colegas e por ter me ensinado o procedimento de isolamento mitocondrial, obrigada.

A colega Ana Paula Negrello Newton pela sua amizade, carinho e troca de experiências.

Ao colega André Berlin Mariano pelo carinho e amizade.

À Juliana Inaba, ou Julila, não sei se não fossem os seus incentivos eu estaria aqui hoje, obrigada pelo apoio e pela amizade.

Aos colegas de mestrado: Ana Helena, Gerusa, Graciele, Patrícia, Giovana, Lauro, Diogo, Marcelo, Gustavo e Juliana, entramos, passamos por nivelamento, créditos, experimentos, churrascos, almoços, tudo isso juntos, essa conquista nós compartilhamos desde o começo, obrigada por tudo.

**“O segredo da felicidade consiste  
em fazer do seu dever o seu prazer...”**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>X</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1. BIOSÍNTESE E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS FLAVONÓIDES .....	5
2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES .....	9
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	10
2.4 RELAÇÃO ESTRUTURA – ATIVIDADE .....	14
2.5 EUPAFOLINA .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1. REAGENTES .....	24
4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE EUPAFOLINA .....	24
4.3. ANÁLISES DOS EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL .....	25
4.3.1 Animais .....	25
4.3.2 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato para determinação do consumo de oxigênio, atividades enzimáticas e inchamento mitocondrial .....	25
4.4 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO .....	26
4.5. PREPARO DA SUSPENSÃO DE MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS MITOCONDRIAIS .....	27
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL .....	28
4.6.1. NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase) .....	28

4.6.2. NADH Citocromo <i>c</i> Redutase (EC 1.6.99.3 - NADH Citocromo <i>c</i> ÓxidoRedutase)	29
4.6.3. NADH-Desidrogenase (EC 1.6.5.3 - NADH: Ferricianeto Óxidoreductase) -----	30
4.6.4. Succinato Citocromo <i>c</i> Redutase (EC 1.3.99.1 - Succinato: Ferrocitocromo <i>c</i> ÓxidoRedutase) -----	30
4.6.5. Succinato Desidrogenase (EC 1.3.5.1 - Succinato: Fenazina Metasulfato ÓxidoRedutase) -----	31
4.6.6. Citocromo <i>c</i> Oxidase (EC 1.9.3.1 - Ferrocitocromo <i>c</i> : Oxigênio ÓxidoRedutase) ---	32
4.6.7. Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias Rompidas -----	33
4.6.8. Controles não-enzimáticos -----	34
4.7. DETERMINAÇÃO DO INCHAMENTO ( <i>SWELLING</i> ) MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO KNO <sub>4</sub> . -----	34
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS -----	35
4.9. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDOX DA EUPAFOLINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA -----	35
4.10. EFEITOS DA ADIÇÃO DE NADH, CIANETO E EDTA SOBRE A REDUÇÃO DE CITOCROMO <i>C</i> INDUZIDA PELA EUPAFOLINA EM REAÇÃO NÃO – ENZIMÁTICA --	36
4.10.1. Efeito da adição de NADH e/ou EDTA sobre a redução do citocromo <i>c</i> em presença de eupafolina -----	36
4.10.2. Efeito da adição de cianeto sobre a redução do citocromo <i>c</i> em presença de eupafolina -----	36
4.11. EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA -----	37
4.11.1 Células -----	37
4.11.2 Procedimentos de Cultivo -----	37
4.11.3 Ensaio de Viabilidade Celular -----	37
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS EXPERIMENTAIS -----	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----</b>	<b>39</b>
5.1 ANÁLISES POLAROGRÁFICAS DO CONSUMO DE OXIGÊNIO -----	39
5.2 EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL -----	47
5.3 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A ATIVIDADE DA ATPASE -----	53
5.4 DETERMINAÇÃO DO INCHAMENTO ( <i>SWELLING</i> ) MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO KNO <sub>3</sub> -----	55

5.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDOX DA EUPAFOLINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA -----	58
5.6 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE NADH, CIANETO E EDTA SOBRE A REDUÇÃO DE CITOCROMO C INDUZIDA PELA EUPAFOLINA EM REAÇÃO NÃO – ENZIMÁTICA -----	60
5.6.1. Avaliação do efeito da adição de NADH e/ou EDTA sobre a redução do citocromo c em presença de eupafolina -----	60
5.6.2. Avaliação do efeito da eupafolina sobre a redução do citocromo c em presença de cianeto -----	65
5.7. EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA UTILIZANDO O MTT -----	71
<b>6. DISCUSSÃO FINAL -----</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSÕES -----</b>	<b>77</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FORMAÇÃO DA ESTRUTURA CINAMOIL .....	5
FIGURA 2: VIA BIOSINTÉTICA DOS FLAVONÓIDES .....	7
FIGURA 3: NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C (FLAVONA) .....	8
FIGURA 4: ESTUTURA GERAL DE ALGUMAS CLASSES DE FLAVONÓIDES .....	9
FIGURA 5: FÓRMULA ESTRUTURAL DA HISPIDULINA .....	18
FIGURA 6: FÓRMULA ESTRUTURAL DA EUPAFOLINA .....	20
FIGURA 7: FOTO DO <i>EUPATORIUM LITORALLE</i> .....	21
FIGURA 8: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO UTILIZANDO-SE GLUTAMATO DE SÓDIO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL .....	40
FIGURA 9: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA, NA PRESENÇA DE NITRATO DE POTÁSSIO .....	57
FIGURA 10: VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DA EUPAFOLINA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO .....	59
FIGURA 11: REAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA ENTRE EUPAFOLINA, NADH E CITOCROMO C .....	65
FIGURA 12: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A REDUÇÃO DO CITOCROMO C EM PRESENÇA DE NADH E EDTA .....	67
FIGURA 13: EFEITO DA ADIÇÃO DE EDTA SOBRE A REDUÇÃO DO CITOCROMO C EM PRESENÇA DE EUPAFOLINA NA AUSÊNCIA DE NADH .....	68
FIGURA 14: EFEITO DA ADIÇÃO DE EUPAFOLINA SOBRE A REDUÇÃO DO CITOCROMO c EM PRESENÇA DE NADH NA AUSÊNCIA DE EDTA .....	69
FIGURA 15: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A REDUÇÃO DO CITOCROMO C EM PRESENÇA DE CIANETO .....	70
FIGURA 16: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA UTILIZANDO O MTT .....	72
FIGURA 17: EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA UTILIZANDO O MTT .....	73

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA NO ESTADO III, UTILIZANDO-SE GLUTAMATO E SUCCINATO DE SÓDIO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS -----41

TABELA 2: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA NO ESTADO IV UTILIZANDO-SE O GLUTAMATO E SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS -----43

TABELA 3: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A RAZÃO ADP/O UTILIZANDO O GLUTAMATO OU SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS -----44

TABELA 4: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO UTILIZANDO-SE O GLUTAMATO E SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS -----45

TABELA 5: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL -----52

TABELA 6: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA ATPase DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL -----54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP - adenosina 5' difosfato

ADP/O – quociente entre nmol de ADP e nanoátomos de oxigênio consumidos durante o estado III

ATP – adenosina 5' trifosfato

ATPase – adenosinatrifosfatase

BSA – albumina de soro bovino

CCR – coeficiente de controle respiratório

DCPIP – 2, 6 diclorofenolindofenol

DMSO – dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

EGTA – ácido etileno glicol bis (éter 2-aminoetil) N, N, N', N', tetracético

ERO – espécie reativa de oxigênio

FCCP – carbonil cianeto de p-trifluormetoxifenilhidrazona

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

HBSS - solução balanceada de Hanks

HEPES – N –(2hidroxietil) piperazina N'(ácido 2-etano sulfônico)

IC<sub>50</sub> – dose de inibição de 50% do crescimento

I<sub>50</sub> - dose capaz de causar 50% de inibição

MEM – meio essencial mínimo de Eagle

MTT – brometo de 3 - (4,5 – dimetiltiazol-2-il) 2-5 difenil tetrazólio

NAD<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleotídio (forma oxidada)

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida)

NAD<sup>•</sup> - nicotinamida adenina dinucleotídio (radical)

PEP – fosfoenolpiruvato

Pi – fosfato inorgânico

PMS – fenazina metassulfato

SOD – superóxido dismutase

TCA – ácido tricloroacético

Tris – tris (hidrometil) amino metano

SQ – Semiquinona

Q - Quinona

## RESUMO

Flavonóides são compostos fenólicos de baixo peso molecular encontrados em diversas plantas e alimentos de origem natural. Diversos são os estudos que relataram as suas inúmeras propriedades biológicas, entre elas: antioxidante, seqüestradora de radicais livres, inibidora da peroxidação lipídica, etc. A eupafolina (5, 7, 3, 4' tetrahidroxi 6-metoxiflavona), a flavona objeto de estudo desse trabalho foi extraída das folhas secas do *Eupatorium litoralle* e seus efeitos sobre parâmetros mitocondriais foram avaliados. Além disso, foi comparada sua atividade sobre a viabilidade celular de células Hela pelo teste do MTT com a hispidulina (5, 7, 4' trihidroxi 6-metoxiflavona), uma flavona extraída da mesma planta. A eupafolina nas doses testadas (25 – 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) provocou uma intensa inibição na velocidade respiratória do estado III, com o glutamato e o succinato de sódio e provocou estímulo do estado IV com ambos os substratos (75 e 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os complexos enzimáticos demonstraram que essa flavona tem como seu principal sítio de ação a região compreendida entre os complexos I e III. A eupafolina não promoveu alteração nas atividades enzimáticas da citocromo C – oxidase e ATPase em mitocôndrias rompidas. Este flavonóide inibiu significativamente o inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e nitrato de potássio sugerindo que a eupafolina provoca alterações em propriedades da membrana mitocondrial. Tanto a eupafolina quanto a hispidulina causaram uma diminuição (40%) na viabilidade de células HeLa na dose de 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sugerindo que para este parâmetro o anel catecol presente na eupafolina parece não influenciar. Através da análise de voltametria cíclica pode-se observar que a eupafolina sofre oxidação irreversível sendo gerado um pico anódico na região de 0,28 V (Ag/AgCl). Também demonstramos que a eupafolina sofre reações de autooxidação catalisadas por EDTA- $\text{Fe}^{+2}$ , com alguns componentes da cadeia respiratória, como o citocromo C, de forma não enzimática, na presença de NADH, e durante essas reações são gerados radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos podem explicar em parte os efeitos citotóxicos da eupafolina e dá suporte a possibilidade desse flavonóide poder ser utilizado em terapias anticâncer no futuro.

## ABSTRACT

Flavonoids are phenolic compounds of low molecular weight widely distributed in plants and natural foods. Several studies biological properties, namely antioxidant, scavenger of free radicals, inhibition of lipid peroxidation, etc. Eupafolin (6-methoxy 5, 7, 3, 4' tetrahydroxyflavone), a flavone used in this study has extracted from dry leaves of *Eupatorium litoralle* and its effects on mitochondrial metabolism were evaluated. Its action, were compared on cellular viability of the Hela cells by MTT trial to these of hispidulin (6-metoxy - 5, 7, 4' tryhydroxyflavone), a flavone extracted from same plant. Eupafolin (25 – 200  $\mu\text{M}$ ) promoted inhibition of the respiratory rate in state III, in the presence of sodium glutamate and succinate, stimulated state IV with both of the oxidizables substrates (75 - 100  $\mu\text{M}$ ). The enzymatic complexes showed that eupafolin caused a reduction of enzymatic activities between complexes I and III. With Cytochrome *c* oxidase, ATPase in intact or disrupted mitochondria in the presence or absence of FCCP enzymes no effect was observed. Eupafolin inhibited the swelling of mitochondria in the presence of valinomycin and  $\text{KNO}_3$ , what demonstrated indirectly that it interferes with the properties of the mitochondrial membrane. Both eupafolin and hispidulin caused a reduction (40%) in the cellular viability of Hela cells (100  $\mu\text{M}$ ), in culture periods (24 h), indicated that the catechol ring did not influenced this parameter. Through voltammetry cyclic analysis eupafolin demonstrated irreversible oxidation with the anodic peak potential in 0,28 V (Ag/AgCl). Auto-oxidation of eupafolin was demonstrated, catalysed by EDTA-Fe, with some components of the respiratory chain such as cytochrome *c*, in the presence of NADH, resulting in the production of the superoxide radical and hydrogen peroxide. The results could explain the citotoxic effects of eupafolina and give support to the hypothesis that flavone could be useful in anticancer chemotherapy in the future.

## 1. INTRODUÇÃO

Os flavonóides têm sido utilizados no tratamento de diversas patologias, pois são constituintes de muitas plantas medicinais e da maioria dos alimentos de origem vegetal. Contudo, o interesse pelo estudo de suas propriedades biológicas cresceu somente nas últimas duas décadas (KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994).

Entre as propriedades demonstradas por flavonóides podemos destacar: citotóxica, antioxidantes, seqüestradores de radicais livres, antiinflamatórias, entre outras. Hodnick e cols. (1988) sugeriram que algumas destas propriedades, por exemplo, a citotóxica, poderiam resultar de alterações na bioenergética celular e inibição da respiração mitocondrial.

Torna-se importante considerar que espécies reativas de oxigênio (ERO) podem causar danos oxidativos em diversas biomoléculas e organelas celulares, como a mitocôndria, a qual é particularmente sensível a esse dano devido ao fato da cadeia respiratória estar continuamente gerando essas espécies reativas (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). A lipoperoxidação de ácidos graxos insaturados presentes na membrana mitocondrial é outro fator importante para a perda da função mitocondrial. Esta lipoperoxidação pode ser desencadeada por ERO e por complexos de ferro de baixo peso molecular.

Diversos trabalhos têm documentado a atividade protetora dos flavonóides sobre patologias desencadeadas pela superprodução de radicais livres, porém o mecanismo de ação dessas substâncias sobre o metabolismo mitocondrial não está esclarecido.

Entre os flavonóides de interesse farmacológico, alguns pertencem à classe das flavonas. Para este trabalho foram extraídas do *Eupatorium littorale* duas flavonas, a hispidulina (5, 7, 4'- trihidroxi – 6 – metoxiflavona) e eupafolina (5, 7, 3', 4'- tetrahidroxi – 6 – metoxiflavona), as quais possuem conhecidas propriedades biológicas, sendo encontradas em diversas outras plantas de interesse medicinal, entre elas a carqueja, artemísia, arnica, entre outras.

Os efeitos da hispidulina, cuja única diferença em relação a eupafolina é a presença de mais uma hidroxila no anel B, formando um anel catecol, sobre parâmetros relacionados com o transporte de elétrons na cadeia respiratória já foram estudados em nosso laboratório (BARBOSA, 2003), entretanto, muito pouco é encontrado na literatura sobre a eupafolina.

A eupafolina, o flavonóide objeto do presente estudo, foram descritas principalmente habilidades inibitórias do crescimento de células cancerosas (ABE et al., 2002), ação protetora contra o estresse oxidativo (KIM et al., 2002) e atividade antiinflamatória (SALA, 2000), porém, seu mecanismo de ação permanece desconhecido. O objetivo geral deste trabalho é contribuir para o conhecimento do mecanismo de ação da eupafolina sobre o metabolismo mitocondrial, verificar sua interferência sobre a viabilidade celular de células Hela e comparar os resultados com aqueles anteriormente obtidos com a hispidulina, verificando a importância da presença do anel catecol para a geração dos efeitos biológicos observados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os flavonóides pertencem a uma ampla classe de compostos fenólicos de baixo peso molecular, derivados de benzo- $\gamma$ -pironas (HEIN et al., 2002). Amplamente distribuídos na natureza, são conhecidos cerca de 4000 destes compostos (HEIN et al., 2002). Nas plantas, muitas vezes excedem a concentração de 1 mM (PUPPO, 1992). São responsáveis pela cor, odor, possuem atividades antibacterianas e antifúngicas, contribuindo para muitos aspectos da fisiologia das plantas (GEE et al., 1998), oferecendo também proteção contra radiação ultravioleta (HEIN et al., 2002). Participam da fase luminosa da fotossíntese como catalisadores do transporte de elétrons e/ou como reguladores dos canais de íons envolvidos na fotofosforilação (HEIN et al., 2002).

Os compostos flavonóides são encontrados na maioria dos vegetais (MONTESINOS et al., 1995) frutas, plantas medicinais e produtos alimentícios derivados de vegetais, como o azeite de oliva, chá e vinho tinto (ISHIGE et al., 2001).

Estima-se que a ingestão diária de flavonóides seja de aproximadamente 16 mg, e os mais consumidos seriam a quercetina, miricetina e kaemferol da classe dos flavonóis, e luteolina e apigenina, da classe das flavonas (GEE et al., 1998). Contudo, pouco se conhece sobre sua disponibilidade para absorção e suas interações com células e tecidos de mamíferos. Neste aspecto, Gee e colaboradores (1998) demonstraram que glucosídeos de quercetina poderiam ser absorvidos no intestino delgado através do transportador de glucose dependente de sódio.

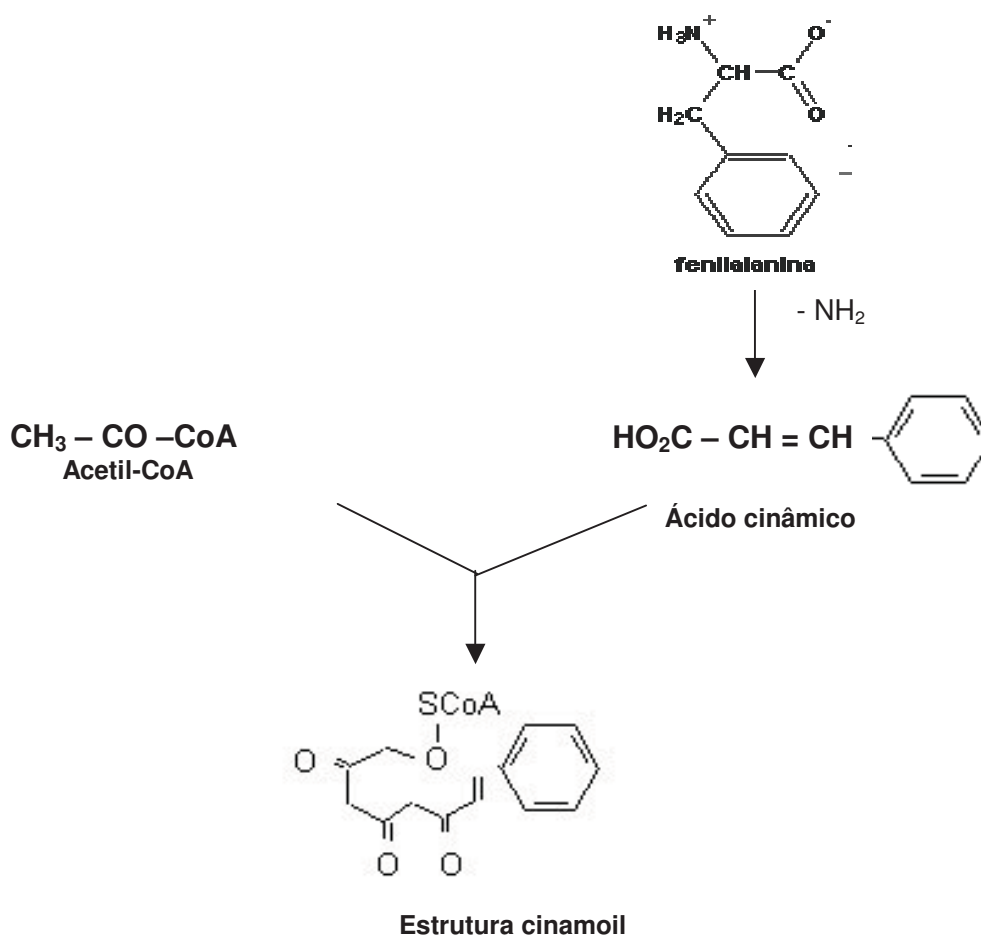
Na medicina tradicional são utilizados para o tratamento de distúrbios estomacais, bronquites (NAGAO et al., 2002), processos inflamatórios e doenças neurológicas (KIM et al., 2002).

