

ANA MARIA KELMER BRACHT

EFEITO DE PRODUTOS DA *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni SOBRE  
MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

Tese de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica da Uni-  
versidade Federal do Paraná

Curitiba  
1981

Tese orientada por:  
Dra. Glaci Therezinha Zancan e  
Dr. Adelar Bracht

DEDICATÓRIA

Dedico êste trabalho aos meus filhos, Fabiano e Livia.

Í N D I C E

1.	Introdução .....	1
1.1	Histórico e caracterização da <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni .....	1
1.2	O princípio doce da <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni (steviosídeo) e seus derivados .....	2
1.3	Efeitos fisiológicos observados .....	7
1.4	Objetivos deste trabalho .....	9
2.	Materiais e Métodos .....	10
2.1	Materiais .....	10
2.1.1	Produtos da <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni — Testes do grau de pureza .....	10
2.1.2	Enzimas, coenzimas e outros materiais .....	14
2.2	Métodos .....	14
2.2.1	Isolamento de mitocôndrias para medidas de respiração e atividade ATP-ásica .....	14
2.2.2	Isolamento de mitocôndrias para medidas de <i>swelling</i> e de efluxo de prótons .....	15
2.2.3	Obtenção de mitocôndrias rompidas para testes enzimáticos ...	15
2.2.4	Medidas do consumo de oxigênio .....	15
2.2.5	Medidas do <i>swelling</i> mitocondrial .....	16
2.2.6	Medidas do efluxo de prótons em mitocôndrias intatas .....	16
2.2.7	Determinação da atividade ATP-ásica .....	17
2.2.8	Determinações polarográficas de atividades enzimáticas .....	18
2.2.9	Determinações espectrofotométricas de atividades enzimáticas ligadas à cadeia respiratória .....	19
2.2.10	Determinação espectrofotométrica de enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e outras desidrogenases .....	20
2.2.11	Dosagem potenciométrica da hexoquinase .....	22
2.2.12	Determinação quantitativa do steviosídeo .....	22
2.2.13	Dosagem de proteínas .....	22
2.2.14	Avaliação gráfica das estimativas preliminares dos parâmetros cinéticos da NADH-oxidase .....	24
2.2.15	Tratamento estatístico dos dados .....	26
3.	Resultados e discussão .....	27

3.1	Efeito sobre a respiração de mitocôndrias intatas, isoladas de fígado de rato .....	27
3.1.1	Efeito do isosteviol .....	27
3.1.2	Efeito do steviolbiosídeo .....	30
3.1.3	Efeito do steviosídeo .....	34
3.2	Efeito sobre a ativação da respiração induzida pelo ADP — fosforilação oxidativa .....	36
3.3	Efeito sobre a atividade ATP-ásica .....	39
3.3.1	Efeito do atractilato — caracterização dos sistemas utilizados .....	42
3.3.2	Efeito do steviosídeo e do extrato aquoso total da planta ....	44
3.3.3	Efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo .....	46
3.4	Efeito sobre o gradiente protônico induzido pelo succinato ...	47
3.5	Efeito sobre o <i>swelling</i> mitocondrial .....	52
3.5.1	Efeito sobre o <i>swelling</i> induzido por L-glutamato .....	54
3.5.2	Efeito sobre o <i>swelling</i> dependente do succinato .....	56
3.5.3	Efeito sobre o <i>swelling</i> induzido por TMPD + ascorbato .....	58
3.5.4	Efeito sobre o <i>swelling</i> induzido pelo ATP .....	60
3.6	Efeito sobre atividades enzimáticas .....	60
3.6.1	Atividades enzimáticas ligadas à cadeia respiratória .....	62
3.6.2	Efeito sobre enzimas solúveis da matriz mitocondrial e outras .....	67
3.7	Estudo cinético da inibição da NADH-oxidase .....	69
3.7.1	Dependência da concentração dos inibidores .....	69
3.7.2	Efeito do extrato aquoso total .....	72
3.7.3	Efeito sobre a curva de saturação do NADH .....	74
3.8	Estudo cinético do efeito sobre a L-glutamato desidrogenase ..	84
4.	Conclusões e discussão final .....	87
	<i>Efeito sobre a respiração acoplada e desacoplada .....</i>	87
	<i>Evidências a favor da existência de um efeito desacoplante ...</i>	88
	<i>Os efeitos independentes sobre a NADH-oxidase e sobre a succinato-oxidase .....</i>	89
	<i>O efeito sobre a L-glutamato desidrogenase .....</i>	90
	<i>O efeito sobre a fosforilação oxidativa e a atividade ATP-ásica .....</i>	91
	<i>Relação entre a estrutura e o efeito dos compostos testados ..</i>	92
	<i>Possíveis consequências fisiológicas decorrentes da ingestão do steviosídeo e do extrato aquoso total da planta (chá) .....</i>	93
	<i>Possibilidades para investigações futuras .....</i>	95

5.	Resumo .....	96
6.	Bibliografia .....	97
	Agradecimentos .....	103

LISTA DOS PRINCIPAIS SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<i>Símbolo ou abreviatura</i>	<i>Aparece pela primeira vez na página</i>	<i>Significado</i>
A	23	concentração de substrato
ADP	14	adenosina 5'-difosfato
ATP	14	adenosina 5'-trifosfato
ATP-ase	17	adenosina 5'-trifosfatase
DNP	17	2,4-dinitrofenol
EDTA	14	etilenodiamino tetraacetato
$\epsilon$	69	coeficiente de extinção molar
K, K'	23	constantes de Michaelis
K <sub>i</sub>	82	constante de inibição
$\lambda$	13	comprimento de onda
NAD <sup>+</sup>	18	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADP <sup>+</sup>	20	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADH	14	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADPH	20	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
P <sub>i</sub>	17	fosfato inorgânico
r	26	coeficiente de correlação
$\sigma$	26	erro padrão da estimativa
TMPD	18	N,N,N',N'-tetrametil p-fenileno diamina
TRIS	14	tris(hidroximetil)-aminometano
v	23	velocidade de reação

<i>Símbolo ou abreviatura</i>	<i>Aparece pela primeira vez na página</i>	<i>Significado</i>
V, V'	23	velocidades máximas de reação
y	23	intersecção ao eixo dos $v^{-1}$ na representação gráfica de $v^{-1}$ contra $A^{-1}$
x	23	intersecção ao eixo dos $A/v$ na representação gráfica de $A/v$ contra $A$

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico e caracterização da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é um arbusto nativo do Paraguai e do sul do Mato Grosso (1,2). A espécie foi descrita pela primeira vez pelo botânico paraguaio Bertoni, em artigo publicado em 1899 (3). Neste artigo, Bertoni denominou a planta *Eupatorium rebaudianum*, pertencente à família das compostas. Estudos posteriores revelaram que a planta não pertence ao gênero *Eupatorium* e sim ao gênero *Stevia*. Foi o próprio Bertoni quem — após estudos comparativos com outras espécies do gênero *Stevia* — designou a planta como *Stevia rebaudiana* (4). Esta denominação tem sido aceita pelos demais botânicos que a descreveram.

Dada a importância que a espécie acima mencionada adquiriu, o nome "stevia" tem sido usado na linguagem falada principalmente, mas também na linguagem escrita, como designativo da *Stevia rebaudiana*. A sua primeira designação, no entanto, foi dada pelos Índios do Paraguai, os quais chamavam-na de *kaã-hê-ê* (1-3), o que significa "erva-doce". É precisamente esta sua qualidade, a de ter sabor doce, que a faz tão conhecida e também motivo e objeto do interesse de tantos investigadores. A própria designação dada pelos Índios já demonstra que os mesmos conheciam as suas propriedades edulcorantes. Na realidade, sabe-se que os mesmos já utilizavam extratos aquosos das folhas desta planta ou as próprias folhas para adoçar, havendo também algum consenso sobre as suas propriedades medicinais (1).

Tentativas de cultivo da planta tem sido feitas desde há vários decênios, seja no Paraguai (5), seja em outras partes do mundo. Tentativas em climas frios, redundaram em fracasso (6). Atualmente, realizam-se cultivos em diversas regiões do Brasil, do Paraguai e também do Japão, país no qual a planta foi introduzida em 1973 por Sumida (7), o qual obteve sementes em São Paulo. A introdução da planta no Japão coincide também com o início da produção comercial em larga escala, com vistas à industrialização do princípio doce, tido como substituto em potencial da sacarina, sacarose e de-

mais adoçantes (8).

No Brasil e no Paraguai podem ser obtidas folhas secas nas farmácias para o preparo de chá, o qual vem sendo consumido regularmente já há algum tempo. No Paraguai existe à venda um extrato em pó solúvel das folhas (*el dulce té del Paraguay* (9)). A industrialização da planta no Brasil aguarda melhoramentos na tecnologia de extração do princípio doce, bem como das técnicas de cultivo.

### 1.2 O princípio doce da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (steviosídeo) e seus derivados

As primeiras tentativas de isolamento do princípio doce da *Stevia rebaudiana* foram feitas na mesma época dos primeiros estudos botânicos. O químico paraguaio Rebaudi — em honra do qual Bertoni denominou a planta — obteve em 1900 um produto não cristalizado (10). A primeira cristalização foi conseguida em 1908 por Rasenack (11), o qual também procedeu a uma análise elementar, além de ter analisado os produtos da hidrólise ácida.

Após êstes e vários outros trabalhos pioneiros — os quais são de interesse meramente histórico — são importantes os trabalhos de Bridel e Lavieille, publicados em 1931 (12-15). Estes autores utilizaram pela primeira vez a denominação steviosídeo para o princípio doce, baseando-se para tal, nas decisões da União Internacional de Química de 1924. O steviosídeo por êles cristalizado era 300 vezes mais doce do que a sacarose. Bridel e Lavieille puderam demonstrar também que a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática davam origem a produtos diferentes. Com efeito, a hidrólise com o suco digestivo do caracol (*Helix pomatia*) produziu, além de 3 mols de glucose por mol de steviosídeo, um composto não glicídico, por êles denominado de steviol. Já a hidrólise ácida, além dos 3 mols de glucose, produziu um composto de natureza não-glicídica, semelhante ao steviol, o qual foi denominado isosteviol. Com base nos seus estudos, Bridel e Lavieille puderam propor que o steviosídeo é um glicosídeo formado por três moléculas de glucose, mais uma aglucona, no caso o steviol (12).

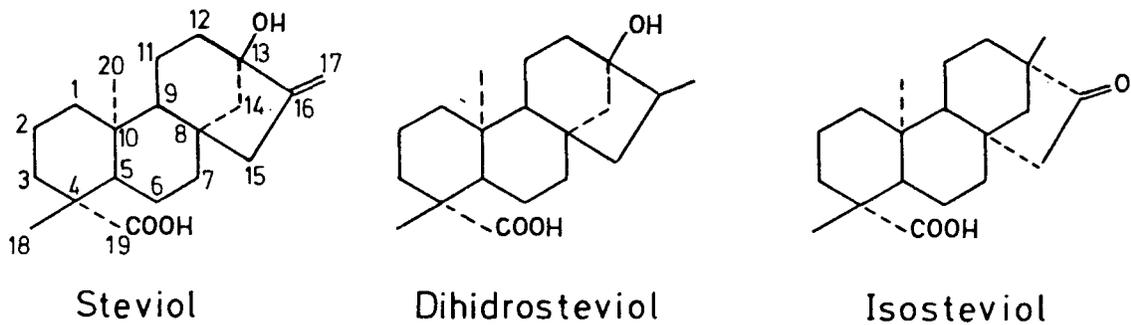


Figura 1. Estrutura química do steviol (19), do dihidrosteviol (18) e do isosteviol (19).

A determinação da estrutura do steviol e dos tipos de ligação através das quais as três moléculas de glucose estão envolvidas, foram objeto de uma série de trabalhos (16-20). A estrutura e a configuração da aglucona (steviol e isosteviol) foi estabelecida por Dolder *et al.* (16) e por Mosettig & Nes (18,19). A figura 1, mostra a fórmula estrutural do steviol bem como a do isosteviol, ao lado da fórmula de um derivado, o dihidrosteviol (22). Observa-se que, em relação ao steviol, o dihidrosteviol é o produto da hidrogenação da dupla ligação entre os carbonos 16 e 17 e o isosteviol é o produto do rearranjo molecular nos carbonos 13 e 16. Estas três moléculas são consideradas como derivados do ácido caurenóico, recebendo os nomes de ácido *ent*-13-hidroxicaur-16-en-19-oico, *ent*-13-hidroxicaure-19-oico e *ent*-16-oxobeieran-19-oico, respectivamente (75,76).

Os tipos de ligação e as respectivas configurações do steviosídeo, por outro lado, foram estabelecidos pelos trabalhos de Wood *et al.* (17), Vis & Fletcher Jr. (20), Wood Jr. & Fletcher Jr. (21) e também de Mosettig *et al.* (19). A estrutura do steviosídeo está representada na figura 3. Como se pode verificar, uma das moléculas de glucose está ligada (por ligação éster) à carboxila da aglucona. As duas moléculas restantes estão unidas entre si

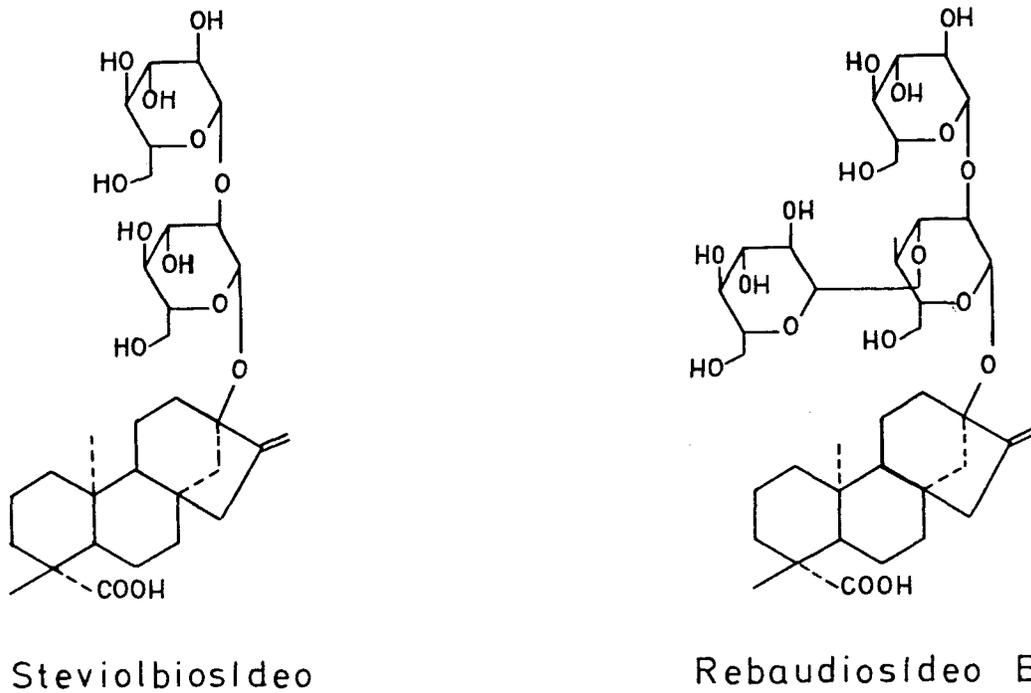


Figura 2. Fórmulas estruturais do steviolbiosídeo e do rebaudiosídeo B (19).

por ligação  $\beta(1\rightarrow2)$  — sofrorose —, e ligadas à hidroxila da aglucona por ligação glicosídica.

O teor em steviosídeo das folhas secas da planta é bastante alto ( $\approx 5\%$ ), sendo que a aglucona não possui sabor doce (1). O steviosídeo tem sido pois considerado como sendo o princípio doce fundamental da *Stevia rebaudiana*, devido também em parte à relativa facilidade com que pode ser extraído e cristalizado. Não obstante, não se pode deixar de notar, que a planta encerra, ao lado do steviosídeo, uma série de glicosídeos derivados, os quais podem ou não apresentar sabor doce.

Um dos derivados do steviosídeo é o steviolbiosídeo, o qual existe em proporções apenas mínimas (23,24). A estrutura deste composto pode ser vista na figura 2. O mesmo não possui sabor doce muito acentuado e pode ser obtido em grande quantidade através de uma hidrólise alcalina do steviosí-

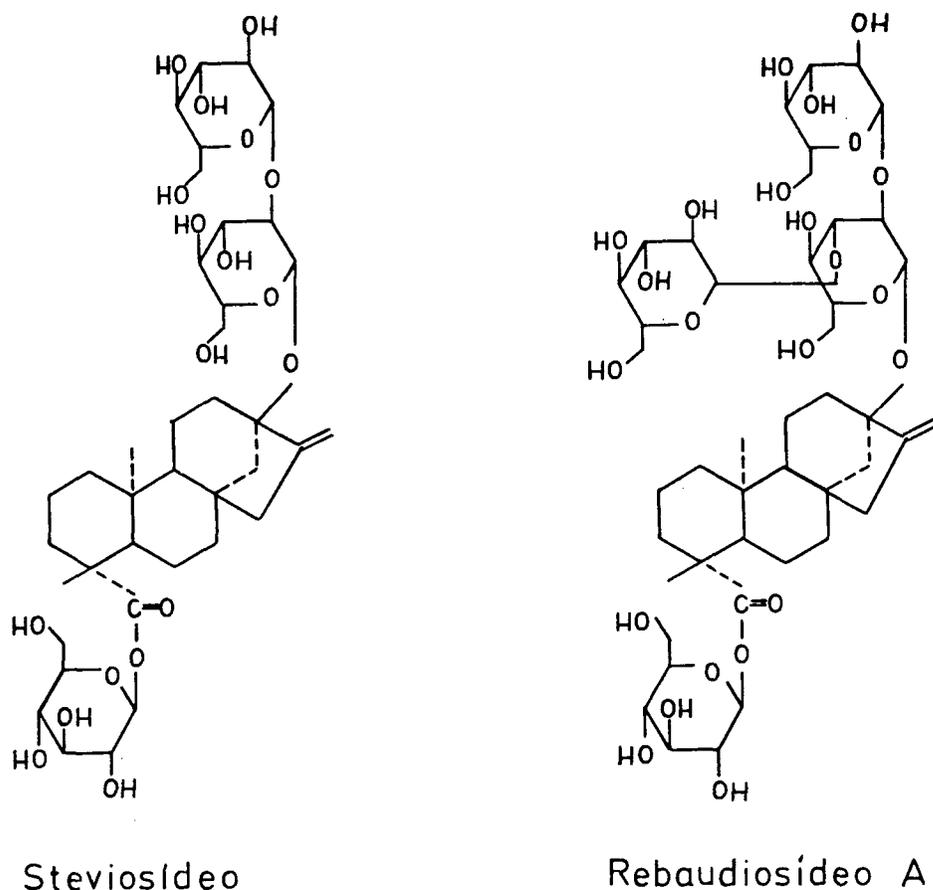


Figura 3. Estrutura do steviosídeo e do rebaudiosídeo A (19).

deo. Em meio alcalino o steviosídeo perde a glucose ligada através da ligação éster, num processo de saponificação (23,24).

Kohda *et al.* foram os primeiros a descrever a existência dos rebaudiosídeos A e B (23). O rebaudiosídeo A tem sabor doce e a sua estrutura é semelhante à do steviosídeo, possuindo porém uma molécula de glucose a mais (ver figura 3). O rebaudiosídeo B, por outro lado, é semelhante ao steviolbiosídeo, isto é, também não possui molécula de glucose esterificando a carboxila da aglucona (figura 2).

Além dos rebaudiosídeos A e B, foram encontrados mais 4 glicosídeos nas folhas da *Stevia rebaudiana*: os dulcosídeos A e B (25) e os rebaudiosídeos D e E (o rebaudiosídeo C é idêntico ao dulcosídeo B) (26,27). Todos

possuem o steviol como aglucona, podendo variar a posição, o tipo (glucose ou ramnose) e o número de moléculas glicídicas. Os dulcosídeos A e B são semelhantes ao steviosídeo e ao rebaudiosídeo A, respectivamente. A diferença está em que os dulcosídeos possuem um ramosil no lugar do glucosil da soforose (ver figura 3).

Já os rebaudiosídeos D e E correspondem ao rebaudiosídeo A e ao steviosídeo, respectivamente, possuindo porê, uma molécula de glucose a mais. Esta molécula de glucose adicional está ligada à glucose da ligação éster através de uma ligação glicosídica do tipo  $\alpha(1\rightarrow2)$  (27).

Uma comparação entre as estruturas descritas para os diversos derivados do steviosídeo permite concluir que existem três tipos moleculares básicos. Em primeiro lugar, temos a própria aglucona isolada (figura 1). Das três possibilidades mostradas na figura 1, steviol, isosteviol e dihidrosteviol, apenas a primeira ocorre na planta, ainda assim em quantidades extremamente pequenas. O isosteviol, no entanto, é o de mais fácil obtenção, pois pode ser produzido por hidrólise ácida do steviosídeo (23).

Ao segundo grupo pertencem o steviolbiosídeo e o rebaudiosídeo B, que são glicosídeos nos quais a carboxila da aglucona não está esterificada (ver figura 2). Ambos ocorrem naturalmente nas folhas da planta, porém, em quantidades pequenas. O steviolbiosídeo pode ser facilmente obtido do steviosídeo por hidrólise alcalina, o mesmo ocorrendo com o rebaudiosídeo B, que pode ser obtido por hidrólise alcalina do rebaudiosídeo A (23).

O terceiro grupo, ao qual pertence também o steviosídeo, apresenta a carboxila da aglucona esterificada (figura 3). Este grupo pode ser considerado em seu conjunto — e não apenas o steviosídeo — como sendo o princípio doce da *Stevia rebaudiana*.

Comparando-se dados da literatura, pode-se fazer uma avaliação das quantidades dos diversos glicosídeos descritos acima, nas folhas da planta. O steviosídeo é o mais abundante: 5% do peso seco das folhas, em média — variando também em função da época da colheita e das condições de cultivo —, são formados por steviosídeo (1,2,23,28). A seguir vem o rebaudiosídeo A com 2% (23,24). Os demais existem em quantidades bem menores.

O steviolbiosídeo, o rebaudiosídeo B e o dulcosídeo B perfazem mais ou menos 0,04% cada um, enquanto que os rebaudiosídeos D e E, contribuem com 0,03% cada um do peso seco das folhas (23-27).

### 1.3 Efeitos fisiológicos observados

A utilização da planta e de seus glicosídeos como adoçantes corre paralelamente com a sua utilização para fins terapêuticos. É voz corrente, seja em bases populares ou científicas, que a planta, ou extratos aquosos da mesma, exercem ao menos cinco efeitos sobre o organismo de mamíferos: (a) efeito hipoglicemiante (29); (b) efeito sobre o aparelho cárdio-vascular — propriedades cardiotônicas (30); (c) efeito anticoncepcional (31); (d) possível efeito anti-cárie (32); (e) e ainda um efeito sobre a contração da musculatura lisa (33).

É possível que alguns destes e também outros efeitos acabem revelando-se pouco significativos. Por outro lado, é também possível que se não todos, ao menos a maioria deles, tenham causa comum, por exemplo, no efeito pronunciado sobre algum parâmetro básico da função celular.

Dos efeitos relacionados acima, é o efeito hipoglicemiante que mais tem merecido a atenção. Uma substância que exerça êste efeito, necessariamente provoca alterações metabólicas pronunciadas e por vezes apresenta padrões bastante complexos. Uma demonstração disto pode ser vista nos resultados obtidos por Suzuki *et al.* (34). Êstes autores alimentaram ratos com dieta rica em carboidratos (64%) e 0,1% de steviosídeo, constatando uma diminuição nos níveis de glicogênio hepático e níveis normais de glucose no sangue. Outro grupo de ratos foi alimentado com dieta rica em lípídeos (30,6%) e 0,1% de steviosídeo, apresentando níveis normais de glicogênio hepático e glucose no sangue. Ratos alimentados durante 4 semanas com ração rica em carboidratos, contendo 10% de folhas secas pulverizadas da planta, apresentaram diminuição no teor de glucose no sangue e na quantidade de glicogênio hepático.

Os resultados de Suzuki *et al.* parecem ser claros num ponto: o efeito hipoglicemiante deve-se ao extrato total da planta e não ao seu principal princípio doce, isto é, ao steviosídeo. Tal fato tem sido confirmado por outros pesquisadores (1,35), Schmelling *et al.* (35), trabalhando com coelhos aloxanizados (diabéticos) verificaram que o extrato aquoso da planta exercia efeito hipoglicemiante. Quanto mais altos os níveis glicêmicos, tanto mais atuante foi o extrato da planta. Coelhos não diabéticos não tiveram seus níveis glicêmicos alterados. Também Oviedo e outros pesquisadores (9, 29) constataram este fenômeno, isto é, que a planta exercia efeito apenas em indivíduos diabéticos e não em indivíduos normais.

Não obstante estas observações, Alvarez *et al.* (36) puderam demonstrar que com doses suficientemente elevadas do extrato aquoso, também indivíduos normais respondem positivamente. Estes autores realizaram testes de tolerância à glucose (GTT) em indivíduos sãos, antes e após a ingestão de extrato aquoso da planta (extrato de 20g de folhas secas, diariamente), tendo constatado sensível aumento na tolerância à glucose.

Destes e outros experimentos parece claro que a planta de fato exerce efeito hipoglicemiante e conseqüentemente vários outros efeitos metabólicos. A rigor, no entanto, não há dados que permitam conclusão a respeito do mecanismo desta ação. A nível bioquímico, até o presente, um único trabalho foi realizado. Vignais *et al.* (22), investigaram o efeito da atractiligenina e seus derivados sobre o transporte de ADP/ATP através da membrana interna de mitocôndrias de fígado de rato. Entre estes derivados estavam o steviol, o dihidrosteviol e o steviosídeo, dada a sua semelhança estrutural com a atractiligenina. Os três compostos citados foram utilizados em algumas experiências, tendo ficado claro que elas inibem o transporte de ADP/ATP através da membrana mitocondrial. Isto leva a uma inibição da fosforilação oxidativa. Estes autores também observaram que o steviol e o dihidrosteviol inibem a NADH-oxidase. Estas observações são importantes no sentido de que os efeitos descritos podem ser responsáveis pelo efeito hipoglicemiante. As inibições da síntese de ATP e da cadeia respiratória, acarretarão de um lado uma ativação da via glicolítica e de outro uma inibição da neoglucogênese (por falta de energia). Se porém, este de fato é o mecanismo responsável pelo efeito hipoglicemiante do extrato aquoso, é assunto ainda em aberto.

#### 1.4 Objetivos deste trabalho

Este trabalho insere-se no contexto de um amplo projeto que visa investigar a fundo, a nível bioquímico, o mecanismo da ação hipoglicemiante, bem como identificar a substância (ou substâncias) responsável. Experiências preliminares, a nível celular, haviam sido planejadas com base nos dados obtidos por Vignais *et al.* (22). Pelos resultados obtidos, no entanto, ficou claro desde o início, que os dados experimentais a nível mitocondrial, eram de todo insuficientes. Com base nos mesmos, não havia possibilidade de uma interpretação segura dos resultados obtidos a nível celular. Vignais *et al.* concentraram seus esforços sobre o transporte de ADP/ATP através da membrana mitocondrial, tendo dado menos atenção a outros efeitos, os quais, a nível celular, parecem exercer papel igualmente importante.

Tendo em vista este fato, decidiu-se levar a cabo primeiramente, um estudo sistemático do efeito dos glicosídeos e do extrato aquoso total da planta sobre as funções mitocondriais. Este estudo visa principalmente prover de dados quantitativos seguros, investigações futuras, a nível celular e supra-celular. É portanto, um trabalho muito mais de natureza fenomenológica do que de natureza mecanística.

Em relação aos compostos a serem testados, estavam disponíveis para a execução deste trabalho o steviosídeo, o steviolbiosídeo e o isosteviol. Cada um destes compostos é casualmente representativo de cada tipo de estrutura, conforme delineado no final do ítem 1.2.

Alguns dos resultados experimentais descritos neste trabalho já foram objeto de comunicação prévia à *X Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica* (37) e ao *I Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana Bertoni* (38).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Produtos da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni — Testes do grau de pureza

O extrato aquoso total, o extrato doce (de sabor doce) e o extrato amargo (de sabor amargo) da *Stevia rebaudiana*, bem como o steviosídeo, o steviolbiosídeo e o isosteviol purificados, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Mauro Alvarez da Universidade Estadual de Maringá.

Com o objetivo de testar o grau de pureza do steviosídeo, do steviolbiosídeo e do isosteviol e sobretudo com o objetivo de caracterizar melhor a composição dos extratos aquoso total, doce e amargo, foram realizados alguns testes, os quais incluíram cromatografia em camada delgada, espectros de absorção, cromatografia gasosa (para o isosteviol), além da determinação dos pontos de fusão.

Os pontos de fusão das substâncias foram medidos utilizando-se um determinador de pontos de fusão *Buchi 510*. Os valores observados concordam com os publicados na literatura, ou seja, 230-234°C para o isosteviol (18), 188-192°C para o steviolbiosídeo e 196-198°C para o steviosídeo (17).

A figura 4 mostra os espectros de absorção (de 200 a 350 nm) das substâncias supra mencionadas, bem como do extrato aquoso total. O extrato aquoso total absorve em toda a extensão, inclusive entre 350 e 700 nm (não mostrado), devido principalmente ao seu alto teor em pigmentos. Há, no entanto um pico bem definido a 202 nm. Este pico deve-se principalmente aos glicosídeos nele existentes. De fato, o steviosídeo e o steviolbiosídeo apresentam um pico em torno de 202 nm. O primeiro absorve mais fortemente que este último. As bandas são agudas e não apresentam ombros ou picos secundários. Não há nenhuma absorção em comprimentos de onda acima de 230 nm (figura 4), como também não há nenhuma banda entre 350 e 700 nm (não mostrado). Nota-se pois que o processo de isolamento destas substâncias eliminou todas as substâncias que absorvem acima de 230 nm. O iso-

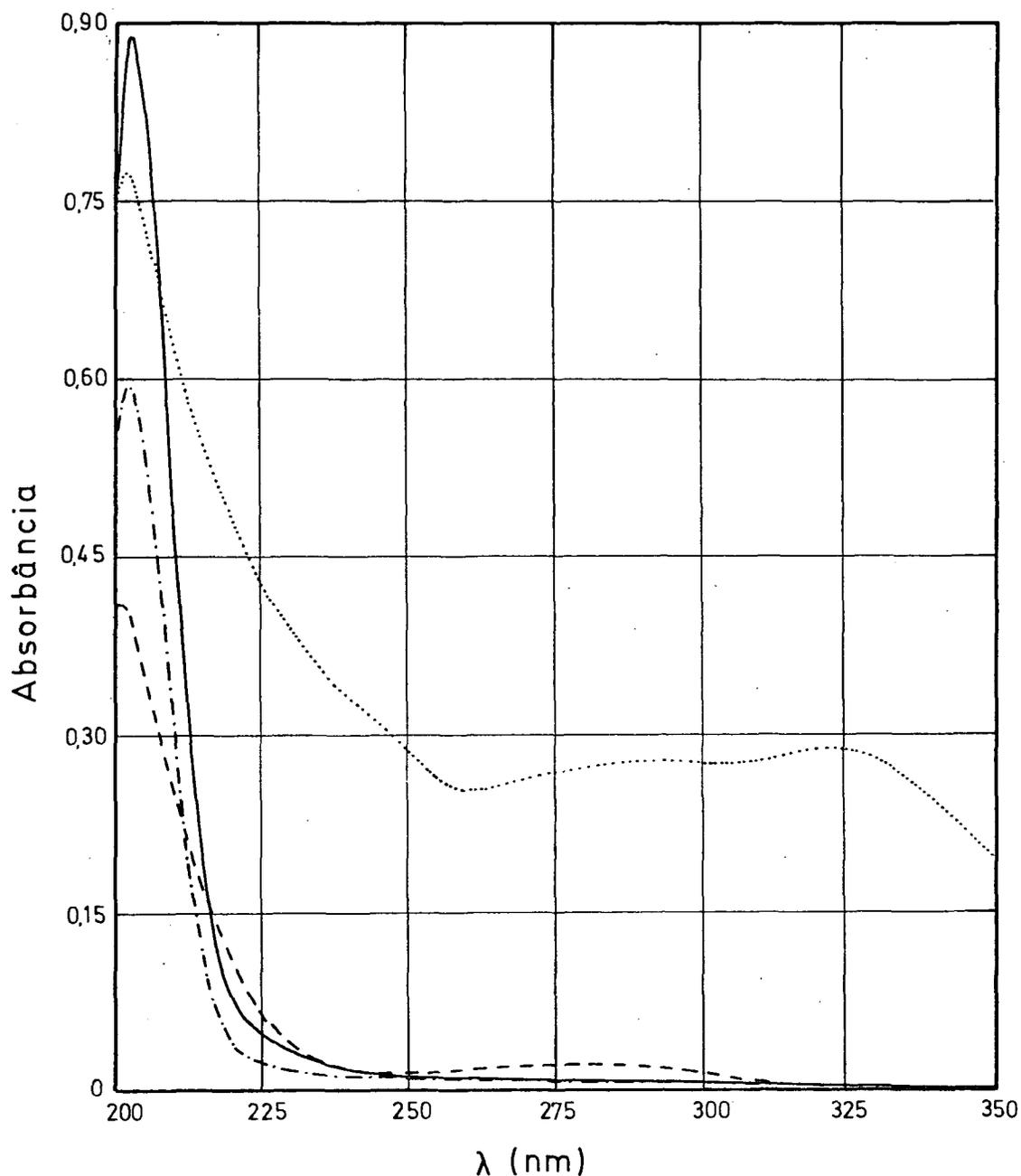


Figura 4. Espectros de absorção do extrato aquoso total (....., 60  $\mu\text{g}$  de folhas secas por ml), do steviosídeo (—, 0,1 mM), do steviolbiosídeo (-.-.-, 0,1 mM) e do isosteviol (-.-.-, 0,38 mM). As substâncias foram diluídas em tampão TRIS 20 mM, pH 7,4. Os espectros de absorção foram traçados por um espectrofotômetro duplo-feixe *Spectronic 2000*, com determinação automática do pico de absorção.

steviol, por outro lado, absorve 8 vezes menos intensamente que o steviosídeo a 201-202 nm (figura 4). Apresenta além do mais uma banda adicional a 280 nm.

