

WELLIGTON LUCIANO BRAGUINI

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ISOESTEVIOL LACTONA:
EFEITOS SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL
E SOBRE MACRÓFAGOS**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eliane Merlin Rocha

**CURITIBA
2001**

WELLIGTON LUCIANO BRAGUINI

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ISOESTEVIOL LACTONA:
EFEITOS SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL
E SOBRE MACRÓFAGOS**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eliane Merlin Rocha

CURITIBA
2001

EE-405

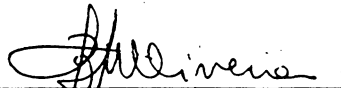
TERMO DE APROVAÇÃO

WELLIGTON LUCIANO BRAGUINI

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ISOESTEVIOL LACTONA:
EFEITOS SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL
E SOBRE MACRÓFAGOS**

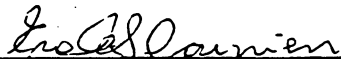
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora:

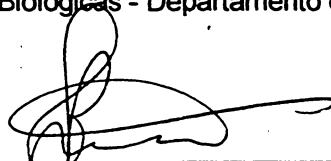


Profª Drª Maria Benigna Martinelli de Oliveira
Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica - UFPR

Membros:



Profª Drª Eva Gunilla Skare Carnieri
Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica - UFPR



Profº Dr. Brás Heleno de Oliveira
Setor de Ciências Exatas - Departamento de Química - UFPR



Profª Drª Silvia Maria Suter Correia Cadena
Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica - UFPR

Curitiba, 30 de março de 2001

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Eliane Merlin Rocha.

*Aos meus pais, Osório e Maria de Lourdes,
que moldaram minha mente e meu ser.*

Dedico

*À minha esposa, Luciane,
incansável incentivadora e ajudadora em
todos os meus empreendimentos,
cujos apoio, estímulo e dedicação
foram imprescindíveis para a
realização deste trabalho.*

Dedico

Agradecimentos

À Deus, o criador, pois sem ele nada é possível.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que seus nomes não tenham sido aqui declinados, meus mais sinceros agradecimentos.

À Profª Drª Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pelo desafio de aceitar a orientação deste trabalho, pela significativa contribuição acadêmica, pela amizade, confiança e conhecimentos dispensados, que muito acrescentaram à minha formação profissional e pessoal.

À Profª Drª Maria Eliane Merlin Rocha, pela amizade, co-orientação, carinho e esmero com que me ajudou a conduzir os experimentos, e pelas valiosas sugestões e correções que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ào Profª Dr. Brits Heleno de Oliveira do Departamento de Química, pela doação dos compostos para este estudo e pelas valiosas sugestões.

À Profª Drª Maria Aparecida Biazon Gomes do Departamento de Química pela disposição e colaboração nos experimentos de voltametria cíclica, bem como da interpretação dos resultados.

À Profª Drª Eva Eunilla Skare Carnieri pela gentileza de corrigir o abstract, pelas sugestões na realização deste trabalho e pela amizade.

À Profª Drª Flávia Maria Puter Correia Cadena pelos incentivos e amizade constante.

Ào Profª Dr. Aguiinaldo José do Nascimento pelo auxílio na análise estatística deste trabalho.

À Profª D. Glaci Zancon, pela leitura do projeto e valiosas sugestões.

Aos Professores Doutores Ana Maria Kelmer-Bracht, Emi Luiza Ishii-Iwamoto e Adelar Bracht e amigos do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá, pelo incentivo à pós-graduação.

Ào Profª Dr. Phillip Gorin pela gentileza de corrigir o abstract.

Aos colegas de laboratório, Briscila Janzen dos Santos, Andréa Rocha, Andréia Penff, Ana Paula N. Newton e Mariana B. Piemonte pela amizade.

A colega Guilhermina Noletto, pelo auxílio e nos experimentos com macrófagos, pelas valiosas sugestões e amizade.

À senhora Marilza Lamour, secretária do curso de Pós-Graduação pela gentileza e dedicação prestados no decorrer deste trabalho.

Às bibliotecárias e funcionários da biblioteca do setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelo auxílio prestado.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Professores e amigos do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo apoio e estímulo.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

*"...Porque Eu, o Senhor Teu Deus, te tomo pela tua mão direita,
e te digo: Não temas, que eu te ajudo."
(Isaías 41: 13)*

*"...Mas Eu o Senhor os curirei, Eu o Deus de Israel,
os não desampararei. Abrirei rios em lugares altos,
e fontes no meio dos vales; tornarei o deserto em tanques de água,
e a terra seca em mananciais."
(Isaías 41: 17-18)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XII
RESUMO	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 TERPENÓIDES.....	1
1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE CAURANOS, BAIERANOS E LACTONAS.....	5
1.2.1 Atividade Biológica de Lactonas Sesquiterpênicas Naturais e Substituídas	5
1.2.2 Cauranos diterpenóides	7
1.2.3 Baieranos diterpenóides.....	9
1.3 <i>Stevia rebaudiana</i> E SEUS GLICOSÍDEOS.....	13
1.4 ISOESTEVIOL.....	15
1.5 ISOESTEVIOL LACTONA.....	17
1.6 BIOQUÍMICA DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS	22
1.7 BIOQUÍMICA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS	23
2 OBJETIVOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 REAGENTES	27
3.2 ISOESTEVIOL (ISO) E ISOESTEVIOL LACTONA (IEL)	27
3.3 ANÁLISES DOS EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E ISOESTEVIOL SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL.....	28
3.3.1 Animais	28
3.3.2 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato para Determinação do Consumo de Oxigênio e Atividades Enzimáticas	28
3.3.3 Determinação do Consumo de O ₂ , Cálculo do Coeficiente de Controle Respiratório e Relação ADP:O	29
3.3.4 Obtenção de Mitocôndrias de Fígado de Rato Rompidas para Avaliação de Atividades Enzimáticas Mitocondriais	30
3.3.5 Determinação da Atividade das Enzimas Ligadas à Cadeia Respiratória.....	30