É amplamente reconhecido o importante papel que o estresse oxidativo desempenha em diversas doenças (YUTING et al., 1990), entre elas: o câncer, a esclerose múltipla, a doença de Parkinson, as doenças auto-imunes, a isquemia, a anemia e a demência senil (ZHOU & ZENG, 1991). Da mesma forma é também do conhecimento da ciência as propriedades antioxidantes de vários flavonóides, além de possuírem atividades antiinflamatórias, citotóxicas entre outras. Sendo assim, existe uma grande expectativa em torno da potencial utilização terapêutica dos flavonóides no tratamento destas patologias (ZHOU & ZENG, 1991), tornando relevante o conhecimento dos mecanismos bioquímicos envolvendo esta classe de compostos.

## 2.1. BIOSÍNTESE E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos formados a partir de aminoácidos aromáticos como, fenilalanina e tirosina, e de unidades acetato. A fenilalanina e tirosina são convertidas a ácido cinâmico e ácido *p* – cumarínico os quais se condensam com unidades acetato para formar a estrutura cinamoil dos flavonóides (Figura 1) (KANDASWAMI & A MIDDLETON, 1994).

FIGURA 1: FORMAÇÃO DA ESTRUTURA CINAMOIL



FONTE: HARBONE, 1967.

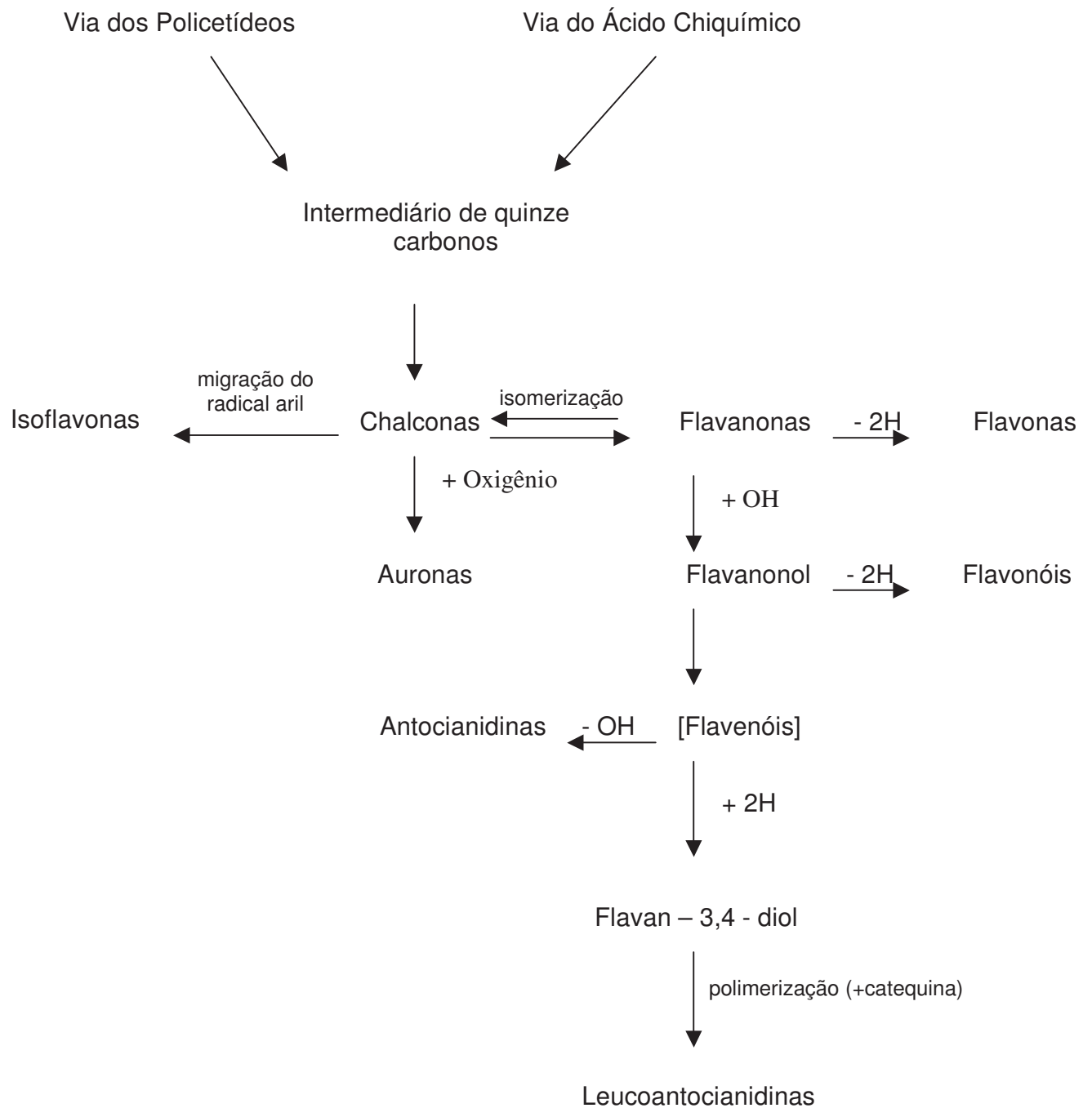
A via biossintética dos flavonóides incorpora precursores das vias do ácido chiquímico e dos policetídeos (figura 2). O primeiro flavonóide formado é a chalcona e todos os outros flavonóides são obtidos a partir de reações de oxidação e de redução deste intermediário (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991).

Os anéis aromáticos conjugados conferem a esses compostos a propriedade de absorção de luz na região do ultravioleta e visível. Os flavonóides são solúveis em água e etanol (KANDASWAMI & A MIDDLETON, 1994).

A posição dos substituintes hidroxil e as propriedades eletrônicas do sistema de anéis sugerem que esses compostos podem ser bons ligantes para elétrons  $d_3$  dos metais de transição do quarto período da tabela periódica (HAVSTEEN, 1983).

Nas plantas são geralmente encontrados na forma glicosilada (KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994), entretanto, podem estar também na forma metilada ou agliconada. A forma glicosilada normalmente é encontrada nos vacúolos enquanto que a forma agliconada pode estar presente em regiões lipofílicas como glândulas de óleo (WOLLENWEBER & DIETZ, 1982).

FIGURA 2: VIA BIOSSINTÉTICA DOS FLAVONÓIDES

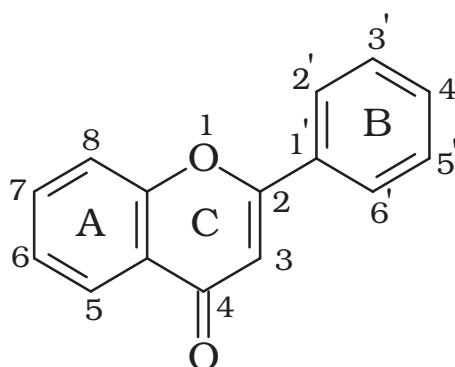


FONTE: HARBONE, 1967.

Os flavonóides são compostos que se oxidam facilmente, devido a sua alta propensão para transferir elétrons e, esse processo, é acompanhado pela abertura do anel  $\gamma$  - pirona (HAVSTEEN, 1983).

A estrutura fundamental dos flavonóides não glicosilados é formada por quinze átomos de carbono, dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono que podem ou não estar formando um anel (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991) (Figura 3). A numeração dos anéis A e C é feita com números ordinários, enquanto que o anel B é numerado utilizando-se apóstrofo (BRAVO,1998). Na figura 3 pode-se observar como exemplo a numeração de uma flavona, classe a qual pertencem os compostos que serão utilizados neste estudo.

FIGURA 3: NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C (FLAVONA)

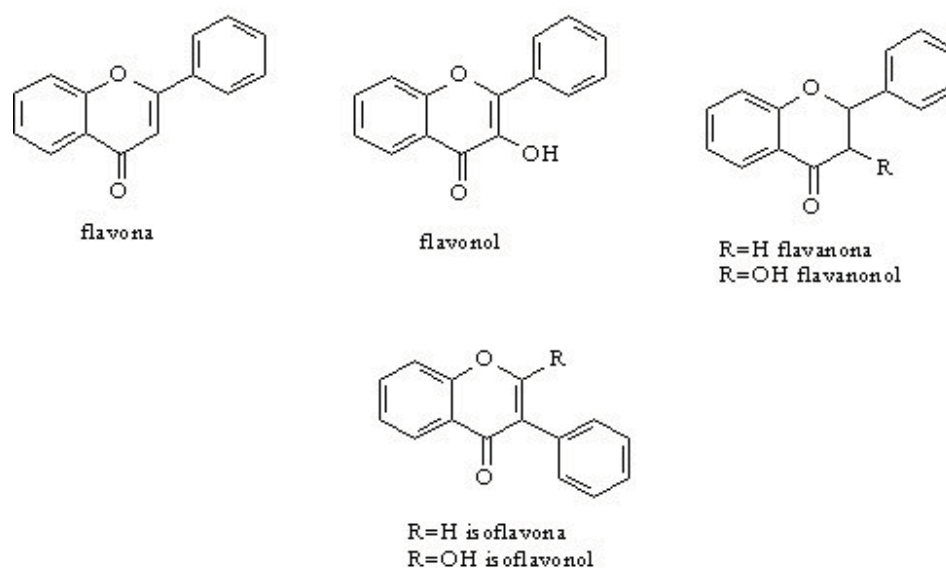


Fonte: BRAVO, 1998.

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES

São conhecidas dez classes de flavonóides que possuem o mesmo núcleo básico (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991). Os flavonóides são classificados de acordo com seus substituintes (HEIN et al., 2002). Na figura 4 estão demonstrados os núcleos básicos das classes de flavonóides. Durante a síntese, grupamentos hidroxil são adicionados, podendo também ser metilados, sulfatados e/ou glicosilados (HEIN et al., 2002).

FIGURA 4: ESTUTURA GERAL DE ALGUMAS CLASSES DE FLAVONÓIDES



O anel de seis membros (C) condensado com o anel benzênico (A) forma uma  $\gamma$  - pirona (flavonóis e flavononas), ou um dihidroderivado (flavanóis e flavanonas). A posição do anel B divide os flavonóides em dois grupos: intoflavonóides (posição 2) e os isoflavonóides (posição 3) (HAVSTEEN, 1983).

Dentre as classes de flavonóides conhecidos, encontramos a das flavonas. Entre os compostos pertencentes a esta classe vários possuem diversos efeitos biológicos conforme será descrito a seguir.

### 2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os flavonóides têm sido muito estudados por desencadear importantes efeitos biológicos. Entre estes se pode citar: antiinflamatória (MIDDLETON, 1984; HAVSTEEN, 1983), antialérgica (MIDDLETON, 1984; HAVSTEEN, 1983), antiviral (MIDDLETON, 1984; HAVSTEEN, 1983), cardioprotetora (BISNACK et al., 2001), antihipertensiva (DUARTE et al., 2001), catecolamínica (KUHNAU, 1976), antioxidante (KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994), entre outras.

Flavonóides também atuam inibindo a lipoperoxidação através de reações envolvendo a doação de átomos de hidrogênio para os radicais peroxil, inativando-os e provocando a terminação das reações de autooxidação dos ácidos graxos (TOREL et al., 1986), (ARORA et al., 1998).

Flavanois e procianidinas podem potencialmente diminuir modificações oxidativas na membrana por restringirem o acesso de oxidantes e a propagação da peroxidação lipídica (VERSTRAETEN et al., 2003).

Flavonas podem inibir a peroxidação lipídica interferindo com a fase de iniciação ou de propagação desse processo, doando um átomo de hidrogênio para o intermediário peroxil ou alcoxil e formando um radical flavona estável (MONTESINOS et al., 1995). O radical formado pode ser eliminado por diversos mecanismos, incluindo a autoreação de radicais ou ser novamente reduzido por compostos como ácido ascórbico e glutathione (COTELLE et al., 1992).

Ishige e colaboradores (2001) demonstraram o efeito protetor de diversos flavonóides, da classe das isoflavonas, flavononas, flavanóis, flavonas e flavonóis, sobre a morte de neurônios induzida pelo stress oxidativo. Sobre desordens vasculares, os flavonóides atuam diminuindo a permeabilidade e fragilidade capilares (TOREL et al., 1986). Entretanto, sob algumas condições reacionais, alguns flavonóides podem atuar como compostos pró-oxidantes, acelerando a formação de radicais de alta reatividade como o radical hidroxila (PUPPO, 1992).

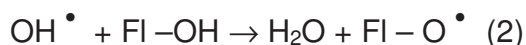
Alguns flavonóides têm propriedades de afetar a fosforilação oxidativa em plantas e animais (RAVANEL, 1986). Este é um dado importante, considerando-se que além do papel central no metabolismo energético, a mitocôndria está envolvida na apoptose, e no processo de indução da transição de permeabilidade (KANTROW et al., 2000). Neste aspecto, a baicalina (5,6- dihidroxi-4-oxo-2-fenil ácido benzopirano-7-il $\beta$ -D-glucopiranosidurônico) um derivado da baicalcina, uma flavona extraída da Sho-saiko-to, uma planta medicinal muito usada na medicina tradicional japonesa e chinesa, induziu apoptose em células leucêmicas derivadas da linhagem T, acompanhada por um aumento de citocromo *c* nas frações citosólicas, da queda do potencial de membrana mitocondrial e geração de

espécies reativas de oxigênio, sugerindo que este flavonóide atua como um pró-oxidante e induzindo apoptose via mitocondrial (UEDA et al., 2001).

A quercetina (4', 5', 5, 7- flavonol) é amplamente reconhecida por seus efeitos inibitórios sobre a atividade da ATPase (CARPENEDO et al., 1969). Takahashi e colaboradores (1998) também demonstraram um efeito inibitório da quercetina sobre a respiração mitocondrial de tecidos germinativos de *Glicina max*. Esse efeito seria decorrente de três fatores: uma inibição direta sobre a oxidação do substrato, inibição da entrada de fosfato na mitocôndria e um desacoplamento da fosforilação oxidativa em concentrações superiores a 0,5 mM.

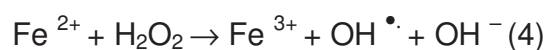
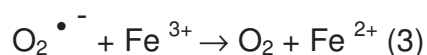
Diversas flavonas testadas não demonstraram efeitos citotóxicos em neutrófilos humanos (MONTESINOS et al., 1995). Estudos de citotoxicidade *in vivo* verificaram que a toxicidade desses flavonóides é muito pequena em animais (HAVSTEEN, 1983). Contudo, algumas flavonas, como exemplo a luteolina, (4', 5', 5, 7- flavona) inibem o crescimento de células tumorais (MORIDANI et al., 2002).

Grande parte dos efeitos biológicos protetores dos flavonóides pode ser atribuída as suas habilidades seqüestradoras de radicais livres (COTELLE et al., 1992) e sua capacidade de transferir elétrons para radicais livres (FERRALI et al., 1997), (ZHOU & ZENG, 1991) através da formação de radicais fenoxil de baixa reatividade (ARORA et al., 1998). (Equações 1 e 2)



Desta forma, os flavonóides atuam por um mecanismo de ação similar ao da vitamina E ( $\alpha$ - tocoferol) no seqüestro de radicais livres, como já descrito anteriormente (COTELLE et al., 1992).

Outra propriedade importante de alguns flavonóides é a de quelar metais de transição como o ferro, suprimindo a geração de radicais hidroxila através da reação de Fenton (ARORA et al., 1998). (Equações 3 e 4)



O radical hidroxil possui uma grande e indiscriminada reatividade e pode causar sérios danos em biomoléculas susceptíveis como o DNA, provocando carcinogênese (ARORA et al., 1998). Alguns flavonóides são capazes de seqüestrar radicais  $\text{OH}^{\bullet}$  gerados através da fotólise do peróxido de hidrogênio (HUSAIN, 1987).

## 2.4. RELAÇÃO ESTRUTURA – ATIVIDADE

Dependendo da estrutura, os flavonóides exibem diferentes propriedades seqüestradoras de radicais (HUSAIN, 1987). A presença de grupamentos hidroxil, O - metil, glicosil e de dupla ligação, no esqueleto básico dos flavonóides têm importância fundamental para as atividades seqüestradoras de radicais livres, quelante de metais e antioxidante (HEIM, 2002).

As diferenças no potencial antioxidante, provocadas pela presença de diferentes grupamentos, é provavelmente conseqüência de uma alteração na distribuição e estabilização do spin no radical fenoxil do flavonóide (ARORA et al., 1998).

A capacidade seqüestradora de radicais livres é atribuída à presença e quantidade de grupamentos hidroxil, principalmente ligados ao anel B (HEIM et al., 2002), especialmente em C-3', já que flavonas não substituídas não apresentaram efeito seqüestrador significativo (HUSAIN, 1987). Entretanto, flavonóides que apresentam dois grupamentos hidroxil em orto, como a baicalina demonstraram boa atividade seqüestradora de radicais livres e tiveram efeito protetor sobre a injúria induzida por peróxido de hidrogênio em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (GAO et al., 1999) Esta atividade seqüestradora é independente da presença de dupla ligação entre C-2 e C-3 (HUSAIN, 1987), sendo sugerido por ARORA et al. (1998) que a presença em C-3 de um grupamento hidroxila, nos flavonóis, seja responsável pela sua forte atividade antioxidante.

A glicosilação dos grupamentos hidroxil não altera sua potência seqüestradora de radicais (HUSAIN, 1987). Entretanto a presença de grupamentos metoxil parece diminuir a habilidade antioxidante em alguns

flavonóides testados, entre eles luteolina (4', 5', 5, 7- flavona) e quercetina (4', 5', 5, 7- flavonol) (ARORA et al., 1998).

A presença de um anel catecol 3' 4' demonstrou aumentar a capacidade de inibição da lipoperoxidação (HEIM et al., 2002); (JOYEUX et al., 1995); (MONTESINOS et al., 1995); (COTELLE et al., 1992); (ARORA et al., 1998). Flavonóides com um grupamento catecol no anel B são seqüestradores de radicais livres mais ativos, enquanto que o restante da molécula demonstrou pouca importância para esta atividade. Entretanto em compostos com somente um grupamento hidroxil em B, a estrutura básica parece influenciar na atividade seqüestradora de radicais (VAN ACKER et al., 1996).