Os espectros de absorção já falam a favor de um certo grau de pureza. Poderiam existir, no entanto, outros glicosídeos ou carboidratos em geral nas amostras, já que estes absorvem na faixa entre 200 e 205 nm. A banda secundária do isosteviol poderia também indicar alguma impureza. Realizou-se por isto cromatografias em camada delgada, utilizando quatro misturas de solventes: (a) clorofórmio:benzeno:metanol (1:1:3); (b) butanol:metanol:H<sub>2</sub>O (8:1:1); (c) benzeno:metanol (3:1); e (d) isobutanol:metanol:H<sub>2</sub>O (8:1:1). Em nenhum dos casos foi possível detectar mais do que uma substância. A única exceção foram algumas amostras de steviosídeo (não utilizadas nas experiências), as quais revelaram pequeno teor em steviolbiosídeo. Este último composto é produto de degradação do steviosídeo. A figura 5 mostra um cromatograma típico, obtido com uma mistura de isobutanol:metanol:água (8:1:1). Como se vê, cada um dos três compostos produziu apenas uma mancha após revelação com ácido sulfúrico etanólico a 5%. Já a cromatografia do extrato amargo e do extrato doce, revelou a presença de uma série de substâncias. É de se salientar, que a soma de ambos os extratos perfaz o extrato aquoso total, livre apenas da maior parte da clorofila e quiçá outros pigmentos, os quais dificultam, por sobrecarga, o normal desenvolvimento de um cromatograma do extrato aquoso total. Em relação ao extrato doce, o extrato amargo é várias vezes mais concentrado, pelo que a intensidade das manchas não pode ser comparada quantitativamente.

Fazendo-se uma comparação das manchas, pode-se tirar algumas conclusões acerca da composição dos extratos amargo e doce e por extensão do extrato aquoso total. Percebe-se que o extrato doce contém steviosídeo e que o extrato amargo deve conter steviolbiosídeo. Já nenhum dos extratos parece conter quantidades significativas de isosteviol. Esta substância não ocorre também no extrato aquoso total, conforme revelado por cromatogramas não mostrados aqui.

Os testes de pontos de fusão, cromatográficos e espectrofotométricos falam pois a favor da pureza do steviosídeo e do steviolbiosídeo. Ambos existem no extrato aquoso total. O isosteviol apresenta um pico secundário a 280 nm. É improvável que isto se deva a alguma impureza, já que a cromatografia de camada delgada falhou em detectar outra substância. Um teste adicional foi realizado, o qual consistiu numa cromatografia gasosa, tendo-se utilizado cromatógrafo de gás modelo CG 35370 (coluna 3% SE-30, chromosorb WHP, 80/100 mesh, 1,8 m). O isosteviol foi injetado como solução etanólica

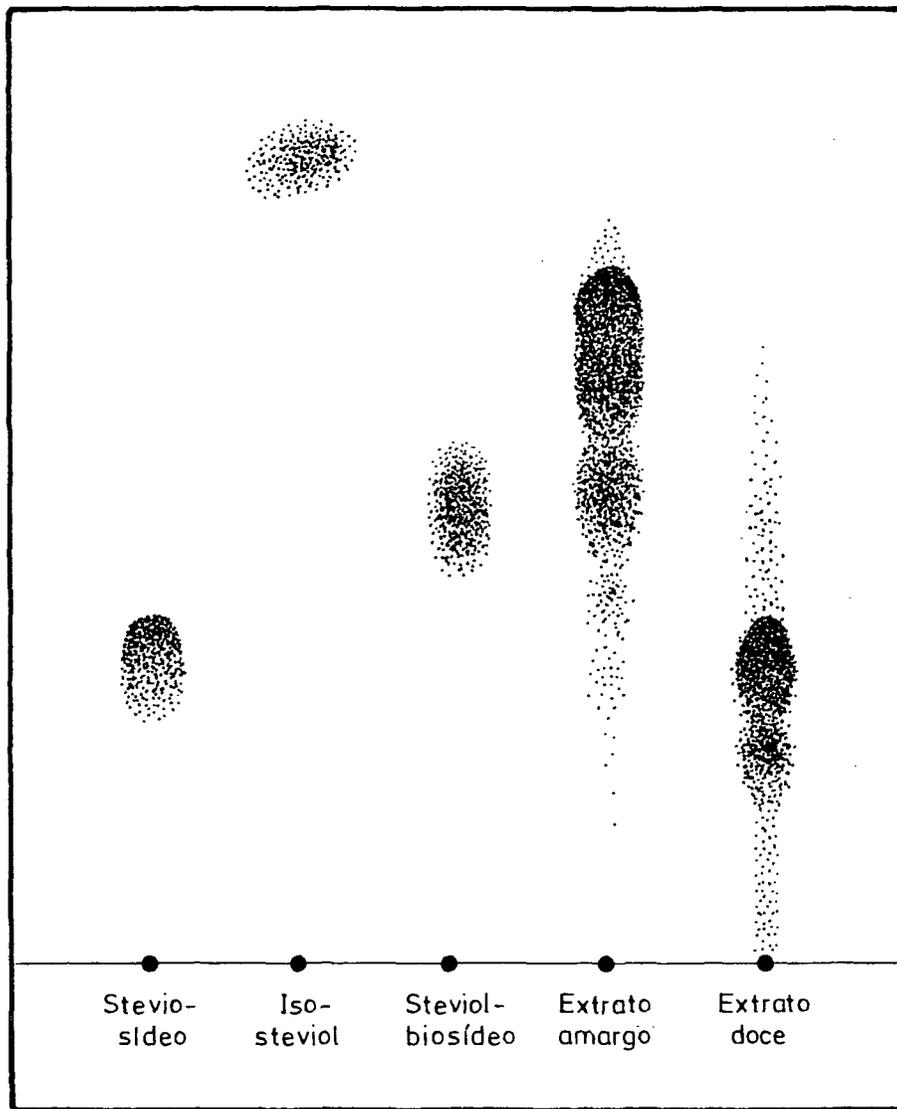


Figura 5. Cromatografia em camada delgada das amostras de steviosídeo, isosteviol, steviolbiosídeo, extrato amargo e extrato doce. Uma cromatofolha de sílica-gel (firma Merck), com espessura de camada de 0,25 mm foi utilizada para o cromatograma. O solvente foi uma mistura de isobutanol:metanol:água, na proporção 8:1:1. Após a corrida, o cromatograma foi revelado com ácido sulfúrico a 5% em etanol.

(10 µg), tendo-se detectado apenas um pico. Os dados permitem pois concluir que também a amostra de isosteviol utilizada neste trabalho, apresenta elevado grau de pureza.

O steviosídeo, bem como o steviolbiosídeo, são pouco solúveis, seja em água, dimetilformamida ou em etanol. Por isto, a adição de ambas as substâncias ao meio de incubação, por vezes, apresentava certos problemas. O steviosídeo foi dissolvido diretamente no meio de incubação sempre que este estava sob agitação (eletrodo de oxigênio, eletrodo de pH). Caso contrário foi adicionado na forma de suspensão (100 mM) em propilenoglicol, fazendo-se os controles para minimizar possíveis efeitos do solvente. O steviolbiosídeo foi adicionado como solução etanólica (25 mM) aquecida a 50°C ou como suspensão em propilenoglicol (50 mM). O isosteviol é bastante solúvel em etanol (até 0,35 M) e mesmo em água (a pH's alcalinos), pelo que o mesmo foi alternadamente adicionado na forma de solução alcoólica ou aquosa (50 mM).

#### 2.1.2 Enzimas, coenzimas e outros materiais

Todas as enzimas (L-lactato desidrogenase, L-glutamato desidrogenase, etc.) e coenzimas (ADP, ATP, NAD<sup>+</sup>, NADH, etc.) utilizados neste trabalho foram produtos da Sigma Co. Os demais reagentes foram produtos da Sigma Co., da Merck, da Reagen, etc., sendo do melhor grau disponível.

Para o isolamento de mitocôndrias, foram utilizados ratos brancos (Wistar), fornecidos pelo biotério da Fundação Universidade Estadual de Maringá.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Isolamento de mitocôndrias para medidas de respiração e atividade ATP-ásica

As mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas de acordo com o método descrito por Voss *et al.* (40), usando-se o meio de extração contendo manitol (0,2 M), sacarose (0,07 M), TRIS (10 mM) e EDTA (0,2 mM). O pH final foi igual a 7,4.

Ratos brancos foram decapitados e seus fígados removidos, lavados em

meio de extração a 0-4°C e homogeneizados em homogeneizador de Van Potter-Elvehjem. A seguir, a suspensão homogeneizada do tecido foi centrifugada a 3000g por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (*Janetzki, K 70 D*) a 0°C. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 10000g por 10 minutos. O sobrenadante foi ressuspensão em meio de extração e centrifugado duas vezes a 8000g. As mitocôndrias assim lavadas, foram ressuspensas no meio de extração em concentração de 20 a 30 mg de proteína por ml.

#### 2.2.2 Isolamento de mitocôndrias para medidas de *swelling* e de efluxo de prótons

As mitocôndrias foram preparadas segundo o método descrito por Packer *et al.* (41), utilizando-se o meio de extração contendo sacarose 0,33 M, EDTA-TRIS 1 mM, a pH 7,5. O procedimento geral de extração obedeceu à mesma sequência que no método anterior. A concentração final da suspensão de mitocôndrias foi de 15 a 20 mg de proteína por ml.

#### 2.2.3 Obtenção de mitocôndrias rompidas para testes enzimáticos

Mitocôndrias intatas, obtidas pelo método de Voss *et al.* (40), mantidas em meio de extração de sacarose e manitol, foram congeladas a -10°C por mais de 24 horas e posteriormente descongeladas até à temperatura ambiente e então estocadas para uso a 0°C. Tais mitocôndrias apresentam todos os componentes da cadeia respiratória em plena atividade e foram utilizadas para medidas da atividade da NADH-oxidase, succinato-oxidase, NADH-desidrogenase, succinato desidrogenase, NADH-citocromo c redutase, citocromo c-oxidase e da ATP-ase.

Para os testes das enzimas solúveis (enzimas da matriz mitocondrial), as mitocôndrias rompidas conforme descrito acima, foram centrifugadas a 30000g por 30 minutos (0°C) e o sobrenadante coletado (extrato bruto) utilizado como fonte das enzimas.

#### 2.2.4 Medidas do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente utilizando-se um eletródio de oxigênio construído nos laboratórios da Fundação Universidade Estadual de Maringá, polarizado com conjunto eletrônico da firma *Rank*

*Brothers*, acoplado a um registrador *RB 101* (*Equipamentos Científicos do Brasil*).

O meio de reação de *Voss et al.* (40) foi utilizado. Este meio continha fosfato de potássio 5 mM, manitol 0,25 M, TRIS 10 mM, EDTA 0,2 mM e cloreto de potássio 10 mM, a pH 7,4.

A velocidade da respiração foi expressa em nmols de oxigênio consumidos por minuto e relacionada à quantidade (em miligramas) da proteína mitocondrial presente no meio de incubação quando necessário. A solubilidade do oxigênio foi tomada como sendo igual a 240  $\mu$ M (42).

A razão ADP:O foi determinada segundo *Chance & Williams* (43), como sendo a razão entre o número de mols de ADP adicionados ao meio de incubação e o número de átomos-grama de oxigênio consumidos no estado ativo da respiração.

#### 2.2.5 Medidas do *swelling* mitocondrial

O aumento do volume mitocondrial (*swelling*), descrito por *Packer et al.* (41) e sustentado pelo sistema transferidor de elétrons ou pela atividade ATP-ásica, foi medido acompanhando-se a variação da densidade ótica (absorbância) a 575 nm, em espectrofotômetro *Shimadzu UV-100-02*, acoplado a um registrador *RB-102* (*Equipamentos Científicos do Brasil*).

O meio de reação continha: sacarose 100 mM, TRIS 10 mM e EDTA 0,3 mM a pH 7,3.

#### 2.2.6 Medidas do efluxo de prótons em mitocôndrias intatas

O efluxo de prótons causado pelo transporte de elétrons a partir do succinato como substrato, foi medido acompanhando-se a variação de pH da suspensão mitocondrial com um potenciômetro *Horiba M-7*, equipado com eletrodo de vidro *Metacrios* e acoplado a um registrador *RB 101* (*Equipamentos Científicos do Brasil*) (44,46,47). O meio de reação, fracamente tamponado,

continha TRIS 1 mM e KCl 0,15 M, com pH inicial igual a 7,4. As soluções das substâncias adicionadas ao sistema de incubação tiveram seu pH ajustado ao pH inicial do meio ou o pH deste último foi reajustado com HCl ou NaOH após a adição.

A calibração foi efetuada, adicionando-se quantidades conhecidas de HCl e registrando-se a deflexão gráfica causada.

### 2.2.7 Determinação da atividade ATP-ásica

A atividade da ATP-ase mitocondrial (mitocôndrias intatas ou rompidas por congelamento),



foi medida, dosando-se o fosfato liberado ou a variação de pH que acompanha a hidrólise do ATP.

A dosagem do fosfato liberado foi feita segundo o método de Fiske & SubbaRow (48), conforme modificação de Lowry & Lopez (49). O meio de incubação para mitocôndrias intatas continha KCl 0,15 M, TRIS 50 mM, ATP 5 mM, DNP 0,2 mM e concentrações variáveis das substâncias a serem analisadas. Para mitocôndrias rompidas por congelamento, adicionou-se  $\text{MgCl}_2$  5 mM, omitindo-se o DNP. A temperatura de incubação foi igual a 37°C.

A reação foi iniciada pela adição de ATP, sendo que após 5 minutos, alíquotas foram desproteinizadas com ácido perclórico a 3% frio e centrifugadas. Ao sobrenadante adicionou-se 1 volume de acetato de sódio 0,1 M mais tampão acetato pH 4,0 até atingir uma concentração final de fosfato entre 0,015 e 0,1 mM.

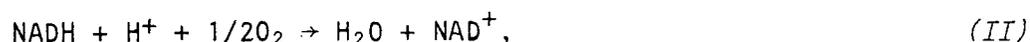
Desta última solução tomou-se uma alíquota (em geral 2 ml) e adicionou-se 0,1 volume de ácido ascórbico a 2% e 0,1 volume de molibdato de amônio a 1,5% em ácido sulfúrico 0,05 N. A cor desenvolvida foi medida a 700 nm, contra branco contendo tampão acetato (pH 4,0). A curva padrão foi feita com fosfato dissolvido em tampão acetato a pH 4,0.

As medidas de liberação de prótons foram feitas essencialmente segundo Mitchell & Moyle (50) utilizando-se a combinação eletródio de vidro, potenciômetro e registrador já descrita no ítem 2.2.6. O meio de incubação continha TRIS 1 mM, KCl 150 mM, DNP 0,1 mM e ATP 0,28 mM nas medidas com mitocôndrias intatas. Para mitocôndrias rompidas por congelamento, adicionou-se MgCl<sub>2</sub> 5 mM, omitindo-se o 2,4-dinitrofenol.

### 2.2.8 Determinações polarográficas de atividades enzimáticas

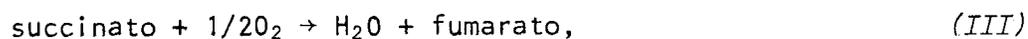
As oxidases foram medidas, acompanhando-se o consumo de oxigênio, utilizando-se aparelho já descrito no ítem 2.2.4. Como fonte de enzima, empregaram-se mitocôndrias rompidas por congelamento, sendo que o meio de incubação continha sempre tampão TRIS 20 mM, KCl 10 mM, a pH 7,4.

A *NADH-oxidase*,



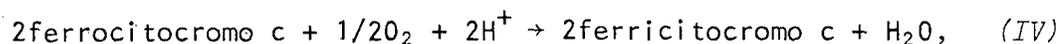
foi medida após a adição de NADH 1 mM ao sistema (51), contendo 0,5 mg de proteína mitocondrial por ml.

As medidas da *succinato-oxidase*,



foram efetuadas na presença de succinato 8 mM (51) e com 0,5 mg de proteína mitocondrial por ml.

Para as medidas da *citocromo c-oxidase*,



o citocromo c endógeno foi reduzido com TMPD+ascorbato na presença de antimicina (52). As concentrações finais de ascorbato, TMPD e antimicina A foram 2 mM, 0,3 mM e 5 µg/ml, respectivamente. A concentração de proteína mitocondrial situou-se entre 0,5 e 1 mg por ml.

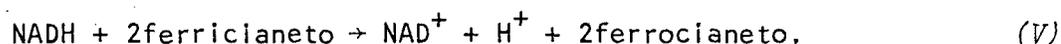
### 2.2.9 Determinações espectrofotométricas de atividades enzimáticas ligadas à cadeia respiratória

As determinações espectrofotométricas de atividades enzimáticas foram feitas utilizando-se espectrofotômetro *Shimadzu UV-100-02*, acoplado a registrador *RB 102 (Equipamentos Científicos do Brasil)*.

Mitocôndrias rompidas por congelamento foram utilizadas como fonte da NADH-oxidase, NADH-desidrogenase, succinato-desidrogenase e NADH citocromo c-redutase.

A *NADH-oxidase* (reação (II)) foi seguida a 340 nm (oxidação do NADH) em meio contendo TRIS 20 mM, pH 7,4, com concentrações de proteína entre 15 e 100 µg por ml. A concentração de NADH foi igual a 0,15 mM (absorbância inicial em torno de 1,0), exceto quando variada sistematicamente.

A *NADH desidrogenase* foi medida utilizando-se ferricianeto como aceptor de elétrons (NADH-ferricianeto redutase, EC 1.6.99.3) na presença de antimicina (10 µg/ml) (51):



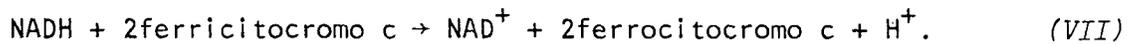
A redução do ferricianeto foi acompanhada a 420 nm. O meio de incubação continha ferricianeto 0,5 mM, NADH 0,5 mM, TRIS 20 mM, pH 7,4 e 5 mg/ml de proteína mitocondrial.

A *succinato desidrogenase* foi igualmente medida empregando-se ferricianeto como aceptor de elétrons (succinato ferricianeto redutase, EC 1.3.99.1), na presença de antimicina (10 µg/ml) (51):



A reação foi acompanhada a 420 nm. O meio de incubação continha TRIS 10 mM, pH 7,4, ferricianeto 0,5 mM, succinato 8 mM e 1 mg de proteína mitocondrial por ml.

A *NADH citocromo c-redutase* foi medida a 550 nm, acompanhando-se a redução do ferricitocromo c (53):



Em tampão TRIS 20 mM, a pH 7,4, 20 µg de proteína mitocondrial foram incubadas com NADH 0,15 mM e ferricitocromo c 25 µM. O aumento da absorvância a 550 nm foi registrado, tendo sido a reação iniciada ou com a adição da proteína mitocondrial ou com a adição do ferricitocromo c.

#### 2.2.10 Determinação espectrofotométrica de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e outras desidrogenases

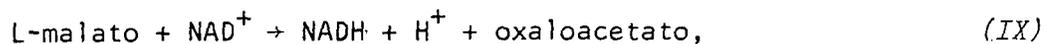
Para a determinação de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e outras desidrogenases, utilizou-se o extrato bruto de mitocôndrias de fígado de rato (ver ítem 2.2.3) ou enzimas purificadas, obtidas comercialmente.

A *fumarase* (L-malato hidro-liase, EC 4.2.1.2),



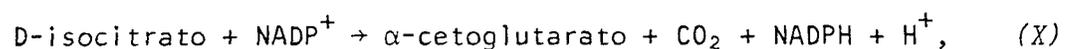
foi dosada acompanhando-se a oxidação do fumarato a 240 nm (55). A fonte de enzima foi o extrato bruto. 70 µg de proteína mitocondrial por ml foram incubados em tampão TRIS 20 mM, pH 7,4, contendo fumarato 0,5 mM. O decréscimo em absorvância foi registrado.

A *L-malato desidrogenase* (EC 1.1.1.37),



foi igualmente medida utilizando-se o extrato bruto como fonte de enzima. A redução do  $\text{NAD}^+$  foi acompanhada a 340 nm (55). O meio de reação continha 7 µg de proteína mitocondrial por ml, DL-malato 12 mM,  $\text{NAD}^+$  1 mM em tampão TRIS 20 mM, a pH 8,5, contendo hidrazina a 2%. A hidrazina foi adicionada para deslocar a reação no sentido da formação de oxaloacetato, já que o equilíbrio da reação (IX) está muito deslocado para a esquerda (55).

A *isocitrato desidrogenase*  $\text{NADP}^+$ -dependente (EC 1.1.1.42),



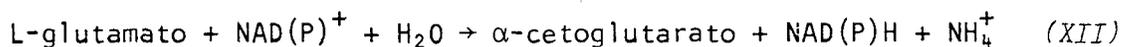
foi medida utilizando-se o extrato bruto como fonte de enzima e medindo-se a redução do  $\text{NADP}^+$  a 340 nm (56). As condições foram: 180 a 300  $\mu\text{g}$  de proteína por ml, DL-isocitrato 0,5 mM,  $\text{NADP}^+$  0,25 mM, em tampão TRIS 20 mM, a pH 7,4.

A *isocitrato desidrogenase*  $\text{NAD}^+$ -dependente (EC 1.1.1.41),



foi medida tendo como fonte de enzima o extrato bruto mitocondrial, seguindo-se a redução do  $\text{NAD}^+$  a 340 nm (56). As condições foram: 0,3 mg de proteína por ml,  $\text{NAD}^+$  1 mM, DL-isocitrato 0,5 mM, ADP 0,7 mM e  $\text{MgCl}_2$  2,3 mM, em tampão TRIS 20 mM, a pH 7,4.

A *L-glutamato desidrogenase* (EC 1.4.1.3),

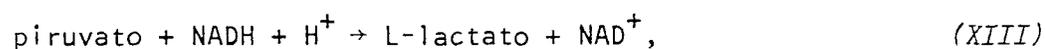


foi medida utilizando-se a enzima purificada de fígado bovino (Sigma) ou o extrato bruto de mitocôndrias de fígado de rato, acompanhando-se a oxidação do  $\text{NAD(P)H}$  ou a redução do  $\text{NAD(P)}^+$  a 340 nm.

A reação de redução do  $\text{NAD(P)}^+$  foi medida nas seguintes condições: tampão TRIS 20 mM, pH 8,5, hidrazina a 2%, L-glutamato 11 mM,  $\text{NAD}^+$  1 mM (ou  $\text{NADP}^+$  0,2 mM) e entre 10 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína por ml do extrato bruto de mitocôndrias de fígado de rato ou 50 a 200 miliunidades da enzima purificada de fígado bovino. A adição de hidrazina desloca o equilíbrio no sentido da formação de  $\alpha$ -cetogluturato (57,58).

A reação de oxidação do  $\text{NADH}$  (ou  $\text{NADPH}$ ), foi medida em tampão TRIS 20 mM, pH 7,4,  $\alpha$ -cetogluturato 2 mM, cloreto de amônio 100 mM,  $\text{NADH}$  0,15 mM (ou  $\text{NADPH}$  0,07 mM) com 10 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína do extrato bruto por ml ou 50-150 miliunidades da enzima purificada de fígado bovino.

A *L-lactato desidrogenase* (EC 1.1.1.27),

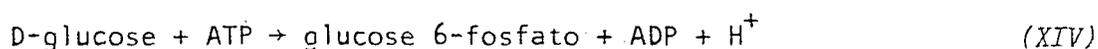


purificada de músculo bovino (Sigma), foi utilizada para a dosagem, tendo-se

medido a oxidação do NADH pelo piruvato a 340 nm (54). As condições foram: tampão TRIS 20 mM, pH 7,4, piruvato 0,5 mM e NADH 0,15 mM, juntamente com 50 miliunidades da enzima.

#### 2.2.11 Dosagem potenciométrica da hexoquinase

Para a dosagem da *hexoquinase* (EC 2.7.1.1),



foi utilizada a enzima purificada de levedura (Sigma). O decréscimo do pH foi medido potenciometricamente, conforme descrito no item 2.2.6. O meio de reação continha: TRIS 1 mM, ATP 0,3 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, glucose 7,0 mM e 50 miliunidades de enzima.

#### 2.2.12 Determinação quantitativa do steviosídeo

A dosagem do steviosídeo no extrato aquoso total foi feita aplicando-se alíquotas de 10 µl do extrato (30 mg de folhas secas extraídas por ml) em placas de sílica-gel ativadas (Merck). A separação foi feita utilizando-se a mistura butanol:etanol:água (8:1:1) como solvente. Após a corrida do cromatograma as manchas foram localizadas e removidas da placa por raspagem, dissolvidas em butanol e dosadas pelo método da antrona/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conforme descrito por Dische (60).

A uma solução de antrona (0,2%) em ácido sulfúrico (96%); pipetou-se 0,5 volume da solução de steviosídeo. A cor desenvolvida foi medida a 625 nm. A curva padrão foi realizada pipetando-se no reagente, soluções de glucose de concentrações entre 0,03 e 0,3 mM. A concentração do steviosídeo foi calculada, dividindo-se por 3 a concentração de glucose obtida (2).

#### 2.2.13 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método descrito por Lowry *et al.* (59), empregando-se soro albumina bovina (Johnson) como padrão.

#### 2.2.14 Avaliação gráfica das estimativas preliminares dos parâmetros cinéticos da NADH-oxidase

As estimativas preliminares das constantes cinéticas da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento foram avaliadas graficamente. Supondo-se que o sistema estudado apresente ao menos dois componentes cinéticos discerníveis, a equação que o descreve será (61,62):

$$v = \frac{VA}{K + A} + \frac{V'A}{K' + A} \quad (1)$$

Na equação (1),  $v$  é a velocidade de reação e  $A$  a concentração de substrato.  $V$  e  $V'$  são as velocidades máximas do primeiro e do segundo componente, respectivamente e  $K$  e  $K'$  as correspondentes constantes de Michaelis.

Formas alternativas da equação (1) podem ser obtidas. A inversão de ambos os lados leva a (61):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{\frac{VA}{K + A} + \frac{V'A}{K' + A}} \quad (2)$$

ou seja,

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + (K + K')/A + KK'/A^2}{(V' + V) + (VK' + V'K)/A} \quad (3)$$

Uma representação gráfica de  $1/v$  versus  $1/A$  pode ser vista na figura 6A (representação gráfica de Lineweaver-Burk) (61). A linha traçada apresenta uma curvatura próximo ao eixo dos  $1/v$ . O valor de  $1/v$  quando  $1/A = 0$ , isto é, a intersecção ao eixo dos  $1/v$ , é igual a  $(V + V')^{-1}$ . Isto significa, que a soma das velocidades máximas pode ser obtida, avaliando-se a intersecção ao eixo dos  $1/v$  num gráfico do tipo da figura 6A.

Pode-se demonstrar também que se  $K > K'$ , a equação (3) reduz-se a

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K/A}{V + V' + KV'/A} \quad (4)$$

quando  $A \gg K'$  (o que será o caso próximo ao eixo dos  $1/v$ ). Da equação (4) surge que quando  $1/v = 0$ ,  $1/A$  será igual a  $-1/K$ , isto é, o valor de  $K$  pode ser obtido, extrapolando-se a curva até ao eixo dos  $1/A$  na figura 6A.

Para a determinação dos valores de  $V$ ,  $V'$  e  $K'$ , necessita-se de outra representação gráfica. A divisão da equação (1) por  $A$ , seguida de inversão, resulta em:

$$\frac{A}{v} = \frac{1}{\frac{V}{K+A} + \frac{V'}{K'+A}} \quad (5)$$

Uma representação gráfica da equação (5) encontra-se na figura 6B (representação gráfica de Hanes (61)). Na equação (5) pode-se verificar que o valor limite de  $A/v$  quando  $A$  tende a zero é igual a  $KK'/(KV' + K'V)$ , isto é, a intersecção ao eixo dos  $A/v$  é complexa função das constantes cinéticas.

Como  $K > K'$ , a equação (5) reduz-se a

$$\frac{A}{v} = \frac{KK' + KA}{V'K + K'V + VA} \quad (6)$$

quando  $A \ll K$  (isto é, quando  $V/(K+A) \approx V/K$ ).

Para  $A/v = 0$  tem-se então  $A = -K'$ , quer dizer, a intersecção ao eixo dos  $A$  na figura 6B fornece o valor de  $K'$ .

$V$  e  $V'$  podem ser avaliados medindo-se as intersecção ao eixo dos  $1/v$  (figura 6A) e ao eixo dos  $A/v$  (figura 6B) e utilizando os valores de  $K$  e  $K'$ . Se  $y$  é a intersecção ao eixo dos  $1/v$  e  $x$  a intersecção ao eixo dos  $A/v$  (figura 6), teremos:

$$V = \frac{KK' - K(x/y)}{x(K - K')} \quad (7)$$

e

$$V' = y^{-1} - V. \quad (8)$$

#### 2.2.15 Tratamento estatístico dos dados

O ajuste fino das estimativas preliminares obtidas como descrito no ítem anterior, foi feito pelo Dr. Adelar Bracht. Para tal, foi utilizado

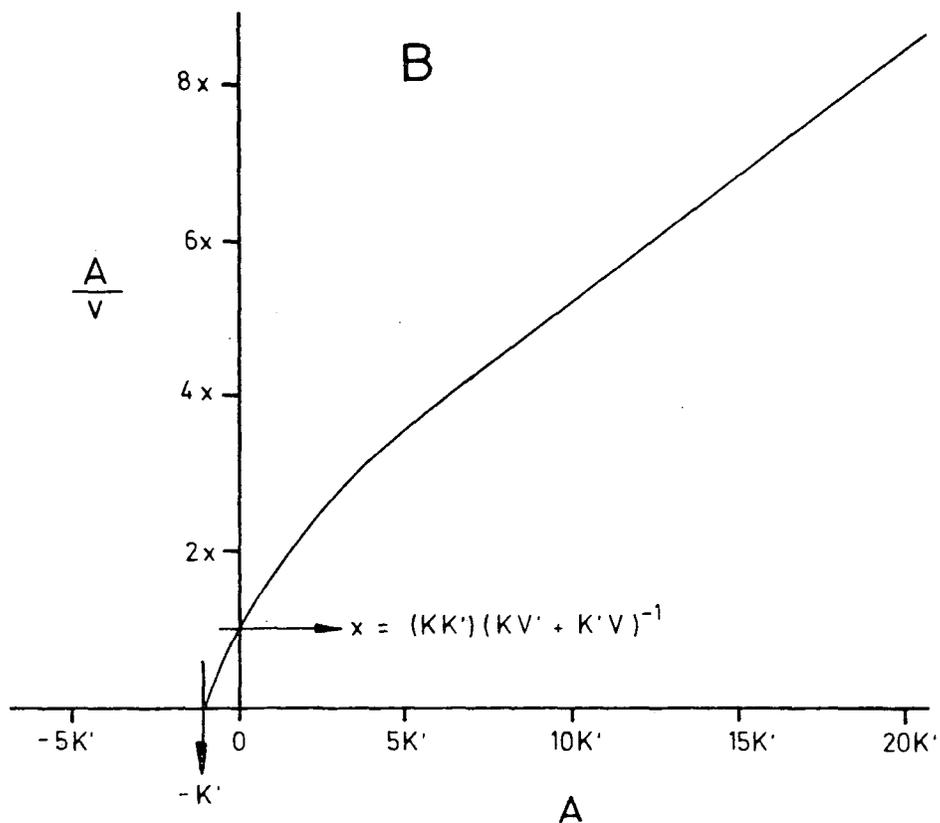
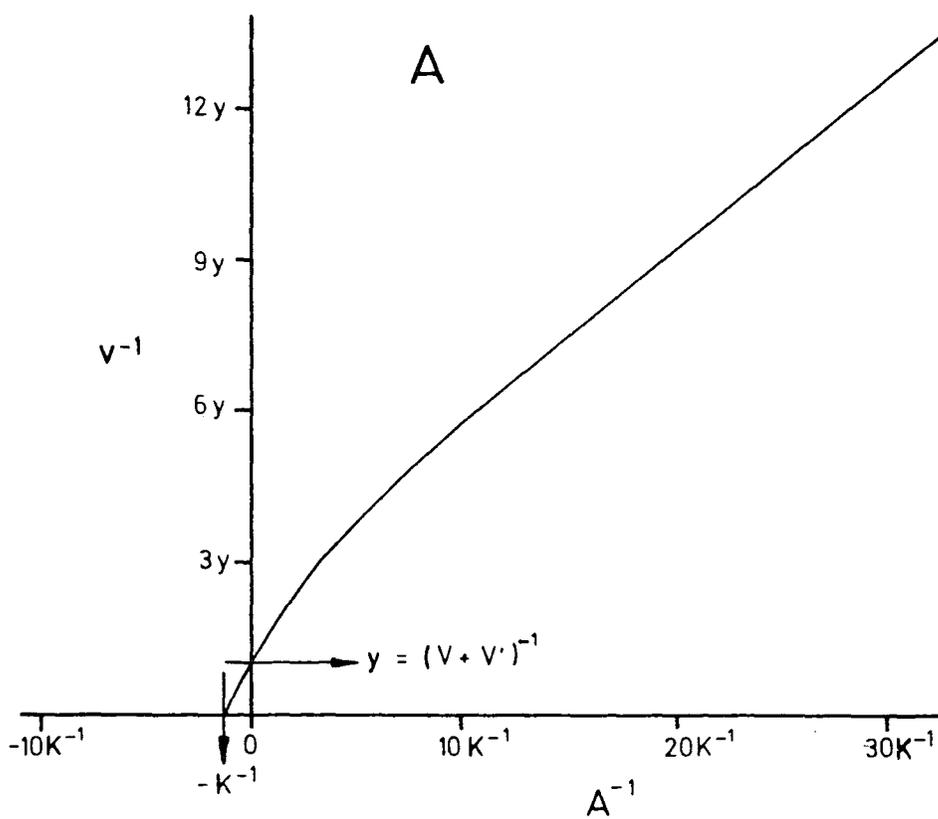


Figura 6. Representação gráfica da equação (1) — A:  $1/v$  contra  $1/A$ ; B:  $A/v$  contra  $A$  —, ilustrando o procedimento gráfico de avaliação das constantes cinéticas  $K$ ,  $K'$ ,  $V$  e  $V'$ . Para maiores detalhes, ver ítem 2.2.14.

processo iterativo de ajuste não-linear, essencialmente conforme descrito por Cleland (62).

As curvas resultantes da representação gráfica do inverso da velocidade inicial de reação ( $1/v$ ) contra a concentração de inibidor, foram submetidas a ajuste linear de mínimos quadrados, tendo-se calculado também o coeficiente de correlação ( $r$ ), bem como o erro padrão da estimativa ( $\sigma$ ) (72).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito sobre a respiração de mitocôndrias intatas, isoladas de fígado de rato

Em experiências preliminares, nas quais investigou-se o efeito do isosteviol sobre a respiração, adicionando-se o mesmo à suspensão mitocondrial sob diversas condições, observou-se ora uma ativação, ora uma inibição ou mesmo ausência de qualquer efeito, tudo dependendo das condições e da concentração final do isosteviol. O mesmo repetiu-se com o steviolbiosídeo e com o steviosídeo.

Experiências também preliminares com o extrato aquoso total da planta, por outro lado, forçaram à conclusão, de que seria temerário investigar o efeito deste extrato sobre a respiração. De fato, a simples adição do extrato aquoso à suspensão mitocondrial, na ausência de qualquer substrato exógeno, já produziu considerável aumento na atividade respiratória. É possível que o extrato aquoso contenha algum substrato oxidável. Por isto mesmo, somente serão válidas experiências com o extrato aquoso, nas quais a possível presença de um substrato oxidável não interfira significativamente com os resultados, como por exemplo é o caso da ativação da respiração pelo ADP (fosforilação oxidativa; ver adiante).