3.3.5.1	NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase).....	31
3.3.5.2	NADH Citocromo <i>c</i> Redutase (NADH Citocromo <i>c</i> Óxido Redutase).....	31
3.3.5.3	Citocromo <i>c</i> Oxidase (Ferrocitocromo <i>c</i> : Oxigênio Óxido-Redutase).....	32
3.3.5.4	Obtenção do Ferrocitocromo <i>c</i>	32
3.3.5.5	NADH Desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido-Redutase).....	33
3.3.5.6	Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase).....	33
3.3.5.7	Succinato Citocromo <i>c</i> Redutase (Succinato: Ferrocitocromo <i>c</i> Óxido-Redutase).....	34
3.3.5.8	Succinato Desidrogenase (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido Redutase).....	34
3.3.6	Determinação Espectrofotométrica da L-Glutamato Desidrogenase (E. C. 1.1.1.37).....	35
3.3.7	Determinação da Atividade da F ₁ F ₀ ATPase.....	35
3.3.7.1	Determinação da Atividade da F ₁ F ₀ ATPase em Mitocôndrias Intactas.....	35
3.3.7.2	Determinação da Atividade da F ₁ F ₀ ATPase em Mitocôndrias Rompidas.....	36
3.3.7.3	Determinação da Atividade da F ₁ F ₀ ATPase em Mitocôndrias Tratadas com Carbonil Cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP).....	37
3.4	DETERMINAÇÃO DO INCHAMENTO MITOCONDRIAL (SWELLING).....	37
3.4.1	Determinação do Inchamento em Mitocôndria Energizada.....	37
3.4.1.1	Determinação do Inchamento Mitocondrial na Presença de Acetato de Sódio.....	38
3.4.1.2	Determinação do Inchamento na Presença de Valinomicina e K ⁺	38
3.5	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDOX DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO ISOESTEVIOL POR VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	39
3.6	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS.....	39
3.7	EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E ISOESTEVIOL SOBRE MACRÓFAGOS.....	40
3.7.1	Obtenção dos Macrófagos.....	40
3.7.2	Determinação da Viabilidade Celular.....	40
3.7.3	Determinação da Produção de Ânion Superóxido por Macrófagos Estimulados com PMA.....	41
3.7.4	Dosagem de Óxido Nítrico (NO [•]).....	42
3.7.5	Determinação da Concentração de Proteína Celular.....	42

3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.....	44
4.2	EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS À CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	50
4.3	EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE O COMPLEXO F ₁ F ₀ - ATPASE.....	53
4.4	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDOX DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO ISOESTEVIOL POR VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	56
4.5	EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO ISOESTEVIOL SOBRE PARÂMETROS OSMÓTICOS DA MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	61
4.5.1	Efeitos do Isoesteviol e do Isoesteviol Lactona Sobre o inchamento de Mitocôndrias Energizadas.....	63
4.5.3	Efeito do Isoesteviol Lactona e do Isoesteviol sobre o Inchamento Mitocondrial Induzido por Valinomicina na Presença de Nitrato de Potássio.....	68
4.6	EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM PMA.....	71
4.7	EFEITOS DO ISOESTEVIOL E ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS.....	76
5	DISCUSSÃO FINAL.....	82
6	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURAS ESPACIAIS REPRESENTATIVAS DA SUBCLASSE DOS CAURANOS E BAIERANOS, E DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA, AMBOS PERTENCENTES A SUBCLASSE DOS BAIERANOS.....	3
FIGURA 2 - ESQUEMA MOSTRANDO A ORIGEM BIOSSINTÉTICA DOS BAIERANOS E CAURANOS.....	4
FIGURA 3 - ESQUELETOS CARBOCÍCLICOS DAS MAIORES CLASSES DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS.	7
FIGURA 4 - ESTRUTURAS QUÍMICAS REPRESENTATIVAS DE COMPOSTOS CAURENÓIDES COM ATIVIDADE BIOLÓGICA.	10
FIGURA 5 - ESTRUTURA GERAL PARA GIBERELINAS (<i>ent</i> -GIBERELANO) E ESTRUTURAS DE 2 DIFERENTES GIBERELANOS (GA ₁₂ E GA ₉).	11
FIGURA 6 - ESTRUTURAS DOS BAIERANOS COM ATIVIDADE SEMELHANTES A GIBERELINA.....	12
FIGURA 7 - ESTRUTURA DO 1-ACETIL-JATIVATRIOL.....	12
FIGURA 8 - DERIVADOS BAIERANOS DO ISOESTEVIOL COM ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	13
FIGURA 9 - HIDRÓLISE ÁCIDA DO ESTEVIOSÍDEO.....	14
FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL.....	15
FIGURA 11 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL LACTONA.....	17
FIGURA 12 - ESTRUTURA DO ISOESTEVIOL (A) E DO ISOESTEVIOL LACTONA (B).....	20
FIGURA 13 - (a) ESPECTRO DE RMN ¹ H DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO (b) ISOESTEVIOL, OBTIDOS EM CDCl ₃	21
FIGURA 14 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO III EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATOS.....	45
FIGURA 15 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO IV EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATOS.....	46
FIGURA 16 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE O CCR DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATOS.....	48
FIGURA 17 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A RAZÃO ADP/O DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATOS.....	49