Em uma série de flavonas testadas quanto a sua atividade antioxidante, observou-se que compostos que não possuíam substituintes no anel B, como a crisina (5, 7, dihidroxi flavona), a presença de determinados grupamentos, como o grupamento hidroxila, no anel A poderiam ser capazes de aumentar a eficiência antioxidante (ARORA et al., 1998).

Por outro lado, alguns flavonóides, com diferentes números e posição de grupos hidroxilas, são descritos como inibidores de atividades de enzimas da cadeia respiratória (HODNICK et al., 1987).

Quando seis flavonas – robinetina (3, 3', 4', 5', 7 – pentahidroxi flavona), ramnetina (3, 3', 4', 5, - tetrahidroxi-7-metoxiflavona) e eupatorina ( 3', 5 – dihidroxi-4', 6, 7, trimetoxiflavona), baicaleina (5, 6, 7, - trihidroxiflavona), 7,8- dihidroxiflavona e norwogonina ( 5, 7, 8, trihidroxiflavona), possuindo variáveis configurações dos grupamentos hidroxil foram testadas quanto a sua capacidade de inibição das atividades das enzimas mitocondriais succinato-oxidase e NADH-

oxidase, os autores observaram um sítio primário de atuação destes flavonóides sobre o complexo I já que os valores de  $IC_{50}$  foram menores para todos os compostos em relação ao complexo II (HODNICK, 1994). Em um estudo relacionando estrutura do flavonóide com a atividade da succinato-oxidase, verificou-se que flavonóides que possuíam um anel catecol em B, demonstravam maior efeito inibitório (HODNICK, 1986). Neste aspecto, Hodnick e colaboradores (1988) mostraram também que a eletroquímica dos flavonóides também é importante pois flavonóides que se autooxidam ( $E_{1/2}$  variando de -30 a + 60 mV) foram potentes inibidores da succinato oxidase comparando-se com aqueles que não se autooxidam (+ 130 a + 340 mV).

Diversos trabalhos documentaram a atividade desacopladora da fosforilação oxidativa, dos flavonóides. Mathiesen e colaboradores (1996) testaram a atividade desacopladora e inibidora da síntese de ATP de uma série de dihidrochalconas C-metiladas e de uma chalcona, as denominadas mirigalonas. Entre a série de mirigalonas pesquisadas, três provocaram desacoplamento da fosforilação oxidativa em mitocôndrias de fígado de rato efeito semelhante aquele provocado pelo 2,4-dinitrofenol (DNP) um desacoplador de referência (MATHIESEN et al., 1996).

Segundo Van Dijk et al., (2000) a atividade desacopladora em vesículas contendo citocromo *c* - oxidase seria decorrente de um ciclo envolvendo as seguintes etapas: a) difusão da forma não-carregada do flavonóide através da membrana; b) dissociação dos grupamentos hidroxila ionizáveis (deprotonação desses grupos é facilitada por um pH alcalino); c) repulsão da forma ionizada em

resposta ao  $\Delta\psi$  e d) protonação da molécula ionizada do lado de fora da membrana.

A propriedade desacopladora dos flavonóides também foi demonstrada em mitocôndria de plantas, onde uma relação entre a estrutura e a atividade desacopladora de uma série de flavonas foi mostrada. Verificou-se que a presença de grupamentos hidroxila nas posições 4' e 7 e a característica lipofílica da molécula são condições que favorecem o desacoplamento (RAVANEL, 1986). Foi observado também que a glicosilação das flavonas ativas suprime a atividade desacopladora. Além disso, Cotelle et al., (1992) demonstraram que entre as flavonas testadas aquelas hidroxiladas em C-7, são eficientes inibidoras da xantina – oxidase.

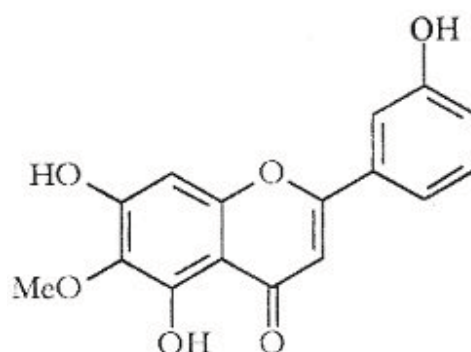
Montesinos e colaboradores (1995) demonstraram que entre uma série de flavonas testadas, as orto - dihidroxiladas, como a eupafolina (flavona utilizada nesse estudo), possuem uma grande atividade inibitória da peroxidação lipídica e são seqüestradoras de radicais superóxido gerados pelo sistema xantina-oxidase em neutrófilos humanos.

Portanto, substituições no anel B são as mais importantes para a atividade antioxidante dos flavonóides. Grupamentos hidroxil aumentam a atividade, enquanto que, grupamentos metoxil diminuem. A presença de substituição O – dihidroxi favorece substancialmente a atividade antioxidante e a presença de um grupamento hidroxil em C-3 promove inibição da peroxidação lipídica (ARORA et al., 1998).

Outra propriedade importante dos flavonóides é a sua capacidade de sofrer reações de óxido-redução. Hodnick et al. (1988) utilizando a técnica de voltametria cíclica verificaram o potencial redox de vários flavonóides (entre eles algumas flavonas) e sua relação com a atividade biológica conhecida. Estes autores demonstraram que o flavonóide mais potente inibidor da succinato – ubiquinona coenzima Q redutase mitocondrial (complexo II), a miricetina (3, 5, 7, 3', 4', 5'-flavonol) possuía configuração dos grupamentos hidroxil capaz de suportar reações redox e um potencial de oxidação de 60 mV.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que a hispidulina (5, 7, 4'- trihidroxi – 6 – metoxiflavona)(Figura 5), flavona também extraída do *E. litoralle*, reduziu a velocidade respiratória no estado III e estimulou o estado IV em mitocôndrias de fígado de rato, nas doses de 50 – 200  $\mu$ M (ROCHA, 2000). Além disso, esse flavonóide estimulou a atividade da enzima ATPase, e provocou inibição das atividades enzimáticas entre os complexos I e III da cadeia respiratória (BARBOSA, 2003).

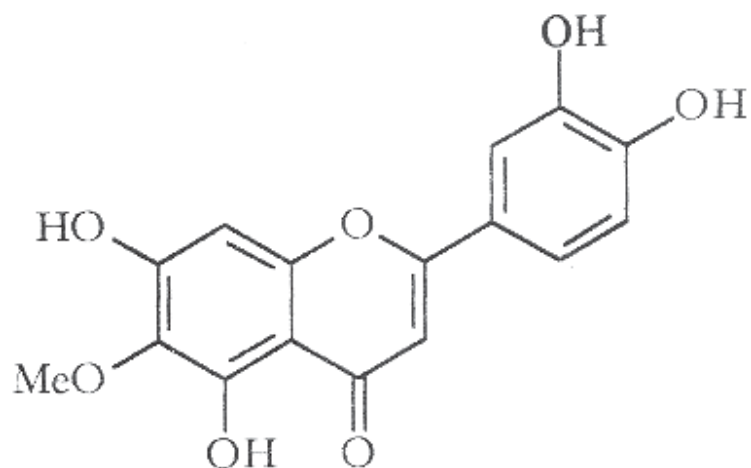
FIGURA 5: FÓRMULA ESTRUTURAL DA HISPIDULINA



## 2.5 EUPAFOLINA

A eupafolina, 5, 7, 3', 4'- tetrahidroxi – 6 – metoxiflavona (Figura 5) também conhecida como nepetina é um flavonóide do grupo das flavonas com fórmula estrutural  $C_{16}H_{12}O_7$  (COLEMAN et al., 1984). Foi primeiramente isolada a partir de um extrato com propriedades citotóxicas de *Eupatorium cuneifolium* (KUPCHAN et al., 1969). Posteriormente foi isolada de *Artemisia Ludoviciana* Var. *Ludoviciana* (YONG-LONG & MABRY, 1982), *Baccharis trimera* less (SOICKE et al., 1987) conhecida vulgarmente como carqueja, *Artemisia Frigida* (YONG-LONG et al., 1981), *Salvia lavandulifolia* (CANIGUERAL et al., 1989) que é usada como hipoglicemiante e cicatrizante na medicina popular, *Brickellia Chlorolepis* e *B. Dentata* (ULUBELEN et al., 1980), *Artemisia vulgaris* L., planta utilizada na medicina tradicional como emenagoga (LEE-SANG-JUN, 1998), *Arnica Montana* L., usada pela população como agente tópico (SANTOS, 1998), entre outras. O flavonóide na sua forma glicosilada foi extraído da *Arnica Chamissonis* (MERFORT, 1988).

FIGURA 6: FÓRMULA ESTRUTURAL DA EUPAFOLINA.



A eupafolina utilizada neste trabalho foi isolada do *Eupatorium littorale* Cabrera, uma planta arbustiva, com cerca de 1 metro de altura (Figura 6) , da família Asteraceae, nativa de Piraquara – PR, de crescimento espontâneo próximo a Serra do Mar (OLIVEIRA et al., 2001).

Recentemente no Departamento de Farmacologia da UFPR (Universidade Federal do Paraná) demonstrou-se que a eupafolina testada isoladamente, no músculo cutâneo-peitoral, promoveu uma despolarização da membrana deste tecido, e em um segundo momento, induziu a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (HANSAUL, 2002).

FIGURA 7: FOTO DO *EUPATORIUM LITORALLE*



Trabalhos desenvolvidos por Abe e colaboradores (2002) demonstraram que a eupafolina inibe o crescimento de três linhagens tumorais testadas, MK-1 (adenocarcinoma gástrico humano), HeLa (carcinoma uterino humano), B16F10 (melanoma murino) com os seguintes valores de  $GI_{50}$  (dose responsável pela inibição de 50% do crescimento) : 29, 6 e 16  $\mu$ M respectivamente. Segundo esses autores a potente atividade inibitória do crescimento é decorrente dos quatro substituintes polares hidroxil.

A eupafolina demonstrou ação protetora contra stress oxidativo induzido por L-glutamato em células corticais de cérebro de rato (KIM et al., 2002), atividade

antiinflamatória (SALA et al., 1999) e entre diversos flavonóides testados verificou-se sua potente atividade inibitória sobre a atividade da enzima xantina oxidase e uma potente inibição da lipoperoxidação *in vitro* (SANZ et al., 1994). Barbosa (2003) verificou a capacidade da eupafolina de reagir com o radical livre DPPH e de promover a liberação de ferro da ferritina..

O extrato metanólico de *Santolina Chamaecyparissus* contendo quatro sesquiterpenos e eupafolina, inibiu a atividade da enzima fosfolipase  $A_2$  *in vitro*, e demonstrou atividade antiinflamatória em edema de pata de rato na concentração de 1mg/mL (SALA, 2000).

Coleman e colaboradores (1984) demonstraram a propriedade da eupafolina em inibir a velocidade respiratória estimulada por ADP utilizando-se como substrato oxidável succinato (14% de inibição) e glutamato de sódio (45% de inibição) com uma única dose (40 $\mu$ M) testada. Outros dados na literatura, sobre a influência da eupafolina em parâmetros respiratórios mitocondriais não foram encontrados.

Em experimentos de inchamento mitocondrial com preparações oxidando o substrato, a hispidulina (BARBOSA, 2003) que possui uma hidroxila a menos que a eupafolina na posição 3', reduziu a velocidade e amplitude do inchamento. Porém, estes parâmetros não foram alterados na presença de valinomicina e potássio. Estes parâmetros e os relativos ao consumo de oxigênio e atividades enzimáticas não foram ainda avaliados para eupafolina e constituem objetivos do presente estudo.

### 3. OBJETIVOS

- Determinar os efeitos da eupafolina sobre os seguintes parâmetros mitocondriais, utilizando glutamato e succinato como substratos oxidáveis:  
Consumo de oxigênio na presença de ADP (estado III);  
Consumo de oxigênio após a utilização de ADP (estado IV);  
Coeficiente de controle respiratório (CCR);  
Relação ADP/O.
- Determinar os efeitos da eupafolina sobre as atividades das enzimas da cadeia respiratória.
- Verificar os efeitos da eupafolina sobre propriedades da membrana mitocondrial utilizando a técnica de inchamento mitocondrial.
- Comparar os efeitos da eupafolina sobre o metabolismo mitocondrial com aqueles causados pela hispidulina.
- Determinar o potencial de oxidação da eupafolina através da técnica de voltametria cíclica.
- Comparar os efeitos da eupafolina e hispidulina sobre a viabilidade celular de linhagens de células Hela .

## 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, e Tris foram adquiridos da Sigma Chemical Co<sup>®</sup>. (EUA). 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>.

### 4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE EUPAFOLINA

A eupafolina foi extraída da planta *Eupatorium littorale* e cedida gentilmente pelo Dr. Brás Heleno de Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Para o preparo da solução estoque ( $13 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) a eupafolina foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO). As concentrações utilizadas nos experimentos mitocondriais foram: 25, 50, 75, 100 e  $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Nos experimentos de viabilidade celular as concentrações foram: 2,5, 5, 10, 50 e  $100 \mu\text{ mol.L}^{-1}$ .

### 4.3. ANÁLISES DOS EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL

#### 4.3.1 Animais

Para o isolamento de mitocôndrias, foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, machos, pesando de 200-300 g, mantidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com ração Nuvilab<sup>®</sup> e antes dos experimentos foram colocados em jejum por 12 horas com água *ad libitum*. Os animais foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, e o fígado foi rapidamente retirado e colocado no meio de isolamento, sendo mantido em banho de gelo durante todo o processamento.

Este trabalho recebeu aprovação (Processo n° 8595104-06 de 15/03/04) 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 inchamento mitocondrial.

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por VOSS *et al.* (1961), utilizando como meio de isolamento modificado: D-manitol 210 mmol.L<sup>-1</sup>, sacarose 70 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> e soroalbumina bovina (BSA) 0,05 g%. Os animais foram sacrificados como já descrito e o fígado foi removido e lavado com o meio de isolamento e conservado em banho de gelo. O material 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 2°C – 4°C a 320.g por cinco minutos. Nesta primeira etapa de centrifugação, desprezou-se o sedimento, que possuía restos de células intactas, membranas e núcleos, e o sobrenadante que contém as mitocôndrias, foi novamente centrifugado a 12.600 g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão com meio de isolamento e centrifugado a 8100 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.

Para os experimentos de *swelling* mitocondrial, o procedimento bem como os meios de extração utilizados foram idênticos, omitindo-se apenas da última lavagem o EDTA.

A suspensão mitocondrial obtida foi conservada em banho de gelo e utilizada imediatamente, ou então congelada em N<sub>2</sub> líquido, quando destinada à determinação das atividades enzimáticas da cadeia respiratória mitocondrial.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

Foram utilizadas mitocôndrias de fígado de rato (2 mg) isoladas segundo método de VOSS *et al.* (1961) (descrito no item 4.4.2) e meio de incubação contendo: tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EGTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, manitol 125 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.L<sup>-1</sup> e suplementadas com glutamato de sódio 5 mmol.L<sup>-1</sup> ou succinato de sódio 3 mmol.L<sup>-1</sup>, Pi 1,6 mmol.L<sup>-1</sup> e ADP 0,16 mmol.L<sup>-1</sup>. A eupafolina

foi adicionada em diferentes concentrações (25 a 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e permaneceu incubada por 2 min em presença da proteína mitocondrial.

Os experimentos foram realizados em volume final de 1,2 mL, sob agitação constante em câmara termostaticada a 28°C (VOSS *et al.*, 1961). O consumo de  $\text{O}_2$  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  $\text{O}_2$  consumidos $^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína considerando-se a solubilidade do  $\text{O}_2$  na água, à temperatura utilizada e a 1 atm (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 III) e a velocidade após o consumo de ADP (estado IV). 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 III (CHANCE & WILLIAMS, 1955) (ESTABROOK, 1967).

#### 4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO DE MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS MITOCONDRIAIS

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato, conforme descrito anteriormente (item 4.3.2) utilizando-se o método de VOSS *et al.* (1961), foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento do seu uso, quando então foram rompidas por choque térmico (congelamento e descongelamento por 3 vezes) e mantidas em

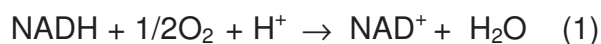
banho de gelo durante o tempo dos ensaios. Foram obtidos fragmentos de membrana, os quais foram utilizados como fonte de enzimas.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

A atividade das enzimas ligadas à cadeia respiratória foi determinada espectrofotometricamente em aparelho Hitashi, modelo U-2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300 ou polarograficamente em oxígrafo Gilson, utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), acoplado a um registrador.

##### 4.6.1. NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade da NADH oxidase foi determinada pelo método de SINGER (1974). A velocidade de oxidação do NADH (reação 1) que se traduz na velocidade de consumo de oxigênio, foi acompanhada polarograficamente.



O sistema de reação foi composto por tampão fosfato 80 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 50 μ mmol.L<sup>-1</sup>, NADH 0,17 mmol.L<sup>-1</sup> e 1 mg de proteína mitocondrial. As mitocôndrias foram incubadas por 2 minutos com cada concentração da droga. A reação ocorreu em temperatura controlada de 28° C, em volume final de 1,3 mL, sendo iniciada pela adição de NADH (T<sub>0</sub>).

Os resultados foram expressos em micromol de oxigênio consumido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína, considerando a solubilidade do O<sub>2</sub> em água, a 1 atm e a 28° C de 235 μmmol.L<sup>-1</sup> (ESTABROOK, 1967).

#### 4.6.2. NADH Citocromo *c* Redutase (EC 1.6.99.3 - NADH Citocromo *c* Óxido-Redutase)

A atividade da NADH citocromo *c* redutase foi determinada espectrofotometricamente pelo método descrito por SOMLO (1965) através do monitoramento da velocidade de redução do citocromo *c* a 550nm.

O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, NADH 50 μ mol.L<sup>-1</sup>, citocromo *c* (oxidado) 40 μmol.L<sup>-1</sup>, NaCN 1 mmol.L<sup>-1</sup> e 80 μg de proteína mitocondrial. Os reagentes presentes no sistema, exceto o citocromo *c*, foram incubados por 10 min a 28°C. Além disso, as mitocôndrias foram incubadas por 2 minutos com cada concentração da droga. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 mL, e foi iniciada pela adição do citocromo *c* (T<sub>0</sub>), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos.

Para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar ε<sub>550 nm</sub> (cit *c* red-ox)= 19.000 cm<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em nanomol de citocromo *c* reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial.

#### 4.6.3. 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 acceptor artificial de elétrons na presença da rotenona e a reação foi monitorada a 420 nm (Reação 2).



O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 2,0 mmol.L<sup>-1</sup>, NADH 0,15 mmol.L<sup>-1</sup>, ferricianeto 600 µmol.L<sup>-1</sup>, rotenona 1 µmol.L<sup>-1</sup>, NaCN 1 mmol.L<sup>-1</sup> e 30 µg de proteína mitocondrial, as mitocôndrias foram incubadas por 2 minutos com cada concentração da droga. 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  $\epsilon_{420\text{nm}} = 1040 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em nanomol de ferricianeto reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial (CREUTZ & SUTIN, 1973).