No caso do isosteviol, steviolbiosídeo e steviosídeo, a adição de qualquer um deles à suspensão mitocondrial, na ausência de substrato exógeno e endógeno, não induz aumento na velocidade da respiração. Conforme já comentado acima, na presença de substrato exógeno, o efeito parece ser complexo. Por isto, decidiu-se investigar a ação destes compostos, variando-se sistematicamente a sua concentração, na presença e na ausência de desacoplante. No tocante às concentrações utilizadas, não foram investigadas concentrações muito superiores às aquelas que produziam inibição total ou quase total da ativação da respiração pelo ADP (fosforilação oxidativa).

##### 3.1.1 Efeito do isosteviol

A figura 7 mostra os resultados de experiências, nas quais a respiração

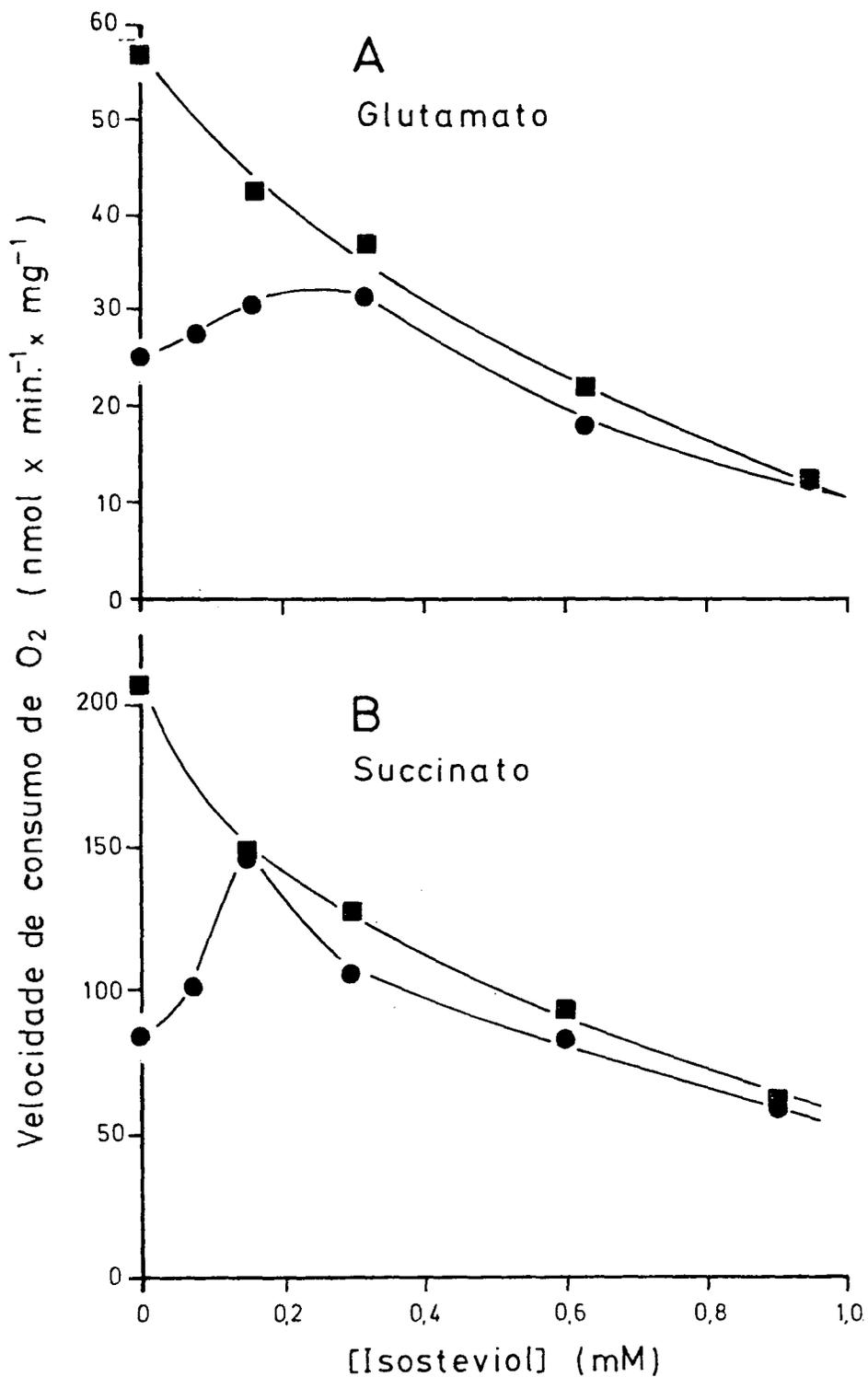


Figura 7. Efeito do isosteviol sobre a velocidade da respiração de mitocôndrias intatas. As mitocôndrias (0,5 mg de proteína por ml) foram incubadas em meio contendo fosfato 5 mM (pH 7,4), TRIS 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,2 mM e manitol 0,25 M, na presença (■) ou na ausência (●) de 2,4-dinitrofenol 0,1 mM. O consumo de oxigênio foi seguido polarograficamente (ver *Materiais e Métodos*). A: com L-glutamato como substrato (8 mM); B: com succinato como substrato (8 mM).

de mitocôndrias intatas foi medida polarograficamente (ver *Materiais & Métodos*, ítem 2.2.4), na presença de diferentes concentrações de isosteviol. A figura 7A mostra os resultados obtidos com L-glutamato como substrato (NAD<sup>+</sup>-dependente) enquanto que a figura 7B mostra os resultados obtidos com succinato (substrato FAD-dependente). Como se pode observar, a variação da atividade respiratória em função da concentração do isosteviol fica na dependência do estado das mitocôndrias. Com mitocôndrias acopladas, o que se observa inicialmente é uma ativação da respiração. Esta ativação é seguida de uma queda na velocidade respiratória à medida que se aumenta a concentração de isosteviol. Para uma concentração de isosteviol igual a 0,4 mM, aproximadamente, a velocidade de respiração é igual à do controle, independente do substrato utilizado. A partir desta concentração começa a haver uma inibição, a qual em relação ao controle, não é muito pronunciada. Na presença de 2,4-dinitrofenol, isto é, com mitocôndrias desacopladas, o único efeito observado é uma inibição, a qual, em relação ao controle respectivo, é bastante pronunciada com isosteviol 1 mM. Com L-glutamato como substrato, a inibição é um pouco maior do que com succinato. Tanto com L-glutamato como com succinato, as duas curvas — presença e ausência de 2,4-dinitrofenol — tendem a encontrar-se a concentrações mais elevadas de isosteviol ( $\approx 1$  mM).

Experiências realizadas com TMPD + ascorbato como fonte de elétrons, revelaram que não há efeito inibidor sobre o consumo de oxigênio, na presença de 2,4-dinitrofenol. Na ausência de desacoplante, no entanto, há um pequeno, mas consistente efeito ativador, o qual não é seguido de uma queda na velocidade respiratória ao aumentar-se ainda mais a concentração de isosteviol (experiências não mostradas).

Os dados da figura 7 admitem sem dúvida várias interpretações. Uma das interpretações mais simples, no entanto, seria a seguinte. O isosteviol exerceria ao menos dois efeitos. Um deles seria um efeito desacoplante — o que levaria a uma ativação da respiração. O segundo efeito seria o de inibir o fluxo de elétrons em um ou mais pontos ao longo da cadeia respiratória — entre a NADH-desidrogenase (neste caso, também a L-glutamato desidrogenase deve ser considerada) e a citocromo c-oxidase. Na ausência de desacoplante, o sistema de transporte de elétrons não opera com capacidade plena, isto é, o fator limitante da velocidade da respiração é a baixa ve-

locidade da fosforilação (por falta de acceptor do grupo fosfato, ADP). Por isto, em baixas concentrações de isosteviol, um possível efeito desacoplante poderia produzir uma ativação do consumo de oxigênio. Esta ativação é no entanto transitória, pois aumentos subsequentes na concentração e que levariam a uma inibição do transporte de elétrons, acabariam por produzir uma inibição na velocidade respiratória. As curvas da figura 7, obtidas na ausência de desacoplante, refletiriam desta maneira, uma competição entre o efeito ativador do desacoplamento e o efeito inibidor sobre a transferência de elétrons: o primeiro já ocorre a baixas concentrações e o segundo torna-se visível apenas em concentrações mais altas. Na presença de desacoplante, conseqüentemente, tudo o que se observa é uma inibição, já que nestas condições, o fator limitante da velocidade da respiração é algum componente do próprio sistema de transferência de elétrons.

Esta interpretação terá que ser comprovada com dados adicionais — principalmente com relação ao efeito desacoplante — antes de se tirar conclusões definitivas. Cumpre acrescentar, no entanto, que um duplo efeito, desacoplamento e inibição do transporte de elétrons, é fenômeno relativamente frequente. Vários agentes agem como desacopladores em baixas concentrações e como inibidores do transporte de elétrons em concentrações mais altas (63).

### 3.1.2 Efeito do steviolbiosídeo

O efeito do steviolbiosídeo foi estudado utilizando-se o mesmo procedimento experimental empregado no estudo do efeito do isosteviol. A figura 8 mostra os resultados obtidos na presença e na ausência de 2,4-dinitrofenol, variando-se a concentração do steviolbiosídeo e o tipo de substrato.

Uma análise ainda que superficial revela que os efeitos, vistos como um todo, são distintos dos efeitos produzidos pelo isosteviol. Com L-glutamato como substrato (figura 8A) observa-se inequívoca inibição da atividade respiratória na presença de 2,4-dinitrofenol. Na ausência de DNP, o steviolbiosídeo tem efeito complexo, dependente inclusive do tempo de incubação. Este efeito do steviolbiosídeo, dependente do tempo de incubação, pode ser visto na figura 9, a qual mostra o registro polarográfico do consumo

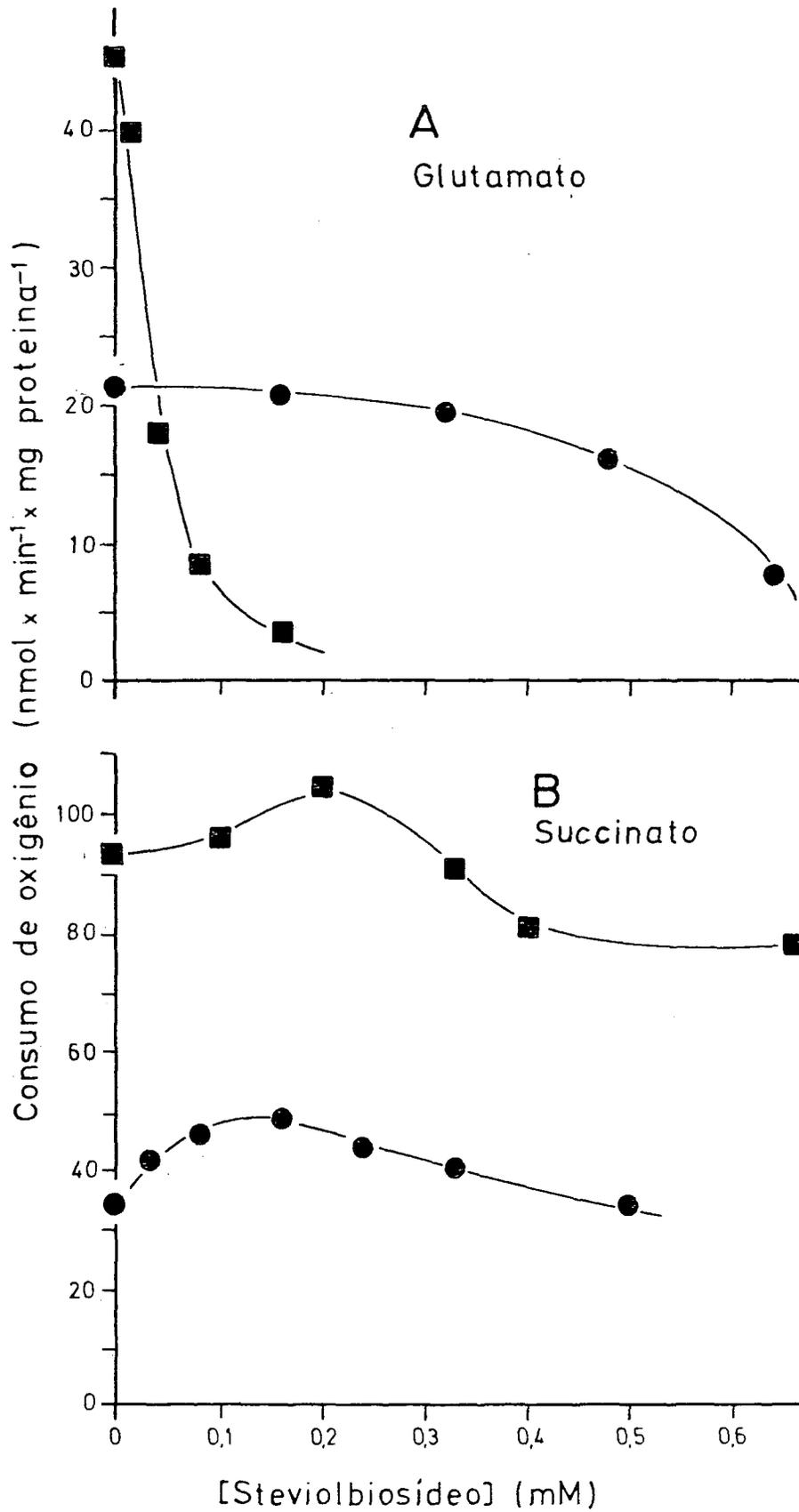


Figura 8. Efeito do steviolbios\u00eddeo sobre a velocidade da respira\u00e7\u00e3o de mitoc\u00f4ndrias intatas. As mitoc\u00f4ndrias (0,4 a 1 mg de prote\u00edna por ml) foram incubadas em meio contendo fosfato 5 mM (pH 7,4), TRIS 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,2 mM e manitol 0,25 M, na presen\u00e7a (■) ou na aus\u00eancia (●) de 2,4-dinitrofenol 0,1 mM. O consumo de oxig\u00eanio foi seguido polarograficamente (ver *Materiais e M\u00e9todos*). A: com L-glutamato como substrato (8 mM); B: com succinato (8 mM).

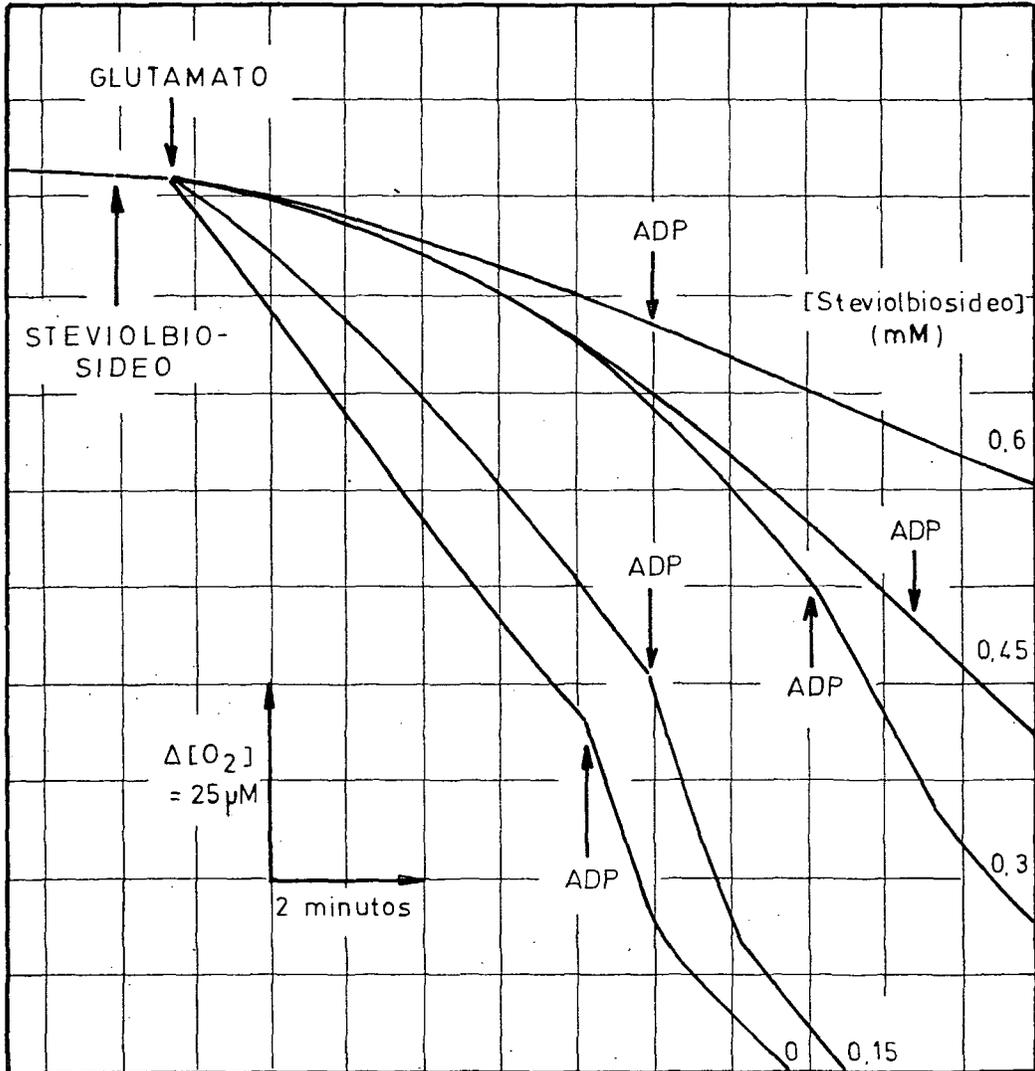


Figura 9. Efeito do steviolbiosídeo sobre o consumo de oxigênio e a ativação da respiração pelo ADP em mitocôndrias intatas. As mitocôndrias (0,8 mg/ml) foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de concentrações crescentes de steviolbiosídeo, conforme indicado. L-glutamato, suficiente para uma concentração final igual a 8 mM, foi adicionado conforme indicado. ADP (250 nmoles) foi adicionado conforme indicado pelas setas. O meio de incubação continha: fosfato 5 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,2 mM, manitol 250 mM e TRIS 10 mM, pH 7,4. O consumo de oxigênio foi registrado polarograficamente (ver *Materiais & Métodos*).

de oxigênio. A figura 9 revela que a adição de steviolbiosídeo ao sistema de incubação deprime consideravelmente a velocidade respiratória inicial. Esta vai recuperando-se parcialmente, no entanto, até atingir valores constantes, porém sempre abaixo do controle (ausência de steviolbiosídeo). Quer dizer, o steviolbiosídeo, com L-glutamato como substrato e na ausência de DNP, induz uma fase de retardo (*lag phase*) à curva de respiração. Os pontos experimentais da figura 8A, na ausência de DNP, representam a velocidade constante de respiração, atingida após a fase de retardo inicial. Percebe-se numa análise da curva, que o resultado final é também uma inibição da respiração, embora em concentrações baixas (menores que 0,3 mM), não haja nenhum efeito, a não ser aquele de induzir uma fase de retardo.

Com succinato como substrato (figura 8B), não há uma inibição clara e bem definida, ao menos no limite das concentrações utilizadas. Na ausência de 2,4-dinitrofenol, à semelhança do que foi observado com isosteviol, há uma pequena ativação, seguida de uma queda em concentrações maiores, sem haver no entanto, inibição em relação ao controle. Na presença de 2,4-dinitrofenol, o steviolbiosídeo exerce também um pequeno efeito ativador inicialmente — o que não ocorre com o isosteviol —, seguido de uma queda na velocidade respiratória, sem haver no entanto, nos limites das concentrações utilizadas, uma inibição significativa. Vistos em conjunto, os efeitos do steviolbiosídeo sobre a respiração dependente do succinato, na presença e na ausência de 2,4-dinitrofenol, são pequenos, pouco definidos e conseqüentemente de difícil interpretação.

O pronunciado efeito sobre a respiração dependente do L-glutamato sugere que o steviolbiosídeo exerce algum efeito inibidor sobre algum componente responsável pela transferência de elétrons entre o L-glutamato e a coenzima Q, já que a respiração dependente do succinato praticamente não é atingida. Se este é realmente o caso, no entanto, apenas uma investigação direta poderá comprovar. Se há ainda algum outro tipo de efeito — por exemplo: desacoplamento ou interação com a membrana mitocondrial — somente experiências específicas poderão dar resposta adequada. Deve-se mencionar aqui no entanto, que o steviolbiosídeo difere fundamentalmente do isosteviol no tocante à solubilidade. A sua solubilidade em solventes como o etanol (até 10 mM apenas), a dimetilformamida ou água, é bastante menor

que a do isosteviol. Estas diferenças no tocante à solubilidade sugerem que as interações de ambos os compostos com a membrana mitocondrial (de natureza lipídica) também apresentam diferenças. Aliás, é possível que em concentrações maiores, o steviolbiosídeo produza efeitos mais definidos sobre a respiração dependente do succinato. Deve-se levar em conta, no entanto, que as concentrações investigadas já inibem completamente a ativação da respiração pelo ADP e que a sua parca solubilidade em solventes adequados torna muito difícil uma significativa elevação de sua concentração no meio de incubação.

### 3.1.3 Efeito do steviosídeo

Os dados referentes ao efeito do steviosídeo podem ser vistos na figura 10. O procedimento experimental foi idêntico ao empregado para o isosteviol e o steviolbiosídeo. Com o steviosídeo, no entanto, concentrações bem maiores puderam ser investigadas. Embora o steviosídeo também seja pouco solúvel em solventes polares como o etanol, pode ser rapidamente dissolvido ou suspenso no próprio sistema de incubação, o que não ocorre com o steviolbiosídeo, o qual dissolve apenas lentamente, possuindo ainda a tendência em aderir às paredes do recipiente de incubação (acrílico). O limite de solubilidade do steviosídeo em água situa-se entre 1 e 1,5 mM, o que deverá ser levado em conta quando da interpretação dos dados. Após este limite, forma-se, no entanto, uma suspensão fina, bastante homogênea.

Como mostra a figura 10, na presença de 2,4-dinitrofenol, o efeito do steviosídeo é inibitório. Com L-glutamato como substrato (figura 10A), o efeito é mais pronunciado. 50% de inibição já é observada com uma concentração um pouco abaixo de 1 mM. Abaixo portanto dos limites de solubilidade do composto. No caso do succinato, 50% de inibição ocorre numa concentração próxima a 4 mM. Esta concentração situa-se acima do limite de solubilidade, porém, mesmo dentro dos limites de solubilidade há pronunciado efeito inibidor. Deve-se salientar, porém, que mesmo acima dos limites de solubilidade do composto, a inibição aumenta quando se aumenta a "concentração", principalmente no caso do L-glutamato.

Na ausência de 2,4-dinitrofenol, o efeito observado também é semelhante para ambos os substratos utilizados. Observa-se de início uma pequena inibição até uma concentração próxima a 1 mM, a qual é revertida à

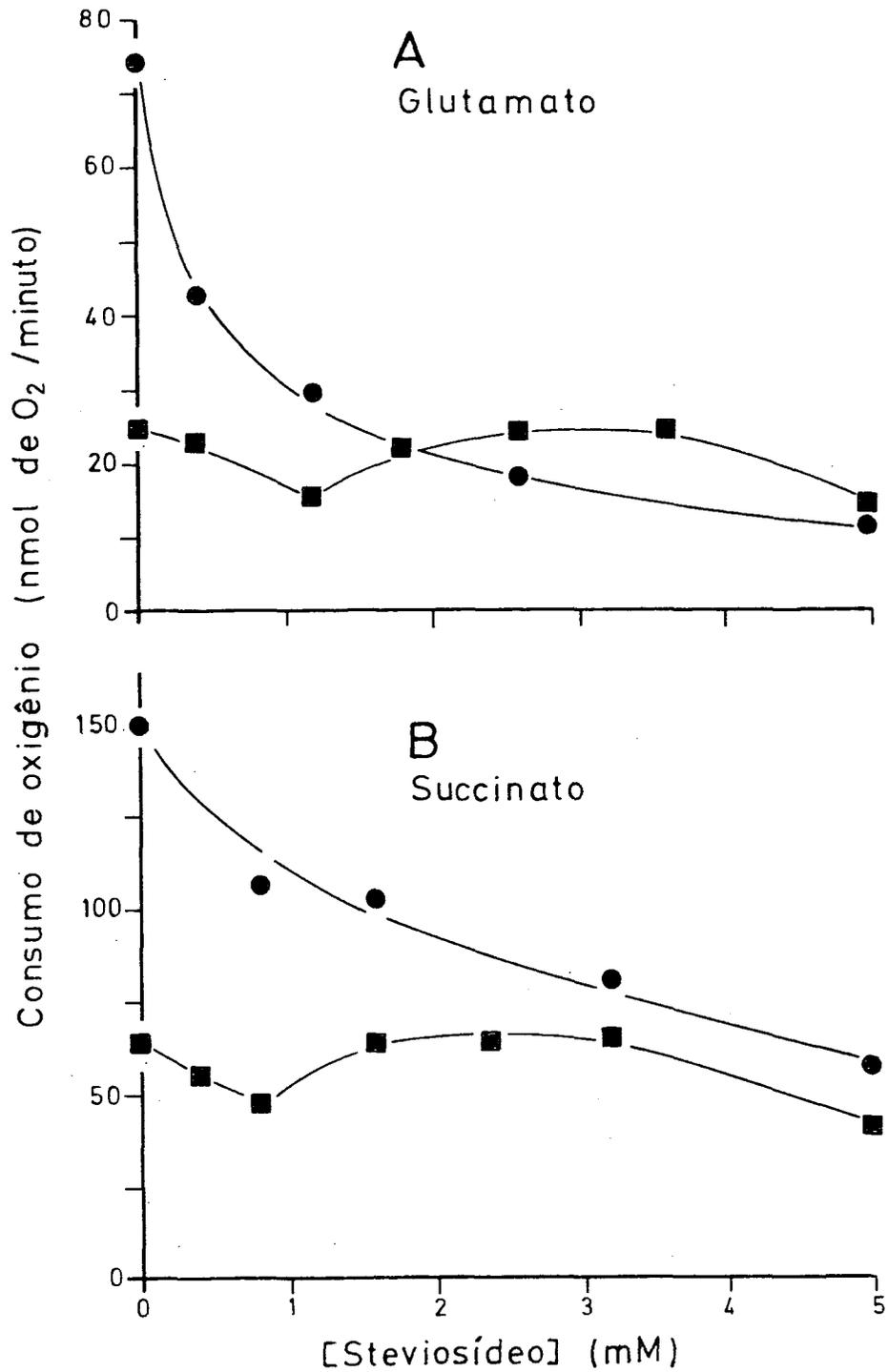


Figura 10. Efeito do steviosídeo sobre a velocidade da respiração de mitocôndrias intatas. As mitocôndrias (0,5 mg de proteína por ml) foram incubadas em meio contendo fosfato 5 mM (pH 7,4), TRIS 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,2 mM e manitol 0,25 M, na presença (●) ou na ausência (■) de 2,4-dinitrofenol 0,1 mM. O consumo de oxigênio foi seguido polarograficamente (ver *Materiais & Métodos*). A: com L-glutamato como substrato (8 mM); B: com succinato como substrato (8 mM).

medida que se aumenta a concentração. Em torno de 5 mM, há novamente uma pequena queda. O efeito do steviosídeo sobre a respiração de mitocôndrias acopladas poderia ser facilmente interpretada como resultado de mera variação experimental, não fosse ele reproduzível, inclusive com substratos diferentes. Não se pode deixar de reconhecer, no entanto, que quantitativamente falando, o efeito é bem pouco pronunciado. Por isto mesmo, num estudo sistemático, pode facilmente passar despercebido.

Uma comparação das curvas obtidas na presença e na ausência de 2,4-dinitrofenol, revela que as mesmas tendem a encontrar-se em concentrações elevadas de steviosídeo. Isto foi também observado em relação ao isosteviol. O efeito inibidor na presença de 2,4-dinitrofenol, sugere uma inibição sobre o sistema de transporte de elétrons (ver ítem 3.1.1). Esta não é, porém, a única interpretação cabível aos dados da figura 10. Não se pode excluir, por exemplo, a possibilidade de o steviosídeo reverter o efeito desacoplante do 2,4-dinitrofenol. Isto levaria igualmente a uma queda na velocidade respiratória. Podem estar ocorrendo também interações complexas entre o composto e a membrana íntima das mitocôndrias, sobretudo em concentrações acima do limite de solubilidade. Seja o que for, outras experiências terão que ser executadas para elucidar estes pontos.

### 3.2 Efeito sobre a ativação da respiração induzida pelo ADP — fosforilação oxidativa

Um dos poucos dados disponíveis na literatura sobre o efeito do steviosídeo, diz respeito justamente ao seu efeito sobre a fosforilação oxidativa. Vignais *et al.* (22), ao examinarem o efeito da atractiligenina e seus derivados sobre o transporte de ADP/ATP através da membrana mitocondrial, chegaram à conclusão de que também o steviosídeo, além do steviol e do dihidrosteviol, inibem este transporte. Como consequência, a fosforilação do ADP exógeno é prejudicada, pois o seu acesso ao interior da mitocôndria, onde se situam os sítios de fosforilação, não é mais possível. Em outras palavras, a fosforilação deve ser inibida.

Em vista do exposto acima, decidiu-se reproduzir os dados de Vignais *et al.* em relação ao steviosídeo, extendendo os experimentos também ao

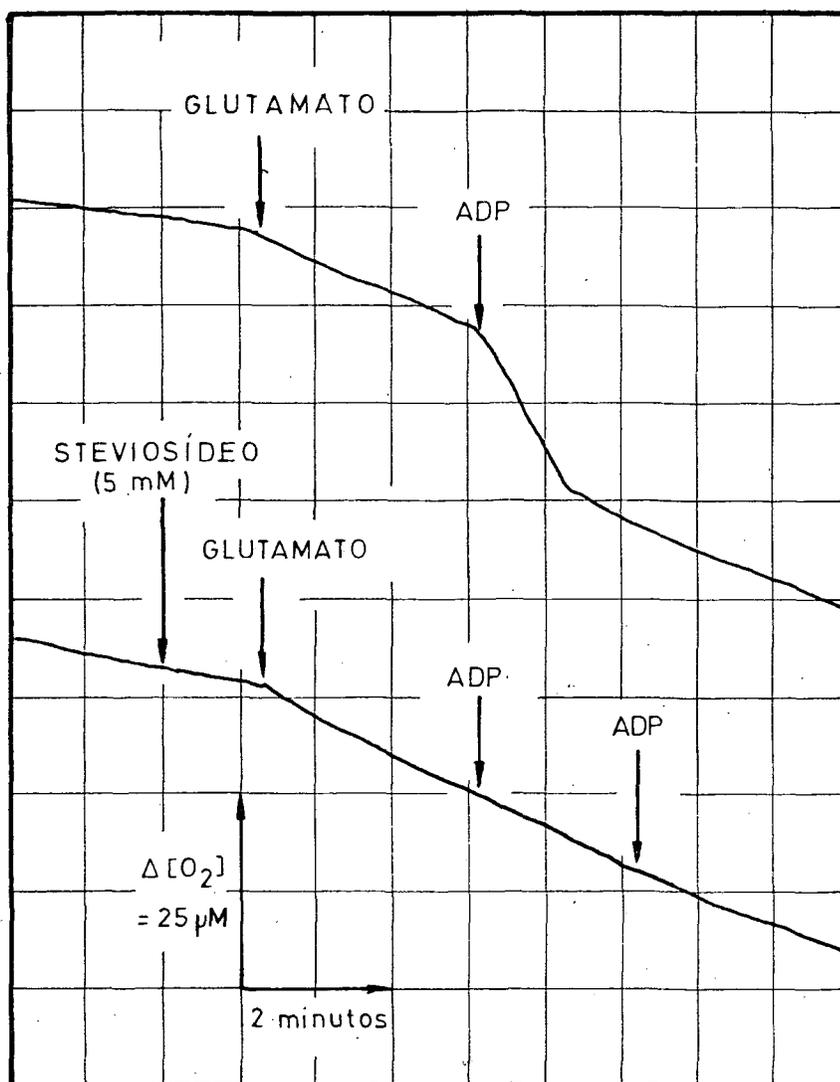


Figura 11. Efeito do steviosídeo sobre a ativação da respiração pelo ADP. Em duas experiências separadas, mitocôndrias (0,5 mg de proteína/ml) foram incubadas na ausência (controle) e na presença de steviosídeo 5 mM, em meio contendo fosfato 5 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,2 mM, manitol 250 mM e TRIS 10 mM, pH 7,4. L-glutamato foi adicionado para uma concentração final igual a 8 mM, conforme indicado. ADP (250 nmoles) foi adicionado conforme indicado pelas setas. O consumo de oxigênio foi registrado polarograficamente (ver *Materiais & Métodos*).

isosteviol e ao steviolbiosídeo, os quais não foram utilizados por aqueles autores. Além do mais, procurou-se também investigar o efeito do extrato aquoso total, o qual, devido ao seu grande teor em glicosídeos também deve exercer algum efeito sobre a ativação da respiração pelo ADP.

A figura 11 mostra o efeito do steviosídeo sobre a ativação da respiração pelo ADP. Ao lado do registro polarográfico obtido na ausência de steviosídeo (controle), a figura 11 mostra o que ocorre na presença de steviosídeo 5 mM. Como se percebe, a adição de ADP na presença de steviosídeo 5 mM, não provoca mais nenhuma ativação na respiração (i.e., não há mais passagem do estado II para o estado III). Coerentemente com os dados da figura 10A, a respiração no estado II (antes da adição de ADP) é muito pouco afetada pelo steviosídeo. Concentrações menores de steviosídeo não inibem completamente a passagem para o estado III, mas reduzem a velocidade da respiração ativada (não mostrado). A redução da velocidade da respiração ativada pelo ADP será tanto maior, quanto maior a concentração do steviosídeo.

A figura 9, já discutida anteriormente em relação ao efeito do steviolbiosídeo sobre a respiração dependente de L-glutamato, mostra também o efeito deste composto sobre a fosforilação oxidativa. Uma concentração em torno de 0,45 mM já torna a adição de ADP totalmente inócua, isto é, parece já não haver mais fosforilação oxidativa.

O mesmo pode ser dito em relação ao isosteviol e ao extrato aquoso total (experiências não mostradas). O isosteviol é extremamente potente em impedir a passagem para o estado III. Já concentrações em torno de 0,1 mM mostram pronunciado efeito. O extrato aquoso, por outro lado, independente do efeito que possa causar sobre a respiração quando adicionado na presença de L-glutamato, também age de maneira a inibir a passagem ao estado III. Concentrações de 10 mg de folhas secas extraídas por ml do meio de incubação, já agem de maneira a impedir totalmente a fosforilação oxidativa.