FIGURA 18 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE O COMPLEXO F_1F_0 - ATPase DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATOS.....	55
FIGURA 19 - VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DO $K_3Fe(CN)_6$ (1mmol.l^{-1}) EM ELETRODO DE PLATINA EM SOLUÇÃO DE KCl 0,1 M, MOSTRANDO O PICO ANÓDICO E O PICO CATÓDICO.....	57
FIGURA 20 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA UTILIZANDO ELETRODO DE PLATINA E TAMPÃO HEPES pH 7,2.....	59
FIGURA 21 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO E TAMPÃO HEPES pH 7,2.....	60
FIGURA 22 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA UTILIZANDO ELETRODO DE PLATINA E TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO pH 7,2.....	60
FIGURA 23 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS, NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO.....	65
FIGURA 24 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E ISOESTEVIOL SOBRE O INCHAMENTO INDUZIDO POR VALINOMICINA, NA PRESENÇA DE POTÁSSIO, EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATOS DESENERGIZADAS.....	70
FIGURA 25 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM PMA "IN VITRO".....	74
FIGURA 26 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES "IN VITRO", APÓS INCUBAÇÃO DE 2 HORAS.....	75
FIGURA 27 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL (ISO) E DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS "IN VITRO", APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO.....	79
FIGURA 28 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS "IN VITRO".....	80
FIGURA 29 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES ESTIMULADOS COM $IFN-\gamma$ "IN VITRO".....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENÓIDES.....	2
TABELA 2 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA.....	51
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) E OS EFEITOS DO ISOESTEVIOL (ISO) SOBRE ALGUMAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	52
TABELA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO ISOESTEVIOL SOBRE O INCHAMENTO INDUZIDO POR GLUTAMATO DE SÓDIO EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Δp	- força próton-motriz
A	- absorbância
ADP	- adenosina 5'-difosfato
ADP/O	- quociente entre nmols de ADP e nanoátomos de oxigênio
ATP	- adenosina 5'-trifosfato
ATPase	- adenosinatrifosfatase
BSA	- albumina de soro bovino
CEP	- células do exsudato peritoneal
$CDCl_3$	- clorofórmio deuterado
DMSO	- dimetilsulfóxido
DCPIP	- 2,6 diclorofenolindofenol
EC_{50}	- concentração da droga que causa 50% do efeito máximo
ECS	- eletrodo de calomelano saturado
EDTA	- ácido etileno diamino tetracético
EGTA	- ácido etilenoglicol bis (éter 2-amino-etil) N,N,N',N' tetracético
FCCP	- carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
HBSS	- solução salina balanceada de Hanks
HEPES	- N-(2-hidroxi-etil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
IEL	- isoesteviol lactona
IFN- γ	- interfeiron-gama
ISO	- isoesteviol
MEM	- meio essencial mínimo de Eagle
MTT	- brometo de (3-[4-,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NAD^+	- nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
PBS	- solução salina tamponada
PEP	- fosfoenolpiruvato
Pi	- fosfato inorgânico
PMA	- forbol 12-miristato 13-acetato
PMS	- fenazina metassulfato
PMSF	- fluoreto de fenil-metil-sulfonila
RMN 1H	- ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RCC	- coeficiente de controle respiratório
TCA	- ácido tricloroacético
Tris	- tris (hidroximetil) amino metano

RESUMO

O isoesteviol lactona é um diterpeno baierano proveniente de uma reação de lactonização do isoesteviol. O isoesteviol é o produto obtido da hidrólise ácida do esteviosídeo, o glicosídeo obtido da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. É relatado que o isoesteviol afeta vários parâmetros do metabolismo mitocondrial, atuando como um desacoplador clássico. Este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos do isoesteviol lactona e comparar com aqueles do isoesteviol. Foram analisados os efeitos do isoesteviol lactona sobre mitocôndrias de fígado de rato e em macrófagos peritoneais de camundongos. Os resultados sobre a respiração mitocondrial mostraram que o isoesteviol lactona diminui a velocidade respiratória no estado III e estimula no estado IV. As análises dos complexos da cadeia respiratória mostraram que o isoesteviol lactona provocou uma diminuição da atividade enzimática dos complexos I, II, III e IV. A atividade da L-glutamato desidrogenase também foi reduzida 85% com 1 mmol.l⁻¹ de isoesteviol lactona. A atividade hidrolítica da ATPase é inibida parcialmente; nos experimentos de voltametria cíclica ambas as substâncias não mostraram ser eletroativas na faixa de potencial que abrange a cadeia respiratória; as análises de inchamento mitocondrial na presença de glutamato e acetato de sódio ou valinomicina e KNO₃ mostraram que o isoesteviol e o isoesteviol lactona inibem este parâmetro (o inchamento) como uma consequência de seus efeitos sobre a geração do potencial eletroquímico de prótons. Aparentemente, a elasticidade da membrana não é afetada pelos compostos. Em quase todas as análises realizadas o isoesteviol lactona promoveu efeitos inibitórios menos acentuados que o isoesteviol tendo apenas uma exceção, a atividade da NADH desidrogenase, porém ainda assim a inibição observada foi de apenas 17%, com o isoesteviol lactona 0,5 mmol.l⁻¹. Os resultados dos experimentos com macrófagos mostraram que ambas as substâncias diminuíram a viabilidade celular a partir de 50 μmol.l⁻¹; a produção de ânion superóxido foi inibida parcialmente tanto pelo isoesteviol como pelo isoesteviol lactona na concentração de 75 μmol.l⁻¹; nenhum efeito significativo foi observado sobre a via de produção de óxido nítrico pelas substâncias em estudo. Contudo, em comparação aos efeitos observados com o isoesteviol, a adição do anel lactônico no isoesteviol lactona promoveu uma diminuição dos efeitos tóxicos do isoesteviol.