#### 4.6.4. 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<sup>-1</sup> e rotenona 1 µmol.L<sup>-1</sup>. A velocidade de redução do citocromo c foi acompanhada a 550 nm.

O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, NaCN 1 mmol.L<sup>-1</sup>, succinato de sódio 5 mmol.L<sup>-1</sup>, rotenona 1 µmol.L<sup>-1</sup> e 20 µg de proteína mitocondrial. Os reagentes presentes no sistema, exceto o citocromo *c*, foram incubados por 10 min a 28°C. A reação ocorreu a 28°C, por 2 min, em volume final de 1 mL. A droga foi incubada por 2 min no meio reacional nas suas diferentes concentrações. A reação foi iniciada pela adição de 40 µmol.L<sup>-1</sup> de citocromo *c* (T<sub>0</sub>).

Para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{550\text{nm}} = 19.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . A atividade enzimática resultante foi expressa em micromoles de citocromo *c* reduzido. min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial.

#### 4.6.5. 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<sup>-1</sup> (pH 7,4), succinato de sódio 20 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, NaCN 1 mmol.L<sup>-1</sup>, rotenona 1 mmol.L<sup>-1</sup>, PMS 1 mmol.L<sup>-1</sup> 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 droga foi incubada por 2 min no meio reacional nas suas diferentes concentrações. A reação ocorreu a 28°C, em

volume final de 1 mL, e foi iniciada pela adição de DCPIP 180  $\mu\text{M}$  ( $T_0$ ), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos.

Os resultados foram expressos em micromol de DCPIP reduzido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{550\text{nm}} = 19.000 \text{ cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$  para o DCPIP reduzido (SINGER, 1974).

#### 4.6.6. 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  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,4), EDTA 2  $\text{mmol.L}^{-1}$ , citocromo *c* reduzido 30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 20  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. A droga foi incubada por 2 min no meio reacional nas suas diferentes concentrações. 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  $\epsilon_{550\text{nm}} = 19.000 \text{ cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em micromols citocromo *c* oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

Obtenção do Ferrocitocromo *c* : Citocromo *c* oxidado foi reduzido usando ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) como agente redutor. O ferrocitocromo *c* foi separado do excesso de ditionito por cromatografia em coluna de Sephadex G-25<sup>®</sup> médio

(YONETANI & RAY, 1965). A concentração do citocromo c reduzido foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{550\text{nm}} = 27.700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  para a hemoproteína reduzida. O ferrocitocromo c preparado por este método contém menos de 5% da proteína oxidada.

#### 4.6.7. Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias Rompidas

A atividade da  $F_1F_0$  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  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 7,4),  $\text{MgSO}_4$   $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , fosfoenolpiruvato (PEP)  $2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 10 unidades de piruvato quinase (1 unidade de piruvato quinase converte  $1 \mu\text{mol}$  de PEP a piruvato por min) e proteína mitocondrial na quantidade de  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Após adição do meio de reação e da piruvato quinase, os tubos foram incubados por 10 minutos, a  $28^\circ \text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição de ATP  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $T_0$ ), e interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 5%. O material foi centrifugado a  $10000 \cdot g$  por 1 minuto, sendo então o fosfato inorgânico do sobrenadante dosado pelo método de SUMNER (1944).

A atividade da ATPase foi expressa em  $\mu\text{mol Pi liberado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ .

#### 4.6.8. Controles não-enzimáticos

Foram realizados controles na presença de DMSO e na ausência de eupafolina ou para avaliação da presença de reações não-enzimáticas entre os constituintes dos meios reacionais e a flavona em todas as determinações.

#### 4.7. DETERMINAÇÃO DO INCHAMENTO (*SWELLING*) MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO $\text{KNO}_3$ .

O inchamento mitocondrial devido à entrada de potássio na matriz, mediada pela valinomicina, foi avaliado de acordo com o método descrito por MORENO & MADEIRA (1990). As variações na absorbância foram acompanhadas em espectrofotômetro Hitashi modelo U-2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300, no comprimento de onda de 546 nm.

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

Os resultados foram expressos como percentagem de inibição relativa ao controle (100%).

#### 4.8 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 Hitachi modelo U-2001.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDOX DA EUPAFOLINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA

As análises foram realizadas em potenciostato EG & G modelo 173 A da PAR (Princeton Applied Research) em tampão Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4) e EDTA (0,5 mmol.L<sup>-1</sup>) sendo submetidos a uma temperatura de 25° C, em um volume final de 15 mL, usando-se os eletrodos de platina como auxiliar, eletrodo de prata (Ag /AgCl) como eletrodo de referência e eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho.

As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio para prevenir a oxidação da eupafolina pelo oxigênio do ar (HODNICK, 1988). Estas análises foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Maria Aparecida B. Gomes do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Para conversão para potencial de redução do eletrodo padrão de hidrogênio, o valor obtido no eletrodo de Ag/AgCl foi subtraído do valor de 0,197.

#### 4.10. EFEITOS DA ADIÇÃO DE NADH, CIANETO E EDTA SOBRE A REDUÇÃO DE CITOCROMO *c* INDUZIDA PELA EUPAFOLINA EM REAÇÃO NÃO - ENZIMÁTICA

4.10.1. Efeito da adição de NADH e/ou EDTA sobre a redução do citocromo *c* em presença de eupafolina.

O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4) e citocromo *c* (oxidado) 40 µ mol.L<sup>-1</sup>. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 mL, e foi iniciada pela adição do citocromo *c* sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos. O meio de reação foi complementado com EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, NADH 50 µmol.L<sup>-1</sup>, desferroxamina 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, catalase 25 U, superóxido dismutase 80 U/mL e eupafolina 200 µmol.L<sup>-1</sup>. A reação foi acompanhada através de uma variação de absorbância relativa a velocidade de redução do citocromo *c* em 550 nm.

4.10.2. Efeito da adição de cianeto sobre a redução do citocromo *c* em presença de eupafolina.

O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, citocromo *c* (oxidado) 40 µmol.L<sup>-1</sup>. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 mL, e foi iniciada pela adição do citocromo *c* sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos. Além desses componentes foram adicionadas ao meio reacional desferroxamina 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, catalase 25 U, superóxido dismutase 80 U/mL cianeto de sódio 1 mmol.L<sup>-1</sup> e eupafolina 200 µmol.L<sup>-1</sup>. A reação foi acompanhada através do monitoramento da variação da absorbância relativa a velocidade de redução do citocromo *c* a 550nm.

#### 4.11. EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA

##### 4.11.1 Células

A linhagem celular HeLa (carcinoma uterino humano) utilizada nestes experimentos foi adquirida no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo).

##### 4.11.2 Procedimentos de Cultivo

As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio MEM acrescido de soro fetal bovino 7,5%, bicarbonato de sódio 8 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão HEPES 20 mmol.L<sup>-1</sup> e gentamicina. As culturas foram mantidas em estufa, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°. Os repiques foram realizados utilizando-se de solução de tripsina em intervalos de 72 h na proporção de 1:3.

##### 4.11.3 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (REILLY et al., 1998). A redução do MTT decorrente da atividade respiratória de células viáveis produz um sal de formazan insolúvel que é posteriormente solubilizado para quantificação em 550 nm. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas Benchmark, Biorad.

As células foram colhidas assepticamente, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços com aproximadamente 10<sup>5</sup> células por poço. Após a aderência (24 h), foram retirados 200 µL do sobrenadante e adicionada a eupafolina ou

hispidulina nas suas diferentes concentrações, o volume final foi completado para 200  $\mu$ L com meio MEM completo. Após 24 horas o sobrenadante foi retirado e adicionaram-se 180  $\mu$ L de HBSS + 20  $\mu$ L da solução de MTT (5 mg/mL), seguindo-se de incubação por 37°C/ 3 h / 5% CO<sub>2</sub>. Após 3h retirou-se o MTT que não reagiu, adicionou-se 200 $\mu$ L de DMSO, para solubilizar o formazan formado. Os resultados foram obtidos em leitor de microplacas utilizando-se filtro 550 nm contra um branco de DMSO.

#### 4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS EXPERIMENTAIS

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

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES POLAROGRÁFICAS DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

A cadeia respiratória mitocondrial é formada por uma série de transportadores de elétrons que ficam inseridos na membrana mitocondrial interna. Os elétrons são transferidos enzimaticamente através desses transportadores de acordo com um gradiente crescente de potenciais redox culminando com a redução do oxigênio à água (NICHOLLS & FERGUSON, 2003). À medida que os elétrons são transportados, ocorre simultaneamente um bombeamento de prótons para o espaço intermembranas gerando um gradiente de prótons responsável pela formação de um potencial de membrana ou força próton motriz que será responsável pela síntese de ATP (NICHOLLS & FERGUSON, 2003).

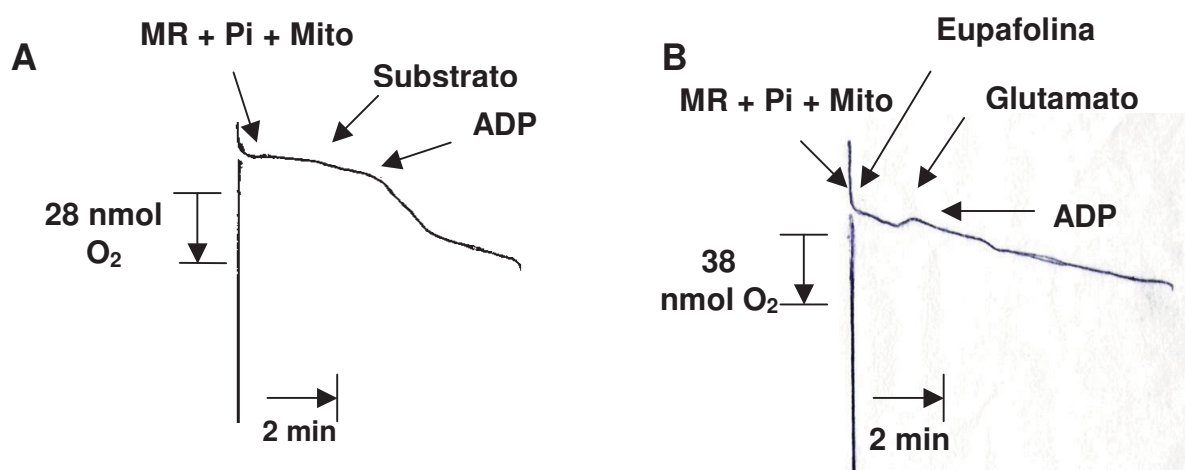
Alguns compostos podem atuar inibindo o fluxo de elétrons como o cianeto, que inibe a enzima citocromo-oxidase, o amital, que impede a transferência de elétrons do centro Fe-S para a ubiquinona ; e outros compostos que são inibidores da síntese de ATP como a oligomicina e venturicidina, existindo ainda aqueles que provocam desacoplamento entre a fosforilação e a transferência de elétrons, como o FCCP e o DNP (ERNSTER et al., 1963) (CHANCE & HOLLINGER, 1963).

Vários flavonóides são descritos como capazes de afetar o transporte de elétrons e o consumo de oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial (HODNICK, 1987), tornando importante o estudo da eupafolina sobre esses parâmetros.

A figura 7 e as tabelas 1-4 mostram os efeitos da eupafolina sobre os parâmetros relacionados ao consumo de oxigênio da suspensão mitocondrial utilizando glutamato ou succinato de sódio como substratos oxidáveis. Na figura 7

pode-se verificar que após a adição da eupafolina ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ocorre a inibição da velocidade respiratória do estado III, quando se utiliza o glutamato como substrato oxidável, resultados semelhantes foram obtidos com o succinato como substrato (dados não mostrados). Desta forma não foi possível fazer a medida da velocidade respiratória do estado IV nesta dose.

FIGURA 8: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO UTILIZANDO-SE GLUTAMATO DE SÓDIO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL



Meio de reação: tampão HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,4), EGTA  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , manitol  $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65 \text{ mmol.L}^{-1}$  e suplementado com glutamato de sódio  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , Pi  $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ , ADP  $0,16 \text{ mmol.L}^{-1}$ , 2 mg de proteína mitocondrial e eupafolina  $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (incubada por 2 min) em volume final de 1,2 mL como indicado. Traçado A: controle (100%). Traçado B: consumo de oxigênio o glutamato como substrato + eupafolina. Perfis representativos de quatro experimentos independentes. MR= meio de reação Mito = suspensão mitocondrial

Observou-se que a eupafolina provocou uma inibição dose-dependente na velocidade respiratória do estado III, quando o glutamato foi utilizado como substrato oxidável, sendo de aproximadamente 80% quando se utilizou a dose máxima ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) da flavona (tabela 1), quando o succinato foi o substrato, o efeito também foi dose-dependente e na dose de  $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de eupafolina verificou-se uma inibição de aproximadamente 65% (tabela 1).

TABELA 1: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA NO ESTADO III, UTILIZANDO-SE GLUTAMATO E SUCCINATO DE SÓDIO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS

Eupafolina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	Consumo de oxigênio (%)	
	Glutamato	Succinato
0	100	100
25	$85 \pm 12^*$	$83 \pm 7^*$
50	$66 \pm 9^*$	$55 \pm 6^*$
75	$49 \pm 6^*$	$51 \pm 7^*$
100	$32 \pm 5^*$	$46 \pm 9^*$
200	$23 \pm 4^*$	$36 \pm 3^*$

Todos os ensaios foram realizados, conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos item 4.4. Controle (100%) corresponde a  $37,9 \pm 5,4$  nanoátomos de O consumido. $\text{min.}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína utilizando-se o glutamato como substrato, e  $57 \pm 13,6$  nanoátomos de O consumido. $\text{min.}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína para o succinato. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle  $\pm$  o desvio padrão de 4 experimentos independentes em triplicata. \* Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 2 podem-se observar os efeitos da eupafolina sobre a velocidade respiratória no estado IV utilizando glutamato ou succinato de sódio como substratos oxidáveis.

Quando o glutamato foi utilizado como substrato não se verificou efeito estatisticamente significativo sobre a velocidade respiratória no estado IV nas doses menores (25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), mas para a maior dose (200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) não foi possível mensurar devido a uma inibição de 77% no valor da velocidade respiratória do estado III (tabela 2) (figura 7) com o glutamato. Quando se utilizou succinato de sódio como substrato, os efeitos observados sobre o estado IV não foram significativos nas doses menores (25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), mas para as maiores doses houve estímulo da velocidade de consumo de oxigênio no estado IV de aproximadamente 20% e 60% para a dose de 75 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  respectivamente, entretanto não foi possível mensurar o valor da velocidade respiratória no estado IV para a dose de 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  também devido à intensa inibição da velocidade respiratória provocada pela eupafolina (tabela 2) bem como o CCR (tabela 4).

TABELA 2: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA NO ESTADO IV UTILIZANDO-SE O GLUTAMATO E SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS

Eupafolina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	Consumo de oxigênio (%)	
	Glutamato	Succinato
0	100	100
25	104 $\pm$ 7	102 $\pm$ 4
50	106 $\pm$ 10	107 $\pm$ 14
75	113 $\pm$ 10*	121 $\pm$ 19*
100	113 $\pm$ 7*	162 $\pm$ 16*
200	-	-

Todos os ensaios foram realizados, conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos ítem 4.4. Controle (100%) corresponde a  $8,46 \pm 0,68$  nanoátomos de O consumido. $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína utilizando-se o glutamato como substrato, e  $11,81 \pm 2,34$  nanoátomos de O consumido. $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína para o succinato. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle  $\pm$  o desvio padrão, de 4 experimentos independentes em triplicata.\* Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ( $p < 0,05$ ).

Considerando-se a razão ADP/O, quando o glutamato foi utilizado como substrato oxidável percebe-se que a eupafolina provocou alteração nesta relação nas doses de 50 a 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  em todas as doses testadas chegando a uma inibição de 10 % na maior dose (tabela 3). Quando se utilizou o succinato como substrato verificou-se uma redução de 20% e 25% nesta relação nas doses de 75 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  respectivamente (tabela 3). Quando se utilizou a eupafolina na dose máxima não foi possível determinar a relação ADP/O.

TABELA 3: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A RAZÃO ADP/O UTILIZANDO O GLUTAMATO OU SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS

Eupafolina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	Razão ADP/O (%)	
	Glutamato	Succinato
0	100	100
25	$93 \pm 6$	$86 \pm 8^*$
50	$85 \pm 8^*$	$85 \pm 7^*$
75	$91 \pm 7^*$	$82 \pm 9^*$
100	$89 \pm 13^*$	$75 \pm 8^*$
200	-	-

Todos os ensaios foram realizados, conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos item 4.4. Controle (100%) corresponde a uma relação ADP/O de  $3,0 \pm 0,39$  utilizando-se o glutamato como substrato, e de  $2,25 \pm 0,26$  para o succinato. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle  $\pm$  o desvio padrão, de 4 experimentos independentes em triplicata. \* Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ( $p < 0,05$ ).

A eupafolina provocou uma significativa redução no coeficiente de controle respiratório quando se utilizou o glutamato como substrato em todas as doses testadas, sendo que, a inibição variou de 25% para a dose de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  a 75% na maior dose mensurável ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (tabela 4).

O CCR foi reduzido em aproximadamente 65% quando o succinato foi utilizado como substrato, (tabela 4) na dose de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de eupafolina.

TABELA 4: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO UTILIZANDO-SE O GLUTAMATO E SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS:

Eupafolina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	CCR (%)	
	Glutamato	Succinato
0	100	100
25	73 $\pm$ 6*	76 $\pm$ 9*
50	67 $\pm$ 9*	56 $\pm$ 6*
75	41 $\pm$ 6*	53 $\pm$ 6*
100	24 $\pm$ 5*	37 $\pm$ 4,5*
200	0,00	0,00

Todos os ensaios foram realizados, conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos ítem 4.4. Controle (100%) corresponde a um coeficiente de controle respiratório de  $4,56 \pm 0,52$  utilizando-se o glutamato como substrato, e de  $4,26 \pm 0,36$  para o succinato. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle  $\pm$  o desvio padrão de 4 experimentos independentes em triplicata. \* Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ( $p < 0,05$ ).

Estes resultados confirmam os dados observados por Coleman e colaboradores (1984) que haviam anteriormente demonstrado, que a eupafolina promove inibição na velocidade respiratória no estado III e redução na razão ADP/O. Contudo, esses autores utilizaram apenas a dose de  $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e verificaram que a eupafolina provocava uma inibição de 45% e 14% no estado III quando o substrato oxidável era o glutamato ou succinato respectivamente. As diferenças observadas em relação à percentagem de inibição, poderiam em parte, ser atribuídas ao fato de que as preparações mitocondriais utilizadas por Coleman e cols. (1984) possuíam coeficiente de controle respiratório entre 2 e 3,5

portanto, abaixo dos valores considerados satisfatórios para esse tipo de experimento e além disso, esses controles foram realizados em presença de etanol o que poderia afetar os resultados e explicar estas diferenças.