Os parâmetros que podem ser obtidos deste tipo de experimento, a razão ADP/O (ver *Materiais & Métodos*) e o quociente de controle respiratório (RC = velocidade da respiração no estado III/velocidade no estado IV) também foram

avaliados. Das curvas da figura 9, por exemplo, pode-se calcular que a razão ADP/O decai de 2,7 para 2,3 e 2,1 quando a concentração de steviolbiosídeo é aumentada de zero (controle) para 0,15 e 0,3 mM, respectivamente. Os valores de RC decaem também de 3,2 para 2,3 e 1,6 respectivamente. A uma concentração de steviolbiosídeo igual a 0,45 mM, já não há mais possibilidade de avaliação destes parâmetros.

Um decréscimo nos valores da razão ADP/O e do controle respiratório é provocado não apenas pelo steviolbiosídeo, mas por todos os compostos em estudo, inclusive pelo extrato aquoso total.

Conquanto os dados polarográficos sejam visualmente evidentes — não há mais passagem para o estado III após a adição de ADP — é temerário utilizar os parâmetros que deles podem ser obtidos (razão ADP/O e RC) para tirar conclusões acerca do mecanismo. Isto se deve em parte aos complexos efeitos já descritos no ítem 3.1 e também à própria dubiedade inerente a estes parâmetros. Um decréscimo no valor de RC, por exemplo, pode significar tanto um efeito desacoplante como uma inibição direta da fosforilação oxidativa (seja a nível de transporte, seja a nível da ATP-ase). Um decréscimo na razão ADP/O, por outro lado, é muito mais indicativo de um efeito desacoplante, pois no caso de uma inibição direta da fosforilação oxidativa, este parâmetro não é afetado, a menos que o grau de inibição seja muito alto. Infelizmente porém, o método polarográfico de determinação da razão ADP/O pode levar a erros consideráveis quando a velocidade da fosforilação é baixa, pelo que os valores devem ser interpretados com cuidado.

### 3.3 Efeito sobre a atividade ATP-ásica

Uma das técnicas que podem ser empregadas para estudar o sistema de fosforilação oxidativa, consiste em medidas da atividade ATP-ásica, isto é, em medidas da hidrólise do ATP. É fato bem estabelecido, que o sistema enzimático responsável pela síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico em mitocôndrias acopladas é o mesmo sistema também responsável pela hidrólise do ATP (50,64). Esta hidrólise do ATP pode ocorrer tanto em

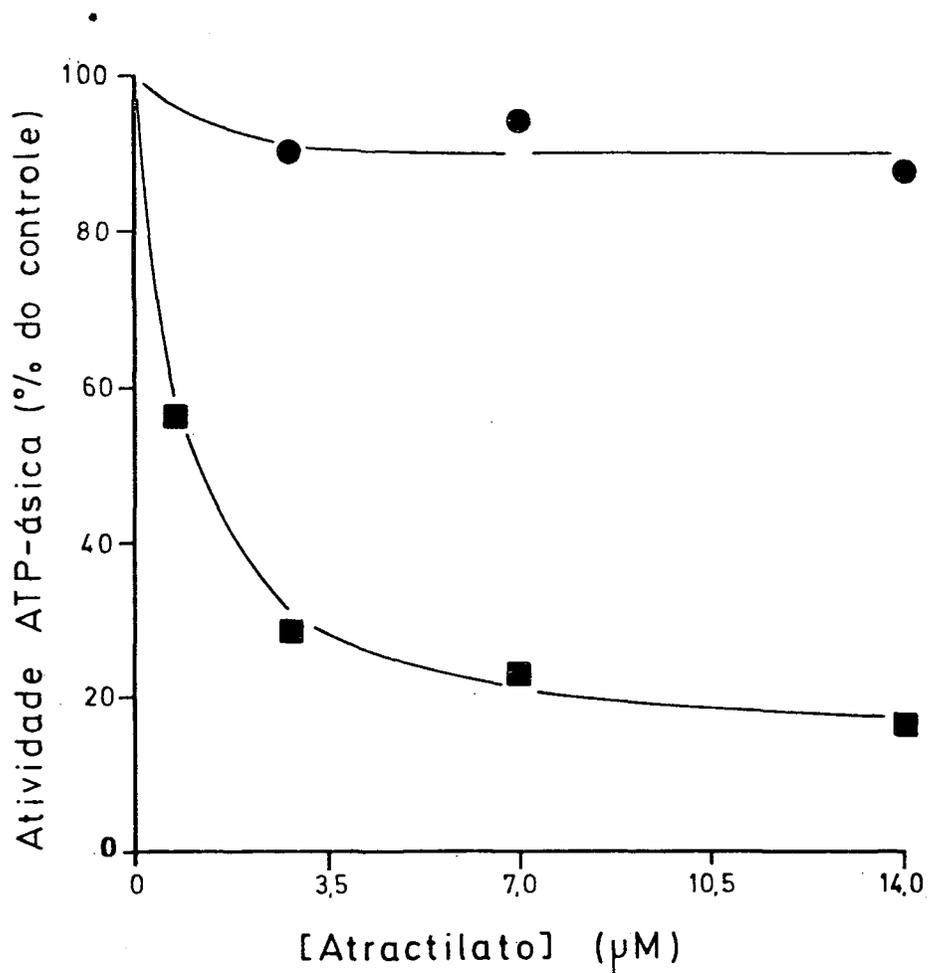


Figura 12. Efeito do atractilosídeo sobre a atividade ATP-ásica de mitocôndrias intatas (■) e rompidas por congelamento (●). As mitocôndrias intatas (0,3 mg de proteína/ml) foram incubadas na presença de 2,4-dinitrofenol (0,1 mM) em meio contendo KCl 0,15 M e TRIS 1 mM, pH 7,4, à temperatura ambiente. As mitocôndrias rompidas por congelamento (0,6 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições, tendo-se porém omitido o 2,4-dinitrofenol, acrescentando-se ainda  $MgCl_2$  5 mM. Em ambos os casos a reação foi iniciada pela adição de ATP 0,28 mM, tendo-se acompanhado a liberação de prótons com o eletrodo de pH, acoplado a registrador, conforme descrito em *Materiais & Métodos*. A atividade ATP-ásica foi expressa como porcentagem do controle (ausência de atractilosídeo).

mitocôndrias acopladas, como em mitocôndrias desacopladas. Em mitocôndrias acopladas, a hidrólise de ATP é mais lenta e a energia resultante da quebra da ligação fosfato pode ser utilizada para reverter o fluxo de elétrons (50,64). A atividade ATP-ásica promove inclusive uma ativa ejeção de prótons, isto é, forma-se um gradiente protônico entre os espaços intra- e extramitocondrial, a exemplo do que ocorre quando os elétrons fluem dos substratos em direção ao oxigênio (46,50). Em mitocôndrias desacopladas, a atividade ATP-ásica não leva à formação de um gradiente protônico, isto é, não há energização da membrana. O efeito mais comum dos agentes desacoplantes é exatamente, o de aumentar de tal maneira a permeabilidade aos prótons da membrana interna das mitocôndrias, a ponto de tornar impossível o estabelecimento de um gradiente (50,64).

Do exposto no parágrafo anterior, portanto, pode-se deduzir que em mitocôndrias acopladas, a hidrólise do ATP promove uma acidificação do meio extracelular por dois motivos: em primeiro lugar há que considerar a liberação estequiométrica de prótons, decorrente da própria hidrólise (ver *Materiais & Métodos*, Ítem 2.2.7) e, em segundo lugar, soma-se a estes prótons liberados estequiometricamente, os prótons ejetados ativamente e que levam à energização da membrana. A adição de desacoplante tem o efeito de eliminar a formação do gradiente protônico, pelo que a quantidade de prótons liberados se torna uma medida da atividade ATP-ásica. Por isto mesmo, neste trabalho, a atividade ATP-ásica foi alternadamente avaliada pela quantidade de prótons liberados e pela quantidade de fosfato liberada. Quando comparados, os resultados foram sempre semelhantes, com desvios pouco significativos. O método baseado na liberação de prótons, permite seguir continuamente a atividade ATP-ásica, o que não ocorre com as medidas de liberação de fosfato inorgânico. A dosagem contínua proporciona a possibilidade de avaliação de velocidades realmente iniciais. Além do mais, o primeiro método, é realmente mais sensível que o segundo.

No presente trabalho empregaram-se tanto mitocôndrias intatas (porém desacopladas com 2,4-dinitrofenol) como também mitocôndrias rompidas por congelamento. O processo de descongelamento promove automaticamente o desacoplamento. Além do mais, o rompimento das mitocôndrias resulta numa perda de  $Mg^{2+}$  endógeno, necessário para a atividade enzimática. Por este motivo, todas as experiências com mitocôndrias rompidas foram feitas na presença de  $MgCl_2$  5 mM.

### 3.3.1 Efeito do atractilato — caracterização dos sistemas utilizados

A figura 12 mostra um teste importante para a caracterização dos dois tipos de mitocôndrias utilizados neste estudo. Trata-se do efeito do atractilato (sal sódico) sobre a atividade ATP-ásica. É sobejamento conhecido, principalmente após os trabalhos de Klingenberg (65), que o atractilato inibe o transportador de ADP/ATP situado na membrana mitocondrial. Este transportador promove o transporte de ADP e ATP através da membrana mitocondrial por um sistema de troca, quer dizer, a entrada de ADP ou ATP exógeno está acoplada à saída de ADP ou ATP endógeno. Em mitocôndrias intatas e acopladas, o sistema funciona preferencialmente no sentido de promover a troca de ADP extramitocondrial pelo ATP intramitocondrial. Em mitocôndrias desacopladas, no entanto, não há preferências e o transportador transporta ADP e ATP em ambas as direções, com praticamente a mesma velocidade. Este transportador é a única possibilidade de acesso dos nucleotídeos de adenina exógenos (ou citoplasmáticos) ao interior da mitocôndria intata.

A experiência da figura 12 pode ser encarada, portanto, como um teste a respeito das necessidades de transporte nos dois tipos de preparação: mitocôndrias intatas (porém desacopladas) e mitocôndrias rompidas por congelamento. Como se pode verificar, a atividade ATP-ásica de mitocôndrias intatas é fortemente inibida por atractilato. Concentrações em torno de  $1 \mu\text{M}$  já produzem 50% de inibição. Obviamente, nesta preparação o transportador de ADP/ATP tem função indispensável no que tange ao acesso do ATP adicionado externamente à ATP-ase. O mesmo já não ocorre com mitocôndrias rompidas por congelamento. A diferença em relação às mitocôndrias intatas é enorme. A inibição é bem pouco pronunciada e deve estacionar em torno de 10%. Evidentemente não há, portanto, necessidade de transporte do ATP nesta preparação, o que aliás é esperado. A pequena inibição que se observa, pode dever-se tanto à existência de algumas mitocôndrias ainda intatas, como também a um possível — embora pequeno — efeito do atractilato sobre a ATP-ase. Deve-se acrescentar que nas duas preparações, a ATP-ase não deve ter sido significativamente alterada, pois em ambos os casos, persistiu a sensibilidade à oligomicina.

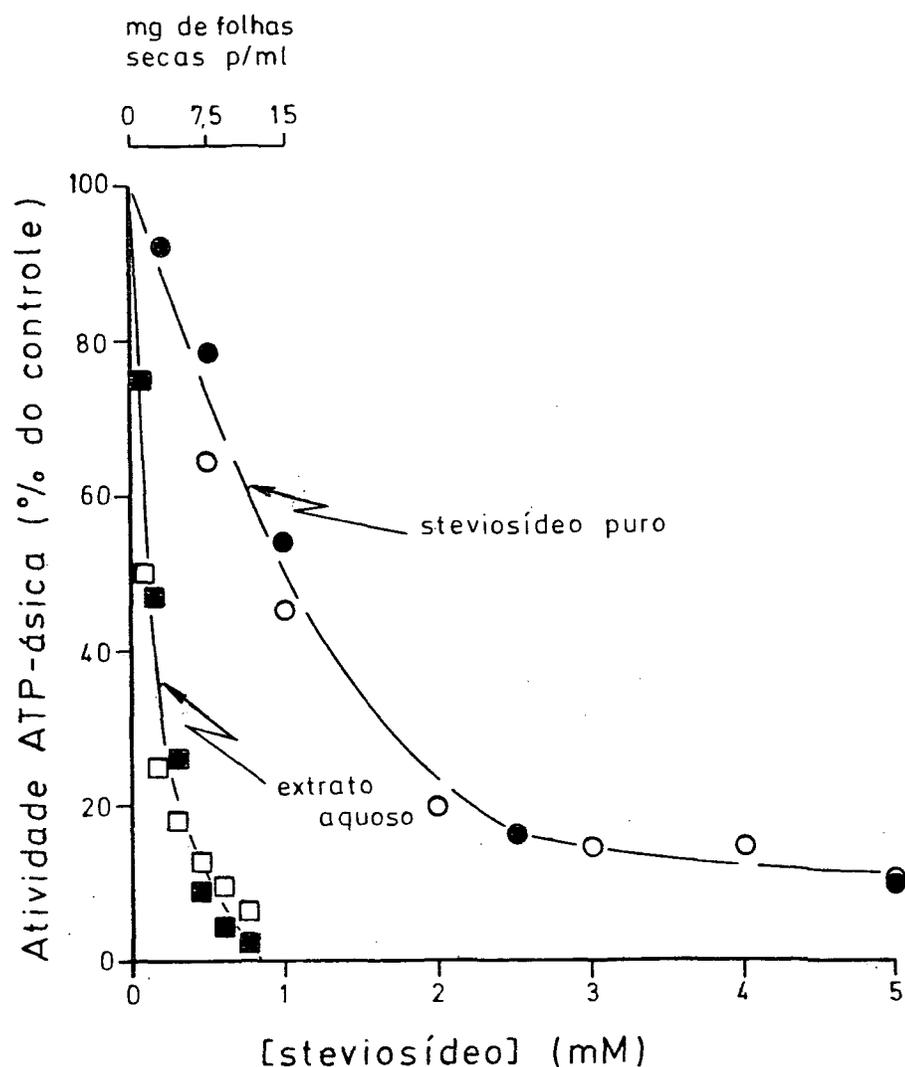


Figura 13. Atividade ATP-ásica de mitocôndrias intatas (●, ■) e rompidas por congelamento (○, □), em função da concentração de steviosídeo no meio de incubação: comparação do efeito do steviosídeo puro (○, ●) e do extrato aquoso total da *Stevia rebaudiana* (□, ■). Na escala superior, a quantidade de folhas secas extraídas está indicada. As mitocôndrias intatas (2 mg de proteína/ml) foram incubadas na presença de 2,4-dinitrofenol (0,1 mM) em meio contendo KCl 0,15 M e TRIS 20 mM, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de ATP 5 mM. A temperatura foi igual a 37°C. As mitocôndrias rompidas por congelamento (5 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições, tendo-se porém omitido o 2,4-dinitrofenol e acrescentado  $MgCl_2$  5 mM. O fosfato liberado após 5 minutos de reação, foi determinado conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

### 3.3.2 Efeito do steviosídeo e do extrato aquoso total da planta

As medidas da atividade ATP-ásica permitem também uma análise do efeito do extrato aquoso total da planta, já que as interferências anunciadas anteriormente (item 3.1) não ocorrem neste tipo de medida. Por isto mesmo, decidiu-se avaliar o efeito deste extrato, comparando-se o mesmo com aquele exercido pelo steviosídeo. Isto tem importância de ordem prática. Em primeiro lugar, o steviosídeo é a substância mais abundante no extrato aquoso (chá). Em segundo lugar, tanto o extrato aquoso (chá) como o steviosídeo vêm sendo consumidos popularmente, seja como adoçante, seja com fins terapêuticos.

A figura 13 mostra os resultados obtidos com mitocôndrias intatas (porém desacopladas) e mitocôndrias rompidas por congelamento. Neste caso, a liberação de fosfato inorgânico foi medida e os resultados, estão representados como percentagem do controle (ausência de extrato ou steviosídeo) contra a concentração final de steviosídeo. Numa escala adicional mostra-se também a quantidade correspondente de folhas secas extraídas. Verifica-se que tanto o steviosídeo como o extrato aquoso inibem a atividade ATP-ásica. O steviosídeo puro já inibe 50% desta atividade numa concentração em torno de 1 mM. Cumpre lembrar aqui que este parâmetro concorda com um dado obtido por Vignais *et al.* (22). Estes autores encontraram que 50% de inibição da fosforilação oxidativa ocorria com steviosídeo 1,2 mM. O extrato aquoso, por outro lado, inibe fortemente a enzima. 50% de inibição podem ser observados já com uma concentração final de steviosídeo no sistema de incubação em torno de 0,2 mM. Isto implica também, em que, o steviosídeo contido no extrato aquoso não é o único responsável pela inibição causada pelo mesmo. Se assim fosse, as duas curvas deveriam sobrepor-se. A diferença no entanto é evidente. Obviamente há, no extrato aquoso, outras substâncias responsáveis por esta inibição. Entre elas podem estar os demais glicosídeos (ver *Introdução*, item 1.2). É possível até que haja entre eles alguns bem potentes, já que todos estão presentes em quantidades menores que o steviosídeo. O efeito do extrato aquoso, visto em termos de folhas secas extraídas é, sem dúvida, bastante pronunciado, já que o extrato de 1,5 mg de folhas secas por ml do meio de incubação, produz 50% de inibição. Se considerarmos que as folhas secas são formadas em sua grande parte por celulose e outros componentes da parede celular (5% são steviosídeo), pode-se

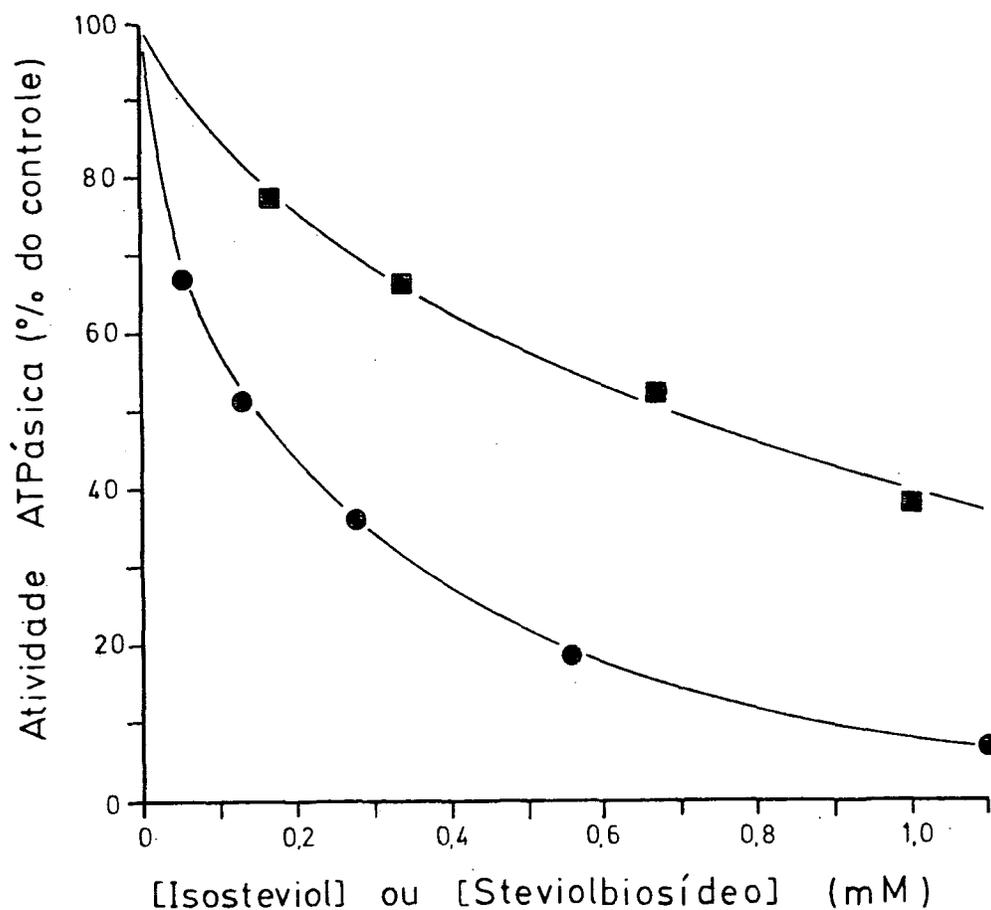


Figura 14. Atividade ATP-ásica de mitocôndrias intatas, isoladas de fígado de rato, em função da concentração de isosteviol (●) ou steviolbiosídeo (■) no meio de incubação. As mitocôndrias (0,5 mg de proteína por ml) foram incubadas na presença de 2,4-dinitrofenol (0,1 mM) em meio contendo KCl 0,15 M e TRIS 1 mM, pH 7,4, à temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ). A reação foi iniciada pela adição de ATP 0,28 mM, tendo-se acompanhado a liberação de prótons com o eletrodo de pH, acoplado a registrador, conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

bem fazer uma idéia sobre a potência das substâncias responsáveis pela inibição. Por outro lado, a ingestão deste extrato na forma de chá, certamente produzirá — dependendo da quantidade ingerida, além de outros fatores — algum efeito sobre o organismo.

A figura 13 mostra também que, a rigor, não há nenhuma diferença entre o efeito sobre a ATP-ase de mitocôndrias intatas e mitocôndrias rompidas por congelamento. Ambas as preparações são sensíveis ao steviosídeo e ao extrato aquoso, não havendo aqui, a diferença observada com o atractilato. Vignais *et al.* (22) encontraram que o steviosídeo, bem como o steviol, inibe o transporte de ADP/ATP. Embora os resultados mostrados aqui não desmintam isto, sugerem, no entanto fortemente, que êste não é o único efeito. O que os resultados da figura 13, em combinação com aqueles da figura 12 permitem concluir, diz respeito à possibilidade de o steviosídeo e os demais glicosídeos da planta agirem também de uma maneira mais direta sobre a ATP-ase mitocondrial.

### 3.3.3 Efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo

O steviol, conforme dados de Vignais *et al.* (22), inibe muito mais fortemente a fosforilação oxidativa do que o steviosídeo (30 vezes mais potente). O mesmo também inibe a atividade ATP-ásica de mitocôndrias intatas. Por isto decidiu-se verificar o efeito do seu análogo, o isosteviol, como também o do steviolbiosídeo. Os resultados obtidos com mitocôndrias intatas, encontram-se na figura 14. Observa-se aí, que o isosteviol inibe fortemente a ATP-ase. 50% de inibição ocorrem numa concentração igual a 0,1 mM. O steviolbiosídeo é menos potente, comparável ao steviosídeo: 50% de inibição ocorre a 0,7 mM. Os resultados obtidos com o isosteviol mostrados na figura 14, resultam de medidas de liberação de prótons e são praticamente idênticos aos resultados obtidos ao medir-se a liberação de fosfato. Um teste sobre uma possível alteração do poder tamponante do meio de reação em decorrência da adição de isosteviol ou steviolbiosídeo, permitiu descartar esta possibilidade.

O isosteviol e o steviolbiosídeo também afetam fortemente a ATP-ase de mitocôndrias rompidas por congelamento, a exemplo do que ocorre com o steviosídeo e o extrato aquoso (experiências não mostradas).

Uma comparação dos dados sobre a atividade ATP-ásica e sobre a ativação da respiração pelo ADP, permite a conclusão de que possivelmente se trata do mesmo efeito. Por um lado, raramente se tem comunicado casos nos quais um inibidor da fosforilação oxidativa não tenha também o mesmo efeito sobre a atividade ATP-ásica (ou vice-versa). Em segundo lugar, as mesmas concentrações que produzem considerável inibição da atividade ATP-ásica, produzem também o desaparecimento da ativação da respiração pelo ADP.

### 3.4 Efeito sobre o gradiente protônico induzido pelo succinato

Uma das características essenciais da cadeia respiratória é o ativo deslocamento de prótons para o meio extramitocondrial que o transporte de elétrons provoca. Este ativo deslocamento de prótons resulta normalmente na formação de um gradiente de pH entre o interior da mitocôndria e o meio externo. Isto se deve ao fato de a membrana mitocondrial ser, em condições normais, bem pouco permeável a prótons, como aliás a cátions em geral (46, 47). A manutenção de um gradiente é por isto mesmo, a resultante da natureza distinta do fluxo de prótons em ambas as direções. A ejeção ativa, dependente do transporte de elétrons é, logo ao iniciar-se a respiração, mais rápida que o refluxo passivo. Será necessário um considerável gradiente de concentração para que o refluxo passivo equilibre com a ejeção ativa (fase estacionária). Um colapso parcial do gradiente formado, pode ser provocado por uma maior disponibilidade de aceptores de fosfato (ADP), fato que tem sido uma das bases da teoria quimioosmótica da fosforilação oxidativa, proposta por Mitchell (46,50).

A reduzida permeabilidade da membrana mitocondrial a prótons e outros cátions em geral, pode ser aumentada por agentes químicos específicos. Assim, a adição de valinomicina torna a membrana mitocondrial (como aliás a membrana plasmática também), consideravelmente mais permeável ao  $K^+$  (45). A valinomicina está incluída entre os chamados ionóforos, substâncias em geral não relacionadas, as quais possuem a capacidade de aumentar seletivamente a permeabilidade das membranas a certos cátions. No caso particular dos íons hidrogênio ( $H^+$ ), as substâncias que possuem capacidade de aumentar

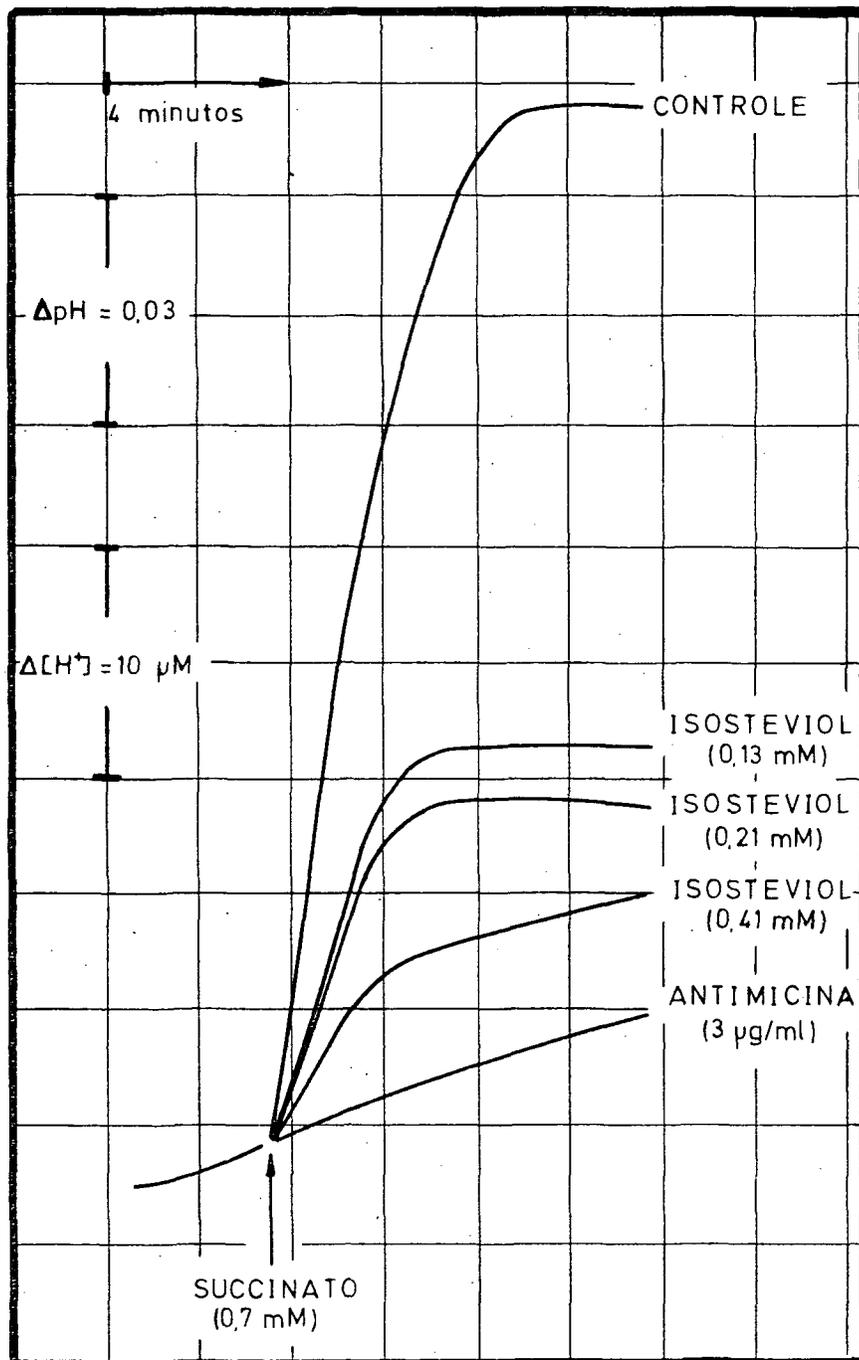


Figura 15. Efeito do isosteviol e da antimicina sobre o efluxo de prótons induzido pelo succinato em mitocôndrias intatas. As mitocôndrias (0,9 mg de proteína/ml) foram incubadas em meio contendo KCl 0,15 M e TRIS 1 mM, com pH inicial igual a 7,4 na ausência (controle) ou na presença de isosteviol e antimicina, nas concentrações indicadas. O meio continha também rotenona 7  $\mu\text{M}$ . Após alguns minutos de estabilização, succinato foi adicionado, conforme indicado pela seta. O efluxo de prótons foi registrado graficamente conforme consta em *Materiais & Métodos*.

a permeabilidade das membranas para com os mesmos, estão, em sua maioria, incluídas no rol dos desacopladores da fosforilação oxidativa (63,68). Nem todos os agentes desacoplantes da fosforilação oxidativa aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial aos íons hidrogênio. Um exemplo clássico disto é o arseniato (63). Esta propriedade destes agentes é no entanto de tal frequência, que já se tornou comum o emprego da expressão "protonóforos" para designá-los (63). Pela teoria quimio-osmótica, o desacoplamento da fosforilação oxidativa pelos agentes que aumentam a permeabilidade da membrana aos prótons é explicado como uma consequência do colapso do gradiente de pH, o qual para esta teoria, joga papel fundamental (46).

Um grande aumento na permeabilidade da membrana aos prótons, faz com que os íons  $H^+$  ejetados ativamente pela atividade respiratória retornem rapidamente. Isto diminui ou impede totalmente a formação do gradiente, tudo dependendo do grau em que a permeabilidade da membrana aos prótons foi afetada. A consequência é também um aumento na atividade respiratória, devido à inexistência ou à reduzida importância do gradiente protônico (63).

O desacoplamento pode pois — caso os valores da razão ADP/O e do RC não sejam confiáveis — ser evidenciado por dois fenômenos básicos: colapso do gradiente protônico e aumento na atividade respiratória. Estes dois fenômenos, se ocorrerem simultaneamente, são indicativos seguros de um desacoplamento. Levando estas considerações em conta, decidiu-se verificar o efeito dos compostos em estudo neste trabalho, sobre o gradiente protônico induzido por substrato oxidável em mitocôndrias de fígado de rato. Este propósito é tanto mais justificado, quando se recorda, que em experiências com mitocôndrias intatas, ativações no consumo de oxigênio foram de fato observadas (ver item 3.1).

Para as experiências escolheu-se, a exemplo de Villalobo & Lehninger (44), o succinato como doador de elétrons. Isto permite conduzir as experiências na presença de rotenona, a qual impede a passagem de elétrons vindos de substratos  $NAD^+$ -dependentes, o que por sua vez permite a obtenção de uma linha base menos sujeita a variações impostas por substrato endógeno. Cumpre acrescentar ainda, que as medidas feitas para este trabalho pretendem ser apenas comparativas, isto é, não se pretende aqui avaliar

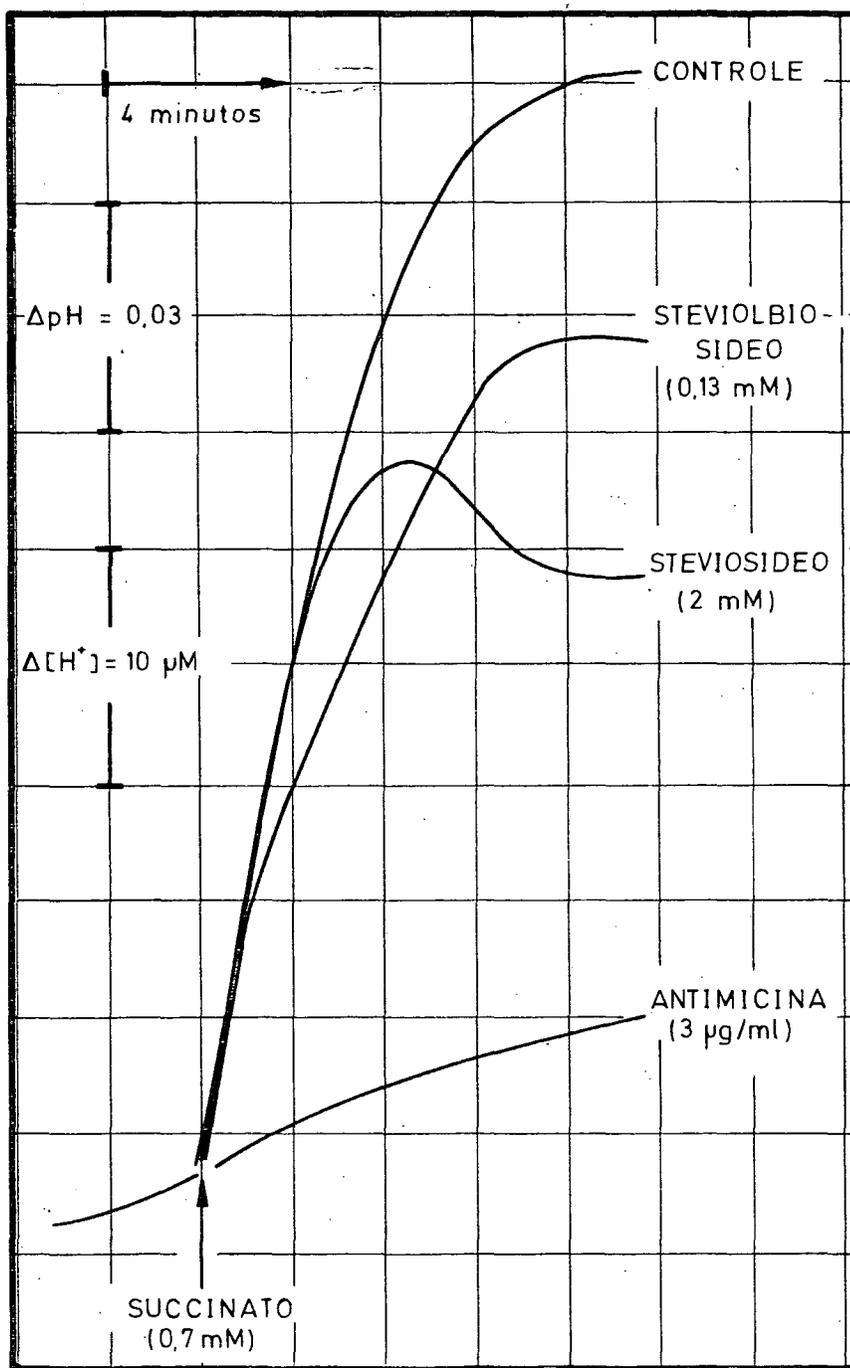


Figura 16. Efeito do steviolbiosídeo, steviosídeo e da antimicina sobre o efluxo de prótons induzido pelo succinato, em mitocôndrias intatas. As mitocôndrias (0,9 mg/ml) foram incubadas em meio contendo KCl 0,15 M, TRIS 1 mM, rotenona 7  $\mu M$ , com pH inicial igual a 7,4, na ausência (controle) ou na presença de steviolbiosídeo, steviosídeo ou antimicina, nas concentrações indicadas. O efluxo de prótons, iniciado pela adição de succinato, foi registrado graficamente, conforme descrito em *Materiais & Métodos*.

razões  $\Delta H^+/e^-$  ou outros parâmetros, o que teria que ser objeto de outro estudo mais detalhado e específico (46,67).