ABSTRACT

Isosteviol lactone is a bayeran diterpene arise by lactonization of isosteviol. It is a product obtained by acid hydrolysis of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. It is known that isosteviol affects some mitochondrial metabolism parameters, acting as a classic uncoupler. The purpose of this work was to study the effects of isosteviol lactone and to compare them with those of isosteviol. The effects of isosteviol lactone on rat liver mitochondria and peritoneal macrophages from female Swiss mice, were examined. In terms of mitochondrial respiration, isosteviol lactone decrease the respiratory rate in state III and stimulated it in state IV. The enzymatic complexes showed that isosteviol lactone causes a reduction of enzymatic activities of complexes I, II, III and IV. The activity of L-glutamate dehydrogenase was also reduced 85% with 1 mmol.l⁻¹ of isosteviol lactone. The hydrolytic activity of ATPase was partially inhibited. In cyclical voltametry experiments, both substances were not electron-active in the redox potential range that applies to the respiratory chain. In the mitochondrial swelling experiments in the presence of glutamate and sodium acetate or valinomycin and KNO₃ showed that isosteviol and isosteviol lactone inhibit this parameter (swelling) as a consequence of effects on proton electrochemical gradient generation. Apparently, the membrane elasticity is not affected by compounds in study. In almost all analyses carried out on isosteviol lactone, lower inhibitory effects were observed than for isosteviol with only one exception, namely the activity of the NADH dehydrogenase. However the inhibition was only 17% with 0,5 mmol.l⁻¹ of isosteviol lactone. Experiments with macrophages showed that both substances lowered the cellular viability, starting from a 50 μmol.l⁻¹ concentration. The production of superoxide anion was partially inhibited by both isosteviol and isosteviol lactone at a concentration of 75 μmol.l⁻¹. Significant effect has been not yet observed in the pathway of nitric oxide production for the studied substances. However, on comparison with the effects observed with isosteviol, the presence of the lactone ring gave rise to a reduction of the toxic effects of isosteviol.

1 INTRODUÇÃO

O início do tratamento de doenças por meio de drogas perde-se na antigüidade, tendo precedido a história escrita. As primeiras drogas foram as de origem natural, extraídas principalmente de plantas superiores, e destinavam-se à terapia de doenças infecciosas (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982). Atualmente, a importância de moléculas derivadas de produtos naturais para a medicina, não está somente em seus efeitos farmacológicos ou quimioterápicos, mas também no seu papel como moléculas modelo para a produção de novas substâncias (PHILLIPSON, 1994).

O estudo de produtos naturais isolados de plantas ou obtidos através de reações químicas destes, representam fontes potenciais tanto de novas drogas, quanto na construção de novas moléculas biologicamente ativas, através de: a) síntese total de um composto semelhante ao isolado da planta ou b) modificação estrutural deste, seja por ciclização da molécula, remoção ou incorporação de grupamentos químicos, modificando assim sua atividade. Estas moléculas alternativas, depois de estudadas e avaliadas, poderão ser utilizadas como guia no desenvolvimento de novas drogas. Entre os produtos naturais com esta grande potencialidade estão os terpenóides, devido a enorme diversidade estrutural destes compostos.

1.1 TERPENÓIDES

Os compostos que se incluem no grupo dos terpenóides caracterizam-se por possuir estruturas que resultam da união de unidades C₅, pirofosfato de 3-isopentenila (IPP) e 3,3'-dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (HANS-WALTER, 1997; BRAMLEY, 1997). Estas unidades resultam da via biossintética do ácido mevalônico,

e são estruturalmente semelhantes ao isopreno, razão pela qual estes metabólitos se denominam genericamente por isoprenóides ou ainda terpenóides ou terpenos (terpenos refere-se a substâncias contendo apenas o esqueleto hidrocarboneto, enquanto que terpenóides podem apresentar além de Carbono e Hidrogênio outros átomos como por exemplo o Oxigênio).

Estes compostos podem ter estruturas cíclicas ou acíclicas que resultam de transformações das cadeias isoprenóides que lhes dão origem. Estas transformações compreendem um grande número de reações, tais como reduções, oxidações, ciclizações envolvendo a formação de carbocátions, rupturas de anel ou rearranjos, conferindo uma enorme diversidade estrutural a estes metabólitos. Estes compostos se organizam em função do número de unidades isoprenóides que os compõem, conforme mostrado na tabela 1, que apresenta a classificação dos terpenos de acordo com a quantidade de unidades isoprenóides (3-metil-1,3-butadieno) em sua composição (HANS-WALTER, 1997; BRAMLEY, 1997).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENÓIDES

		São unidades C_5H_8 que estão presentes em muitos metabólitos cujo esqueleto principal resulta de outra via biossintética. São comuns as alquilações de unidades C_5 em átomos de carbono ou oxigênio.
- C_5	Hemiterpenos	
- C_{10}	Monoterpenos	Derivam de pirofosfato de geranila, $GPP^{(1)}$, ($2 \times C_5$)
- C_{15}	Sesquiterpenos	Derivam de pirofosfato de farnesila, $FPP^{(2)}$, ($3 \times C_5$)
- C_{20}	Diterpenos	Derivam de pirofosfato de geranila geranila, $GGPP^{(3)}$, ($2 \times C_{10}$)
- C_{25}	Sesterterpenos	Derivam de $GGPP$ e $IPP^{(4)}$, ($2 \times C_{10} + C_5$)
- C_{30}	Triterpenos	Derivam de duas unidades de FPP , ($2 \times C_{15}$)
- C_{40}	Tetraterpenos	Derivam de duas unidades $GGPP$, ($2 \times C_{20}$)
- C_{5n}	Politerpenos	Derivam de um número n de unidades isoprenóides superior a oito até 10^5 .

⁽¹⁾ Pirofosfato de Geranila; ⁽²⁾ Pirofosfato de Farnesila; ⁽³⁾ Pirofosfato de Geranila Geranila;

⁽⁴⁾ Pirofosfato de Isopentenila

FONTE: LOURENÇO, 1997.

Dentre os terpenóides destacam-se os diterpenóides, que apresentam 20 átomos de carbono em sua estrutura e que são derivados do pirofosfato geranila-geranila. Os diterpenóides por sua vez são classificados em: bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos e macrocíclicos (HANSON, 1971). Os diterpenóides tetracíclicos (figura 1) podem ainda ser subclassificados em cauranos e baieranos conforme a disposição espacial que assumem os anéis *c* e *d*. Os compostos que são objeto do presente estudo, o isoesteviol (ISO) e o isoesteviol lactona (IEL) são diterpenos, pertencentes a subclasse dos baieranos (figura 2).

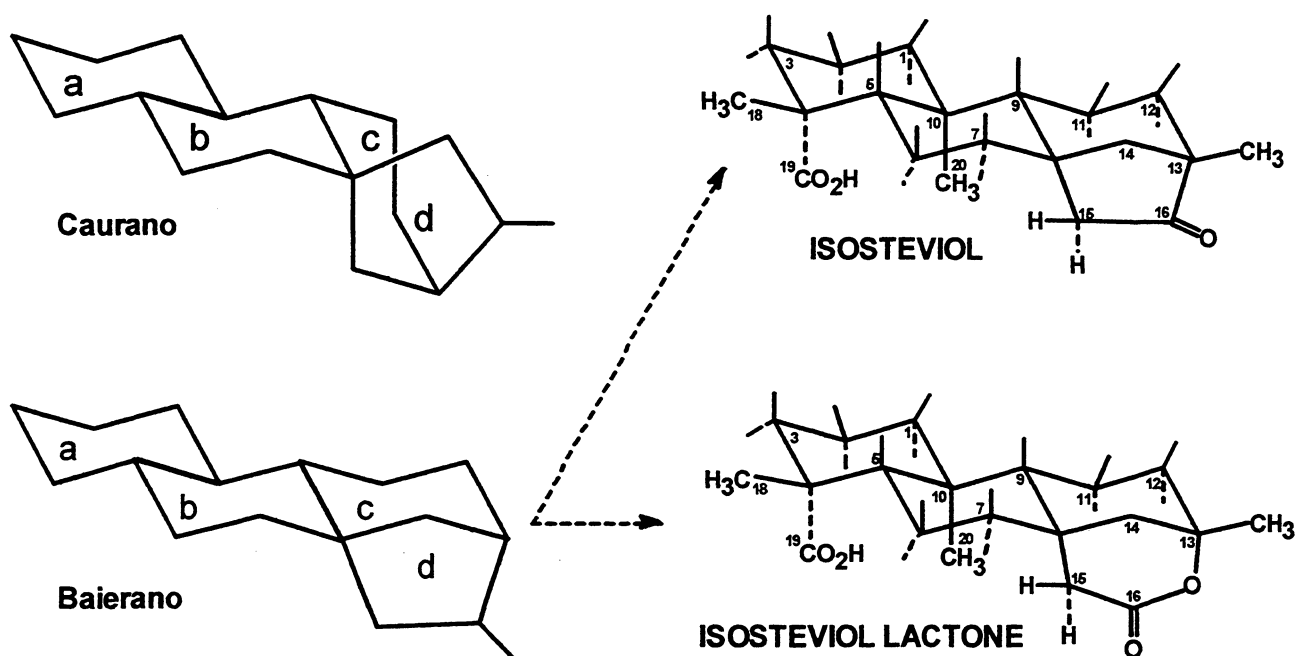


FIGURA 1 - ESTRUTURAS ESPACIAIS REPRESENTATIVAS DA SUBCLASSE DOS CAURANOS E BAIERANOS, E DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA, AMBOS PERTENCENTES A SUBCLASSE DOS BAIERANOS.