Como os resultados obtidos demonstram que a eupafolina possui um acentuado efeito sobre o consumo de oxigênio mitocondrial, poderia estar ocorrendo: interferência direta nos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, interação da eupafolina com a membrana mitocondrial ou ainda, interferência direta sobre o transporte de elétrons em reações de óxido-redução com componentes da cadeia respiratória mitocondrial.

Hodnick e colaboradores (1994) demonstraram que flavonóides alguns deles com estruturas semelhantes a da eupafolina, como a luteolina (4', 5', 5, 7- flavona) uma flavona que possui hidroxilas em orto no anel B mas se distingue da eupafolina por não apresentar grupamento metóxi (HODNICK et al., 1986), inibiam tanto a NADH – oxidase quanto a succinato-oxidase, porém em intensidades diferentes estando estas inibições relacionadas com a sua estrutura química. Este efeito inibidor foi dependente também das propriedades eletroquímicas dos flavonóides (HODNICK, 1988).

Para avaliar melhor estas hipóteses inicialmente foram verificados os efeitos da eupafolina sobre atividades enzimáticas da cadeia respiratória.

## 5.2 EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

As acentuadas intensas inibições causadas pela eupafolina sobre o consumo de oxigênio e os relatos na literatura sobre inibições enzimáticas promovidas por outros flavonóides (HODNICK et al., 1986) motivaram as avaliações dos efeitos da eupafolina sobre os complexos enzimáticos da cadeia respiratória.

A eupafolina provocou uma inibição dose dependente da NADH oxidase, que foi estatisticamente significativa em todas as doses testadas. A inibição máxima foi de aproximadamente 75% com a dose de 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de eupafolina (tabela 5), sendo esses resultados condizentes com os observados para a inibição da velocidade respiratória do estado III obtidos polarograficamente ( $\cong 70\%$ ) (tabela 1), quando se utilizou o glutamato como substrato oxidável. Hodnick e cols (1986) destacam a importância de dois fatores estruturais dos flavonóides para a inibição da NADH - oxidase, sendo eles: a dupla ligação  $C_{2,3}$  e grupo ceto em  $C_4$  sendo estas características estruturais encontradas na eupafolina.

A inibição da atividade da NADH desidrogenase de aproximadamente 50-60% foi observada para todas as doses de eupafolina (tabela 5). Segundo Hodnick et al. (1987) a rotenona um potente inibidor, específico do complexo I, é um derivado de flavonóide, e assim seria esperado que outros flavonóides possam afetar também esta atividade. A NADH citocromo c redutase foi inibida de forma semelhante pelo flavonóide de 25 – 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de forma estatisticamente

significativa ( $\cong 50\%$ ), entretanto na dose máxima ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) observou-se um efeito mais intenso ( $\cong 80\%$ ) de inibição (tabela 5).

Uma análise mais detalhada dos resultados obtidos para as atividades enzimáticas, demonstra que as inibições estão principalmente localizadas sobre a NADH desidrogenase sendo que este efeito não foi dose - dependente. Este fato chama a atenção porque estudos anteriores *in vitro* realizados com *Escherichia coli* utilizando naftoquinonas como a plumbagina, mostraram que estas quinonas, eram capazes de interceptar elétrons da NADH – desidrogenase, e que o excesso de substrato oxidativo inativaria esta enzima que parece ser regulada por estado redox (IMLAY & FRIDOVICH, 1992). De acordo com Halliwell & Gutteridge, (1999), compostos fenólicos como os flavonóides poderiam sofrer oxidação a quinonas e semiquinonas gerando ERO. Assim, a eupafolina através de sua quinona ou semiquinona, poderia estar interferindo de forma semelhante nesse processo. Esta hipótese será averiguada posteriormente através da análise de voltametria cíclica onde se obtêm o potencial de oxidação deste flavonóide e também através da verificação da hipótese da eupafolina reagir com componentes da cadeia respiratória mitocondrial de forma não-enzimática.

De forma global, os resultados obtidos mostram que para as menores doses ( $25$  e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) os valores de inibição obtidos para atividade da NADH oxidase, que considera desde a entrada do substrato NADH no complexo I até a redução completa do oxigênio, são menores que as inibições observadas nos trechos da NADH desidrogenase e NADH citocromo c redutase. Isto poderia ser decorrente de uma menor relação droga/quantidade de proteína utilizada nos

experimentos polarográficos (NADH – oxidase) do que a relação usada nos experimentos espectrofotométricos (NADH desidrogenase e NADH citocromo *c* redutase). Entretanto para as doses maiores (75 –200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) observamos que as inibições das regiões citadas são condizentes com as obtidas para NADH oxidase, possivelmente porque com o aumento da concentração da flavona a relação droga/proteína aumenta e o efeito observado tornar-se-ia mais próximo dos verificados nas análises espectrofotométricas.

Quando se considerou a utilização do substrato através do complexo II da cadeia respiratória, as inibições na atividade da succinato desidrogenase foram de aproximadamente 30% para as doses entre 25 e 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e de 50% para as doses de 100 e 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (tabela 5). A succinato citocromo *c* redutase foi inibida cerca de 60% pela eupafolina (25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e 80% nas concentrações superiores a 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (tabela 5). A succinato oxidase apresentou uma inibição de aproximadamente 25% somente quando utilizamos a dose máxima (200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (tabela 5).

Assim como o observado para o complexo I, os resultados de inibição da succinato oxidase não são condizentes com os valores encontrados nos trechos da succinato desidrogenase e succinato citocromo *c* redutase (tabela 5) e nem com os valores de inibição da velocidade respiratória no estado III para o succinato obtidos polarograficamente (tabela 1). Esta discordância entre a inibição da succinato –oxidase e a inibição dos segmentos também poderia ser decorrente da menor relação droga/quantidade de proteína o que provocaria um efeito menos

acentuado do que o observado nos experimentos com espectrofotometria onde essa relação é bem superior.

A atividade da citocromo *c* oxidase não foi alterada significativamente pela eupafolina em nenhuma das doses usadas (tabela 5).

Devido às reações não-enzimáticas observadas durante a realização das medidas das atividades enzimáticas os valores das enzimas NADH citocromo *c* redutase e succinato citocromo *c* redutase foram corrigidos, subtraindo-se os valores da reação não - enzimática daqueles obtidos na presença de proteína mitocondrial. As reações não - enzimáticas verificadas entre a eupafolina e o citocromo *c* serão analisadas em mais detalhes na seqüência.

Como um dos objetivos desse trabalho foi comparar os efeitos da eupafolina com os obtidos com a hispidulina (BARBOSA, 2003), optou-se por utilizar a concentração molar em detrimento da relação droga/proteína já que com a hispidulina os parâmetros analisados não foram afetados significativamente por esta relação.

A hispidulina, assim como a eupafolina, não afeta a atividade da citocromo *c* oxidase sendo seu sítio de ação também localizado entre os complexos I e III, porém, os efeitos sobre as demais enzimas demonstraram perfis distintos de inibição. As atividades da succinato citocromo *c* redutase e NADH desidrogenase foram cerca de quatro vezes mais inibidas pela eupafolina. A eupafolina também foi capaz de inibir a succinato desidrogenase o que não foi verificado com a hispidulina. A inibição de cerca de 20% nas maiores doses sobre a atividade da succinato oxidase foi semelhante para os dois flavonóides. Estes resultados sugerem que estas drogas podem estar atuando por mecanismos de ação

distintos. Essas diferenças poderiam ser decorrentes da presença do anel catecol na estrutura da eupafolina, que poderia sofrer reações de auto-oxidação gerando espécies reativas de oxigênio capazes de interferir com componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Outra possibilidade seria a da própria droga ligar-se à proteína ou um radical intermediário formado durante processos de oxidação reagir com componentes protéicos da suspensão mitocondrial.

Esses resultados são condizentes com outros trabalhos que já haviam demonstrado as intensas inibições de alguns flavonóides sobre as atividades enzimáticas da cadeia respiratória mitocondrial (HODNICK et al., 1987); (HODNICK, 1994).

Com base nos resultados obtidos podemos inferir que o sítio de atuação da eupafolina na cadeia respiratória mitocondrial está localizado entre os Complexos I e III. A partir desses resultados o próximo passo foi verificar se a eupafolina promove alterações sobre a atividade da ATPase.

TABELA 5: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Eupafolina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	NADH Oxidase	NADH Desidrogenase	NADH Citocromo c Redutase	Succinato Desidrogenase.	Succinato Citocromo c Redutase	Citocromo c Oxidase
0	100	100	100	100	100	100
25	80 $\pm$ 5*	42 $\pm$ 3*	54 $\pm$ 8*	71 $\pm$ 11*	41 $\pm$ 5*	98 $\pm$ 15
50	64 $\pm$ 8*	41 $\pm$ 4*	45 $\pm$ 9*	69 $\pm$ 10*	23 $\pm$ 5*	104 $\pm$ 10
75	50 $\pm$ 6*	51 $\pm$ 7*	46 $\pm$ 8*	78 $\pm$ 8*	12 $\pm$ 2*	102 $\pm$ 11
100	41 $\pm$ 4*	50 $\pm$ 7*	40 $\pm$ 5*	50 $\pm$ 3*	29 $\pm$ 5*	96 $\pm$ 9
200	24 $\pm$ 1*	39 $\pm$ 6*	19 $\pm$ 2*	51 $\pm$ 8*	18 $\pm$ 1*	82 $\pm$ 10

Todos os ensaios foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos, no item 3.6. Os resultados estão expressos em Atividade Enzimática em % relativa ao controle. Controle 100% corresponde a atividade das enzimas; NADH-Oxidase: 42  $\pm$  6,7 nmol de oxigênio consumido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; NADH-Desidrogenase: 24,22  $\pm$  3,9  $\mu\text{mol}$  de ferricianeto reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; NADH-Citocromo c Redutase: 27,4  $\pm$  5,5 nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; Succinato – Desidrogenase: 149  $\pm$  6  $\mu\text{mol}$  de DCPIP reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; Succinato-Citocromo c Redutase: 21,4  $\pm$  6 nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; Citocromo Oxidase: 601  $\pm$  8  $\mu\text{mol}$  de citocromo c oxidado.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle  $\pm$  o desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes. \* Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle (p < 0,05).



### 5.3 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A ATIVIDADE DA ATPASE

A ATPsintase mitocondrial é uma ATPase do tipo F, que catalisa a formação de ATP a partir de ADP e Pi, impulsionada pelo fluxo de prótons do lado P para o lado N da membrana, a denominada força próton motriz. É formada por dois componentes distintos: F<sub>1</sub>, uma proteína periférica de membrana, e F<sub>0</sub>, uma proteína integral de membrana (ERNSTER et al., 1963) (CHANCE & HOLLINGER, 1963).

A atividade ATPásica foi avaliada utilizando-se mitocôndrias rompidas. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 6.

A determinação da atividade ATPásica em mitocôndrias rompidas tem por objetivo verificar a atuação da droga diretamente sobre a enzima. Contudo nas doses testadas não foi encontrado efeito significativo da eupafolina sobre a atividade da enzima ATPase em mitocôndrias rompidas (tabela 6), indicando que essa droga não afeta diretamente a síntese de ATP. Contudo, quando a hispidulina foi utilizada foi verificou-se inibição da ATPase rompida (BARBOSA, 2003).

TABELA 6: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA ATPase DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Eupafolina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	ATPase
0	100
25	103 $\pm$ 14
50	102 $\pm$ 11
75	105 $\pm$ 12
100	94 $\pm$ 8
200	90 $\pm$ 15

Todos os ensaios foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos, no item 4.6. Os resultados estão expressos em Atividade Enzimática em % relativa ao controle. Controle 100% corresponde à atividade da enzima ATPase de mitocôndrias rompidas:  $1343 \pm 34 \mu\text{mols de Pi liberado.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  proteína. Os valores são expressos como percentagem em relação ao controle  $\pm$  o desvio padrão de quatro experimentos independentes.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DO INCHAMENTO (SWELLING) MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA EM MEIO CONTENDO $\text{KNO}_3$

A presença de um núcleo hidrofóbico nas bicamadas lipídicas das membranas biológicas cria uma barreira efetiva para a passagem de espécies carregadas através dessas membranas. Entretanto espécies não carregadas como água, oxigênio e dióxido de carbono são permeáveis à membrana (NICHOLLS & FERGUSON, 2003).

A membrana mitocondrial também possui essas características, entretanto sobre algumas condições como na utilização de ionóforos, compostos que possuem uma região externa hidrofóbica e uma região interna hidrofílica, determinadas espécies carregadas podem ser transportadas através das membranas (NICHOLLS & FERGUSON, 2003).

O inchamento osmótico causado pelo fluxo de íons através da membrana é um valioso meio de estudo do transporte de íons. A valinomicina, um ionóforo catalisador do transporte “uniport” de  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$  (NICHOLLS & FERGUSON, 1992) ou  $\text{NH}_4^+$ , pode ser utilizada para criar um potencial de difusão de potássio em uma membrana mitocondrial desenergizada. Neste trabalho o experimento de inchamento mitocondrial induzido por valinomicina em meio contendo  $\text{KNO}_3$  foi utilizado para avaliar indiretamente o efeito da eupafolina sobre propriedades da membrana mitocondrial, como a fluidez pois este parâmetro pode afetar o fluxo de elétrons na cadeia respiratória e também atividades das enzimas da cadeia respiratória ligadas a membrana.

A eupafolina provocou uma inibição na amplitude do inchamento mitocondrial induzido por valinomicina de aproximadamente 30% somente nas

doses acima de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figura 9). Importante ressaltar que somente o solvente utilizado, DMSO, apresentou um efeito de inibição da amplitude do inchamento de aproximadamente 56% e esse valor foi subtraído do efeito provocado pela droga mais o solvente.

A velocidade inicial do inchamento não foi alterada pela presença da flavona em nenhuma das doses utilizadas.

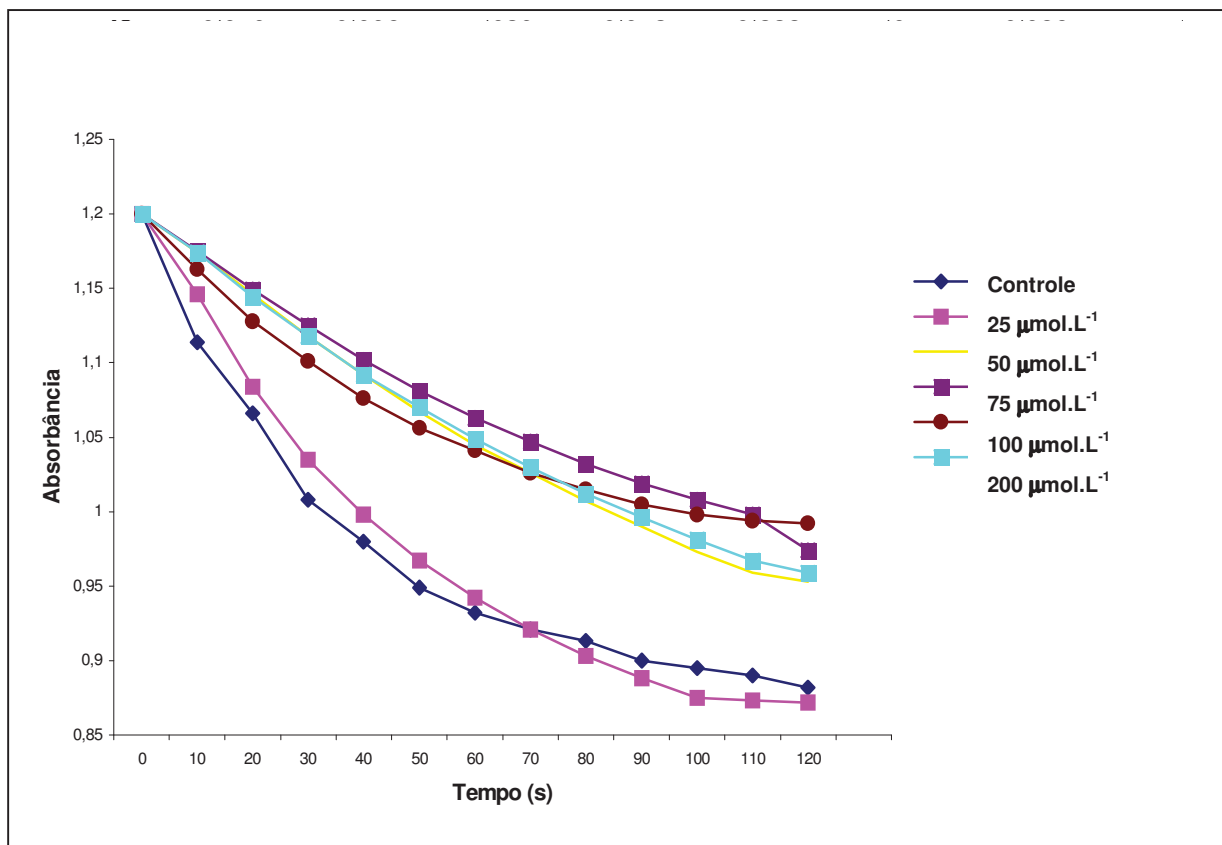
Esses resultados sugerem que a eupafolina possui um efeito sobre o trânsito da valinomicina que por sua vez, é dependente da fluidez da membrana mitocondrial.

Este efeito, aliado às inibições enzimáticas observadas na cadeia respiratória, poderia explicar os efeitos verificados sobre o consumo de oxigênio nas análises polarográficas.

Os resultados obtidos para eupafolina diferem daqueles descritos por Barbosa (2003) para a hispidulina visto que esta não afeta o inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e potássio, nas doses utilizadas.

A interferência da eupafolina no trânsito da valinomicina, inferida pela diminuição do inchamento mitocondrial leva a proposição de que esta flavona poderia se inserir na membrana diminuindo sua fluidez.

FIGURA 9: EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA, NA PRESENÇA DE NITRATO DE POTÁSSIO



O sistema de reação foi constituído de nitrato de potássio 135 mmol.L<sup>-1</sup> M, HEPES 5 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2), EDTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, rotenona 2 µ mol.L<sup>-1</sup>, antimicina A 2 µg.ml<sup>-1</sup> e 0,2 mg de proteína mitocondrial em um volume final de 1 mL, conforme procedimento descrito em materiais e métodos, item 4.7. O controle (100%) constituiu-se somente de sistema de reação. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDOX DA EUPAFOLINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA

A cadeia respiratória mitocondrial consiste de uma série de transportadores de elétrons, a maioria sendo proteínas integrais de membrana, cujos grupos prostéticos são capazes de aceitar ou doar um ou dois elétrons. Cada componente da cadeia aceita elétrons de um transportador precedente e transfere para o seguinte em uma seqüência específica, determinada pelos valores crescentes de potencial de redução (- 0,32 V até + 0,816 V).

A afinidade que uma espécie química possui em doar ou receber elétrons é expressa quantitativamente através do seu potencial redox. Quanto maior é a afinidade em receber elétrons, caracterizada por um potencial positivo, mais oxidante é a substância, ao contrário, quanto mais facilmente um composto doa seu elétron maior é o seu potencial redutor e de carga negativa. Nas reações do tipo redox, há uma espécie se oxidando em detrimento da redução de outra, esses são os conhecidos pares redox.