A figura 15 mostra o resultado de uma experiência, na qual se adicionou succinato 0,7 mM a uma suspensão mitocondrial tratada previamente com rotenona. Na ausência de qualquer outra adição, pode-se verificar que o meio externo sofre considerável acidificação ( $-\Delta pH \approx 0,12$ ), resultante da ejeção de 50 nions-grama de  $H^+$  por mg de proteína. Após esta quantidade ter sido ejetada, o pH tende a permanecer estacionário. A adição de antimicina, a qual inibe o fluxo de elétrons vindos do succinato, reverte o gradiente (não mostrado). Se as mitocôndrias já tinham sido incubadas com antimicina antes da adição de succinato, a adição deste último não provoca quase nenhuma acidificação do meio externo. Estas observações provam que o gradiente formado realmente é decorrência do transporte de elétrons vindos do succinato. No caso do isosteviol, interessa justamente o efeito de concentrações que provoquem ou uma ativação ou que não possuem nenhum efeito sobre a respiração, já que também uma inibição da respiração pode levar a uma inibição na formação do gradiente. Por isto, foram investigadas concentrações de isosteviol até 0,4 mM, as quais provocam ativação na respiração, ou permanecem sem efeito (figura 7B). O que a figura 15 permite reconhecer claramente é que o isosteviol, numa concentração igual a 0,13 mM, já tem pronunciado efeito sobre a formação do gradiente, pois o mesmo já fica reduzido a um terço do controle. Aumentos da concentração, até 0,41 mM, trazem um incremento no efeito inibidor. Parece pois claro, que o isosteviol afeta a permeabilidade da membrana aos prótons, já que a respiração é aumentada ou permanece a mesma nas concentrações testadas.

Embora de maneira menos sistemática que no caso do isosteviol, também o efeito do steviosídeo e do steviolbiosídeo foi investigado. As concentrações escolhidas obedeceram ao mesmo critério que prevaleceu no caso do isosteviol. Uma análise da figura 8B mostra que a ativação da respiração com succinato (na ausência de DNP) pelo steviolbiosídeo possui um máximo em torno de 0,15 mM. Para o steviosídeo (conforme figura 10B), a concentração correspondente estaria entre 1,5 e 3 mM, embora neste caso não haja ativação. A figura 16 mostra alguns dos traçados obtidos com o steviolbiosídeo 0,13 mM e com o steviosídeo 2 mM. Como se vê, ambos exercem efeito inibidor. O efeito do steviolbiosídeo 0,13 mM porém é bem me-

nor que o observado com isosteviol 0,13 mM. Estas concentrações são aproximadamente aquelas que provocam máxima ativação no consumo de oxigênio (figuras 7B e 8B). O efeito do steviosídeo também é menos pronunciado que o do isosteviol. O steviolbiosídeo e o steviosídeo provocam também alterações na forma da curva (dependência do tempo). Não há porém dados que permitam tirar conclusões acerca das causas de tal comportamento. O certo é que, o steviolbiosídeo, o steviosídeo e também o isosteviol, em vista dos dados de medidas de respiração e de efluxo de prótons, parecem exercer, ao menos em certo grau, efeito desacoplante. Com o isosteviol, o efeito parece ser mais pronunciado que no caso dos outros dois compostos.

### 3.5 Efeito sobre o *swelling* mitocondrial

Intimamente relacionado ao deslocamento vetorial de prótons, induzido por substratos oxidáveis ou por ATP, está o fenômeno osmótico entumescimento (*swelling*) das mitocôndrias (41,67). Alterações no volume mitocondrial podem ser provocadas experimentalmente de várias maneiras. De um modo geral, no entanto, pode-se dizer que o *swelling* depende principalmente do fluxo de elétrons, seja em direção ao oxigênio (substratos fornecedores de elétrons) seja na direção contrária (ATP). O gradiente protônico criado pela energia derivada do transporte eletrônico pode fazer com que ácidos carboxílicos — como o ácido acético —, que são ácidos fracos, sofram uma redistribuição entre os espaços intra- e extramitocondrial. O íon acetato, por exemplo, distribui-se entre os espaços intra- e extramitocondrial de acordo com a diferença de pH — isto é,  $[\text{acetato}]_i / [\text{acetato}]_e = 10^{\text{pH}_i - \text{pH}_e}$  onde os índices "i" e "e" estão para o espaço intra- e extramitocondrial, respectivamente. A forma protonada, por outro lado, por ser neutra, distribui-se igualmente entre os dois espaços (68). Isto se deve ao fato de a forma protonada ser a forma permeante, isto é, o influxo ou o efluxo de acetato sempre é acompanhado de um próton. Uma acidificação do meio externo leva, por conseguinte, a um aumento na concentração de acetato no interior da mitocôndria. A pressão osmótica gerada por este aumento é o principal fator responsável pelo inchamento (*swelling*) da organela. Dependendo das condições, o processo de *swelling* pode ser complicado com a participação de cátions permeáveis, quais sejam o  $\text{Ca}^{2+}$  ou o  $\text{K}^+$  mais valinomicina (41,67).

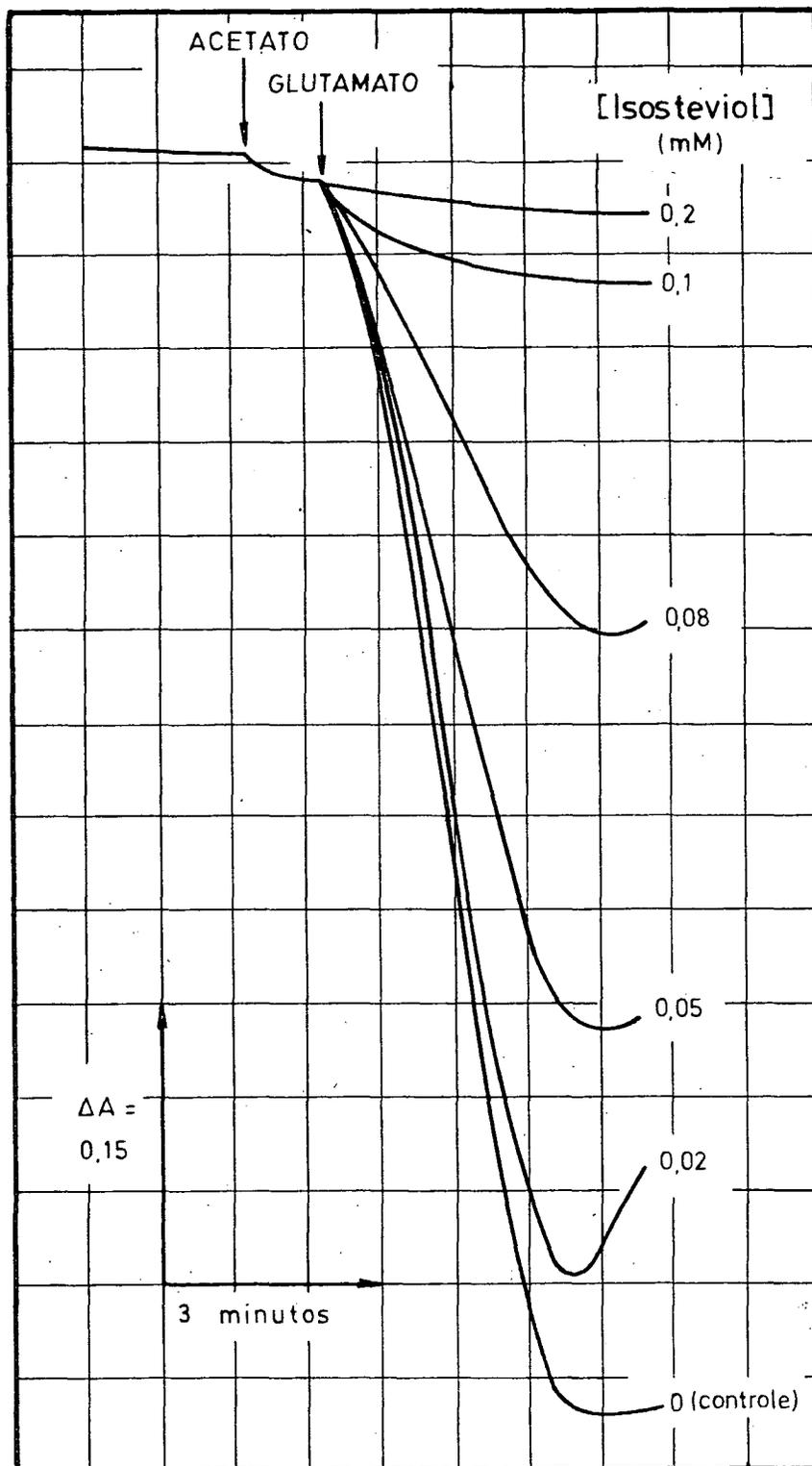


Figura 17. Efeito do isosteviol sobre o swelling mitocondrial induzido por L-glutamato. A absorbância da suspensão mitocondrial foi registrada (575 nm). As mitocôndrias foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações de isosteviol, conforme indicado na figura. Acetato (20 mM) e L-glutamato (10 mM) foram adicionados conforme indicado. O meio de incubação continha: sacarose 0,1 M, EDTA 0,3 mM, TRIS 10 mM a pH 7,3. Proteína mitocondrial: 0,7 mg/ml.

As medidas de *swelling* deste trabalho foram feitas utilizando o procedimento descrito por Mustafa *et al.* (67). As mitocôndrias, preparadas como descrito em *Materiais & Métodos* (Ítem 2.2.2) foram incubadas em sacarose 100 mM, tamponada com TRIS 10 mM, a pH 7,3, contendo também EDTA 0,3 mM. Nenhum cátion permeante foi adicionado, utilizando-se acetato como ânion permeante. Um estudo sistemático foi feito utilizando o isosteviol. Os outros compostos foram investigados apenas esporadicamente.

### 3.5.1 Efeito sobre o *swelling* induzido por L-glutamato

A figura 17 mostra o efeito do isosteviol sobre a extensão do *swelling* causado pela respiração dependente do L-glutamato. Como também nas demais experiências, a absorbância a 575 nm foi registrada. As mitocôndrias inicialmente incubadas em meio apropriado, ao qual, conforme o caso, já se tinha adicionado isosteviol. O isosteviol (como também o steviolbiosídeo) não provoca por si só, nenhuma alteração no volume mitocondrial, ao menos nas condições normais dos experimentos mostrados aqui. A figura 17 mostra que após a adição de acetato, seguida da adição de L-glutamato, as mitocôndrias devem sofrer acentuado aumento de volume, já que a absorbância decresce em 0,65 de unidade. A adição de rotenona reverte totalmente o *swelling* (não mostrado) o que prova que o mesmo é dependente da transferência de elétrons via NADH-desidrogenase. O mesmo ocorre com o 2,4-dinitrofenol. A pré-incubação com diferentes concentrações de isosteviol, por outro lado, leva a uma progressiva diminuição do grau de entumescimento. Já com concentrações entre 50 e 80  $\mu\text{M}$  há 50% de inibição. Com isosteviol 0,2 mM, não há mais praticamente nenhum decréscimo em absorbância após a adição de L-glutamato. Como se vê, a sensibilidade do entumescimento induzido pelo L-glutamato ao isosteviol é bastante acentuada. Uma comparação entre os dados da figura 17 e os da figura 7A mostra que a concentração de isosteviol que já provoca completa inibição do *swelling*, causa também máxima (ou quase máxima) ativação da respiração acoplada, dependente do L-glutamato. Este fato vem em apóio à idéia de que o isosteviol age como desacoplante nestas baixas concentrações, já que uma ativação da respiração sem desacoplamento não deveria, em princípio, levar a uma inibição do *swelling*.

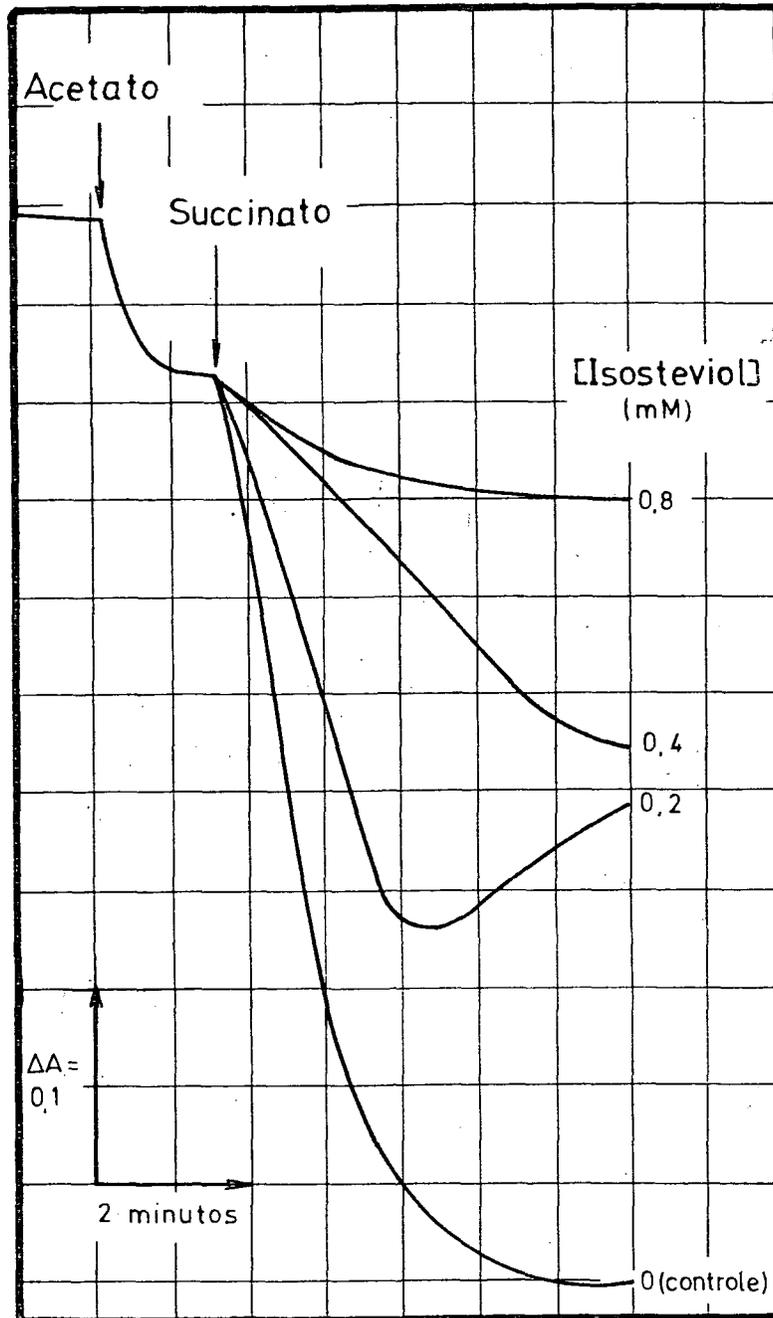


Figura 18. Efeito do isosteviol sobre o swelling mitocondrial induzido pelo succinato. As condições de incubação e o procedimento experimental estão descritos na legenda da figura 17. As concentrações de isosteviol estão indicadas; a concentração de succinato foi igual a 10 mM, a de rotenona 12,5  $\mu$ M e a concentração de proteína mitocondrial foi igual a 0,6 mg por ml.

O efeito do steviolbiosídeo também foi investigado (experiências não mostradas). Este composto afeta igualmente o *swelling* dependente do L-glutamato, sendo porém menos eficiente que o isosteviol. 50% de inibição foi observada com concentrações em torno de 0,2 mM. Concentrações um pouco acima de 0,4 mM já impedem quase que totalmente o entumescimento induzido pelo L-glutamato. A interpretação destes resultados não é muito fácil. Isto se deve ao fato de o steviolbiosídeo induzir uma fase de retardo na curva de dependência do tempo (ver figura 8A). Esta fase é relativamente curta com concentrações abaixo de 0,2 mM. É porém mais longa com concentrações maiores. A inibição do *swelling* com altas concentrações deve-se certamente à inibição da respiração, após ou durante a fase de retardo. Em baixas concentrações, onde há uma recuperação rápida, é possível que outros fatores — desacoplamento, por exemplo — tenham papel predominante.

### 3.5.2 Efeito sobre o *swelling* dependente do succinato

As experiências referentes ao entumescimento induzido pela oxidação do succinato oferecem a possibilidade interessante de uma comparação das mesmas com os dados do efluxo de prótons, expostos nas figuras 15 e 16. Como no caso do L-glutamato, o efeito do isosteviol foi preferencialmente investigado. Os resultados desta investigação encontram-se representados na figura 18. Estes dados foram obtidos na presença de rotenona. Cumpre dizer, porém, que experiências sem rotenona (não mostradas) produziram resultados de todo semelhantes. O *swelling* induzido pelo succinato é totalmente sensível à antimicina, o que prova a sua dependência da transferência de elétrons. Como se pode deduzir da figura 18, o isosteviol 0,2 mM afeta fortemente o entumescimento dependente do succinato (aproximadamente 50%). Com 0,4 mM o efeito acentua-se e com 0,8 mM já não há mais quase *swelling* algum. Cumpre comentar, que a sensibilidade ao isosteviol, neste caso, é menor do que em relação ao L-glutamato (compare figuras 17 e 18).

Para a análise do efeito do isosteviol, melhor se fará em comparar os resultados das experiências representadas na figura 7B (respiração na ausência de desacoplante), na figura 15 (efluxo de prótons) e na figura 18 (*swelling*). Desta comparação resulta a constatação de que o isosteviol, numa concentração em torno de 0,2 mM, ao mesmo tempo em que ativa a res-

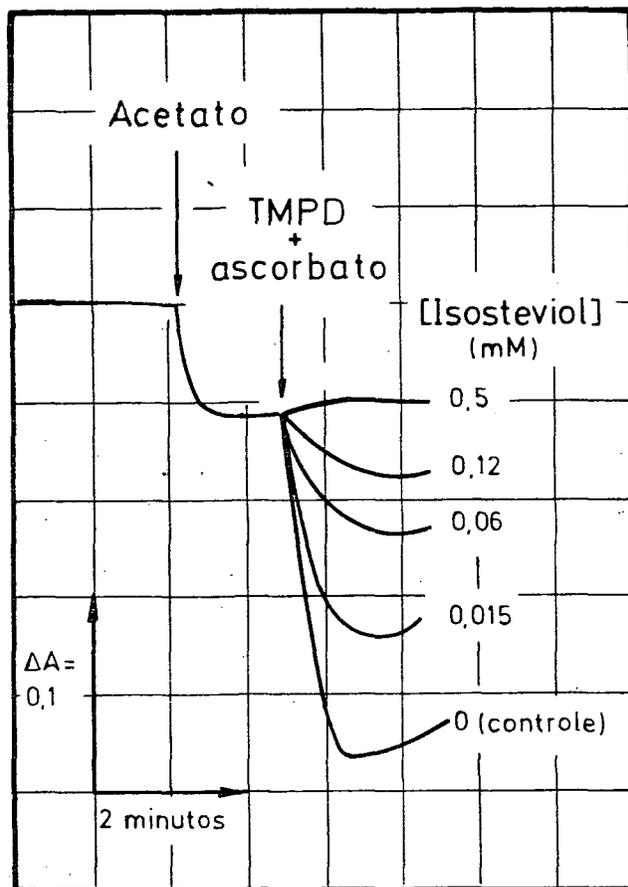


Figura 19. Efeito do isosteviol sobre o swelling mitocondrial induzido por TMPD + ascorbato. As condições de incubação e o procedimento experimental estão descritos na legenda da figura 17. As mitocôndrias foram incubadas na presença de antimicina (5  $\mu\text{g/ml}$ ) e na presença de várias concentrações de isosteviol, conforme indicado. As concentrações de TMPD e ascorbato foram 1,2 mM e 10 mM, respectivamente. A concentração de proteína mitocondrial foi igual a 0,7 mg por ml.

piração, promove também um colapso no gradiente protônico e inibe o trabalho osmótico. Estes novos dados experimentais, conseqüentemente, vem dar apoio à interpretação dada aos dados de respiração (ver ítem 3.1.1).

O efeito do steviolbiosídeo, o qual também afeta o estabelecimento do gradiente protônico (figura 16), foi igualmente investigado (resultados não mostrados). Como já ocorreu em relação ao L-glutamato, também o *swelling* dependente do succinato é afetado pelo steviolbiosídeo. O efeito porém é menos pronunciado que o do isosteviol, a exemplo do que ocorre com o estabelecimento do gradiente de pH (figura 16). Independente disto, os resultados, vistos como um todo, são coerentes e parecem indicar que um certo grau de desacoplamento, mesclado talvez com outros efeitos sobre a membrana, é realmente causado pelo steviolbiosídeo.

### 3.5.3 Efeito sobre o *swelling* induzido por TMPD + ascorbato

Conforme mostram Mustafa *et al.* (67), também a adição de ascorbato juntamente com TMPD pode induzir as mitocôndrias ao inchamento. O ascorbato pode ceder seus elétrons em vários pontos ao longo da cadeia respiratória(52). O bloqueio entre o citocromo b e o citocromo c<sub>1</sub> pela antimicina, no entanto, reduz os pontos de entrada à citocromo c-oxidase. Já se mencionou que o isosteviol não inibe a respiração dependente de TMPD+ascorbato. Ao contrário, há uma pequena ativação em mitocôndrias acopladas. Um efeito inibidor sobre o *swelling* induzido pelo ascorbato mais TMPD, viria pois corroborar as conclusões em favor de um efeito desacoplante deste composto.

Com efeito, conforme mostra a figura 19, o entumescimento dependente do TMPD+ascorbato — sensível também ao cianeto — é bastante sensível ao isosteviol. Concentrações abaixo de 0,1 mM já causam 50% de inibição no decréscimo de absorbância. Com 0,5 mM, nada mais ocorre. Mais uma vez deve-se destacar que isto ocorre paralelamente a um efeito ativador — embora pequeno — sobre a respiração, o que reforça a interpretação que vem sendo dada neste trabalho a respeito da ação do isosteviol.

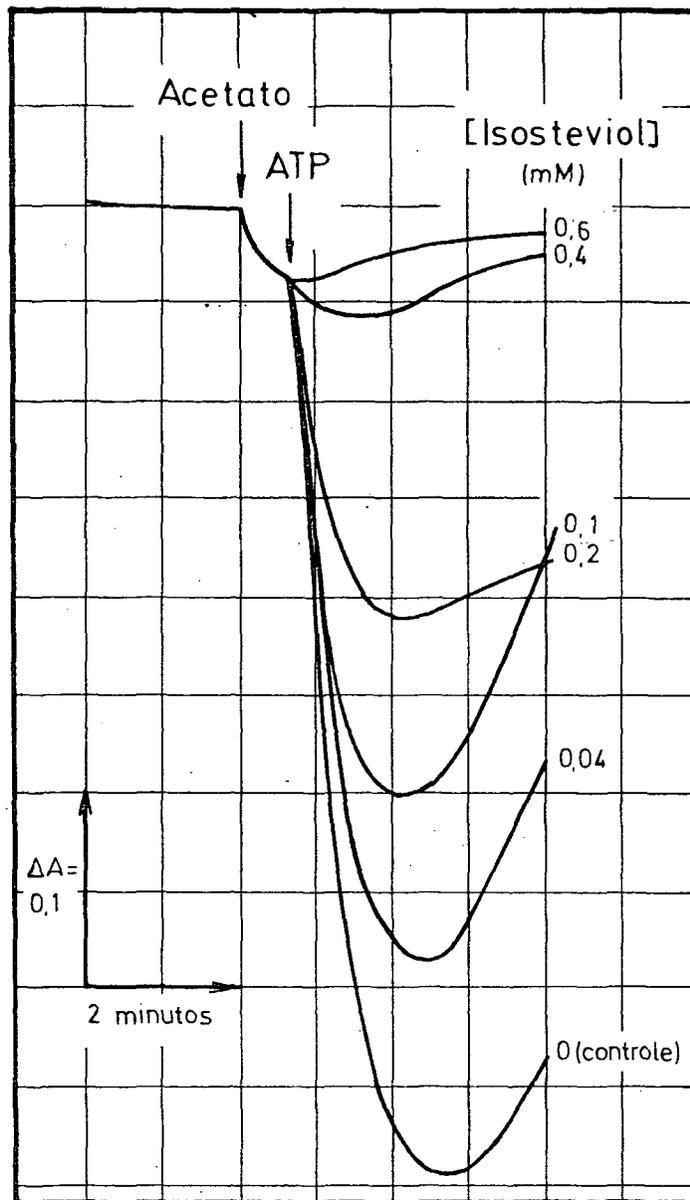


Figura 20. Efeito do isosteviol sobre o swelling mitocondrial induzido pelo ATP. As condições de incubação estão descritas na legenda da figura 17. As concentrações de isosteviol estão indicadas; a concentração de ATP foi igual a 1 mM. Proteína mitocondrial: 0,6 mg por ml.

#### 3.5.4 Efeito sobre o *swelling* induzido pelo ATP

Conforme já se discutiu no ítem 3.3, a atividade ATP-ásica leva à ejeção ativa de prótons, formando-se um gradiente de pH. Consequentemente, a adição de um ânion permeante como o acetato, leva também neste caso a um entumescimento (50,67). Esta alteração no volume mitocondrial, como é dependente da hidrólise do ATP, é sensível à oligomicina (que inibe a ATP-ase) e ao atractilosídeo (o qual impede o acesso do ATP à ATP-ase).

Como todos os compostos investigados neste trabalho — inclusive o extrato aquoso total — afetam a atividade ATP-ásica e a fosforilação oxidativa, é de se esperar também que afetem o *swelling* induzido pelo ATP. Como composto representativo, escolheu-se, no entanto, o isosteviol, já que com relação ao *swelling* induzido por outros substratos, os dados mais completos disponíveis referem-se justamente a este composto, o qual parece ser o mais eficiente. Os resultados de uma experiência, na qual a concentração de isosteviol foi variada sistematicamente até 0,6 mM, podem ser vistos na figura 20. Pode-se ver que o entumescimento induzido pelo ATP é de fato afetado. Com concentrações de isosteviol entre 0,1 e 0,2 mM, observou-se já 50% de inibição no decréscimo da densidade ótica. Com 0,6 mM, já não há mais *swelling* algum. Estes dados corroboram os efeitos observados sobre a atividade ATP-ásica e a fosforilação oxidativa.

#### 3.6 Efeito sobre atividades enzimáticas

Os dados obtidos em medidas de respiração sugerem a possibilidade de vários efeitos sobre atividades enzimáticas. Os efeitos podem situar-se tanto a nível da cadeia respiratória como a nível das enzimas localizadas na matriz mitocondrial. A fim de obter uma idéia acerca do efeito dos compostos em investigação, bem como do extrato aquoso total, procedeu-se a medidas sistemáticas da atividade de várias enzimas. Para estas medidas preliminares estabeleceu-se como padrão, a comparação das velocidades de reação na ausência (controle) e na presença de isosteviol 0,5 mM, steviolbiosídeo 0,5 mM e steviosídeo 1 mM. Os resultados estão expostos na Tabe-

TABELA I

Efeito do isosteviol (0,5 mM), do steviolbiosídeo (0,5 mM) e do steviosídeo (1 mM) sobre diversas atividades enzimáticas. A metodologia e os sistemas de ensaio estão descritos em *Materiais e Métodos*. Exceto quando indicado, as fontes de enzima, são mitocôndrias de fígado de rato.

Atividade enzimática	Porcentagem de inibição		
	isosteviol (0,5 mM)	steviolbiosídeo (0,5 mM)	steviosídeo (1 mM)
ATP-ase mitocondrial (mitocôndrias intatas) .....	80	45	50
NADH-oxidase .....	85	40	0
Succinato-oxidase .....	24	11	8
Succinato desidrogenase (ferricianeto-redutase) ..	24	10	10
NADH citocromo c-redutase (1) .....	82	50	0
L-glutamato desidrogenase (NADH) (2) .....	80	60	0
L-glutamato desidrogenase (NADPH) (2) .....	75	60	0
Citocromo c-oxidase .....			
Hexoquinase (3) .....			
Fumarase .....			
Isocitrato desidrogenase (NAD <sup>+</sup> -dependente) .....	0	0	0
Isocitrato desidrogenase (NADP <sup>+</sup> -dependente) .....			
L-malato desidrogenase mitocondrial .....			
NADH-desidrogenase (ferricianeto-redutase) .....			

(1) Calculado sobre a porção sensível à rotenona.

(2) Enzima de fígado de rato ou de fígado bovino.

(3) Extraída de levedura.

la I, juntamente com os dados correspondentes ao efeito sobre a atividade de ATP-ásica, já descritos no ítem 3.3.

### 3.6.1 Atividades enzimáticas ligadas à cadeia respiratória

Utilizando-se mitocôndrias rompidas por congelamento, foram testadas a NADH-oxidase, a NADH-desidrogenase, a succinato-oxidase, a succinato-desidrogenase, a NADH-citocromo c-redutase e a citocromo c-oxidase. Um exame da Tabela I revela que apenas a NADH-desidrogenase e a citocromo c-oxidase não são afetadas pelo isosteviol e pelo steviolbiosídeo. Em relação ao steviosídeo, por outro lado, a mesma análise revela que apenas a succinato desidrogenase e a succinato-oxidase são por ele inibidas.

A *NADH-oxidase* é mais sensível ao isosteviol que ao steviolbiosídeo (85% e 40% de inibição, respectivamente, para uma concentração igual a 0,5 mM de ambos os compostos). A figura 21 mostra o procedimento experimental para a dosagem espectrofotométrica, além de algumas características da inibição. Como se percebe, a adição de isosteviol causa inibição imediata, não havendo pois dependência do tempo após a adição do inibidor. A adição de ferricianeto, no entanto, provoca imediata oxidação do NADH remanescente. Neste ponto aliás, a inibição pelo isosteviol apresenta grande semelhança para com a inibição provocada pela rotenona. Como se vê também na figura 21, a adição de ferricianeto após a rotenona — a qual inibe quase que totalmente a oxidação de NADH — também provoca imediata oxidação do NADH, o que significaria que a transferência de elétrons do NADH para o ferricianeto não é afetada. Os efeitos do isosteviol e da rotenona também apresentam semelhança em outro aspecto. As mitocôndrias rompidas por congelamento podem perder em parte a sensibilidade à rotenona. Isto se dá por envelhecimento, principalmente se a suspensão for submetida a sucessivos congelamentos e descongelamentos. Esta perda de sensibilidade à rotenona é acompanhada também por uma perda de sensibilidade ao isosteviol e ao steviolbiosídeo. Isto sugere no mínimo que a inibição pelo isosteviol e pela rotenona exige que o sistema enzimático se apresente nas mesmas condições, podendo, no entanto, também significar que ambos possuem sítios de ação muito próximos ou mesmo coincidentes.

Surpreendentemente, o steviosídeo não exerce qualquer efeito inibidor sobre a NADH-oxidase até uma concentração igual a 1 mM. Uma inibição seria de se esperar com base nas inibições do isosteviol e do steviolbiosídeo (semelhança estrutural), combinadas com os dados da respiração dependente do L-glutamato em mitocôndrias desacopladas. Como se recorda (figura 10A), o steviosídeo inibe a respiração com L-glutamato como substrato. No tocante à NADH-oxidase, no entanto, em concentrações acima de 1 mM, passa a ocorrer inclusive uma ativação. Com efeito, o steviosídeo 1,8 mM provoca 30% de ativação; com steviosídeo 5 mM, esta ativação sobe a quase 60% sobre o controle.

A NADH-oxidase também é afetada pelo extrato aquoso. Uma análise desta inibição é feita mais adiante, juntamente com um estudo cinético da inibição da NADH-oxidase pelo isosteviol e steviolbiosídeo.

Como se vê na figura 21, medidas da velocidade de reação da *NADH-dehidrogenase* — tendo o ferricianeto como acceptor de elétrons (51) — requerem que se utilize quantidade bem menor de enzima, já que o ferricianeto oxida o NADH com extrema rapidez. Com efeito, com 5 µg de proteína por ml do meio de incubação a velocidade de reação (medindo-se a redução do ferricianeto a 420 nm) ainda é apreciável. As medidas feitas, conforme a Tabela 1, não revelaram nenhum efeito por parte dos três compostos em estudo.