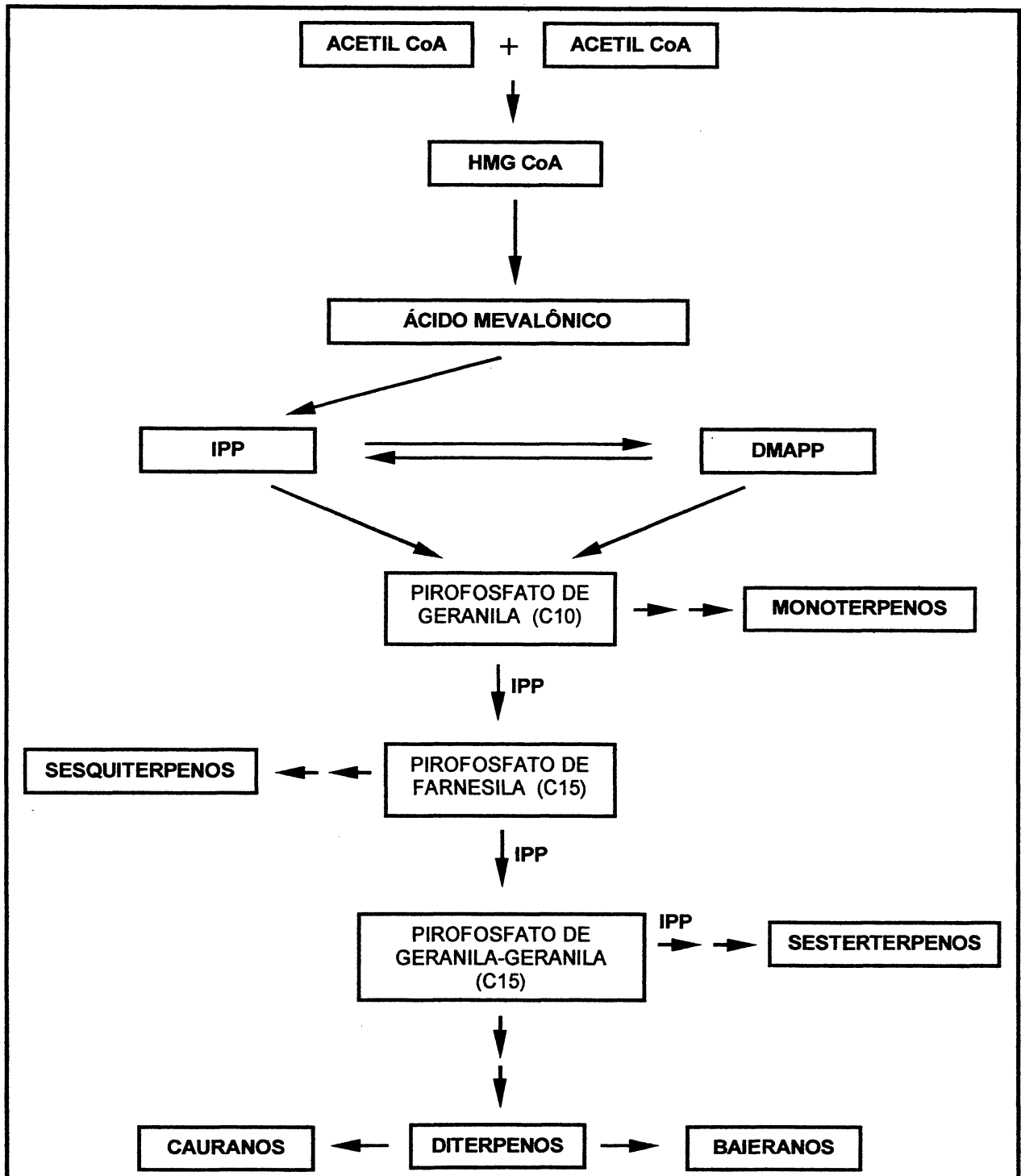


FIGURA 2 - ESQUEMA MOSTRANDO A ORIGEM BIOSSINTÉTICA DOS BAIERANOS E CAURANOS.

IPP e DMAPP são formados a partir do acetil CoA, via ácido mevalônico. Da união sucessiva de unidades pirofosfato de isopentenila (IPP) resultam cadeias precursoras dos isoprenóides. As estruturas finais de cada metabólito dependem da conformação adotada pela cadeia isoprenóide que lhe deu origem. DMAPP = Pirofosfato de dimetilalila. HMG CoA = Hidroximetilglutaril-CoA.

Devido a enorme variedade de diterpenos com diferentes grupos funcionais, inúmeras pesquisas têm sido feitas em todo mundo utilizando plantas empregadas na medicina popular, nas quais diterpenos tetracíclicos têm sido reconhecidos como responsáveis por atividades biológicas. Em alguns destes compostos, encontra-se o anel lactona incorporado na molécula como ocorre por exemplo, em alguns compostos extraídos de plantas biologicamente ativas da família das Compostas (Asteraceae) com cerca de 3000 diferentes estruturas relatadas (PICMAN, 1986).

1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE CAURANOS, BAIERANOS E LACTONAS

Dentre os terpenóides extraídos de plantas que possuem atividades biológicas relevantes merecem destaque também, além dos diterpenos que serão comentados a seguir, os compostos que possuem anel lactônico em sua estrutura, como por exemplo as lactonas sesquiterpênicas.

1.2.1 Atividade Biológica de Lactonas Sesquiterpênicas Naturais e Substituídas

As lactonas substituídas mais simples são importantes blocos construtores na síntese de muitos produtos naturais, em geral, no campo dos antibióticos, farmacêutica anti-tumor, feromônios e prostaglandinas (FURNISS, 1989).