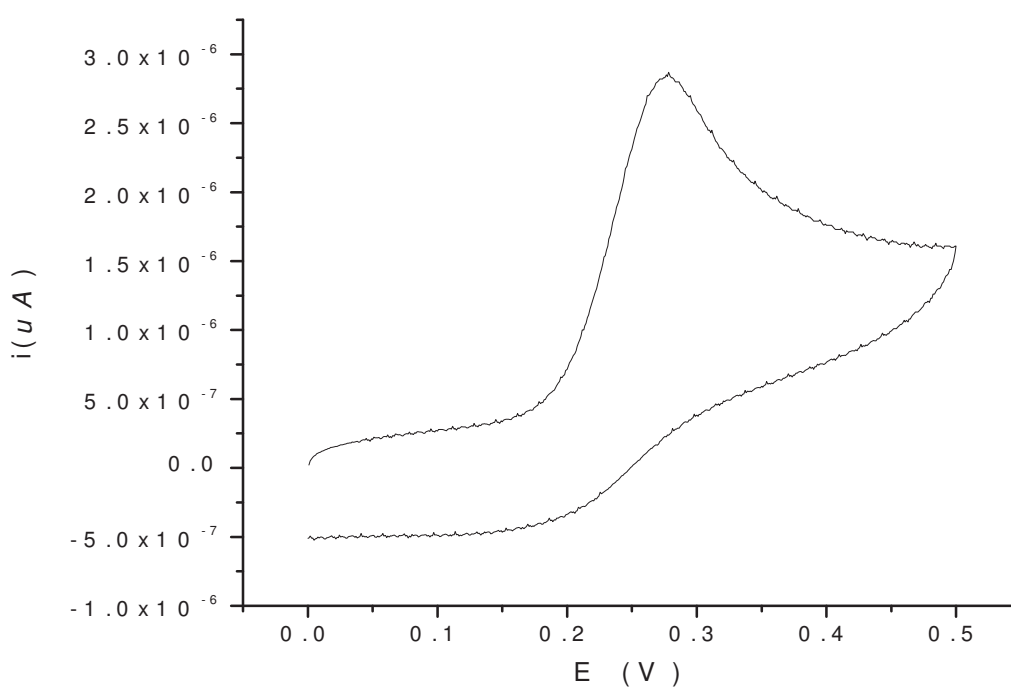
Hodnick e colaboradores (1988) já demonstraram que alguns flavonóides, devido à presença de grupamentos hidroxila em sua estrutura, possuem a propriedade de interferir em sistemas enzimáticos e sofrer reações redox.

Considerando a possibilidade de que este flavonóide poderia desviar elétrons da cadeia respiratória e assim interferir no consumo de oxigênio foi realizada a análise de voltametria cíclica, para verificar se a eupafolina poderia sofrer óxido –redução em valores de potencial na faixa da cadeia respiratória.

O resultado deste experimento está demonstrado na figura 10 onde observa-se um pico anódico em + 0,28 V (Ag/AgCl) em uma reação irreversível no voltamograma obtido para eupafolina. A conversão para o eletrodo padrão

de hidrogênio origina o valor de potencial de redução de - 0,08 V sugerindo fortemente que esta flavona pode sofrer oxidação em uma faixa de potencial dentro dos valores encontrados nos componentes da cadeia respiratória mitocondrial especialmente na faixa onde se situam os citocromos.

FIGURA 10: VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DA EUPAFOLINA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO



Sistema: Tampão HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , (pH 7,2), EGTA  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  suplementado com eupafolina  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  M em DMSO a  $25^\circ\text{C}$ . O eletrodo de referência utilizado foi de Ag/AgCl, como auxiliar o eletrodo de platina e o de trabalho o eletrodo de carbono vítreo. A velocidade de varredura foi de  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ .

## 5.6 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE NADH, CIANETO E EDTA SOBRE A REDUÇÃO DE CITOCROMO C INDUZIDA PELA EUPAFOLINA EM REAÇÃO NÃO - ENZIMÁTICA

Hodnick e colaboradores demonstraram que flavonóides contendo substituições hidroxil (como hidroquinonas e catecol) seriam capazes de participar de reações de óxido-redução e isto estaria correlacionado com suas propriedades inibitórias da succinato-oxidase mitocondrial (HODNICK et al., 1986).

Posteriormente este mesmo grupo demonstrou que flavonóides que apresentavam um anel catecol, como é o caso da eupafolina, possuíam uma baixa velocidade de auto-oxidação e que esse processo era estimulado pela adição de cianeto (HODNICK et al., 1994).

Ao se investigar o processo de autooxidação em moléculas com anel catecol, é importante considerar a participação de metais como o ferro e cobre, pois esses podem atuar como catalisadores desse processo, gerando espécies reativas de oxigênio, quinonas (Q) e semiquinonas (SQ) como produtos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Considerando que a eupafolina sofre oxidação na faixa do potencial encontrado na cadeia respiratória, foram realizadas análises para avaliar se no meio reacional a droga iria interferir no processo de redução do citocromo c.

### 5.6.1. Avaliação do efeito da adição de NADH e/ou EDTA sobre a redução do citocromo c em presença de eupafolina

Quando a eupafolina foi colocada em um meio reacional contendo tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4) na presença de EDTA, NADH e citocromo c, porém na ausência da preparação mitocondrial, verificou-se que ocorria uma

reação onde o produto final era o citocromo c reduzido já que esse era a molécula detectada no comprimento de onda utilizado (550 nm). As figura 12 e 13 mostram a dependência da presença do NADH para esta reação ocorrer, tendo em vista que a variação de absorbância era extremamente pequena na ausência deste fator.

A adição da enzima superóxido-dismutase (enzima responsável pela dismutação do radical superóxido) neste meio reacional provocou uma queda substancial ( $\cong 50\%$ ) na variação de absorbância demonstrando a presença e a participação do íon superóxido nesse processo (Figura 12). Pode-se, portanto sugerir a hipótese de que esse radical poderia estar reduzindo o citocromo c. Quando se adicionou a reação, catalase, enzima responsável pela transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, uma redução do  $\Delta A$  também foi observada ( $\cong 20\%$ ) demonstrando a geração dessa espécie reativa na reação entre eupafolina, NADH e citocromo c (Fig.12).

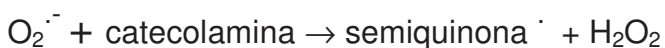
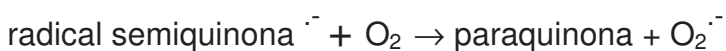
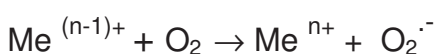
Redução importante ( $\cong 50\%$ ) relativa ao experimento utilizando-se somente eupafolina, NADH e citocromo c foi observada ao adicionar-se desferroxamina, indicando a importância desse metal para a catálise da reação (Figura 12). A desferroxamina é um quelante de alta afinidade, forma um complexo estável de coordenação octaédrica com o íon férrico e impede a redução deste íon (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Importante ressaltar que o tampão utilizado continha traços de contaminação por ferro em torno de 0,001 %. O ferro poderia estar envolvido na formação do íon superóxido no meio, que por sua vez induziria a oxidação da eupafolina, de forma semelhante ao que acontece com a 6-hidroxidopamina (BANDY & DAVISON, 1987). Estes resultados estão condizentes com os descritos por Bandy & Davison (1987)

que propuseram que a 6-hidroxi-dopamina, uma molécula que também possui anel catecol, poderia sofrer autooxidação catalisada por metal gerando radical superóxido, peróxido de hidrogênio e semiquinona da catecolamina através das reações descritas abaixo.

**Iniciação:**



**Propagação:**

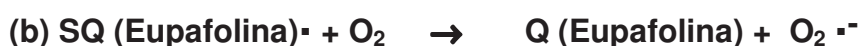


FONTE: BANDY & DAVISON, 1987.

Como se verificou a interferência da desferroxamina, um quelante de metais, na sequência foi avaliada a possibilidade de outro quelante como o EDTA interferir na reação. O EDTA pode formar complexos tanto com o  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso) quanto com o  $\text{Fe}^{3+}$  (férico). O complexo com  $\text{Fe}^{2+}$  tem uma estrutura hexadentada e um sétimo sítio de coordenação ocupado pela água, que é deslocado por ligantes como azida, peróxido de hidrogênio ou oxigênio. Quando isso ocorre, o íon quelado pode participar de reações redox. O EDTA também diminui o potencial de redução do ferro, de 0,77 a 0,12 V, explicando o porque acelera autooxidação de fortes doadores de elétrons (BANDY & DAVISON, 1987).

Quando se utilizou um tampão na ausência de EDTA como meio reacional (Figura 14) não foi observada nenhuma reação entre a eupafolina,

NADH e citocromo C comparando-se essa variação de absorvância com a obtida no meio com EDTA (Figura 14) indicando que a presença do complexo EDTA-Fe é fator importante para a reação, semelhante ao observado por Bandy & Davison (1987) com a 6 -hidroxidopamina. Desta forma podemos sugerir que neste meio reacional contendo tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4) com EDTA, eupafolina, NADH e citocromo c estariam ocorrendo as seguintes reações:



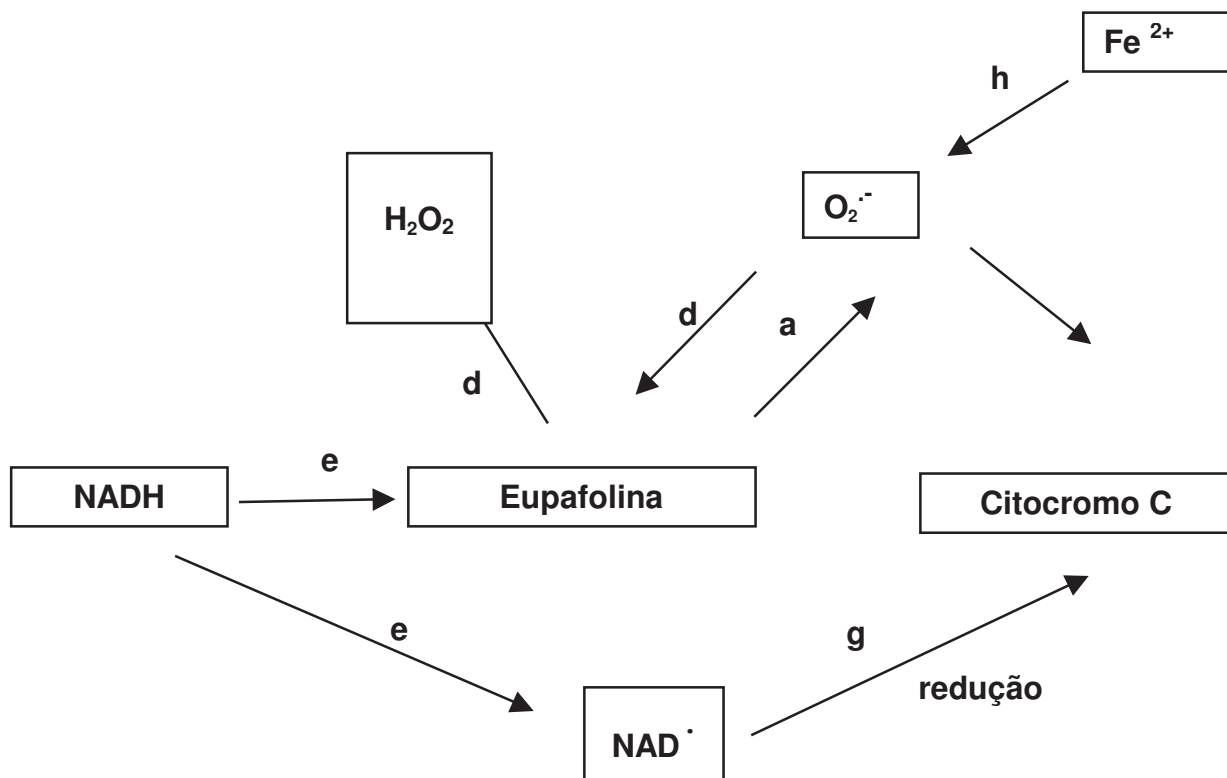
A eupafolina através de uma reação de autooxidação poderia estar gerando uma semiquinona e o radical superóxido (reação a) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A semiquinona formada poderia se oxidar novamente a quinona dando como produto radical superóxido (reação b) ou reagir com este radical oriundo da reação de autooxidação formando peróxido de hidrogênio

(reação c). Além disso, a eupafolina não-oxidada poderia estar reagindo diretamente com o radical superóxido gerando também sua semiquinona e peróxido de hidrogênio (reação d). Como na presença de NADH verifica-se um aumento da velocidade de redução do citocromo *c* quando comparado com o sistema sem NADH pode-se sugerir que o NADH adicionado ao meio reacional poderia estar sendo oxidado pela semiquinona da eupafolina, gerada durante sua autooxidação promovendo a formação do radical NAD<sup>•</sup>, eupafolina e próton (reação e), regenerando a eupafolina que por sua vez poderia ser novamente oxidada.

Portanto, a redução do citocromo *c* poderia ser decorrente de uma reação direta com o radical superóxido gerado pela oxidação da eupafolina (reação f) ou de reação com o radical NAD<sup>•</sup> (reação g), sendo que no primeiro caso teria como produto oxigênio e na segunda reação a espécie NAD<sup>+</sup>.

O ferro entraria nesse processo como catalisador através da formação de radical superóxido pela sua oxidação a Fe<sup>3+</sup> (reação h). Todas as reações acima descritas estão indicadas e sumarizadas na figura 11.

FIGURA 11: REAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA ENTRE EUPAFOLINA, NADH E CITOCROMO C

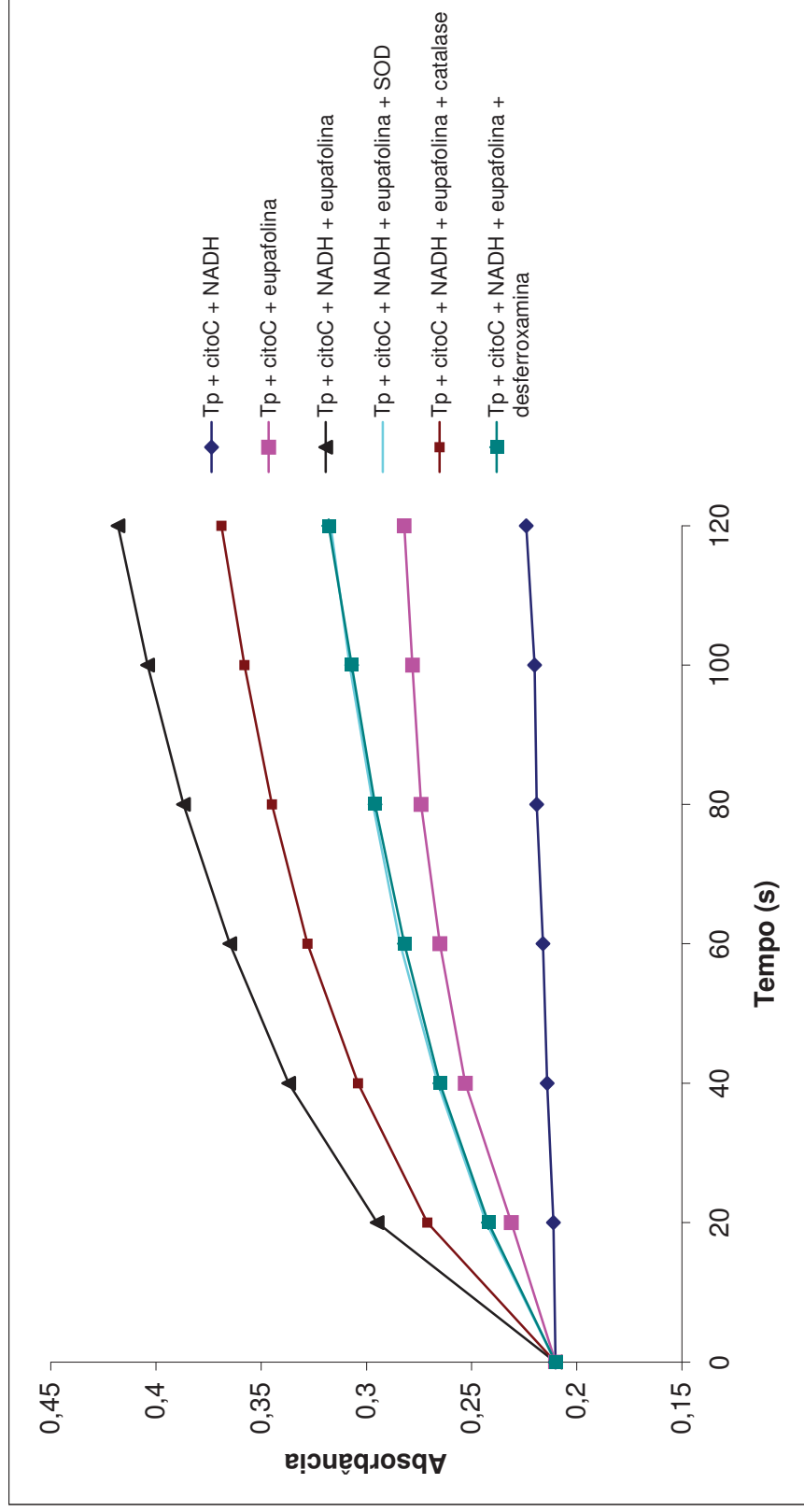


### 5.6.2. Avaliação do efeito da eupafolina sobre a redução do citocromo *c* em presença de cianeto

Os experimentos com cianeto demonstraram a presença de uma reação de caráter não-enzimático entre a eupafolina e o cianeto (Figura 15), assim como foi observado para outros flavonóides (HODNICK et al., 1994) e essa reação não seria dependente da presença de NADH. Desta forma poderíamos concluir que o cianeto poderia favorecer a autooxidação da eupafolina. A observação dessa reação torna-se importante para entender o papel de alguns glicosídeos cianogênicos nas plantas, que em presença de flavonóides,