Outra atividade enzimática importante é a da *succinato oxidase*. Esta enzima exige dosagem polarográfica (51). A NADH-oxidase também pode ser dosada polarograficamente. Uma comparação do efeito do isosteviol sobre os dois sistemas (que utilizam em parte percurso comum em direção ao oxigênio) pode ser vista na figura 22. Ao lado dos dois controles (com succinato ou NADH apenas), pode-se ver a resposta do consumo de oxigênio à adição de NADH na presença de isosteviol 0,4 mM. A inibição é muito forte e coincide com os graus de inibição obtidos com a dosagem espectrofotométrica. A adição de succinato 7 mM provoca, no entanto, considerável aumento na velocidade do consumo de oxigênio. Isto já demonstra a considerável diferença entre os efeitos sobre a NADH-oxidase e a succinato-oxidase. A sensibilidade da succinato-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento varia grandemente de preparação para preparação, ao contrário da

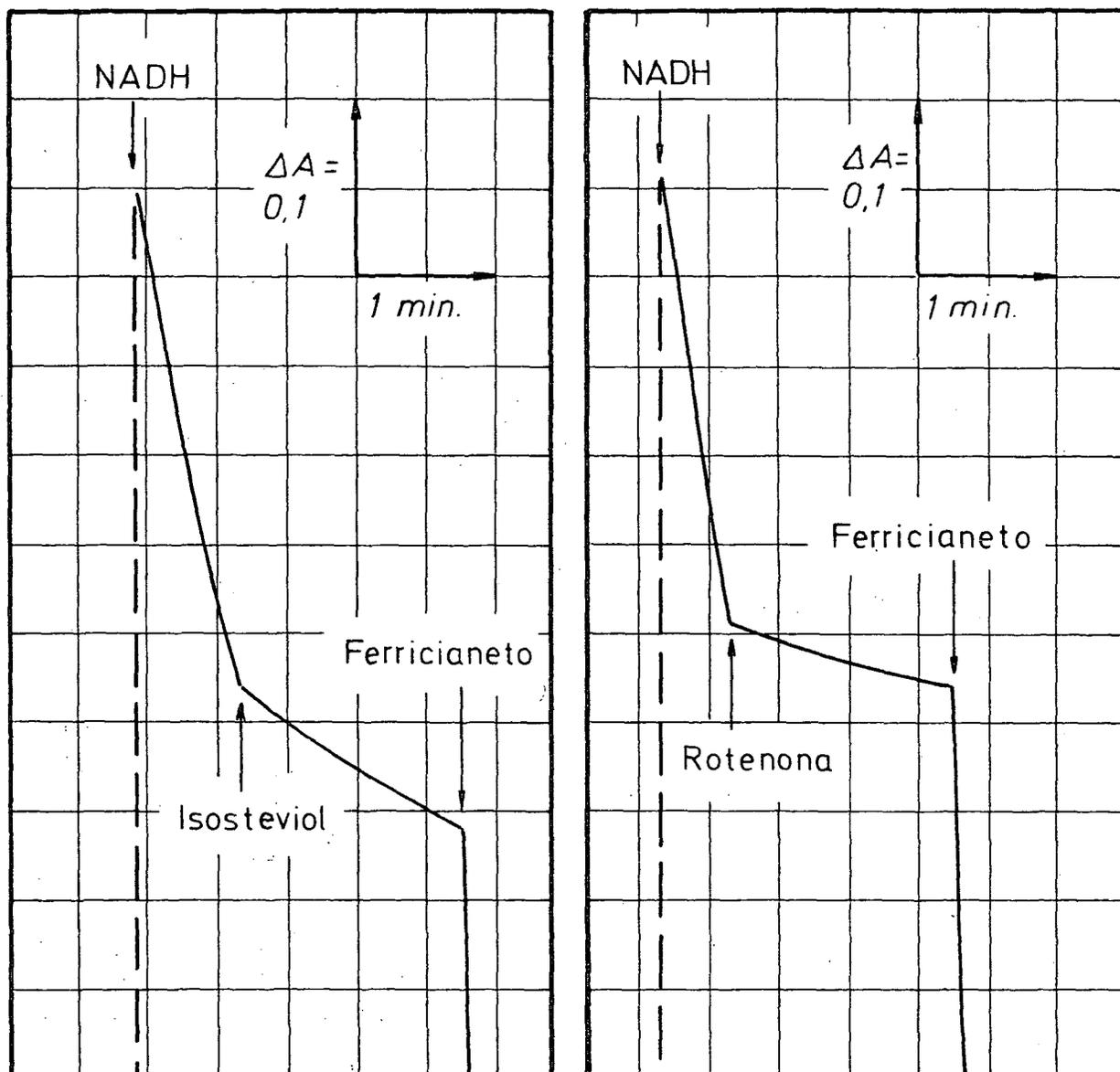


Figura 21. Comparação do efeito do isosteviol e da rotenona sobre a NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. 150  $\mu\text{g}$  de proteína por ml foram incubadas à temperatura ambiente ( $\approx 20^\circ\text{C}$ ) em meio contendo TRIS 20 mM, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de NADH 0,15 mM, fazendo-se subsequentes adições de isosteviol 0,5 mM, ferricianeto 1 mM e rotenona 12,5  $\mu\text{M}$ , conforme indicado.

NADH-oxidase, que apresenta apenas variações mínimas. Por isto, os valores da Tabela I, referentes ao efeito sobre a succinato-oxidase representam a média de várias medidas (entre 7 e 15 medidas). Como se vê aí, 24% e 11% de inibição ocorrem em média com isosteviol e steviolbiosídeo 0,5 mM, respectivamente. Aumentos na concentração, como é de se esperar, traduzem-se num aumento do grau de inibição. Também o steviosídeo exerce algum efeito neste caso: 8% de inibição foram observados com uma concentração igual a 1 mM. O grau de inibição aumenta com incrementos na concentração.

Ao contrário do que ocorre com relação ao NADH, a transferência de elétrons do succinato ao ferricianeto também é afetada pelos compostos. Na presença de antimicina A, bem como na ausência de NADH, a redução do ferricianeto com elétrons vindos do succinato é uma medida da atividade da *succinato-desidrogenase*, já que o ferricianeto aceita elétrons ao nível da flavoproteína (51). Os dados obtidos revelam que a succinato-desidrogenase é afetada em grau praticamente idêntico à succinato-oxidase (Tabela I).

Sobre a velocidade de redução do ferricitocromo c pelo NADH (*NADH-citocromo c-redutase*; complexos I a III) o isosteviol provoca cerca de 60% de inibição quando presente numa concentração igual a 0,5 mM. Isto poderia levar à conclusão de que as sensibilidades da NADH-oxidase — complexos I a IV — e da NADH-citocromo c-redutase — complexos I a III — são distintas. Isto é, no entanto, mais aparente do que real. Ocorre que o citocromo c — principalmente quando a membrana está em processo de desagregação — pode aceitar elétrons também da flavoproteína, principalmente quando não se adiciona fosfolípidos ao sistema (51,53). Esta transferência de elétrons não é sensível à rotenona, ao contrário da transferência via complexos I a III, a qual é afetada. A porção sensível à rotenona é portanto uma medida da percentagem de elétrons que chegam ao citocromo c através dos complexos I e III. No caso das mitocôndrias rompidas por congelamento, as medidas feitas neste trabalho revelaram uma sensibilidade à rotenona em torno de 70%. Uma comparação entre os dados referentes à NADH-oxidase e à NADH citocromo c-redutase requer portanto uma correção, para excluir a porção insensível à rotenona (30% em média). Os dados que constam da Tabela I são justamente os valores corrigidos e uma comparação revela que a NADH-oxidase e a NADH citocromo c-redutase são afetadas em grau de todo semelhante. Isto vale para o isosteviol como também para o steviolbiosídeo. O steviosídeo, como era de se esperar, não

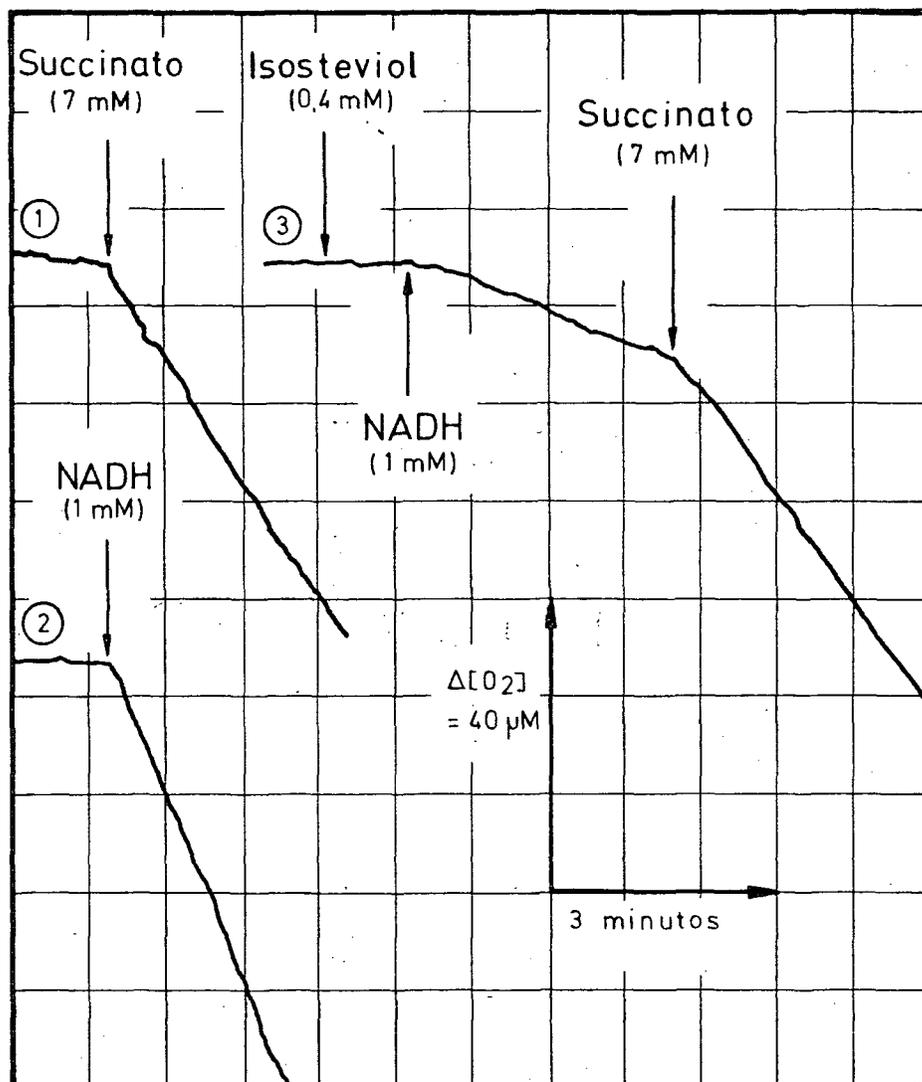


Figura 22. Comparação do efeito do isosteviol sobre a NADH-oxidase e sobre a succinato-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. A atividade da enzima foi medida polarograficamente. 0,5 mg de proteína por ml foram incubadas à temperatura ambiente ( $\approx 20^{\circ}\text{C}$ ), em meio de reação contendo KCl 10 mM, TRIS 20 mM, pH 7,4, fazendo-se adições de NADH, succinato e isosteviol, conforme indicado. Resultados de três incubações separadas, conforme indicado.

exerce nenhum efeito. É altamente provável que a inibição da NADH-oxidase e da NADH-citocromo c-redutase sejam fenômenos idênticos.

A *citocromo c-oxidase* foi dosada utilizando-se a combinação TMPD+ ascorbato para reduzir o citocromo c endógeno, na presença de antimicina (52). Os resultados obtidos não revelaram nenhuma inibição dos três compostos, o que já era de se esperar em virtude das experiências de respiração com mitocôndrias intatas.

As experiências descritas acima, parecem pois indicar que os sítios (ou sítio) de ação localizam-se entre as flavoproteínas (NADH-desidrogenase e succinato-desidrogenase) e a citocromo c-oxidase. Os efeitos sobre a NADH-oxidase e a succinato-oxidase apresentam uma diferença básica em relação à sensibilidade ao isosteviol e ao steviolbiosídeo: a NADH-oxidase é muito mais sensível. Este fato já exclui, por si só, a possibilidade de que se trate integralmente do mesmo fenômeno, isto é, que haja um único sítio de inibição entre as flavoproteínas e a citocromo c-oxidase. Se este fosse o caso, o grau de inibição deveria, *a priori*, ser idêntico para ambas as atividades.

Também a possibilidade de haver um sítio de ação entre a NADH-desidrogenase e a coenzima Q e outro entre a coenzima Q e a citocromo c-oxidase esbarra no fato de que a succinato desidrogenase (com ferricianeto comoceptor de elétrons) também é afetada. Como o efeito é praticamente igual ao verificado com a succinato-oxidase, é mais lógico concluir-se que o sítio de ação localiza-se antes da coenzima Q. Um esclarecimento definitivo desta questão poderá ser obtido a partir de um estudo do efeito sobre a NADH-oxidase: a existência de dois pontos de ação no caminho dos elétrons entre o NADH e o oxigênio traz consequências cinéticas facilmente detectáveis (ver item 3.7).

### 3.6.2 Efeito sobre enzimas solúveis da matriz mitocondrial e outras

Das enzimas solúveis da matriz mitocondrial interessa, para o presente trabalho, a *L-glutamato desidrogenase*, de vez que o L-glutamato foi o

substrato  $\text{NAD}^+$ -dependente utilizado nos estudos de respiração e de *swelling* controlado. Como mostra a Tabela I, a L-glutamato desidrogenase é afetada pelo isosteviol, bem como pelo steviolbiosídeo. O steviosídeo parece não exercer nenhum efeito. A L-glutamato desidrogenase é inespecífica em relação à coenzima: pode utilizar tanto o  $\text{NAD}^+$  (ou  $\text{NADH}$ ) como também o  $\text{NADP}^+$  (ou  $\text{NADPH}$ ). Como se vê na Tabela I, o efeito dos isosteviol e steviolbiosídeo é, a rigor idêntico, não importando a coenzima. Também não importa a direção de reação que se esteja medindo. Tanto a oxidação do  $\text{NAD(P)H}$  (com  $\alpha$ -cetogluturato +  $\text{NH}_4^+$ ), como a reação de redução do  $\text{NAD(P)}^+$  (com L-glutamato) é afetada de maneira quase que idêntica. Não parece importar também a origem da enzima. No presente caso, foram investigadas a L-glutamato desidrogenase contida no extrato bruto de mitocôndrias de fígado de rato (ver *Materiais & Métodos*) e a L-glutamato desidrogenase purificada a partir de fígado bovino (Sigma Co.). Ambas foram afetadas, podendo-se dizer que, a rigor, os resultados são iguais.

O efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo sobre a oxidação do L-glutamato em mitocôndrias intatas, pode pois ser devido também ao efeito destas substâncias sobre a primeira etapa, qual seja, aquela catalizada pela L-glutamato desidrogenase. Dada a sua importância, um estudo mais detalhado foi realizado (ver adiante). Neste estudo, encontra-se também uma análise do efeito do extrato aquoso, o qual também inibe a enzima, a exemplo do que sucede com a  $\text{NADH}$ -oxidase.

O efeito sobre a L-glutamato desidrogenase ensejou alguns testes com outras enzimas solúveis, principalmente desidrogenases, a maioria mitocondrial, mas também algumas citoplasmáticas. Ambas isocitrato desidrogenases (a  $\text{NAD}^+$ -dependente — alostérica — e a  $\text{NADP}^+$ -dependente) não são afetadas. O mesmo vale para a L-malato desidrogenase mitocondrial e para a fumarase. A hexoquinase foi investigada com vistas ao efeito sobre a  $\text{ATP}$ -ase. As reações catalizadas por ambas as enzimas exigem  $\text{ATP}$  o qual é transformado em  $\text{ADP}$ . Parece porém que a identidade de um dos substratos não faz com que ambas sejam afetadas pelos compostos em questão. Deve-se levar em conta, porém, que a hexoquinase utilizada foi a enzima de levedura, pelo que um teste desta e outras hexoquinasas de células de mamíferos ainda permanece como uma possibilidade interessante.

Que a L-glutamato desidrogenase não é a única desidrogenase piridino-nucleotídeo-dependente afetada, foi revelado por estudos preliminares com outra enzima citoplasmática, a L-lactato desidrogenase. Os dados foram obtidos com a enzima purificada de músculo bovino (Sigma). Não constam porém da Tabela I. Ocorre que o efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo apresenta várias complexidades. Parece, por exemplo, que o grau de inibição depende do tempo de incubação, não sendo portanto instantâneo, como é o caso da L-glutamato desidrogenase.

### 3.7 Estudo cinético da inibição da NADH-oxidase

#### 3.7.1 Dependência da concentração dos inibidores

A NADH-oxidase é uma das atividades mais sensíveis à ação do isosteviol e do steviolbiosídeo. Por este motivo, e também com a finalidade de esclarecer alguns pontos do mecanismo desta inibição, decidiu-se realizar um estudo cinético.

Este estudo cinético foi feito medindo-se espectrofotometricamente, a 340 nm a oxidação do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A concentração do outro substrato (ver reação (II), ítem 2.2.8), oxigênio dissolvido no meio de incubação, pode ser encarada como essencialmente constante. Além disto, a concentração — em torno de  $240 \mu\text{M}$  — é também saturante, já que a afinidade da cadeia respiratória para com o oxigênio é extremamente elevada. Para uma análise segura, tomou-se o cuidado de avaliar sempre velocidades iniciais.

A figura 23 mostra o resultado de experiências, nas quais a velocidade inicial de oxidação do NADH foi medida em função da concentração de isosteviol, steviolbiosídeo e steviosídeo. Na figura 23A, as velocidades de reação — expressas como percentagem do controle — estão representadas contra a concentração dos inibidores, enquanto que na figura 23B, o inverso das velocidades de reação está representado em função também da concentração dos inibidores. A figura 23A mostra bem as diferentes sensibilidades da NADH-oxidase aos três compostos. O steviosídeo, conforme consta

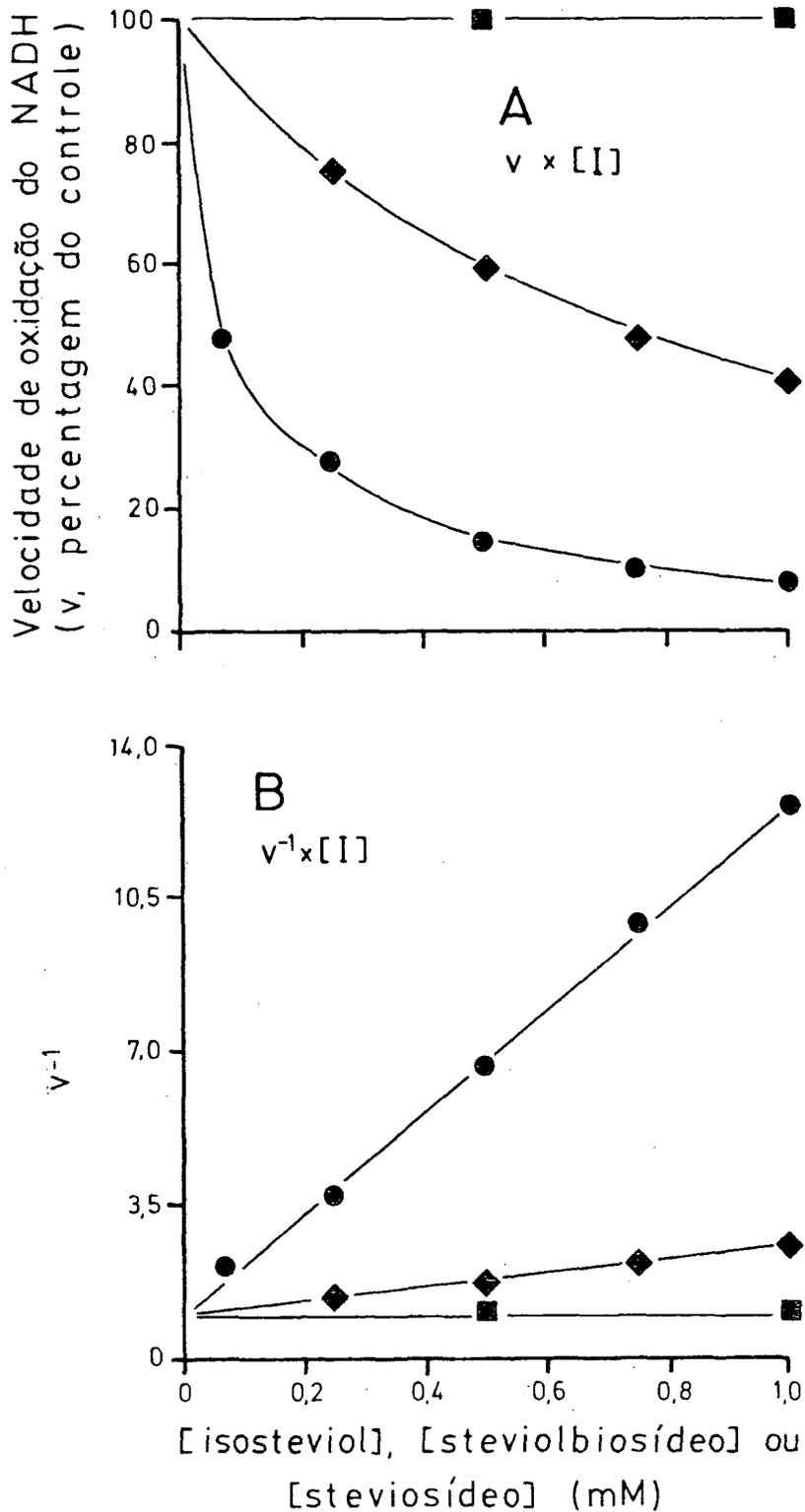


Figura 23. Efeito do steviosídeo (■), do steviolbiosídeo (◆) e do isosteviol (●) sobre a NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. A atividade foi acompanhada espectrofotometricamente a 340 nm. Condições: temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ); concentração de proteína mitocondrial: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; concentração inicial de NADH: 0,15 mM; meio de incubação contendo TRIS 20 mM a pH 7,4. A velocidade (A) ou o inverso da velocidade de reação (B) está representada contra a concentração de isosteviol (●), steviolbiosídeo (◆) ou steviosídeo (■).

também na Tabela 1, é inofensivo. O isosteviol é mais potente que o steviolbiosídeo, sendo que 50% de inibição já ocorre entre 0,1 e 0,15 mM. Com o steviolbiosídeo, uma inibição correspondente só ocorre em concentrações entre 0,6 e 0,7 mM.

Maiores informações fornece a figura 23B. Como se pode verificar, o inverso da velocidade de reação varia linearmente com a concentração dos inibidores. Os dados experimentais descrevem retas quase que perfeitas. Há de se mencionar que o grau de inibição, com isosteviol 1 mM, é de mais de 90%. O fato de a linearidade manter-se até um grau de inibição tão elevado é altamente significativo. Deve-se levar em conta também a heterogeneidade do material — mitocôndrias rompidas por congelamento — e a complexidade do sistema enzimático: trata-se praticamente de toda a cadeia respiratória. A dependência do inverso da velocidade de reação ( $1/v$ ) da concentração dos inibidores ( $[I]$ ) pode pois ser descrita pela relação,

$$1/v = C_1[I] + C_2. \quad (9)$$

Na equação (9),  $C_1$  e  $C_2$  são constantes, funções da concentração dos substratos (mas apenas se a inibição for competitiva ou incompetitiva), das constantes cinéticas — constante de Michaelis e velocidade máxima — e das constantes de inibição (61). O ajuste de mínimos quadrados da equação (9) aos dados, revelou coeficientes de correlação iguais a 0,99 para ambas as curvas; já o erro padrão da estimativa ( $\sigma$ ), foi igual a  $\pm 0,0033$  para a curva correspondente ao isosteviol e igual a  $\pm 0,0038$  para a curva do steviolbiosídeo.

Uma inibição linear como a da figura 23B significa sempre que o inibidor possui apenas um sítio de ação (61,69). Se o isosteviol e o steviolbiosídeo tivessem dois pontos de ação ao longo do caminho NADH-desidrogenase  $\rightarrow$  coenzima Q  $\rightarrow$  citocromo c-oxidase, a inibição não seria linear e sim parabólica, isto é, a representação de  $1/v$  contra  $[I]$ , resultaria numa parábola (61,69). Esta observação vem em apoio à interpretação dada anteriormente aos dados obtidos com a NADH-oxidase, succinato-oxidase e succinato-desidrogenase (Ítem 3.6.1). Os dados anteriores, bem como os descritos agora são coerentes com dois sítios de ação: um deles entre a NADH-desidrogenase e a coenzima Q e outro entre a succinato desidrogenase e a coenzima Q. O dado mais conclusivo é o que diz respeito ao único sítio de ação entre a NADH-

desidrogenase e o  $O_2$  (inibição linear). Se este sítio de ação estivesse localizado após a coenzima Q, a succinato oxidase teria que ser inibida em grau idêntico à NADH-oxidase. Neste caso também não haveria efeito sobre a succinato-desidrogenase. Como isto não se verifica, a interpretação mais coerente é aquela que supõe a existência de dois sítios de ação separados: entre a NADH-desidrogenase e a coenzima Q e entre a succinato desidrogenase e a coenzima Q.

### 3.7.2 Efeito do extrato aquoso total

A figura 24 mostra o efeito do extrato aquoso sobre a NADH-oxidase. Como se percebe, o extrato aquoso tem efeito extremamente potente. Já 0,15 mg de folhas secas extraídas por ml do meio de incubação provocam 50% de inibição. Este efeito é cerca de 10 vezes mais potente do que o efeito sobre a ATP-ase (Ítem 3.3.2). Em termos da concentração final do steviosídeo, 50% de inibição é observada com steviosídeo 10  $\mu M$ . O steviosídeo isoladamente não possui efeito, mas este parâmetro fornece a possibilidade de se aquilatar a concentração dos demais glicosídeos no meio de incubação, a qual deve ser bastante baixa (ver Ítem 1.2 da Introdução). É claro que se pode esperar efeito inibidor de alguns deles. É o caso comprovado do steviolbiosídeo, por exemplo. Se apenas os glicosídeos são responsáveis pela inibição, pode haver alguns de extrema potência, já que a sua concentração no sistema é baixa.

A figura 24 mostra também a relação entre o inverso da velocidade de reação e a dose do extrato aquoso. A relação é linear. O ajuste de mínimos quadrados revelou um coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,99; o erro padrão da estimativa ( $\sigma$ ) foi igual a  $\pm 0,0017$ . Isto não significa — como possa parecer talvez, antes de uma análise mais profunda — que haja apenas uma substância no extrato que possua efeito inibidor. Na realidade significa apenas que, se houver mais de um inibidor, cada um deles exerce inibição linear.

Os principais responsáveis por este efeito podem ser os glicosídeos doces e não os amargos. É o que se pode deduzir do fato de o extrato doce inibir muito mais fortemente a enzima do que o extrato amargo (experiên-

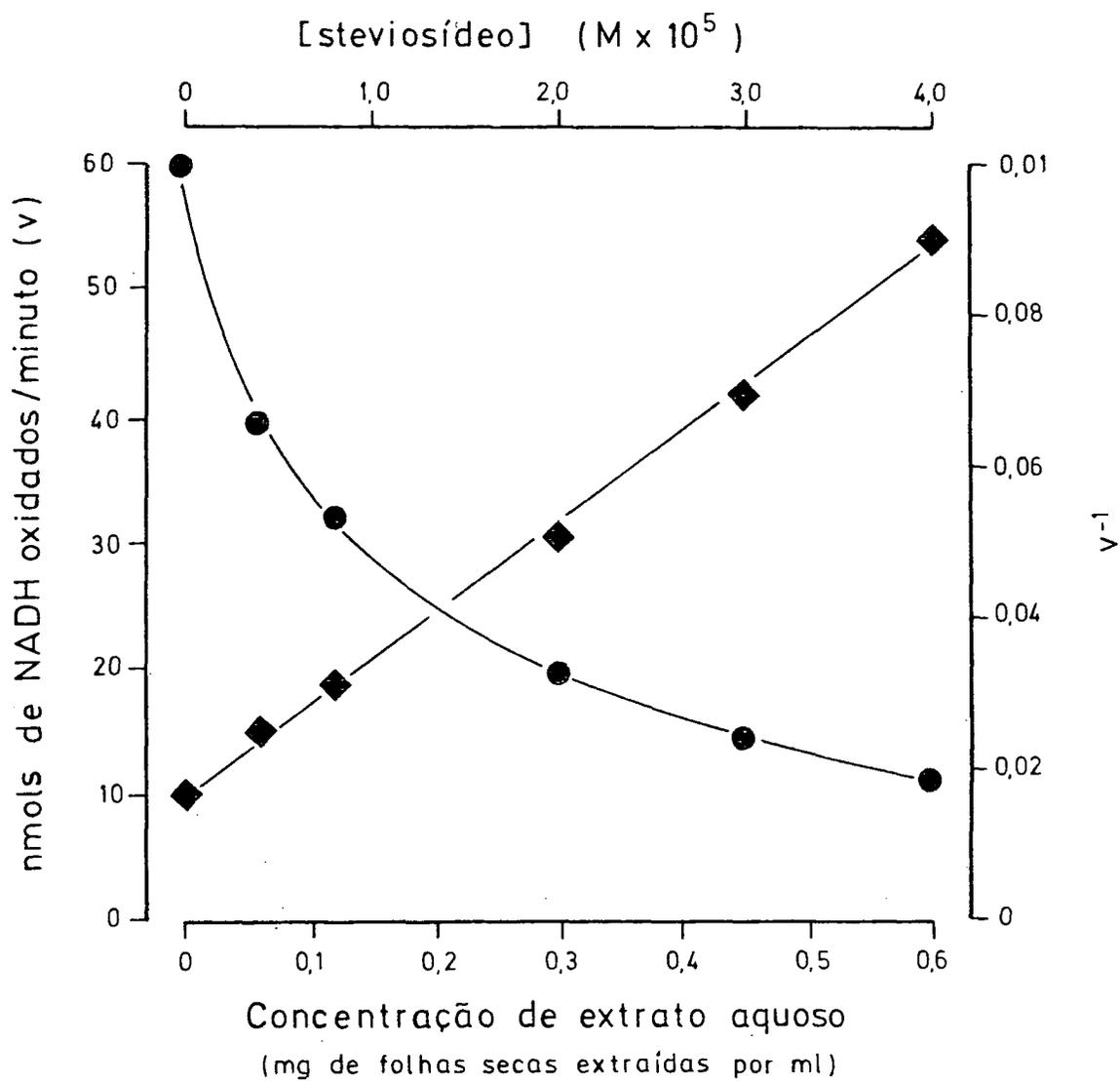


Figura 24. Efeito do extrato aquoso total da *Stevia rebaudiana* sobre a *NADH-oxidase* de mitocôndrias rompidas por congelamento. À temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ),  $100\ \mu\text{g/ml}$  de proteína mitocondrial foram incubadas em TRIS  $20\ \text{mM}$ , pH  $7,4$ . A reação foi iniciada pela adição de NADH  $0,15\ \text{mM}$  e acompanhada espectrofotometricamente a  $340\ \text{nm}$ . A velocidade (●) ou o inverso da velocidade de reação (◆), está representada contra a concentração do extrato aquoso (expresso em mg de folhas secas extraídas por ml do meio de incubação; escala inferior) ou contra a concentração final de steviosídeo (escala superior).

cias não mostradas aqui). Não se deve esquecer, no entanto, que o extrato doce contém outras substâncias além dos glicosídeos, pelo que a possibilidade de o inibidor (ou inibidores) não pertencer a este grupo, é coisa que não pode ser descartada.

### 3.7.3 Efeito sobre a curva de saturação do NADH

Uma extensão da análise cinética da inibição do isosteviol e do steviolbiosídeo é o estudo do efeito destes compostos sobre a curva de saturação do NADH. Isto pode fornecer informações adicionais sobre a natureza da inibição. Uma destas informações, por exemplo, diz respeito ao grau de inibição. A indagação que surge é se o grau de inibição depende ou não da concentração de NADH. Deve-se recordar aqui, que nas experiências anteriores, a concentração do NADH foi mantida fixa (0,15 mM, aproximadamente).

Um estudo desta natureza requer que se utilize quantidades bem pequenas de enzima, já que de outra maneira torna-se impossível medir a velocidade inicial em concentrações muito pequenas de NADH. Por isto, apenas 15 a 20 µg de proteína mitocondrial por ml do meio de incubação foram utilizadas. Isto tem a vantagem de provocar também extrema diluição de possíveis fatores de interferência, como por exemplo  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  endógeno.

A figura 25 mostra os resultados obtidos com a variação simultânea da concentração do NADH (entre 2,5 e 150 µM) e do isosteviol (controle, 0,125 e 0,25 mM). Como se vê na figura 25A, o NADH 150 µM já provoca considerável saturação na NADH-oxidase. Isto significa que os dados das figuras 23 e 24, por exemplo, foram obtidos em condições quase que saturantes. As curvas de saturação na presença de isosteviol 0,125 e 0,25 mM correm abaixo do controle. Uma análise revelou, que o grau de inibição — igual a  $0,46 \pm 0,034$  com isosteviol 0,125 mM e  $0,74 \pm 0,008$  com isosteviol 0,25 mM — permanece inalterado entre NADH 2,5 e 150 µM. Isto já sugere que a inibição é do tipo não-competitiva (61).