As lactonas sesquiterpênicas naturais são relativamente estáveis e são derivadas de *trans, trans* farnesil pirofosfato (3 x C5) seguida de uma ciclização e subseqüentes modificações oxidativas. Estes compostos recebem o sufixo "olídeo" em seu nome químico o qual refere-se ao seu grupamento lactona (RODRIGUEZ, 1976). Uma característica comum e importante das lactonas sesquiterpênicas é a

presença de um anel γ -lactona (fechado entre ou C-6 e C-7 ou entre C-7 e C-8) contendo, em muitos casos, um grupo α -metileno (PICMAN, 1986). Entre as lactonas sesquiterpênicas, a grande variedade de estruturas químicas descobertas é marcada por uma diversidade de atividades biológicas. De acordo com seus esqueletos carbocíclicos a classificação da maioria das lactonas sesquiterpênicas (figura 3) se inserem em 4 grandes grupos (PICMAN, 1986): germacranolídeos (com um anel de 10 membros); eudesmanolídeos (compostos 6/6-bicíclicos); guaianolídeos e pseudoguaianolídeos (ambos compostos 5/7-bicíclicos). Entretanto, as lactonas sesquiterpênicas exibem uma variedade de outros arranjos de seu esqueleto carbônico. Acredita-se que os germacranolídeos representam biogeneticamente a classe mais primitiva e que todas as outras lactonas sesquiterpênicas evoluíram desta classe (PICMAN, 1986).

Numerosos estudos sugerem que estes metabólitos secundários de plantas exercem importante papel na proteção de plantas contra patógenos, insetos, herbívoros e mamíferos, e que eles também funcionam como agentes alelopáticos na competição com outras plantas (PICMAN, 1986), além de atuarem como reguladores de crescimento.

Várias pesquisas tem demonstrado atividades biológicas de lactonas sesquiterpênicas tais como: antimicrobiana, anticancerígena, citotóxica, antibacteriana, antifúngica, citoprotetoras gástricas e podem causar dermatite de contato alérgica (RODRIGUEZ *et al.*, 1976; GIORDANO *et al.*, 1990; PICMAN, 1986). Estes compostos são conhecidos também por possuírem atividades irritantes para os olhos, nariz e trato gastrintestinal (PICMAN, 1986).

Alguns pesquisadores observaram perda de atividade de enzimas onde o grupo sulfidrílico é importante (como a fosfofrutoquinase (HANSON *et al.*, 1970) e a glicogênio sintase (SMITH *et al.*, 1972)), depois de reagirem com lactonas sesquiterpênicas conhecidas por agirem como inibidoras do crescimento de tumores. Segundo PICMAN (1986) estas observações levaram a considerar a hipótese de que

as lactonas sesquiterpênicas inibem o crescimento de tumores por alquilação seletiva de macromoléculas biológicas regulatórias do crescimento, tais como enzimas que controlam a divisão celular, em especial com os grupos sulfidrílicos destas enzimas.

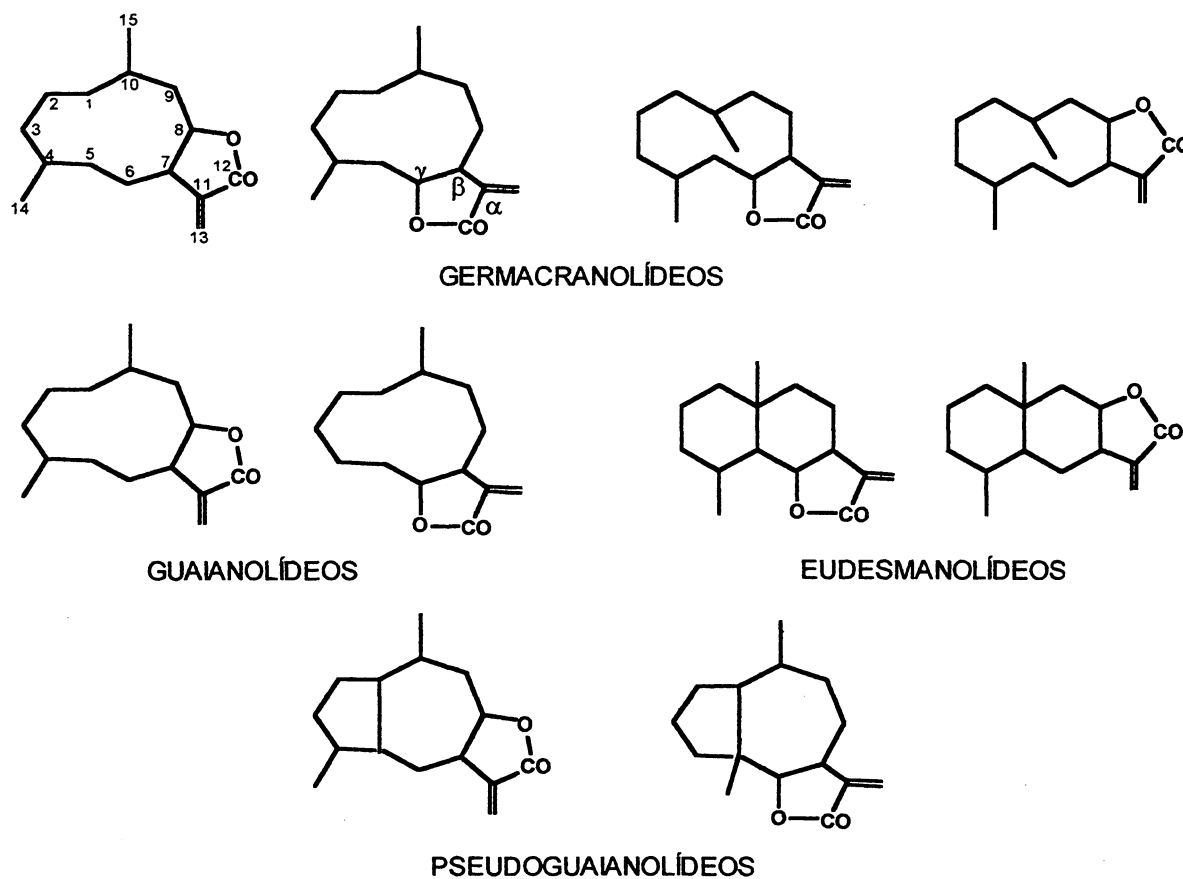


FIGURA 3 - ESQUELETOS CARBOCÍCLICOS DAS MAIORES CLASSES DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS.