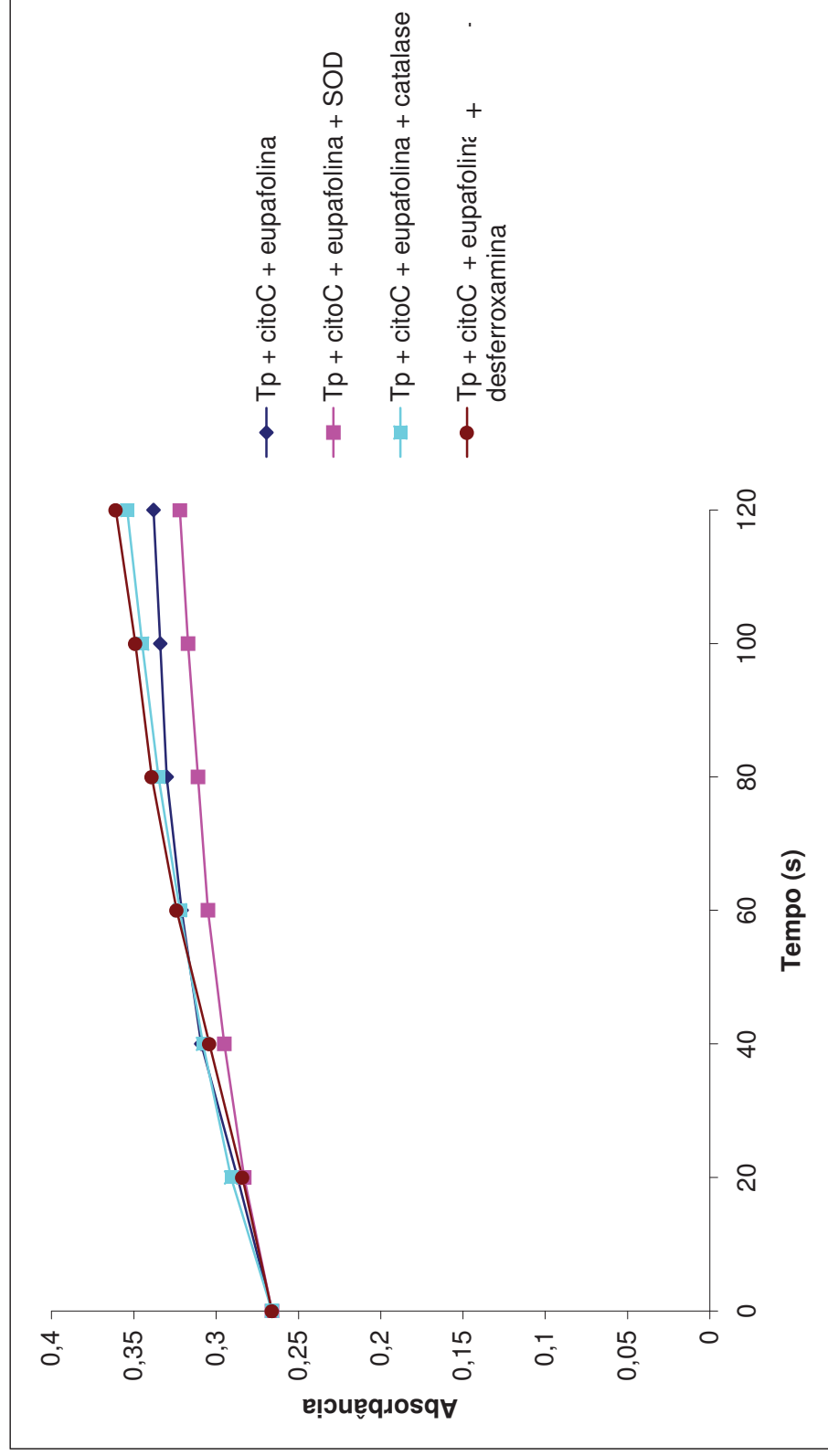
compostos largamente distribuídos na natureza, provocariam a autooxidação desses flavonóides gerando radicais livres que atuariam como um processo de defesa nas plantas contra insetos insensíveis ao cianeto (HODNICK et al., 1994).

FIGURA 12: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A REDUÇÃO DO CITOCROMO C EM PRESENÇA DE NADH E EDTA



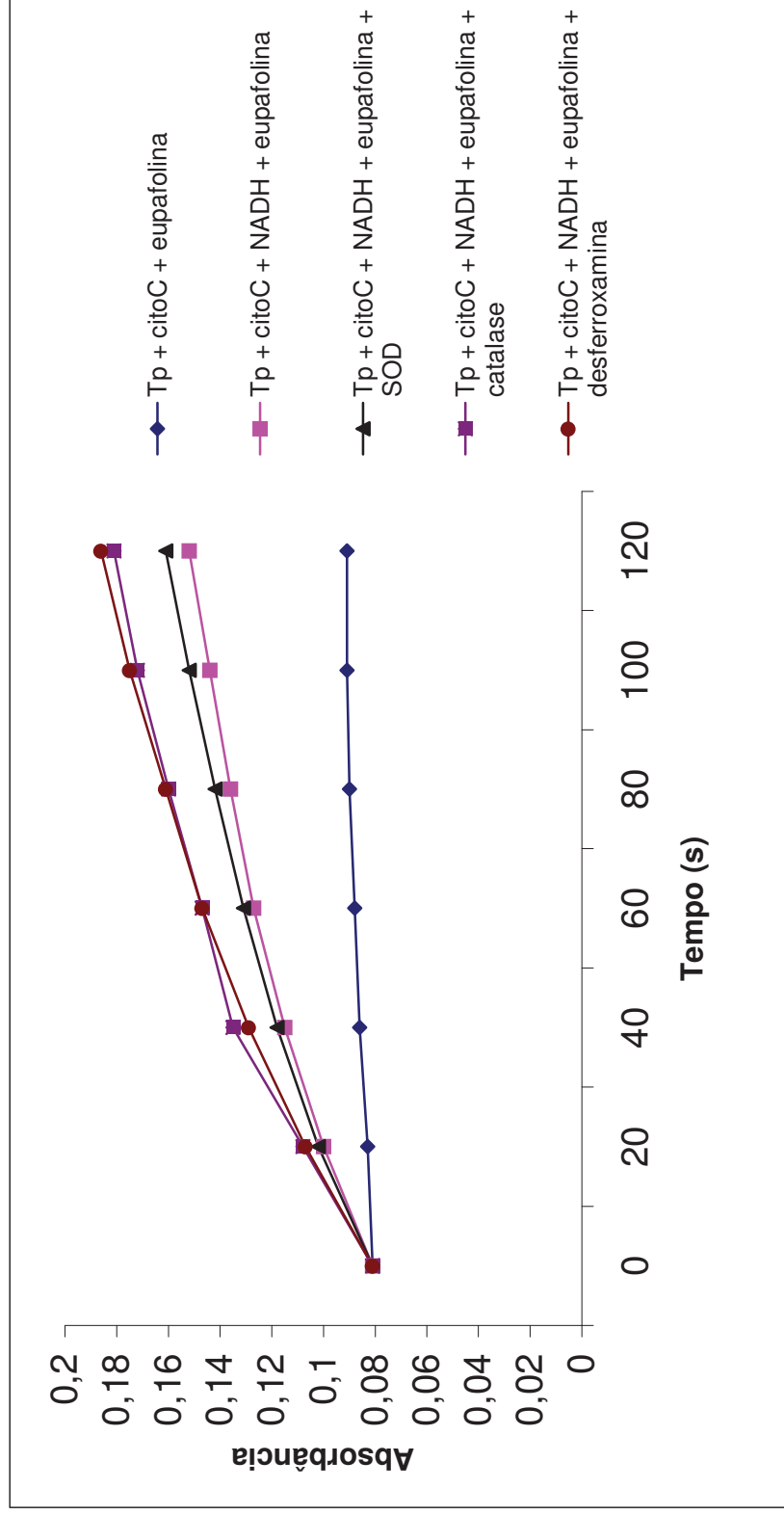
Meio de reação: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4 e EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup> suplementado com eupafolina 200 μmol.L<sup>-1</sup>, NADH 50 μmol.L<sup>-1</sup>, citocromo c 40 μmol.L<sup>-1</sup>, superóxido dismutase (SOD) 80U / mL, catalase 25 U e desferroxamina 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> conforme indicado. Todos os ensaios foram realizados espectrofotometricamente em 550 nm conforme procedimento descrito em materiais e métodos no item 4.11.

FIGURA 13: EFEITO DA ADIÇÃO DE EDTA SOBRE A REDUÇÃO DO CITOOCROMO C EM PRESENÇA DE EUPAFOLINA NA AUSÊNCIA DE NADH



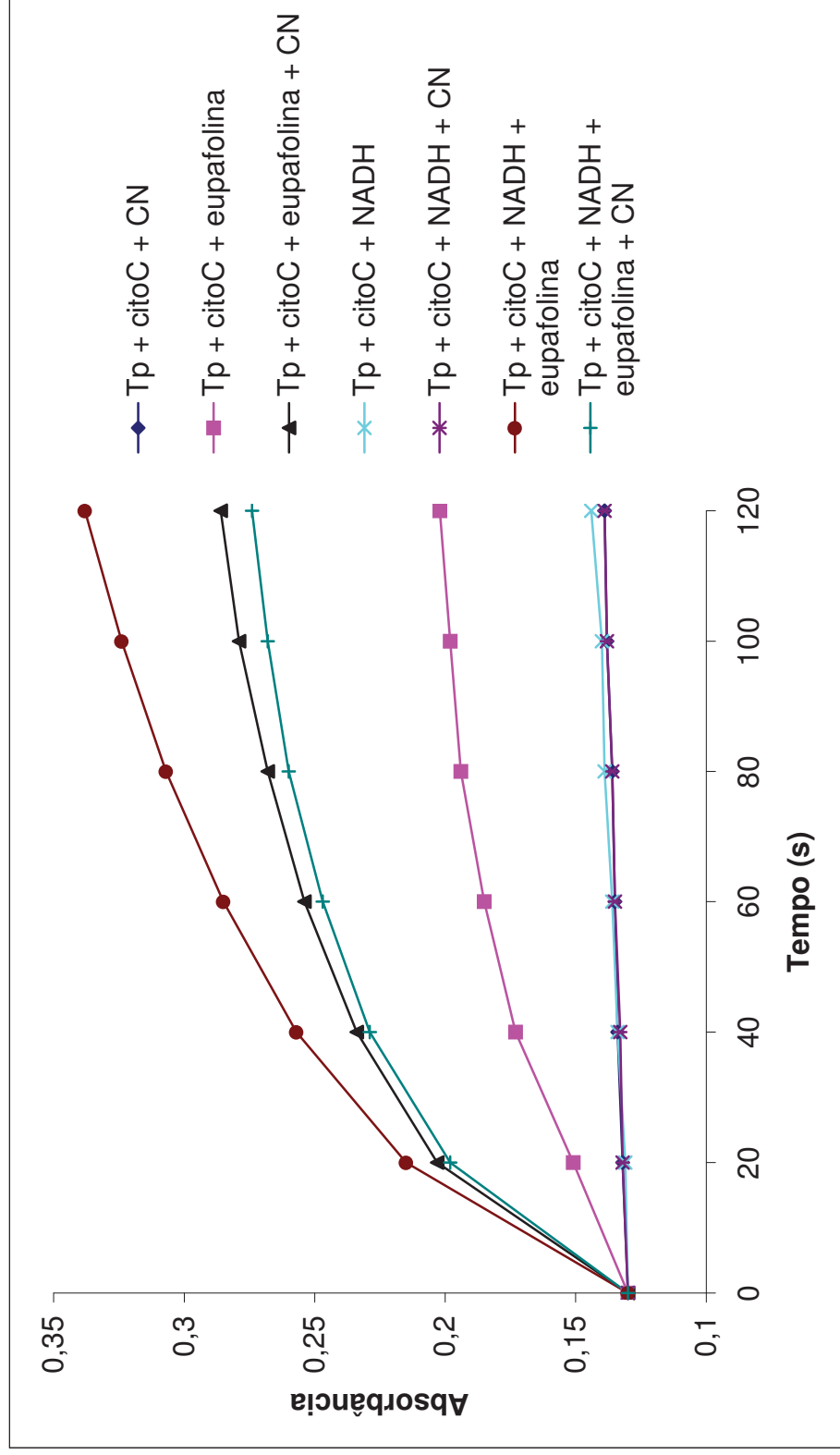
Meio de reação: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4 e EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup> suplementado com eupafolina 200 μmol.L<sup>-1</sup>, citocromo c 40 μmol.L<sup>-1</sup>, superóxido dismutase (SOD) 80U / mL, catalase 25 U e desferroxamina 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> conforme indicado. Todos os ensaios foram realizados espectrofotometricamente em 550 nm conforme procedimento descrito em materiais e métodos no item 4.1.1.

FIGURA 14: EFEITO DA ADIÇÃO DE EUPAFOLINA SOBRE A REDUÇÃO DO CITOCROMO *c* EM PRESENÇA DE NADH NA AUSÊNCIA DE EDTA



Meio de reação: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4 suplementado com eupafolina 200 μmol.L<sup>-1</sup>, NADH 50 μmol.L<sup>-1</sup>, citocromo *c* 40 μmol.L<sup>-1</sup>, superóxido dismutase (SOD) 80U / mL, catalase 25 U e desferroxamina 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> conforme indicado. Todos os ensaios foram realizados espectrofotometricamente em 550 nm conforme procedimento descrito em materiais e métodos no item 4.1.1.

FIGURA 15: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A REDUÇÃO DO CITOCROMO C EM PRESENÇA DE CIANETO



Meio de reação: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4 e EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup> suplementado com eupafolina 200 μmol.L<sup>-1</sup>, NADH 50 μmol.L<sup>-1</sup>, citocromo c 40 μmol.L<sup>-1</sup>, e cianeto 1mmol.L<sup>-1</sup> conforme indicado. Todos os ensaios foram realizados espectrofotometricamente em 550 nm conforme procedimento descrito em materiais e métodos no item 4.11.

## 5.7. EFEITO DA EUPAFOLINA E HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA UTILIZANDO O MTT

As propriedades antitumorais de diversos flavonóides já foram amplamente documentadas em diversos trabalhos (MORI et al., 1988); (MORIDANI et al., 2002); (KUPCHAN et al., 1969); (ABE et al., 2002), inclusive relacionando propriedades estruturais como hidrofobicidade e potencial redox com a toxicidade desses compostos (MORIDANI et al., 2002).

Trabalhos anteriores já haviam documentado a propriedade da eupafolina de inibir o crescimento de linhagens tumorais entre elas: MK-1 (adenocarcinoma gástrico humano), HeLa (carcinoma uterino humano), B16F10 (melanoma murino) (ABE et al., 2002). O objetivo dessa análise foi comparar os efeitos da eupafolina e hispidulina, duas flavonas cuja única diferença estrutural é a presença de uma hidroxila na posição 3' na eupafolina sobre a viabilidade celular da linhagem tumoral de carcinoma uterino humano.

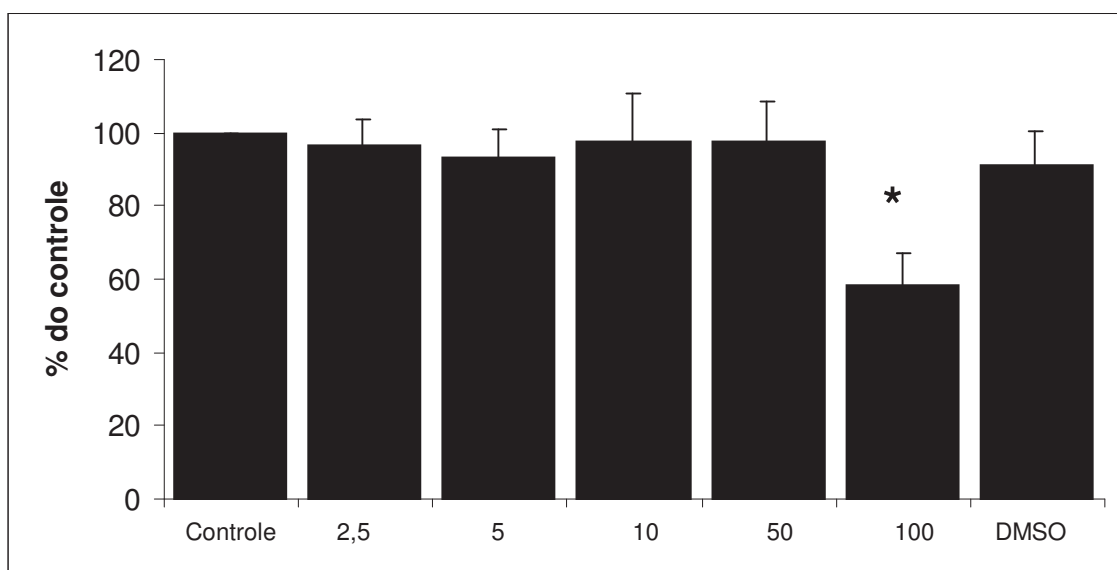
As duas flavonas testadas demonstraram comportamentos semelhantes. Tanto a eupafolina, quanto a hispidulina provocaram uma inibição de aproximadamente 40% na viabilidade celular de células HeLa na dose de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figuras 16 e 17). Nas demais doses testadas, não foram observados efeitos estatisticamente significativos. Uma curva com diversas concentrações de DMSO foi realizada e este solvente não demonstrou efeito significativo diferente do controle na concentração máxima utilizada que foi de 0,7% (v/v).

Portanto, como não houve diferença entre os resultados obtidos com as duas flavonas testadas, podemos inferir que nas doses testadas (2,5 - 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e no tempo de incubação utilizado (24h), o anel catecol presente na eupafolina não influenciou o efeito observado, contudo demonstra a

capacidade destas flavonas de diminuir a viabilidade celular de células tumorais.

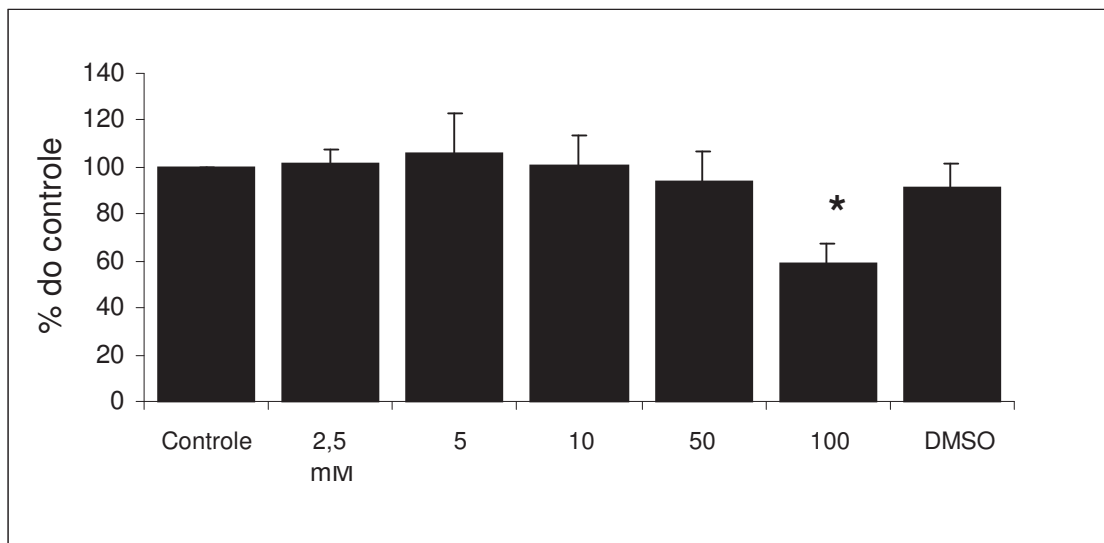
Entretanto, o teste do MTT é um experimento que avalia a atividade metabólica da célula e foi demonstrado que a eupafolina interfere em diversas propriedades mitocondriais, seria importante avaliar a viabilidade celular através de outros métodos, como a exclusão do corante azul de Trypan ou ainda, o experimento de liberação da lactato desidrogenase que avaliariam possíveis danos à membrana.