Com o steviolbiosídeo, ocorre coisa de todo semelhante. A figura 26 mostra os resultados das experiências correspondentes. A curva controle da figura 26A foi obtida independentemente e com preparação diversa daquela

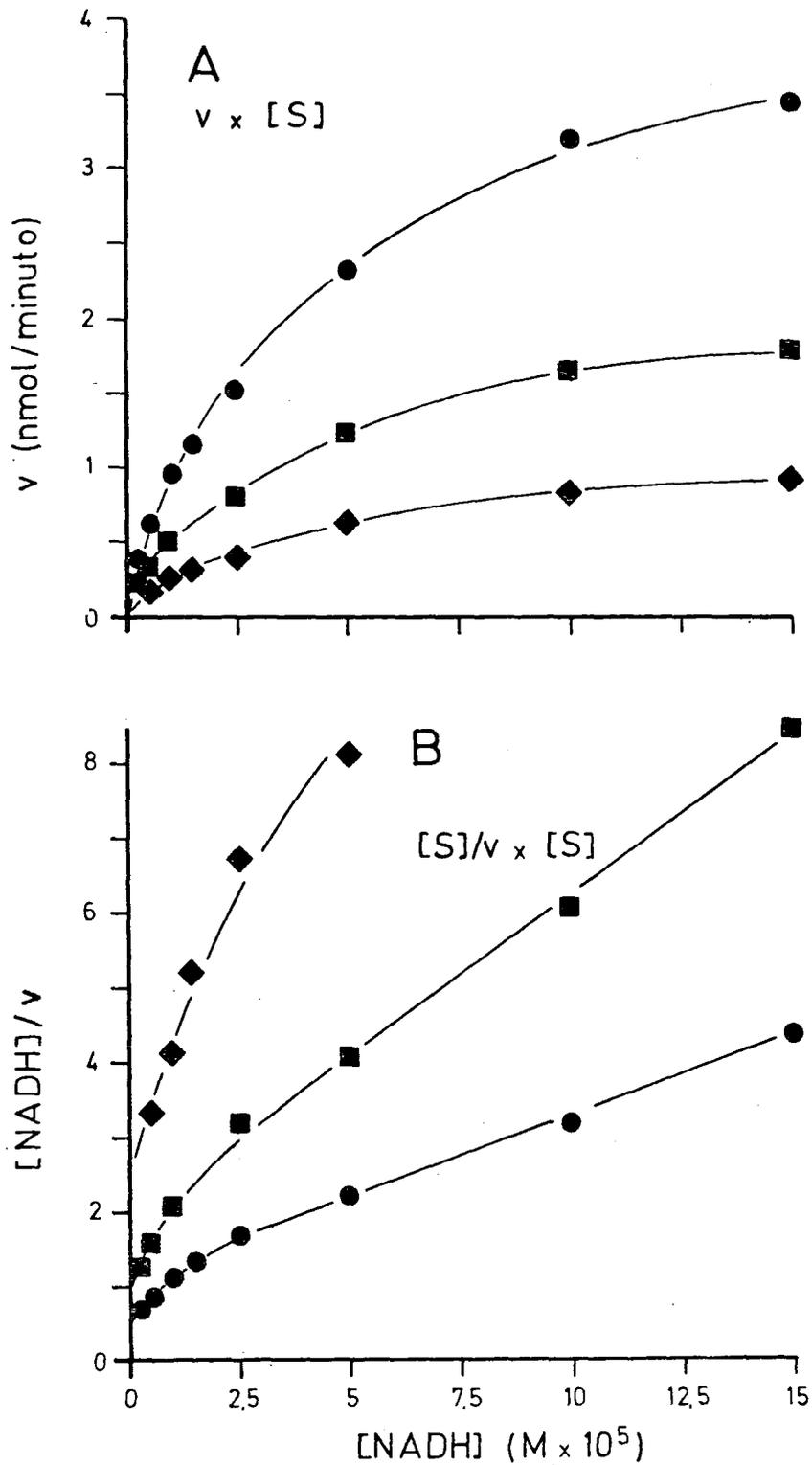


Figura 25. Efeito do isosteviol sobre a curva de saturação da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento (NADH como substrato). A velocidade inicial foi medida espectrofotometricamente a 340 nm. Condições: temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ); concentração de proteína: 16  $\mu\text{g/ml}$ ; meio de incubação: tampão TRIS 20 mM, pH 7,4. A velocidade (A) ou a razão concentração de NADH/velocidade (B) está representada contra a concentração de NADH. Controle: ●; com isosteviol 0,125 mM: ■; com isosteviol 0,25 mM: ◆

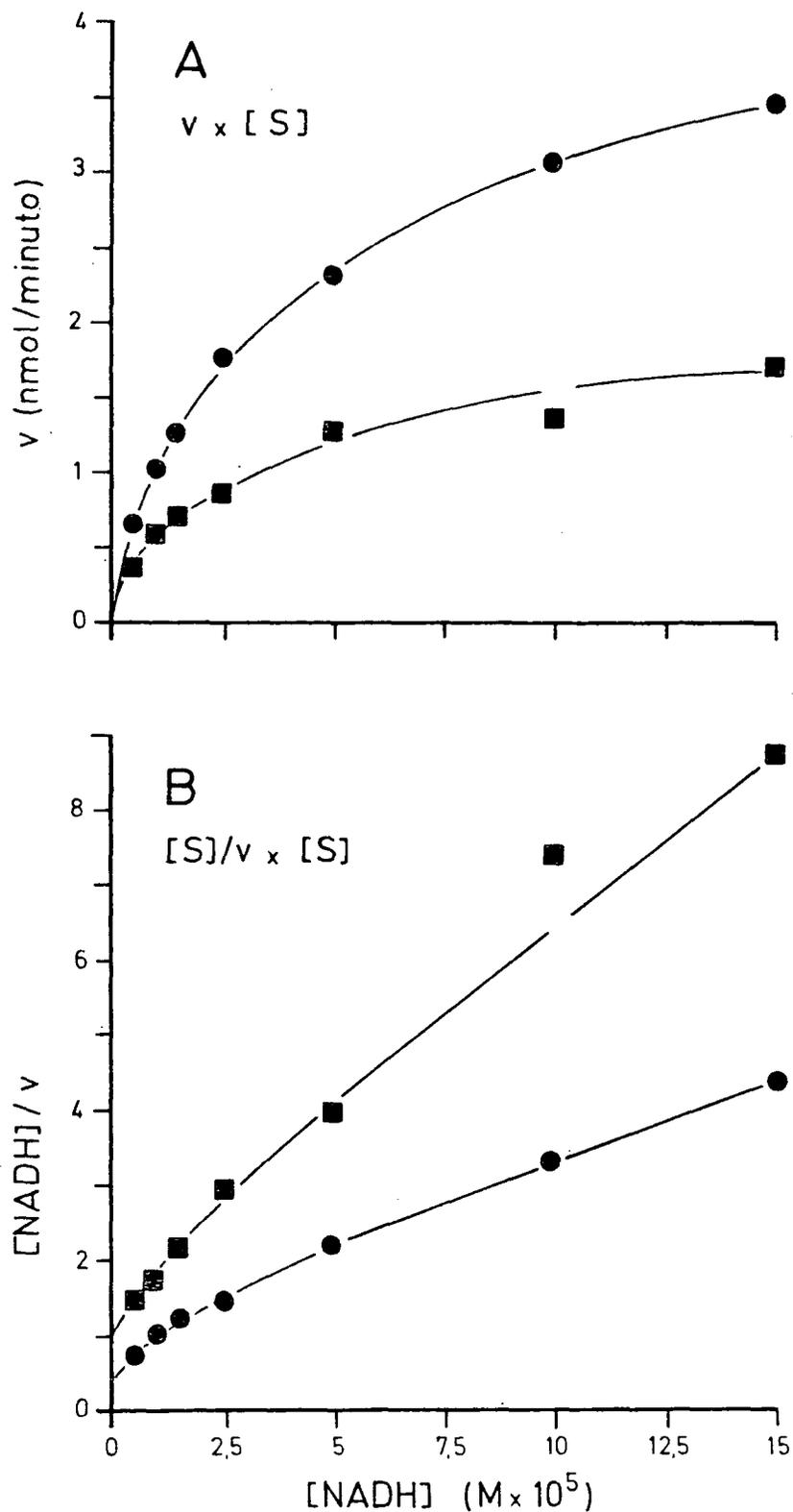


Figura 26. Efeito do steviolbiosídeo sobre a curva de saturação da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. Condições e procedimento experimental idênticos aos da figura 25. A velocidade (A) ou a razão concentração de NADH/velocidade (B) está representada em função da concentração de NADH. Controle: ●; steviolbiosídeo 0,5 mM: ■.

da figura 25A. Uma comparação entre ambas (ver figura 27), mostra que são praticamente iguais, dentro de uma certa margem de erro. Isto atesta a reprodutibilidade do sistema, embora ele seja bastante complexo. O grau de inibição do steviolbiosídeo 0,5 mM é igual a  $0,48 \pm 0,05$ . Igualmente ao que ocorre com o isosteviol, esta inibição também é independente da concentração do NADH, ao menos nos limites de concentração aqui estudados.

Se a independência do grau de inibição da concentração do NADH já sugere inibição não-competitiva, uma resposta definitiva requer uma análise um pouco mais apurada. A análise gráfica da curva de saturação é técnica já bem conhecida (61). Ao fazer-se a representação duplamente recíproca (isto é,  $1/v$  contra  $1/[NADH]$ ) de Lineweaver-Burk bem como a representação de  $[NADH]/v$  contra  $[NADH]$  (representação de Hanes), constatou-se que os pontos não descrevem, em nenhum dos casos, uma linha reta (61). Todas as curvas analisadas apresentam curvatura próximo ao eixo dos  $1/v$  ou ao eixo dos  $[NADH]/v$ . A representação de Hanes pode ser vista nas figuras 25B (para o isosteviol) e 26B (para o efeito do steviolbiosídeo). Curvas bifásicas deste tipo são frequentes em sistemas enzimáticos (71) e tem sido tradicionalmente interpretadas como significando a existência de ao menos duas formas distintas de enzima (61,69). Isto não deve surpreender no caso da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento, já que o sistema realmente é bem complexo. As curvas das figuras 25 e 26 podem ser evidência tanto da existência de duas formas da NADH-oxidase (ou NADH-desidrogenase) como também, por exemplo, refletir dois graus diferentes de desagregação da membrana mitocondrial. Curvas deste tipo são obtidas também no caso de haver várias formas de transição entre formas extremas. Por isto mesmo, a interpretação deste tipo de curva resulta bastante difícil. Deve-se acrescentar ainda, que a sensibilidade à rotenona deste sistema, é superior a 95%, pelo que é improvável que se trate de uma forma insensível e outra sensível à rotenona. Tampouco é fácil estabelecer paralelos entre as propriedades cinéticas da NADH-desidrogenase purificada, objeto de grande número de trabalhos (39,73,77,78) e a NADH-oxidase, já que as diferenças entre ambos os sistemas são óbvias. Seja como for, o fato de o grau de inibição depender da concentração do NADH, significa também, que todos os componentes cinéticos são afetados. Caso um deles fosse afetado e o outro não, por exemplo, o grau de inibição teria que variar. Esta variação seria tanto maior, quanto maior fosse a diferença entre as afini-

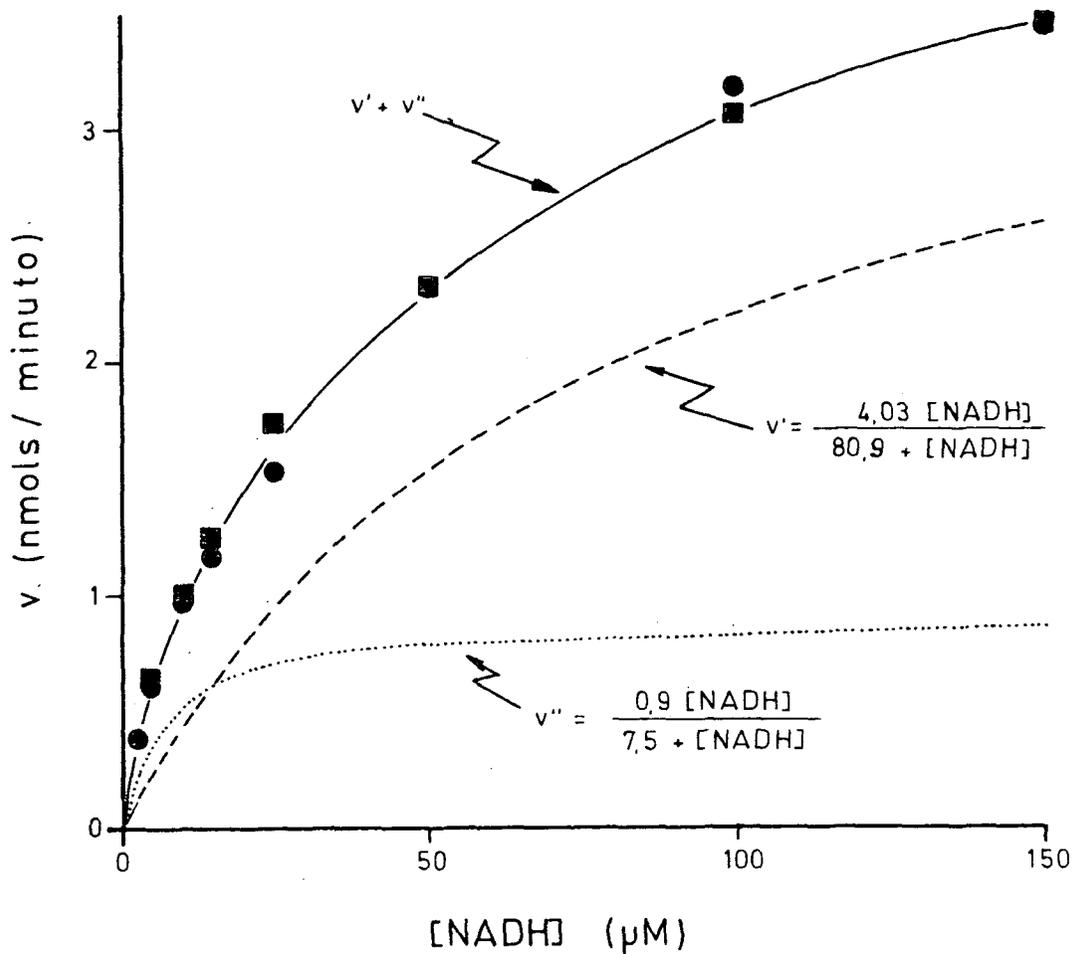


Figura 27. Comparação dos dados experimentais e calculados da curva de saturação da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. Os dados experimentais de dois experimentos realizados independentemente ( $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ), estão representados, juntamente com a curva calculada (—), introduzindo-se na equação (10) as constantes cinéticas  $K = 80,9 \mu M$ ,  $K' = 7,5 \mu M$ ,  $V = 4,03 \text{ nmol/min}$  e  $V' = 0,9 \text{ nmol/min}$ . Os valores das constantes cinéticas resultaram do ajuste fino de mínimos quadrados das estimativas preliminares obtidas por manipulação gráfica (ver *Materiais & Métodos*). A resolução da curva em seus dois componentes também está demonstrada (-----, .....).

dades de cada um dos componentes cinéticos pelo NADH.

Isto tudo não impede, no entanto, que se faça uma avaliação das constantes cinéticas da enzima, desde que seja possível descrever quantitativamente as curvas. Tradicionalmente curvas como as das figuras 25 e 26 tem sido descritas pela equação abaixo (61,69):

$$v = \frac{V \text{ NADH}}{K + \text{NADH}} + \frac{V' \text{ NADH}}{K' + \text{NADH}} \quad (10)$$

A equação (10) é idêntica à equação (1), tendo-se apenas introduzido a concentração de NADH, no lugar do símbolo genérico para substrato (A). V e V' são as velocidades máximas de cada componente e K e K' as respectivas constantes de Michaelis.

Conforme consta em *Materiais & Métodos*, formas alternativas desta equação permitem através de representações gráficas (Lineweaver-Burk e Hanes), a obtenção de estimativas preliminares dos parâmetros cinéticos V, V', K e K'. Estas estimativas preliminares podem então ser ajustadas definitivamente pelo método dos mínimos quadrados (62). Os valores que foram obtidos da análise gráfica não diferiram muito dos valores definitivos resultantes do ajuste de mínimos quadrados, o que bem atesta a relativa precisão do método gráfico utilizado.

A Tabela II mostra os valores obtidos com o ajuste fino de mínimos quadrados. As constantes de Michaelis para o NADH, na ausência de inibidores, são iguais a 7,5  $\mu\text{M}$  e 80,9  $\mu\text{M}$ . Há portanto um componente cinético com baixa constante de Michaelis e outro com alta constante de Michaelis. O valor maior (80,9  $\mu\text{M}$ ), concorda com os valores normalmente propostos para a constante de Michaelis da NADH-desidrogenase (39,77,78). Não há porém dados que permitam afirmar se isto realmente guarda alguma relação, já que os sistemas são bastante diferentes entre si.

Uma medida do grau de confiança dos parâmetros avaliados é dado pelo coeficiente de correlação (r) e pelo erro padrão da estimativa ( $\sigma$ ). O coeficiente de correlação obtido para as cinco curvas foi igual a 0,99; já o erro padrão da estimativa variou entre  $\pm 0,03$  e  $\pm 0,08$  (ver Tabela II).

TABELA II

*Parâmetros cinéticos da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento: efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo. Os parâmetros foram avaliados conforme descrito em *Materiais & Métodos*. Ao lado das velocidades máximas (V e V') e das constantes de Michaelis (K e K'), o erro padrão da estimativa ( $\sigma$ ) e o coeficiente de correlação (r), também são apresentados.*

Parâmetro	controle	isosteviol 0,125 mM	isosteviol 0,25 mM	steviolbiosídeo 0,5 mM
V (nmol/min)	4,03	2,10	1,17	1,85
V' (nmol/min)	0,90	0,43	0,19	0,55
K ( $\mu$ M)	80,9	74,5	80,7	76,5
K' ( $\mu$ M)	7,5	6,9	9,6	8,1
$\sigma$	$\pm 0,075$	$\pm 0,064$	$\pm 0,03$	$\pm 0,08$
r	0,99	0,99	0,99	0,99

Uma avaliação visual do ajuste entre os dados experimentais e a equação (10) oferece a figura 27. Na figura 27 traçou-se a linha teórica calculada com base na equação (10), utilizando-se os parâmetros cinéticos constantes da Tabela II. Uma comparação entre a curva calculada e os pontos experimentais indica que a concordância é bastante boa. Não parece haver desvios em nenhum dos extremos. Tendo em vista pois os valores do coeficiente de correlação e os valores dos erros padrões das estimativas — constantes da Tabela II — juntamente com as curvas da figura 27, pode-se concluir que a equação (10) é, em princípio, suficiente para a descrição das curvas de saturação do NADH.

A figura 27 mostra também a resolução da curva teórica nos seus dois componentes. Como se vê, o componente com baixa constante de Michaelis ( $7,5 \mu\text{M}$ ) satura já com NADH  $50 \mu\text{M}$ , enquanto que o componente com alta constante de Michaelis ( $80,9 \mu\text{M}$ ) ainda não está saturado com NADH  $150 \mu\text{M}$ . As velocidades máximas de cada componente são também nitidamente distintas:  $0,9$  e  $4,03 \text{ nmol/min}$ , respectivamente.

O que fica para ser analisado ainda é o efeito dos inibidores sobre os valores de  $K$ ,  $K'$ ,  $V$  e  $V'$ , o que pode ser feito com base nos valores constantes da Tabela II. Uma análise revela que se há algum efeito, este se reflete na velocidade máxima, enquanto que as constantes de Michaelis não são praticamente alteradas. Os valores de  $K$  oscilam entre  $74,5$  e  $80,9 \text{ M}$ . Os valores de  $K'$  oscilam um pouco mais, porém assystematicamente, entre  $6,9$  e  $9,6 \text{ M}$ . Já os valores de  $V$  e  $V'$  mostram nítida e sistemática tendência de queda. Para o isosteviol, por exemplo,  $V$  decresce de  $4,03$  para  $1,17 \text{ nmol/min}$  e  $V'$  de  $0,9$  para  $0,19 \text{ nmol/min}$ . Por outro lado, o decréscimo nos valores de  $V$  e  $V'$  é comparável ao grau de inibição. Disto se deduz que a inibição se deve praticamente a uma depressão nas velocidades máximas. Deve-se lembrar que a inibição seria competitiva caso houvesse aumento nos valores de  $K$  e  $K'$  e os valores de  $V$  e  $V'$  permanecessem constantes (61). Se tanto os valores de  $K$  e  $K'$  como também os de  $V$  e  $V'$  fossem afetados, por outro lado, a inibição seria incompetitiva (61). Os dados são, portanto, muito mais consistentes com uma inibição não-competitiva, estando também de acordo com a independência do grau de inibição da concentração do substrato (NADH). A constância do grau de inibição indica também que a equação (10), na presença de inibidor, pode ser reescrita

com a introdução de um único termo de inibição, ou seja,

$$v_i = \left[ \frac{1}{1 + \{I\}/K_i} \right] \left[ \frac{V\{NADH\}}{K + \{NADH\}} + \frac{V'\{NADH\}}{K' + \{NADH\}} \right] \quad (11)$$

Na equação (11),  $v_i$  é a velocidade de reação na presença de inibidor,  $\{I\}$  a concentração do inibidor (isosteviol ou steviolbiosídeo), enquanto que  $K_i$  é a constante de inibição. A divisão da equação (11) pela (10) resulta em

$$v_i/v = \frac{1}{1 + \{I\}/K_i} \quad (12)$$

isto é, a razão  $v_i/v$  — e como consequência o grau de inibição que é igual a  $1 - v_i/v$  — depende exclusivamente da concentração do inibidor, sendo independente da concentração do substrato (NADH).

Uma comparação da equação (10) com a equação (11), por outro lado, revela também que os valores de  $V$  e  $V'$  obtidos na presença de isosteviol ou steviolbiosídeo são na realidade, iguais a  $V(1 + \{I\}/K_i)^{-1}$  e  $V'(1 + \{I\}/K_i)^{-1}$ , respectivamente. Isto quer dizer, em outras palavras, que os valores de  $V$  e  $V'$  medidos na presença de inibidores são na realidade parâmetros aparentes ( $V_{ap}$  e  $V'_{ap}$ , respectivamente), o que permite o cálculo da constante da inibição pelas relações,

$$K_i = \frac{V_{ap}\{I\}}{V - V_{ap}} = \frac{V'_{ap}\{I\}}{V' - V'_{ap}} \quad (13)$$

Os valores médios de  $K_i$ , calculados para o isosteviol e para o steviolbiosídeo, são 0,1 e 0,6 mM, respectivamente. Estes valores são aproximadamente as concentrações que provocam 50% de inibição (ver figura 23). Isto é exatamente o que se espera no caso da inibição não-competitiva pura, pois neste tipo de inibição, o valor de  $K_i$  corresponde à concentração de inibidor que provoca 50% de inibição.

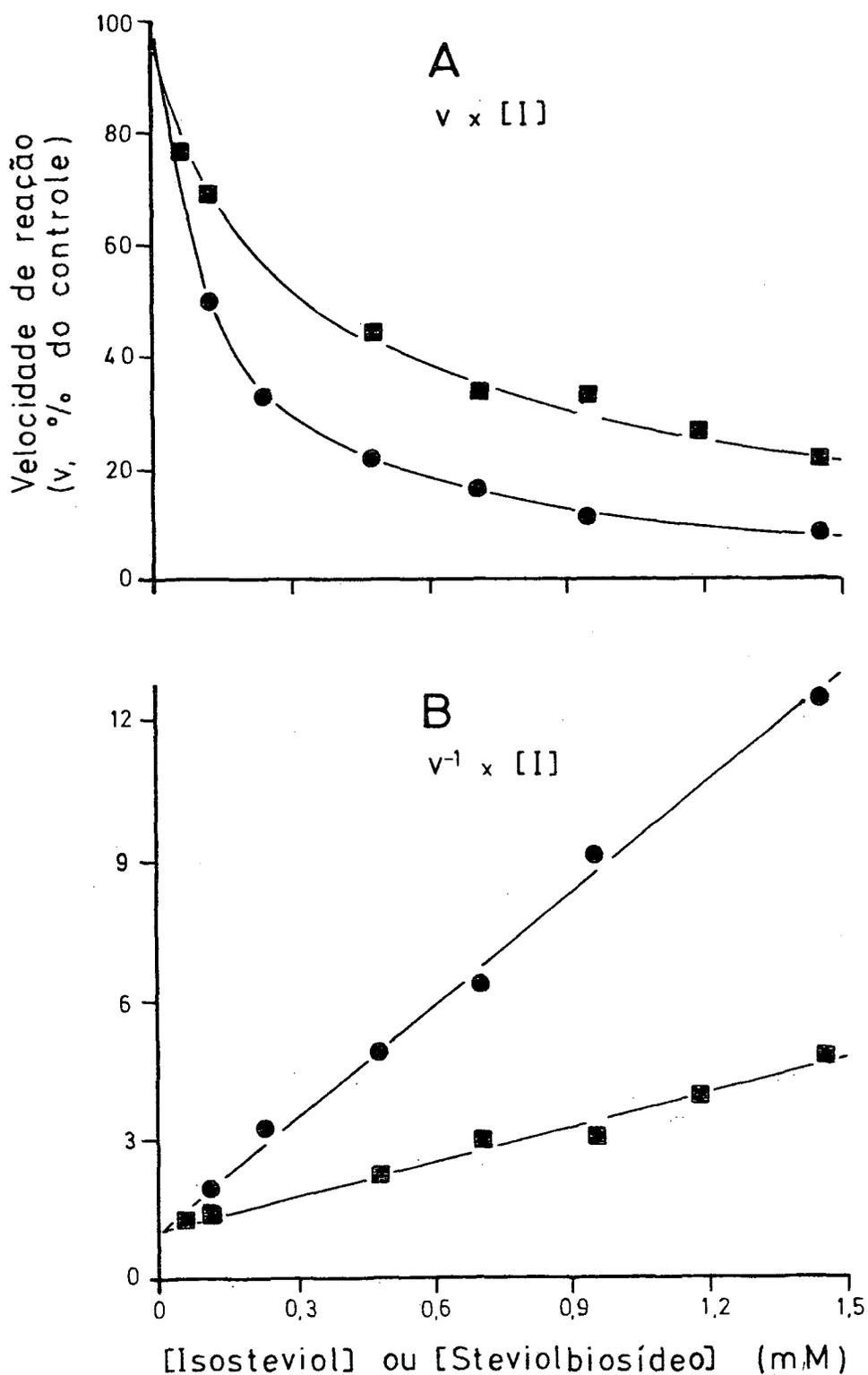


Figura 28. Efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo sobre a L-glutamato desidrogenase. 125 miliunidades de L-glutamato desidrogenase purificada de fígado bovino foram incubadas em meio de reação tamponado com TRIS 20 mM (pH 7,4), juntamente com cloreto de amônio 95 mM e  $\alpha$ -cetoglutarato 5 mM, na ausência ou na presença de diversas concentrações de isosteviol (●) ou steviolbiosídeo (■). A reação foi iniciada pela adição de NADH 0,15 mM, cuja oxidação foi seguida espectrofotometricamente a 340 nm. A: velocidade de reação versus concentração dos inibidores; B: inverso da velocidade de reação contra a concentração dos inibidores.

### 3.8 Estudo cinético do efeito sobre a L-glutamato desidrogenase

A L-glutamato desidrogenase é enzima com propriedades alostéricas, estruturalmente bastante complexa, sendo formada por 8 subunidades (57). Ela pode ser ativada pelo ADP, embora o efeito ativador deste composto não seja muito pronunciado (57). A L-glutamato desidrogenase não possui especificidade em relação à coenzima: tanto o  $\text{NAD}^+$  (ou NADH) como o  $\text{NADP}^+$  (ou NADPH) podem ser utilizados.

Considerando a inibição provocada pelo isosteviol, pelo steviolbiosídeo e também pelo extrato aquoso, torna-se interessante uma análise cinética desta inibição, a exemplo do que se fez com relação à NADH-oxidase. A complexidade da enzima — múltiplos substratos, ativações alostéricas, catálise em ambas as direções —, no entanto, faz com que uma análise profunda fuja do escopo deste trabalho, o qual tem por objetivo muito mais a função mitocondrial como um todo. Uma análise mais superficial foi no entanto realizada, visando com isto lançar as bases para estudos futuros.

Para as experiências, utilizou-se a enzima purificada de fígado de boi (Sigma). A amostra comercial está dissolvida em glicerol 50%. Para as medidas, diluiu-se a enzima em tampão TRIS 20 mM, pH 7,4, contendo albumina bovina (10 mg/ml). A albumina estabiliza a enzima no tampão. Além do mais, a dissolução da enzima neste tampão parece alterá-la de alguma forma, pois a enzima pipetada diretamente da solução em glicerol a 50% ao sistema de ensaio, revelou uma sensibilidade bem menor ao isosteviol do que a enzima diluída. De qualquer forma, porém, o comportamento da enzima diluída em tampão contendo albumina é semelhante — em termos de grau de inibição — ao da enzima do extrato bruto de mitocôndrias de fígado de rato.

Todas as experiências apresentadas aqui, foram feitas na ausência de ADP, o ativador alostérico. Procurou-se com isto obter dados preliminares, livres de possíveis complicações devidas à ativação alostérica.

O efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo pode ser apreciado na figura 28, na qual estão expostos os dados obtidos ao medir-se a oxidação do NADH. Como se percebe, o efeito do isosteviol é mais potente. 50% de inibição ocorre com uma concentração igual a 0,15 mM. Com o steviolbiosídeo,

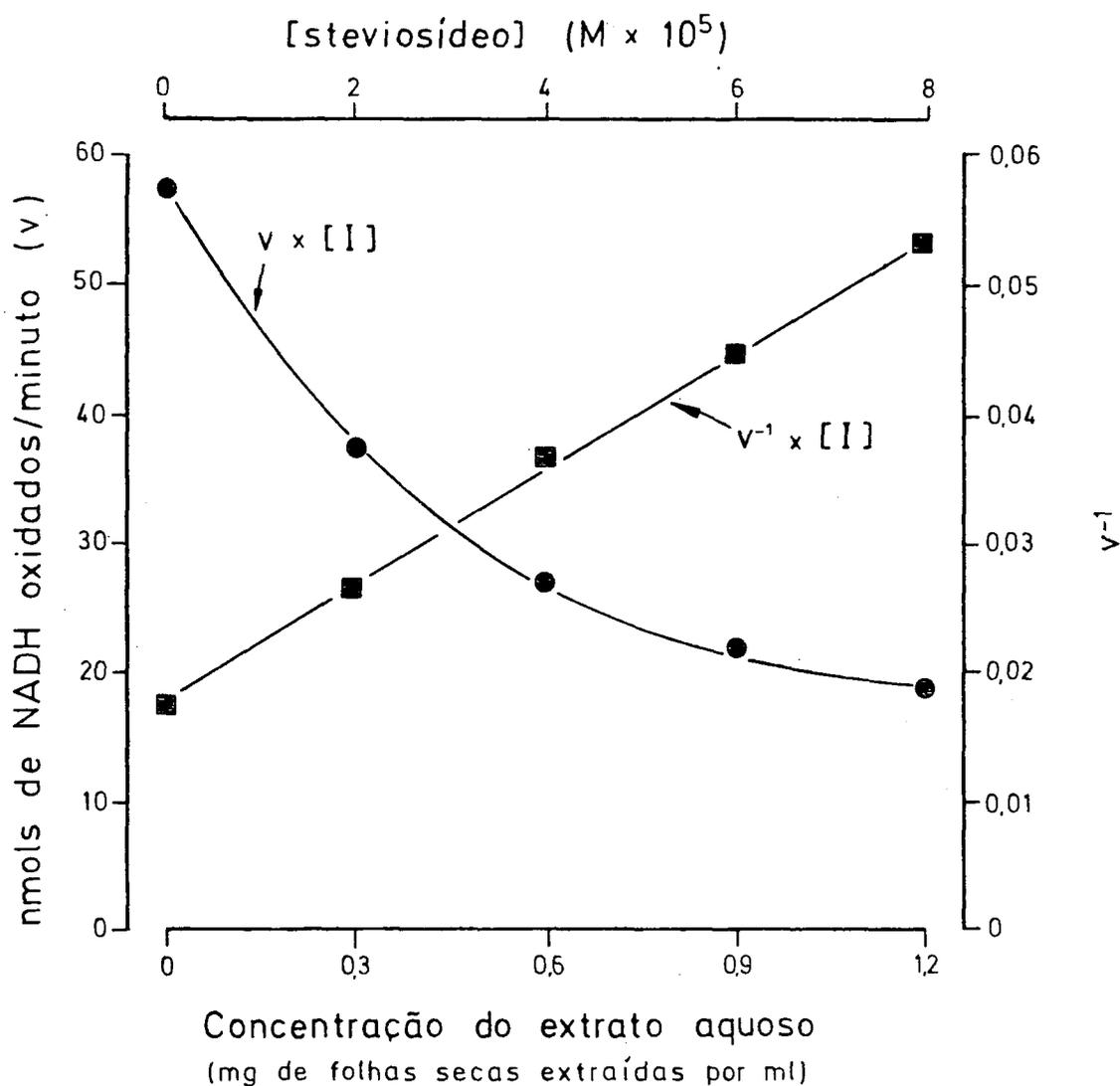


Figura 29. Efeito do extrato aquoso total da *Stevia rebaudiana* sobre a *L*-glutamato desidrogenase. A temperatura ambiente ( $\approx 25^\circ$ ), 100 miliunidades de *L*-glutamato desidrogenase purificada (fígado bovino) foram incubadas em meio de reação tamponado com TRIS 20 mM (pH 7,4), juntamente com cloreto de amônio 95 mM e  $\alpha$ -cetoglutarato 5 mM, na ausência ou na presença de diversas doses do extrato aquoso total. A reação foi iniciada pela adição de NADH 0,15 mM, cuja oxidação foi seguida espectrofotometricamente a 340 nm. As velocidades de reação ( $\bullet$ ) ou o inverso das velocidades ( $\blacksquare$ ) estão representadas contra a concentração do extrato.

êste mesmo grau de inibiçãõ necessita de uma concentraçãõ em torno de 0,4 mM.

A figura 28B, por outro lado, revela que a inibiçãõ é linear (isto é,  $1/v$  contra  $[I]$  é uma reta), a exemplo do que ocorre com a NADH-oxidase. Isto sugere que os inibidores em questãõ possuem apenas um sítio de açãõ por centro catalítico (61,69).

O efeito do isosteviol sobre a L-glutamato desidrogenase é um pouco menos pronunciado do que sobre a NADH-oxidase. Já com o steviolbiosídeo ocorre exatamente o contrário, ou seja, o seu efeito sobre a L-glutamato desidrogenase é um pouco mais pronunciado do que sobre a NADH-oxidase.

A figura 29, finalmente, mostra o efeito do extrato aquoso total. O efeito neste caso é menos pronunciado que o efeito sobre a NADH-oxidase. 50% de inibiçãõ ocorre com 0,45 mg de folhas secas extraídas por ml do meio de incubaçãõ (0,15 com a NADH-oxidase). Isto corresponde a uma concentraçãõ final de steviosídeo igual a 30  $\mu$ M. Num ponto, porém, as inibições sãõ semelhantes: a representaçãõ de  $1/v$  contra a dose de extrato, revela que também neste caso, a inibiçãõ é linear.

#### 4. CONCLUSÕES E DISCUSSÃO FINAL

Os resultados obtidos neste trabalho permitem fazer uma idéia acerca dos efeitos que os glicosídeos da *Stevia rebaudiana* (ou a própria planta) exercem sobre diversas funções mitocondriais. Sobretudo deve ser ressaltado, que êste estudo sistemático, realizado com um representante de cada tipo de estrutura dos glicosídeos da planta (isosteviol, steviolbiosídeo e steviosídeo) demonstra a existência de vários efeitos desconhecidos até agora, além de evidenciar aspectos novos acerca de efeitos já conhecidos (22). Os efeitos já conhecidos foram descritos pela primeira vez por Vignais *et al.*, em trabalho no qual foram utilizados o steviol e o steviosídeo, juntamente com uma série de análogos da atractiligenina. Êstes autores centraram sua atenção na atractiligenina (a aglucona do atractiliosídeo) e no seu efeito sobre o transporte de ADP/ATP. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é bem mais amplo, tendo-se além do mais utilizado substâncias diferentes, à excessão do steviosídeo, sem falar das investigações com o extrato aquoso total da planta.

Entre os novos aspectos trazidos à luz neste trabalho cite-se, entre outros: (a) o complexo efeito das substâncias sobre a velocidade da respiração (inibição, ativação ou ausência de efeito, dependendo das condições de incubação); (b) o efeito desacoplante; (c) o possível efeito direto sobre a ATP-ase (fosforilação oxidativa); (d) o efeito sobre outras atividades enzimáticas (como por exemplo, sobre a L-glutamato desidrogenase), além do efeito já conhecido sobre a NADH-oxidase.

##### *Efeito sobre a respiração acoplada e desacoplada*

O que salta à vista imediatamente é a acentuada diferença que há entre o efeito sobre a respiração acoplada e a respiração desacoplada por 2,4-dinitrofenol. A respiração desacoplada, com substrato  $\text{NAD}^+$  ou FAD-dependente, quase sempre é afetada negativamente (figuras 7-10). A única excessão é o efeito do steviolbiosídeo sobre a velocidade respiratória dependente do succinato: na presença de 2,4-dinitrofenol, não há inibição de monta a registrar, sendo que inicialmente há inclusive uma ativação em

baixas concentrações (figura 8B).

Complicações surgem quando se analisa o efeito sobre a respiração acoplada. Os efeitos são bastante variáveis, podendo haver (a) ativação em baixas concentrações e inibição em concentrações mais altas (como é o caso do isosteviol), (b) relativa insensibilidade em baixas concentrações e inibição em concentrações maiores (caso específico do steviolbiosídeo com L-glutamato como substrato) ou (c) um efeito bem pouco definido, além de quantitativamente pouco significativo (caso do steviosídeo). No rol destes efeitos, pode-se incluir também a fase de retardo (*lag phase*) causada pelo steviolbiosídeo sobre a respiração com L-glutamato (figura 9).

Este quadro complexo é, muito provavelmente, a resultante de vários fatores interligados, fatores estes que fazem sentir o seu peso com intensidades diversas, tudo dependendo das condições impostas à organela. Efeitos divergentes podem ser muitas vezes provocados por desacoplamento conjugado com uma inibição do fluxo de elétrons em um ou mais pontos ao longo da cadeia respiratória. Por este motivo, desenvolveu-se neste trabalho algum esforço no sentido de demonstrar ambos os efeitos.