FIGURA 16: EFEITO DA EUPAFOLINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA UTILIZANDO O MTT



Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 4.10. em volume final de 200  $\mu\text{L}$  em meio MEM completo, no controle somente foi adicionado o meio MEM. A eupafolina foi incubada nas doses indicadas ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) por 24h a 37°C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,7% (v/v). \*Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ( $p < 0,05$ ).

FIGURA 17: EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA UTILIZANDO O MTT



Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 4.10., com volume final de 200  $\mu\text{L}$  em meio MEM completo, no controle somente foi adicionado o meio MEM. A eupafolina foi incubada nas doses indicadas ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) por 24h a 37° C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,7% (v/v). \*Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO FINAL

A eupafolina provoca uma intensa inibição da velocidade do consumo de oxigênio no estado III utilizando glutamato ou succinato como substratos oxidáveis. Esta inibição está relacionada com a atuação desse flavonóide sobre as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, assim como o demonstrado por Hodnick e cols (1994) com flavonóides contendo anel catecol, e este efeito está concentrado principalmente entre os complexos I e III.

Contudo não foi visualizado o efeito clássico desacoplador desse flavonóide como o demonstrado em trabalhos com outros flavonóides (MATHIESEN, et al; 1996) (RAVANEL, 1986). Porém, a eupafolina possui algumas propriedades características que são observadas com outros compostos, como o DDT, classificados como desacopladores inibidores (MORELAND, 1994):

- a) promove estímulo do estado IV em baixas doses (tabela 2);
- b) inibe o estado III em altas doses (tabela 1);
- c) inibe o “swelling” induzido por valinomicina (figura 9);
- d) seus efeitos concentram-se nas enzimas entre complexo I e III (tabela5).

Adicionalmente, estes compostos induzem a atividade da ATPase sensível a oligomicina, entretanto a flavona testada não demonstrou efeito significativo sobre a ATPase em mitocôndrias rompidas.

Além dos efeitos sobre as enzimas da cadeia respiratória, verificou-se de forma indireta, através dos experimentos de inchamento mitocondrial induzido por valinomicina, que a eupafolina pode afetar a fluidez da membrana mitocondrial o que poderia influenciar o funcionamento dos complexos

inseridos na membrana e ser responsável juntamente com as inibições enzimáticas, pelos efeitos observados sobre o consumo de oxigênio.

Através dos experimentos não-enzimáticos com componentes da cadeia respiratória como o NADH e citocromo *c* pôde-se observar que a eupafolina através de uma reação de auto-oxidação levou a formação de espécies reativas de oxigênio como o radical superóxido e peróxido de hidrogênio. Além disso, observou-se que o cianeto promoveu um estímulo da reação de auto-oxidação da eupafolina.

Sendo assim, uma das hipóteses que pode ser sugerida é que o efeito sobre a membrana mitocondrial seria decorrente da interação de componentes da membrana com espécies reativas de oxigênio formadas durante a oxidação da eupafolina através de reações não-enzimáticas.

No experimento de voltametria cíclica verificou-se que esta flavona pode sofrer oxidação em uma faixa potencial dentro dos valores encontrados na cadeia respiratória mitocondrial e este valor de potencial, aliado às inibições enzimáticas e inibição do inchamento induzido por valinomicina poderiam explicar os efeitos observados sobre o consumo de oxigênio. Considerando-se estes resultados não se pode descartar a possível interferência direta da eupafolina sobre o transporte de elétrons, especialmente nos complexos envolvendo citocromo *c*.

Comparando-se a eupafolina com a hispidulina, outra flavona com grandes semelhanças estruturais, podemos perceber que a eupafolina demonstra um efeito inibitório superior de aproximadamente 30% sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado III nas doses testadas, entretanto a hispidulina não demonstrou nenhum efeito significativo sobre a

membrana mitocondrial (BARBOSA, 2003). Os efeitos da hispidulina sobre a cadeia respiratória basicamente são decorrentes de inibições enzimáticas dos complexos (BARBOSA, 2003), já os efeitos da eupafolina além das inibições enzimáticas são produto de alterações na membrana mitocondrial. Além disso, a eupafolina possui a capacidade de sofrer autooxidação gerando EROS.

Nos experimentos de viabilidade celular pode-se constatar que as duas flavonas testadas são citotóxicas contra a linhagem de células Hela e esta citotoxicidade poderia pelo menos em parte ser explicada pelas alterações nos parâmetros respiratórios observadas para a hispidulina (ROCHA, 2000) e eupafolina.

## 7. CONCLUSÕES

- A eupafolina provocou uma inibição dose-dependente na velocidade respiratória do estado III com o glutamato e o succinato (tabela 1).
- Não se verificou efeito estatisticamente significativo sobre a velocidade respiratória no estado IV nas doses menores independentemente do substrato utilizado, mas para as doses de 75 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  houve estímulo com o succinato (tabela 2).
- A eupafolina provocou alteração na relação ADP/O em todas as doses testadas com o succinato, e com o glutamato nas doses de 50 a 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (tabela 3).
- A flavona provocou uma significativa redução no coeficiente de controle respiratório nas doses testadas para os dois substratos (tabela 4).
- A eupafolina provocou um efeito mais intenso sobre a inibição da velocidade respiratória no estado III quando comparada a hispidulina para os dois substratos oxidáveis usados e sobre as atividades enzimáticas da cadeia respiratória mitocondrial.
- As duas flavonas analisadas promoveram redução no coeficiente de controle respiratório, não afetaram a atividade da citocromo c oxidase e inibiram a succinato-oxidase.
- A eupafolina promoveu alteração significativa sobre a relação ADP/O com ambos os substratos, enquanto que a hispidulina, causou redução sobre essa relação somente nas doses de 150 e 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  com o succinato e o glutamato.

- O sítio de atuação da eupafolina na cadeia respiratória mitocondrial está localizado entre os Complexos I e III, assim como observado para hispidulina.
- A eupafolina interfere sobre a fluidez da membrana mitocondrial nas concentrações entre 50 – 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .
- Este flavonóide gera um pico anódico em + 0,28 V (Ag/AgCl) em uma reação irreversível, um potencial de redução de - 0,08 V (eletrodo padrão de hidrogênio).
- Tanto a eupafolina quanto a hispidulina, provocaram uma inibição de aproximadamente 40% na dose de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figuras 15 e 16) na viabilidade celular de células HeLa, indicando que a presença do anel catecol na eupafolina nessas condições experimentais não interferiu nos resultados nessas condições experimentais.
- A reação de redução do citocromo *c* induzida pela eupafolina é afetada pela presença do NADH e do complexo EDTA-Fe e essa reação gera espécies reativas de oxigênio como radical superóxido e peróxido de hidrogênio.
- O cianeto favorece a autooxidação da eupafolina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. Antiproliferative Constituents in Plants 9. Aerial Parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. **Biol. Pharm. Bull** v. 25, n.7, pp.920-922, 2002.

ARORA A.; NAIR M. G.; STRASBURG G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a serie of flavonoids in a liposomal system. **Free Radicals in Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

BANDY, B.; DAVISON A. J. Interaction between metals, ligands and oxygen in the autooxidation of 6 hydroxi-dopamine: Mechanisms by wich metal chelation enhances inhibition by superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**., Orlando, v. 259, n. 2, p. 305-315, 1987.

BARBOSA, P. D. **Mecanismo de Ação da Hispidulina sobre o Metabolismo Energético Mitocondrial e Análise Comparativa das Propriedades Antioxidantes da Hispidulina e Eupafolina**. Curitiba, 2003. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BISNACK R.; BOERSMA B. J.; PATEL R. P.; KIRK M.; WHITE C. R.; DARLEY-USMAR V.; BARNES S.; ZHOU F.; PARKS D. A. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 25, n. 6, p. 434-443, 2001.

BRAVO, L. Poliphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.

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

CANIGUERAL S.; IGLESIAS J.; HAMBURGER M.; HOSTETMANN K. Phenolic constituents of *Salvia lavandulifolia*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 55, n. 1, p. 92, 1989.

CARPENEDO, F. BORTIGNON, C. BRUNI, A., SANTI, R. Effect of Quercetin on Membrane-Linked Activities. **Biochemical Pharmacology**. V. 8, pp. 1495 – 1500, 1969.

CHANCE B. & HOLLINGER, G. Effects of amytal, thiopental, rotenone, progesterone and methylene glycol **J. Biol. Chem.**, v. 278, n.1, 1963.

CHANCE B. & WILLIAMS G.R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, v. 217, n. 1, p. 383-393, 1955.

COLEMAN, P. C.; POTGIETER, D. J. J.; VAN ASWEGEN, C. H.; VERMEULEN, N. M. J. Flavonoids of Geigeria. **Phytochemistry**. V. 23, n. 5, pp. 1202 –1203, 1984.

COTELLE N.; BERNIER J. L.; HENICHART J. P.; CATTEAU J. P.; GAYDOU E.; WALLET J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 211-219, 1992.

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

DUARTE, J.; PEREZ-PALENCIA, R.; VARGAS, F.; OCETE, M. A.; PEREZ-VISCAIO, F.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 1, p. 117-124, 2001.

ERNSTER, L.; DALLNER, G.; FELICE, G.A. Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. **Journal Biological Chemistry**, v. 238, n.3, 1963

ESTABROOK R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. **Meth. Enzymol.**, v. 10, p. 41-47, 1967

FERRALI M.; SIGNORINI B.; CACIOTTI B.; SUGHERINI L.; CICCOLI L.; GIACHETTI D.; COMPORTI M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, n. 416, p. 123-129, 1997.

FREHSE, F. L. **Flavonóides de *Eupatorium littorale* Cabrera e biotransformação de (±) flavonona pela *Gibberella fujikuroi***. Curitiba, 1999. Tese (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

GEE, J.M.; DUPONT, M.S.; RHODES, M.J.C.; JOHNSON, I.T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 25, n. 1, pp. 19-25, 1998.

HANSAUL, A.C. **Efeitos do extrato bruto metanólico e da mistura hispidulina:eupafolina (1:1) de *Eupatorium litorale* Cabrera sobre SNC e musculatura esquelética e lisa não vascular**. Curitiba, 2002. Tese (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HARBORNE, J.B. **Comparative Biochemistry of the Flavonoids**. Academic Press; London and New York, 1967.

HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radical Biology & Medicine**, 3. ed., Ed. Oxford University Press, New York, 1999.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**. V. 32, n.7, pp. 1141-1148, 1983.

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

HODNICK W.F.; KUNG F.S.; ROETTGER W.J.; CRAIG W.B. & PARDINI R.S. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n.14, p. 2345-2357, 1986.

HODNICK W.F.; BOHMONT C.W.; CAPPS C. & PARDINI R.S. Inhibition of the mitochondrial NADH-oxidase (NADH-coenzyme Q oxido-reductase) enzyme system by flavonoids: a structure-activity study. **Biochemical Pharmacology**. v. 36, n. 17, p. 2873-2874, 1987.

HODNICK W.F.; MILOSAVLJEVIC, E.B.; NELSON J. H.; PARDINI R.S. Eletrochemistry of flavonoids - Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2607-2611, 1988.

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**, v. 47, n.3, p. 573-580, 1994.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n.9, pp. 2489 – 2491, 1987.

IMLAY, J.; FRIDOVICH, I. Exogenous quinones directly inhibit the respiratory NADH Dehydrogenase in *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 296, n. 1, pp. 337-346, 1992.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 30, n. 4, pp. 433-446, 2001.

JOYEUX, M.; LOBSTEIN A.; ANTON R.; MORTIER F. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, p. 126-129, 1995.

KAN HE, G. M.; HOFFMANN, J. J.; TIMMERMANN, B. N. Diterpenoids from *Baccharis Linearis*. **Phytochemistry**, Vol. 41, No. 4, pp. 1123-1127, 1996

KANDASWAMI C. & MIDDLETON E. Free Radical Scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. **Free Radicals in Diagnostic Medicine**. Ed. D. Armstrong, Plenum Press, New York, 1994.

KANTROW, S. P.; TATRO, L.G.; PIANTADOSI. Oxidative Stress and adenine nucleotide control of mitochondrial permeability transition. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 2, pp. 251-260, 2000.

KIM, S. R.; PARK, M. J.; LEE, M. K.; SUNG, S. H.; PARK, E. J.; KIM, J.; KIM, S. Y.; OH, T.H.; MARKELONIS, G. J.; KIM, Y. C. Flavonoids of *Inula Britannica* Protect Cultured Cortical Cells from Necrotic Cell Death Induced by Glutamate. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 32, n. 7, pp. 596- 604, 2002.

KOWALTOWSKI, A. J. ; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 26, n.3/4, pp. 463-471, 1999.

KUHNAU J. **World Ver. Nutr. Diet**, n. 24, p. 117-191, 1976.

KUPCHAN S.M.; SIGEL C.W.; HEMINGWAY R.J.; KNOX J.R. & UDAYAMURTHY M.S. Citotoxic flavones from *Eupatorium* species. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 25, n.8, p 1603-1615, 1969.

LEE-SANG-JUN; CHUNG-HA-YULL; MAIER, C.G.A.; WOOD, A.R.; DIXON, R. A.; MABRY, T. J. Estrogenic flavonoids from *Artemisia vulgaris* L. **Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry**. Vol. 46 (8) p. 3325-3329, 1998.

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.

MARCANO, D.; MASAHISSA, H. **Fitoquímica organica**. Caracas: Universidad Central de Venezuela, p. 81, 1991.

MARKHAM, K.R. **Techniques of Flavonoid Identification**. Londres: Academic Press, 113p, 1982.

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. Uncoupling of respiration and inhibition of ATP synthesis in mitochondria by C-methylated flavonoids from *Myrica gale* L.. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 373-379, 1996.

MERFORT, I. Acetylated And Other Flavonoid Glycosides From Arnica Chamissonis. **Phytochemistry**. Vol. 27, No. 10, pp. 3281 3284, 1988.

MIDDLETON E. The flavonoids. **Trends in Pharmaceutical Sciences (TIPS)**, Kidlington, aug, p. 335-338, 1984.

MONTESINOS, M. C.; UBEDA, A.; TERCENIO, M. C.; PAYA, M.; ALCARAZ, M. J. Antioxidant profile of Mono and dihydroxylated Flavone Derivatives in Free Radical Generating Systems. **Zeitschrift für Naturforschung C Biosciences**, v.50, n. 7/8 p.552-560, 1995.

MORELAND, D. E. Effects of toxicants on oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **In: Introduction to Biochemical Toxicology**, 2. Ed, Appleton & Langecity – New York, 1994.

MORENO, A.J.M. & MADEIRA, V.M.C. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam., v.1015, p361-367, 1990.

MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. Cytotoxicity of plant flavonoidss against Hela cells **Phytochemistry**, v.27, p 1017-1020, 1988.

MORIDANI, M.Y.; GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Comparative quantitative structure toxicity relationshipss for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and Hela tumor cells **Chemico-Biological Interactions**, v.139, p 251-264, 2002.

MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K.; PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. **Biochemical Biophysical Research Communications**, Orlando, v.24, p.381-385, 1966.

NAGAO, T.; ABE, F.; KINJO, J.; OKABE, H. Antiproliferative Constituents in Plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and Consideration of Structure – Activity Relationship. **Biol. Pharm. Bull** v. 25, n.7, pp.875-879, 2002.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON S. J. **Bioenergetics 2** San Diego: Academic Press, 1992, 254 p.

OLIVEIRA B. H.; NAKASHIMA T.; FILHO J. D. S.; FREHSE, F. L. HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium litoralle*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 243-246, 2001.

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 Chemistry**, Bethesda, v. 235, n. 11, p. 3322-3329, 1960.

PUPPO, A. Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions; influence of the iron chelator. **Phytochemistry**. V. 31, n.1, pp. 85-88, 1992.

RAVANEL, P. Uncoupling activity of a series of flavones and flavonols on isolated plant mitochondria. **Phytochemistry**. V.25, n. 5, pp. 1015-1020, 1986.

REILLY, M. L. Comparison of the *In Vitro* Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, 1998.

ROCHA, A. M. **Efeitos da hispidulina sobre parâmetros respiratórios mitocondriais utilizando glutamato e succinato como substratos oxidáveis**. Curitiba, 2000. – Comunicação pessoal do autor.

SALA, A.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MANEZ, S.; RIOS, J. L. Anti-Phospholipase  $A_2$  , and Anti-Inflammatory Activity of Santolina Chamaecyparissus. **Life Sciences**. V. 66, n. 2, pp. PL 35-40, 2000.

SANTOS A.C.; UYEMURA S.A.; LOPES J.L.C.; BAZON J.N.; MINGATTO F.E. & CURTI C. 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.

SANZ, M. J.; FERRANDIZ, M. L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M. C.; BUSTOS, G.; GIL, B.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**. V. 24, n. 7, pp. 689-699, 1994.

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

SOICKE H., LENG P. E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, Stuttgart, , v. 53, n. 1, p. 37-39, 1987.

SOMLO M. Induction des lactico-cytocromo c reductases (D – ET L -) de la levure aerobie par les lactates (D – ET L -). **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v. 97, p. 183-201, 1965.

SUMNER, J.B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, Washington, v.100, p. 413-414, 1944.

TOREL, J; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of Flavonoids and Reactivity with peroxi radical. **Phytochemistry**. V. 25, n. 2, pp. 383-385, 1986.

UEDA, S.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, H.; SSASADA, T.; TAKABAYASHI, A.; YAMAOKA, Y.; YODOI, J. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Molecular Immunology**. V. 38, pp. 781-791, 2001.

ULUBELEN, A.; TIMMERMANN, B. N.; MABRY, T. J. Flavonoids from *Brickellia Chlorolepis* and *B. Dentata*. **Phytochemistry**, Vol. 19, pp. 905-908, 1980.

VAN ACKER, S.A.B.E.; BERG, D.J. ; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; BENNEKOM, W.P.; VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant

activity of flavonoids. **Free Radical Biology e Medicine**, New York, v. 20, n.3, p. 331-342, 1996.

VAN DIJK, C.; DRIESSEN, A.J.M.; RE COURT, K. The Uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1593-1600, 2000.

VERSTRAETEN, S.V.; KEEN, C.L.; SCMITZ, H.H.; FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. **Free Radical Biology e 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. **Biochem. Biophys. Res. Commol.**, v.4, n.1, p. 48-51, 1961.

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**, Vol. 20, No. 6, pp. 1389-1395, 1981.

YONG-LONG LIU; T. J. MABRY Flavonoids from *Artemisia Ludoviciana* Var. *Ludoviczana*. **Phytochemistry**. v. 21, n. 1, p. 209-214, 1982.

YUTING C.; RONGLIANG Z.; ZHONG JIAN J. & YONG J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 9, p. 19-21, 1990.

WOLLENWEBER E.; DIETZ V.H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 20, n. 5, p. 869, 1982.

ZHOU, Y. C.; ZHENG, R. L. Phenolic Compounds and na analog as supeorxide anion scavengers and antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 6, pp. 1177-1179, 1991.