#### *Evidências a favor da existência de um efeito desacoplante*

Um efeito desacoplante poderia ser o responsável pelas ativações na respiração acoplada ou pela relativa insensibilidade em baixas concentrações, já que em mitocôndrias acopladas, o fator limitante da respiração é a parca disponibilidade de ADP. Devido à existência de vários outros efeitos, os parâmetros normalmente utilizados para demonstrar efeito desacoplante — a razão ADP/O e o quociente respiratório —, tiveram que ser postos de lado, o que exigiu, por sua vez, procedimento experimental específico. Entre os dados que apoiam a suposição de um efeito deste tipo pode-se incluir: (a) o efeito negativo que os compostos exercem sobre a ejeção de prótons induzida pelo succinato (figuras 15 e 16), quando presentes em concentrações que ou ativam ou permanecem sem efeito sobre a respiração; (b) a inibição do *swelling* induzido por substratos NAD<sup>+</sup>- ou FAD-dependentes, em concentrações que ativam ou permanecem sem efeito sobre a respiração; (c) o efeito inibidor do isosteviol sobre o *swelling* induzido pelo

TMPD + ascorbato, sabendo-se que não há nenhum efeito sobre a citocromo c-oxidase.

O efeito desacoplante mais potente — a julgar pela eficiência em inibir o efluxo de protons e pela ativação da respiração — é o do isosteviol. No caso do steviolbiosídeo e do steviosídeo, o efeito desacoplante parece ser menos pronunciado, sendo possível que o mesmo contribua menos que no caso do isosteviol, para o efeito global sobre a respiração.

*Os efeitos independentes sobre a NADH-oxidase e sobre a succinato-oxidase*

Os estudos das atividades enzimáticas ligadas à cadeia respiratória revelaram dois efeitos básicos: tanto a NADH-oxidase como a succinato-oxidase são afetadas. Sobre a citocromo c-oxidase, no entanto, não há efeito. Por isto, os sítios de ação dos compostos estudados poderiam localizar-se em qualquer ponto entre as flavoproteínas — NADH-desidrogenase e succinato-desidrogenase — e a citocromo c-oxidase. Os resultados obtidos, falam a favor de dois sítios de ação separados. Um deles — e que leva à inibição da NADH-oxidase — localiza-se entre a NADH-desidrogenase e a coenzima Q. O outro, que é a causa da inibição da succinato-oxidase, localiza-se entre a succinato-desidrogenase e a coenzima Q. São as seguintes as observações que falam a favor destes sítios de ação distintos: (a) a succinato-oxidase é muito menos sensível do que a NADH-oxidase; por exemplo, o isosteviol 0,5 mM provoca 85% de inibição da NADH-oxidase, mas apenas 25% sobre a succinato-oxidase; (b) o steviosídeo inibe a succinato-oxidase, porém ativa (em altas concentrações) a NADH-oxidase; (c) a succinato desidrogenase (succinato ferricianeto-redutase) também é afetada e em grau idêntico à succinato-oxidase; isto sugere que o sítio de ação sobre a succinato-oxidase é a própria succinato-desidrogenase; (d) a inibição sobre a NADH-oxidase é linear; isto elimina a possibilidade de dois sítios de ação no caminho dos elétrons entre a NADH-desidrogenase e a citocromo c-oxidase.

O efeito sobre a NADH-oxidase foi verificado por Vignais *et al.* (22). Estes autores utilizaram o steviol. Neste trabalho demonstrou-se que o isosteviol e o steviolbiosídeo exercem o mesmo efeito. Aquelles mesmos auto-

res não verificaram nenhum efeito do steviol sobre a succinato-oxidase e a succinato-desidrogenase. É possível que o steviol tenha comportamento diverso do isosteviol. É mais provável, no entanto, que esta discrepância se deva às diferentes fontes de enzima utilizadas. Vignais *et al.* utilizaram partículas submitocondriais, preparadas com digitonina, enquanto que neste trabalho, mitocôndrias rompidas por congelamento foram utilizadas. Não há dúvidas de que as mitocôndrias rompidas por congelamento e descongelamento — principalmente quando congeladas e descongeladas apenas uma vez — conservam muito mais as características originais do que as partículas preparadas com agentes de ação tão drástica com a digitonina. É possível, portanto, que o fato de Vignais *et al.* não terem detectado inibição sobre a succinato-oxidase deva-se ao grau de desagregação da estrutura membranar das organelas.

A inibição da NADH-oxidase e da succinato-oxidase, seja como for, explica boa parte dos efeitos sobre a respiração desacoplada. Isto é particularmente verdadeiro para o isosteviol: tanto a respiração dependente do L-glutamato, como aquela dependente do succinato é inibida. Já o efeito do steviolbiosídeo sobre a respiração dependente do L-glutamato, na presença de DNP, pode ser apenas parcialmente explicada pelo efeito sobre a NADH-oxidase: uma comparação entre ambos os efeitos (figuras 8A e 23A) revela que a inibição da respiração com L-glutamato é mais forte do que a inibição sobre a NADH-oxidase. Esta observação sugere a possibilidade de outros efeitos sobre outras atividades enzimáticas ou sobre a estrutura membranar das organelas.

#### *O efeito sobre a L-glutamato desidrogenase*

Surpreendentemente os compostos investigados — como também o extrato aquoso da planta — tiveram efeito pronunciado sobre a L-glutamato desidrogenase. A escolha do L-glutamato como substrato  $\text{NAD}^+$ -dependente para os estudos de respiração baseou-se no fato de Vignais *et al.* (22) terem utilizado o mesmo composto. Coincidentemente, a desidrogenase correspondente é também afetada. Vignais *et al.* (22) não verificaram se o steviol exerce efeito semelhante. A ação inibidora sobre a L-glutamato desidrogenase não

pode ser estendido genericamente a todas as desidrogenases piridino nucleotídeo dependentes. Na realidade, entre as quatro desidrogenases adicionalmente testadas, apenas a L-lactato desidrogenase (que é enzima citoplasmática) é afetada. Com relação à L-glutamato desidrogenase, deve-se salientar que a enzima de fígado de rato parece ser tão sensível quanto a enzima de fígado de boi. A sensibilidade independe da natureza da coenzima e até da direção da reação.

O efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo sobre a L-glutamato desidrogenase não é tão potente como aquele sobre a NADH-oxidase. Apesar disso, em princípio, pode-se supor que a inibição da respiração dependente do L-glutamato deve-se ao menos em parte à ação sobre a desidrogenase correspondente. Deve-se lembrar, no entanto, que a L-glutamato desidrogenase é enzima alostérica bastante complexa. Por isto não há como dizer se a forma existente em mitocôndrias recém isoladas é a mesma forma que foi utilizada para os testes e nem se as eventuais diferentes formas tem sensibilidades distintas. Todas estas indagações terão que ser objeto de investigações futuras.

#### *O efeito sobre a fosforilação oxidativa e a atividade ATP-ásica*

O efeito da atractiligenina e seus derivados (entre os quais o steviol e steviosídeo) sobre o transporte de ADP/ATP através da membrana mitocondrial perfaz o corpo principal do trabalho já citado de Vignais *et al.* (22). O transporte de ADP e ATP não foi medido neste trabalho. O que pôde ser investigado diz respeito ao efeito sobre a fosforilação oxidativa — através da ativação da respiração provocada pela adição de ADP — e sobre a atividade ATP-ásica. Os estudos da ativação da respiração pelo ADP confirmam os dados de Vignais *et al.*: com concentrações suficientemente elevadas dos glicosídeos da *Stevia rebaudiana*, o ADP não produz mais qualquer ativação quando adicionado. Como há, no entanto, vários efeitos sobre parâmetros intimamente relacionados à fosforilação — fluxo de elétrons e grau de acoplamento — não nos pareceu aconselhável extrair parâmetros de experiências deste tipo. As medidas da atividade ATP-ásica, no entanto, são menos sujeitas a interferências. Neste sentido, o que salta à vista é o efeito praticamente idêntico obtido com mitocôndrias intatas e mitocôn-

drias rompidas. Um teste preliminar com atractilato — substância que reconhecidamente inibe o transporte de ADP e ATP — revelou que em mitocôndrias rompidas por congelamento não há praticamente necessidade de transporte. Não há porque invalidar a observação de Vignais *et al.* de que os glicosídeos da *Stevia rebaudiana* inibem o transporte de ADP/ATP. Mas também, a dar crédito às experiências deste trabalho, é altamente provável de que esta não seja a única causa da inibição da fosforilação do ADP exógeno. A elucidação definitiva desta questão requer, no entanto, estudos sistemáticos e específicos, os quais fogem do alcance deste trabalho.

#### *Relação entre a estrutura e o efeito dos compostos testados*

A utilização de três estruturas representativas — o isosteviol, o steviolbiosídeo e o steviosídeo (ver figuras 1-3) — tem justamente a vantagem de se poderem fazer comparações entre os efeitos, com vistas a uma possível relação entre estrutura e ação biológica. Com relação às atividades enzimáticas, a atividade ATP-ásica incluída, a ordem de potência obedece sempre, sem exceção, à sequência isosteviol > steviolbiosídeo > steviosídeo. As diferenças entre os compostos podem variar de efeito a efeito. Muito frequentemente ocorre que o último na sequência, o steviosídeo, não exerça nenhum efeito: isto ocorre por exemplo, em relação à L-glutamato desidrogenase,

O mesmo ocorre também em relação a outros fenômenos, os quais nem sempre estão vinculados ao efeito sobre as diversas atividades enzimáticas. É o caso, por exemplo, do efeito desacoplante: o isosteviol é muito mais potente que o steviolbiosídeo e o steviosídeo. O mesmo pode-se dizer em relação ao *swelling*, à ativação da respiração pelo ADP, etc. A conclusão que se pode tirar é de que o "desnudamento" da aglucona, progressivo na sequência steviosídeo → steviolbiosídeo → isosteviol, aumenta a atividade biológica dos compostos, ao menos a nível mitocondrial. A carboxila possivelmente joga um papel importante — principalmente no tocante ao efeito desacoplante (63) —, mas outras porções da molécula podem ser igualmente responsáveis por determinados tipos de efeito observados.

Os dados aqui obtidos com o isosteviol podem também ser comparados com

os resultados obtidos por Vignais *et al.* com o steviol. Disponíveis estão os dados sobre a fosforilação oxidativa e sobre a NADH-oxidase. Uma comparação revela que ambas as estruturas afetam fortemente, tanto a fosforilação como a NADH-oxidase. Embora as atividades sejam comparáveis, parece que o steviol é um pouco mais potente que o isosteviol em relação à inibição da fosforilação oxidativa: steviol 40  $\mu\text{M}$  provoca 50% de inibição da fosforilação oxidativa; para o isosteviol, a concentração que provoca idêntica inibição parece situar-se em torno de 100  $\mu\text{M}$ .

*Possíveis consequências fisiológicas decorrentes da ingestão do steviosídeo e do extrato aquoso total da planta (chá)*

A utilização do extrato aquoso total da planta, seja como adoçante, seja com fins terapêuticos, já vem de longa data (9). Já a utilização do steviosídeo purificado como adoçante não tem sido muito intensa no passado. Há, no entanto, interesse crescente por este composto, seja por parte da indústria de alimentos, seja por parte da indústria farmacêutica, o que certamente incentivará o seu uso como adoçante, em substituição aos demais adoçantes não-calóricos ou mesmo em substituição à sacarose (2).

No caso do extrato aquoso total, sabe-se que o mesmo vem sendo ingerido sem que tenha havido consequências danosas. Isto talvez cause certa estranheza quando se sabe que, conforme os resultados deste trabalho, o extrato aquoso total inibe fortemente a fosforilação oxidativa e mais fortemente ainda a NADH-oxidase e a L-glutamato desidrogenase. Isto se deve provavelmente às relativamente baixas doses ingeridas. O extrato aquoso da planta é extremamente doce, mesmo que a quantidade de folhas extraídas seja bem pequena. Um aumento na quantidade de folhas extraídas torna o sabor bastante desagradável. Por isto, a tendência é ingerir um extrato bastante diluído, pelo que a extrema diluição dilui também o efeito. Por outro lado, mesmo doses bem elevadas não causam transtornos sérios, ao menos se ingeridas por um período de até cinco dias. É o que verificaram Alvarez *et al.* (36), os quais ministraram a pacientes sãs, doses diárias de 20 g de folhas secas extraídas. Com estas doses, o que se observa é antes um efeito hipoglicemiante, isto é, uma queda no nível da glucose sanguínea (36). A questão que se impõe é, se o efeito do extrato

aquoso sobre a fosforilação oxidativa e sobre a NADH-oxidase, realmente é o responsável pelo efeito hipoglicemiante. Teoricamente esta é uma possibilidade, já que em geral, inibidores da fosforilação oxidativa tem efeito hipoglicemiante. O atractilato, por exemplo, por ser muito potente, pode provocar convulsões hipoglicemiantes. Há toda uma gama de agentes hipoglicemiantes orais (guanidinas, por exemplo), cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição da fosforilação oxidativa (74,75). A interpretação que se tem dado é a de que a inibição da fosforilação oxidativa limita de tal forma a disponibilidade de ATP, que a gluconeogênese fica inibida ao mesmo tempo que o consumo de glucose é ativado. O resultado final é uma hipoglicemia.

Do exposto acima, parece claro que o extrato aquoso da planta pode causar hipoglicemia através dos seus efeitos sobre a cadeia respiratória. Se é isto, no entanto, o que realmente ocorre com as doses normalmente ministradas nos estudos feitos até agora, é coisa a ser investigada ainda, seja a nível celular, seja a nível de organismo inteiro.

A utilização do steviosídeo como adoçante, por outro lado, terá que levar em conta os seus efeitos sobre a respiração e sobretudo sobre a fosforilação oxidativa. É evidente, no entanto, que em relação ao seu poder adoçante, o steviosídeo é bem pouco ativo biologicamente, ao menos a nível mitocondrial. Este composto é 300 vezes mais doce do que a sacarose. Será necessário ingerir apreciável quantidade (inviável por causa do grande poder adoçante), para atingir um nível de steviosídeo suficientemente elevado que possa inibir significativamente a fosforilação oxidativa. Maior perigo talvez ofereça a possibilidade de uma hidrólise do steviosídeo, seja na cavidade digestiva, seja no interior das células. A hidrólise, se for enzimática, pode levar à liberação de steviol, o qual é mais de uma ordem de grandeza mais potente em inibir a fosforilação oxidativa, exercendo além do mais outros efeitos (sobre a NADH-oxidase, por exemplo). Uma indicação acerca desta possibilidade foi obtida em trabalho recentemente publicado por Wingard *et al.* (66). Estes autores demonstraram que o steviosídeo, bem como o rebaudiosídeo A, podem ser degradados a steviol e glucose pela microflora intestinal do rato. O steviol formado é, além do mais, facilmente absorvido. Estes fatos, se de um lado tornam indispensável a realização de experiências análogas com a microflora humana,

é também um fator positivo que apoia a investigação do efeito das outras estruturas, derivadas do steviosídeo.

#### *Possibilidades para investigações futuras*

Embora este trabalho tenha revelado toda uma gama de possíveis efeitos das três substâncias vistas globalmente, não se pode deixar de mencionar que há vários aspectos de difícil interpretação. O aspecto mais delicado é o que diz respeito ao efeito do steviosídeo sobre a respiração, principalmente na presença de desacoplante. O steviosídeo inibe a respiração ativada pelo 2,4-dinitrofenol, tanto com L-glutamato como substrato, como com succinato. No caso do succinato, pode-se explicar a inibição, como uma consequência da ação sobre a succinato-desidrogenase (ver Tabela I). No caso do L-glutamato, no entanto, não há explicação tão simples: o steviosídeo não inibe nem a NADH-oxidase, nem a L-glutamato desidrogenase. Na realidade, em altas concentrações, este composto chega a ativar a NADH-oxidase. E no entanto, a inibição da respiração com L-glutamato e DNP é bastante forte. Haveria uma reversão do desacoplamento por parte do steviosídeo? Esta hipótese não é muito provável, já que o próprio steviosídeo, a julgar pelas experiências de ejeção ativa de prótons (figura 16), parece exercer um certo grau de desacoplamento. Seja como for, não há dados suficientes para a interpretação do efeito do steviosídeo.

Há sem dúvida outros pontos pouco claros, dependendo de investigações futuras. O aspecto mais premente é sem dúvida aquele referente ao exato mecanismo da inibição da fosforilação oxidativa. Experiências para elucidar esta questão, poderão ir desde medidas de hidrólise do ATP endógeno (em mitocôndrias intatas) até experiências com a ATPase purificada.

Outro aspecto ainda diz respeito à possível interação entre os compostos e as membranas mitocondriais. Que pode haver interações complexas é sugerido, por exemplo, pela fase de retardo que o steviolbiosídeo induz às curvas de respiração de mitocôndrias acopladas oxidando L-glutamato. Não está também provado que os três compostos investigados neste trabalho efetivamente passem através da membrana mitocondrial. É sabido que dissacarídeos não permeiam a membrana mitocondrial: o caso mais conhecido é o

da sacarose. Por outro lado, os glicosídeos em geral também não permeiam a membrana mitocondrial; é o caso do atractilosídeo, por exemplo, o qual exerce os seus efeitos do lado externo da membrana (65). Por isto mesmo, seria interessante saber-se da influência do radical sofrósil (que é um dissacarídeo; ver figuras 2 e 3) sobre a permeabilidade do steviosídeo e do steviolbiosídeo. Se de fato a sofróse tiver alguma influência (negativa, presumivelmente) sobre a permeabilidade, sem dúvida alguma, a permeabilidade do steviosídeo e do steviolbiosídeo deve diferir significativamente daquela do isosteviol. Uma confirmação neste sentido, por outro lado, poderia explicar várias das diferenças entre os efeitos dos três compostos.

## 5. RESUMO

Um estudo do efeito do isosteviol (até 1 mM), do steviolbiosídeo (até 1 mM) e do steviosídeo (até 5 mM) — bem como do extrato aquoso total da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (até 15 mg de folhas secas extraídas por ml) — foi realizado. Os estudos revelaram a existência de diversos efeitos, seja a nível da membrana mitocondrial, seja a nível enzimático. Os seguintes resultados foram obtidos:

1. O efeito sobre a respiração acoplada difere do efeito sobre a respiração desacoplada por 2,4-dinitrofenol. A respiração desacoplada por 2,4-dinitrofenol tende a ser inibida; a respiração acoplada pode sofrer ativação em baixas concentrações e inibição em altas concentrações, podendo também não ser afetada de modo muito significativo.
2. A ativação da respiração pelo ADP é inibida; a atividade ATP-ásica de mitocôndrias intatas e rompidas por congelamento é inibida.
3. Há evidências a favor de um efeito desacoplador, principalmente por parte do isosteviol. Esta conclusão baseia-se nos resultados do efeito dos compostos sobre a respiração (ativação ou ausência de efeito em mitocôndrias acopladas), sobre a ativa e ejeção de prótons (inibição) e sobre o *swelling* controlado (inibição).
4. A NADH-oxidase e a succinato-oxidase são inibidas, enquanto que a citocromo c-oxidase não é afetada. A succinato-desidrogenase também é inibida. Os dados são consistentes com dois sítios de ação: um deles entre a NADH-desidrogenase e a coenzima A e o outro entre a succinato-desidrogenase e a coenzima A.
5. Um estudo cinético do efeito sobre a NADH-oxidase revelou a existência de um único sítio de ação entre a NADH-desidrogenase e a citocromo c-oxidase. A inibição do isosteviol e do steviolbiosídeo é do tipo não-competitiva, com  $K_i$  igual a 100  $\mu\text{M}$  e 600  $\mu\text{M}$ , respectivamente.
6. A L-glutamato desidrogenase é entre as enzimas solúveis testadas a mais fortemente inibida.
7. O isosteviol foi o composto mais ativo em praticamente todos os efeitos observados; o steviolbiosídeo vem logo a seguir, sendo o steviosídeo o menos ativo.
8. O extrato aquoso total inibe fortemente a NADH-oxidase e a L-glutamato desidrogenase. A atividade ATP-ásica e a fosforilação oxidativa também são inibidas, porém, o efeito é menos pronunciado.

## 6. BIBLIOGRAFIA

01. Schmeling, G.A. von — Caã-ehê. Edulcorante natural não calórico. *Bol. San., S. Lucas S. Paulo XCIV(5):67-68, 1967.*
02. Angelucci, E. — O steviósido de plantas brasileiras de *Stevia rebaudiana* Bertoni e a potencialidade de seu emprego em alimentos. Ensaaios em formulações hídricas e carbonatadas. Tese de doutorado, USP, São Paulo, 1979.
03. Bertoni, M.S. — El caã-ehê (*Eupatorium rebaudianum*, species nova). *Rev. Agr. 1:35-37, 1899.*
04. Bertoni, M.S. — Le kaã-hê-ê. Sa nature et ses propriétés. *An. Cient. Paraguayos série I(5):1-14, 1905.*
05. Bertoni, M.S. — La *Stevia rebaudiana* Bertoni. La Estevina y la Rebaudina. Nuevas substancias edulcorantes. *An. Cient. Paraguayos série II(2):129-134, 1918.*
06. Melville, J. — Kaa-Hê-ê (*Stevia rebaudiana*) as a substitute for sugar and saccharine (Memorandum). Private communication from the Director of the Royal Botanic Gardens, Kew, 1911, 2p.
07. Sumida, T. — Reports on *Stevia rebaudiana* Bertoni M. Introduced from Brazil as new sweetness resource in Japan. *Misc. Publ. Hokkaido Nat. Agric. Exper. Sta. 2:69-83, 1973.*
08. Dietrich, S.M. de Campos — *Stevia rebaudiana* Bertoni. Histórico. In: *I Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana Bertoni*. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 1981, p. 1.1-1.2.
09. Gasperi, L. E. de — *El dulce té del Paraguay*. Folheto explicativo acompanhando o chá solúvel de *Stevia rebaudiana*.
10. Rebaudi, O. — Nota sobre el caã-ehê. *Rev. Quím. Farm. Buenos Aires 2,3,4, 1900.*
11. Rasenack, P. — Über die Süß-stoffe des *Eupatorium rebaudianum* und des Sussholzes. *Arb. Kaiserl. Gesundh. 28:420-443, 1908.*
12. Bridel, M. & Lavieille, R. — Sur le principe sucré des feuilles de kaã-hê-ê (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Compt. Rend. Acad. Sci. 192: 1123-1125, 1931.*
13. Bridel, M. & Lavieille, R. — Le principe à saveur sucrée du kaã-hê-ê (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Bull. Soc. Chim. Biol. 13:636-655, 1931.*
14. Bridel, M. & Lavieille, R. — Le rebaudine de Dietrich est du steviósido impur. *J. Pharm. Chim. 14:161-163, 1931.*

15. Bridel, M. & Lavieille, R. — Le principe sucré du kaá-hê-ê (*Stevia rebaudiana* Bertoni). II. L'hydrolyse diastasique du stéviósíde. III. Le stéviol de l'hydrolyse diastasique et l'isostéviol de l'hydrolyse acide. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 13:781-796, 1931.
16. Dolder, F., Lichti, H., Mosettig, E., Quitt, P. — The structure and stereochemistry of steviol. *J. Amer. Chem. Soc.* 82:246-247, 1960.
17. Wood Jr., H.B., Allerton, R., Diehl, H.W. & Fletcher, H.C. — Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. *J. Org. Chem.* 20: 875-883, 1955.
18. Mosettig, E. & Nes, W.R. — Stevioside. II. The structure of the aglucon. *J. Org. Chem.* 20:884-899, 1955.
19. Mosettig, E., Quitt, P., Beglinger, U., Waters, J.A. — A direct correlation of the diterpene alkaloids and hydrocarbons of the phyllocladene group. Interconversion of garryfoline and steviol. *J. Amer. Chem. Soc.* 83:3163-3164, 1961.
20. Vis, E. & Fletcher Jr., H.G. — Stevioside, IV. Evidence that stevioside is a sophoroside. *J. Am. Chem. Soc.* 28:4709-4710, 1956.
21. Wood Jr., H.B. & Fletcher Jr., H.G. — Stevioside, III. The anomeric 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-O-mesitoyl-D-glucopyranoses and their behaviour with alkali. *J. Am. Chem. Soc.* 78:207-210, 1956.
22. Vignais, P.V., Duee, E.D., Vignais, P.M. & Huet, J. — Effects of atractyligenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and on the translocation of adenine nucleotide in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 118:465-483, 1966.
23. Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K. & Tanaka, O. — New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 15:981-983, 1976.
24. Sakamoto, I., Kohda, H., Murakami, K. & Tanaka, O. — Quantitative analysis of stevioside. *Yarugaku Zasshi* 95(12):1507-1510, 1975.
25. Kobayashi, M., Horikava, S., Degrandi, I.H., Ueno, J., Mitsushashi, H. — Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 16:1405-1408, 1977.
26. Sakamoto, I., Yamasaki, K. & Tanaka, O. — Application of <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy to chemistry of natural glycosides: rebaudioside C a new sweet diterpene glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Chem. Pharm. Bull.* 25(4):844-846, 1977.
27. Sakamoto, I., Yamasaki, K. & Tanaka, O. — Application of <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides: rebaudiosides D and E, new sweet diterpene-glycosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Chem. Pharm. Bull.* 25(12):2437-2439, 1977.
28. Alvarez, M., Bracht, A. & Ishii, E.L. — Extração do steviosídeo e outros componentes das folhas de *Stevia rebaudiana*. Comunicação prévia à X Reunião Anual da SBBq. *Arq. Bio. Tecnol.* 24(1):179, 1981.

29. Miquel, O. — Un nuevo hipoglicemiante oral (comunicación previa). *Rev. Med. Paraguaya* 7:200, 1966.
30. Boeckh, E.M.A. — *Stevia rebaudiana* Bertoni. Efeitos cárdio circulatórios do extrato aquoso total em pessoas normais e do steviosídeo em ratos e sapos (resumo). In: *I Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana Bertoni*, Campinas, 1981, p.XI.1-XI.2.
31. Planas, G.M. & Kué, J. — Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science* 162:1007, 1968.
32. Yabu, M., Takase, M., Toda, K., Tanimoto, K., Yasutake, A., Iwamoto, Y. — Studies on stevioside, natural sweetener. *Hiroshima Daigaku Shigaku Zasshi* 9(1):12-17, 1977.
33. Turrin, M.Q. do Amaral — Esteviosídeo: potenciação da resposta contrátil em músculo liso isolado de cobaia. In: *I Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana Bertoni*. Campinas, 1981, p. XII.1-XII.4.
34. Susuki, H., Kasai, T., Sumihara, M., Sugisawa, H. — Influence of oral administration of stevioside on levels of blood glucose and liver glycogen of intact rats. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 51(3):171-173, 1977.
35. Schmeling, G.A. von, Carvalho, F.N. & de Espinoza, A.D. — *Stevia rebaudiana* Bertoni. Avaliação do efeito hipoglicemiante em coelhos aloxanizados. *Ciência e Cultura* 22(5):599-601, 1977.
36. Alvarez, M., Bazzote, R.B., Godoy, G.L., Cury, R. & Botion, L.M. — Efeito do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre parâmetros bioquímicos de pessoas adultas normais, Comunicação à X Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica. *Arq. Bio. Tecnol.* 24(1):178, 1981.
37. Bracht, A., Alvarez, M. & Kelmer-Bracht, A.M. — Efeitos de produtos extraídos da *Stevia rebaudiana* sobre o metabolismo celular. Comunicação à X Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica. *Arq. Biol. Tecnol.* 24(1):77, 1981.
38. Bracht, A., Alvarez, M. & Kelmer-Bracht, A.M. — Efeitos do extrato aquoso da *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre o metabolismo celular e subcelular. Comunicação ao *I Seminário Brasileiro sobre a Stevia rebaudiana Bertoni*. Campinas, 1981, p. XIV-1-XIV-2.
39. Singer, T. P. — Flavoprotein dehydrogenases of the respiratory chain. In: Florin, M. & Stotz, E.H. (ed.) — *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, 1966, vol. 14, p.127-198.
40. Voss, D.O., Campello, A.P. & Bacila, M. — The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 4:48-51, 1961.
41. Packer, L., Utsumi, K. & Mustafa, M.G. — Oscillatory states of mitochondria I — Electron and energy transfer pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 117:381-393, 1966.
42. Estabrook, R.W. — Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP:O ratios. In: Lowenstein, J.M. (ed.) —

*Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, 1967, vol. X, p.41-47.

43. Chance, B. & Williams, G.R. — A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* 175:1120-1121, 1955.
44. Villalobo, A. & Lehninger, A.L. — The proton stoichiometry of electron transport in Ehrlich ascites tumor mitochondria. *J. Biol. Chem.* 254 (11):4352-4358, 1979.
45. Pressman, B.C. — Biological applications of ionophores. In: Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. & Slater, C. — *Ann. Rev. Biochem.* 46:501-530, 1977.
46. Mitchell, P. & Moyle, J. — Respiration driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 105:1147-1162, 1967.
47. Papa, S. — Proton translocation reactions in the respiratory chains. *Biochim. Biophys. Acta* 456:39-84, 1976.
48. Fiske, C.H. & Subbarow, Y. — The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375-400, 1925.
49. Lowry, O.H. & Lopez, J.A. — The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.* 162(1,3): 421-428, 1946.
50. Mitchell, P. & Moyle, J. — Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 4:530-539, 1968.
51. Singer, T.P. — Determination of the activity of succinate, NADH, choline and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenases. In: Glick, D. (ed.) — *Methods of Biochemical Analysis*. New York, John Wiley & Sons, 1974, vol. 22, p.123-175.
52. Mustafa, M.G., Gowger, M.L., Labbe, R.F. & King, T.E. — General nature of "Wurster's Blue shunts" in the respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 243(8):1908-1918, 1968.
53. Hatefi, Y. & Rieske, J.S. — The preparation and properties of DPNH-cytochrome c-reductase (Complex I-III) of the respiratory chain. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (ed.) — *Methods of Enzymology*, 1967, vol. X.
54. Bergmeyer, H.V., Gawehn, K. & Grassl, M. — Enzymes as biochemical reagents. In: Bergmeyer, H.V., (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, New York, Academic Press, 1974, vol. 1, p.425-522.
55. Gutmann, I. & Wahlefeld, A.W. — L(-)malate determination with malate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H.V. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, New York, Academic Press, 1974, vol. 3, p.1585-1581.
56. Plaut, G.W.E. — Isocitrate dehydrogenase (DPN-specific) from bovine heart. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (ed.), *Methods of enzymology*, New York, Academic Press, 1974, vol. 2, p.650-656.

57. Schmidt, E. — Glutamate dehydrogenase UV-assay. In: Bergmeyer, H.V. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*; New York, Academic Press, 1974, vol. 2, p.650-656.
58. Bernt, E. & Bergmeyer, H.V. — L-glutamate UV-assay with glutamate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H.V. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, New York, Academic Press, 1974, vol.3, p.1704-1708.
59. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
60. Dische, Z. — Color reaction of hexoses. In: Whilster, R.L. & Wolform, M.L. (ed.), *Methods in carbohydrate chemistry*. New York, Academic Press, 1962, vol. 1, p.491-492.
61. Plowman, K.M. — *Enzyme kinetics*. New York, McGraw-Hill, 1972.
62. Cleland, W.W. — The statistical analysis of enzyme kinetic data. In: Nord, F.F. (ed.), *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. New York, Inter-science Publishers, 1967, vol. 29, p.1-32.
63. Hanstein, W.G. — Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 456:129-148, 1976.
64. Kozlov, I.A. & Skulachev, V.P. — H<sup>+</sup>-Adenosine triphosphatase and membrane energy coupling. *Biochim. Biophys. Acta* 463:29-89, 1977.
65. Klingenberg, M., Riccio, P., Aquila, H., Schmiedt, B., Grebe, K. & Topitsch, P. — Characterization of the ADP/ATP carrier in mitochondria. In: Azzone, G.F., Klingenberg, M.E., Guagliariello & Siliprandi, N. (ed.), *Membrane proteins in transport and phosphorylation*, Amsterdam, North-Holland Pub. Co., 1974, p.229-243.
66. Wingard Jr., R.E., Brown, J.P., Enderlin, F.E., Dale, J.A., Hale, R.L. & Seita, C.T. — Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia* 36: 519-520, 1980.
67. Mustafa, M.G., Utsumi, K. & Packer, L. — Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 24:381-385, 1966.
68. Klingenberg, M. & Rottenberg, H. — Relation between the gradient of the ADP/ATP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane. *Eur. J. Biochem.* 73:125-130, 1977.
69. Cleland, W.W. — Steady-state kinetics. In: Boyer, P.D. (ed.) — *The enzymes*. New York, Academic Press, 1970, vol. 2, p.1-65.
70. Hollunger, G. — Guanidines and oxidative phosphorylations. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 11(1):7-84, 1955.
71. Hill, C.M., Waight, R.D. & Bardsley, W.G. — Does any enzyme follow

- the Michaelis-Menten equation? *Mol. & Cel. Biochem.* 15(3):173-178, 1977.
72. Wilkinson, G.N. — Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* 80:324-332, 1961.
73. Galante, Y.M. & Hatefi, Y. — Purification and molecular and enzymic properties of mitochondrial NADH-dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 192(2):559-568, 1979.
74. Slater, J.D.H. — Oral hypoglycaemic drugs. *Prog. Med. Chem.* 1(187): 187-219, 1961.
75. Bearder, J.R., Frydman, V.M., Gaskin, P., MacMillan, J., & Wels, C.M. — Fungal products, part XVI. Conversion of isosteviol and steviol acetate into gibberellin analogues by mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi* and the preparation of [<sup>3</sup>H] giberellin A<sub>20</sub>. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2:173-178, 1976.
76. Bearder, J.R., MacMillan, J. & Wels, M. — The metabolism of steviol to 13-hydroxylated-*ent*-gibberellanes and *ent*-kaurenes. *Phytochem.* 14: 1741-1748, 1975.
77. Dooijewaard, G. & Slater, E.C. — Steady-state kinetics of high molecular weight (type-I) NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 440: 1-15, 1976.
78. Dooijewaard, G. & Slater, E.C. — Steady-state kinetics of low molecular weight (type-II) NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 440: 16-35, 1976.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Meus especiais agradecimentos dirigem-se

ao Dr. Mauro Alvarez, por ter generosamente colocado à disposição as substâncias utilizadas neste trabalho e pelo aconselhamento durante a sua execução;

ao Dr. Adelar Bracht pelo tratamento estatístico dos dados e pela constante assistência prestada durante a execução das experiências;

à Dra. Glaci Therezinha Zancan por ter generosamente aceito a orientação deste trabalho;

à Fundação Universidade Estadual de Maringá, por ter colocado à minha disposição equipamento e laboratórios;

ao Luiz Saraiva Arraes, assistente técnico, pela prestimosa assistência técnica prestada;

ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Técnico e Científico (CNPq), pelo auxílio financeiro.