FONTE: PICMAN, 1986.

1.2.2 Cauranos diterpenóides

Os diterpenóides têm sido objeto de muitos estudos. Efeitos antiinflamatórios e inibidor de tumor, são exemplos de atividades biológicas descritas para estes compostos (KUBOTA e KUBO, 1969; NODE *et al.*, 1983; FUJITA e NODE, 1984; KE CHEN *et al.*, 1992). Nas plantas, funções como as de inibidores de

desidratação e de ataques biológicos também são atribuídas a estes compostos, que constituem a maior parte das resinas de vegetais (HANSON, 1971).

Um número significativo de relatos sobre a atividade antimicrobiana dos diterpenos estão disponíveis, segundo GHISALBERTI (1997). O ácido 19-caurenóico (figura 4a), por exemplo, é ativo contra *Bacillus subtilis* ($0,313 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) (SLIMESTAD *et al.*, 1995), *Staphylococcus aureus* ($12,5 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$) (MITSCHER *et al.*, 1983), *Mycobacterium smegmatis* ($6,25 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$) (MITSCHER *et al.*, 1983), *Saccaromyces cerevisiae*, *E. coli*, *C. herbarum* e *Candida albicans* (SLIMESTAD *et al.*, 1995).

Os cauranos geralmente são descritos como compostos que apresentam modesta atividade contra bactérias e fungos; porém, mesmo com baixa atividade antimicrobiana, estes compostos podem ser responsáveis pelo controle de populações de microrganismos das folhas que os produzem, funcionando como defesa da planta (GHISALBERTI, 1997). Entre os cauranos, o ácido 19-caurenóico (figura 4a) também apresenta atividade contra o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas (tripanosomíase americana), a qual afeta mais de 90 milhões de pessoas em todo mundo (ALVES *et al.*, 1995). Este composto também apresenta citotoxicidade significativa em células de tumor de tórax, além de efeito moderado *in vitro* em células tumorais de pulmão (A-549), sistema nervoso central (XF498), ovário (SK-OV-3), pele (SK-MEL-2) e colo uterino (HCT15) (GHISALBERTI, 1997). Um importante efeito anticoncepcional é relatado na medicina mexicana para este composto, que junto com o ácido grandiflorênico (figura 4e), isolados de folhas de *Montanoa tomentosa* (Asteraceae), têm sido utilizados para controlar a fertilidade de animais (GALLEGOS, 1985). Segundo WU (1996) o derivado diol ácido (figura 4b) mostrou significativa atividade contra replicação do HIV em linfócitos H9 com um EC_{50} $0,8 \text{ mg/ml}$.

As raízes de *Tripterygium wilfordii* (Celestraceae), uma planta venenosa do sul da China, tradicionalmente têm sido utilizadas como inseticida. Foram relatadas atividades antitumoral, antiinflamatória e imunossupressiva nos extratos das raízes

desta planta (ZHEN *et al.*, 1995) cujo extrato é usado para o tratamento de várias doenças tais como: dermatite, artrite reumatóide, acne rosácea sistêmica e nefrite com bons resultados e sem efeitos colaterais (CHEN *et al.*, 1992). Mais recentemente, um número de diterpenos tricíclicos com propriedades antitumoral e anticoncepcional foram isolados desta planta. Entre os diterpenos encontrados no extrato etanólico das raízes destaca-se a tripterifordina (figura 4c) que mostrou atividade anti-replicação do HIV em linfócitos H9 (EC_{50} 6 μ M) e não afetou células não infectadas utilizando 15 μ mol.l⁻¹ deste composto (CHEN *et al.*, 1992).

Segundo CHEN *et al.* (1995) a neotriplerifordina (EC_{50} 25 nmol.l⁻¹) (figura 4d), uma lactona isomérica mais potente, isolada da mesma planta, inibiu a replicação do HIV em linfócitos H9 e não inibiu células não afetadas na concentração de 3,1 μ mol.l⁻¹. A citotoxicidade demonstrada pelos derivados cauranos parece estar associada com o grupo carboxílico no C19, e a atividade anti-HIV parece ser mediada pelos substituintes no C16 e próximo a este carbono (GHISALBERTI, 1997).

1.2.3 Baieranos diterpenóides

Alguns estudos relatam atividades biológicas importantes de baieranos naturais e sintéticos. Por exemplo pode-se citar a atividade inseticida contra *Schizaphis graminum*, um inseto muito comum nas plantações de sorgo e outras gramíneas cultivadas nos Estados Unidos, constituindo uma praga quase incontrolável. Na busca por agentes químicos capazes de controlar a população deste inseto, um grande número de substâncias tem sido testadas contra este organismo incluindo grupos de dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonóides, compostos fenólicos e diterpenos. Dentre estes grupos, um diterpeno baierano, o isoesteviol, apresentou atividade de inibidor do apetite mais pronunciado contra *S. graminum* (EC_{50} 115 ppm) (NANAYAKKARA *et al.*, 1987).

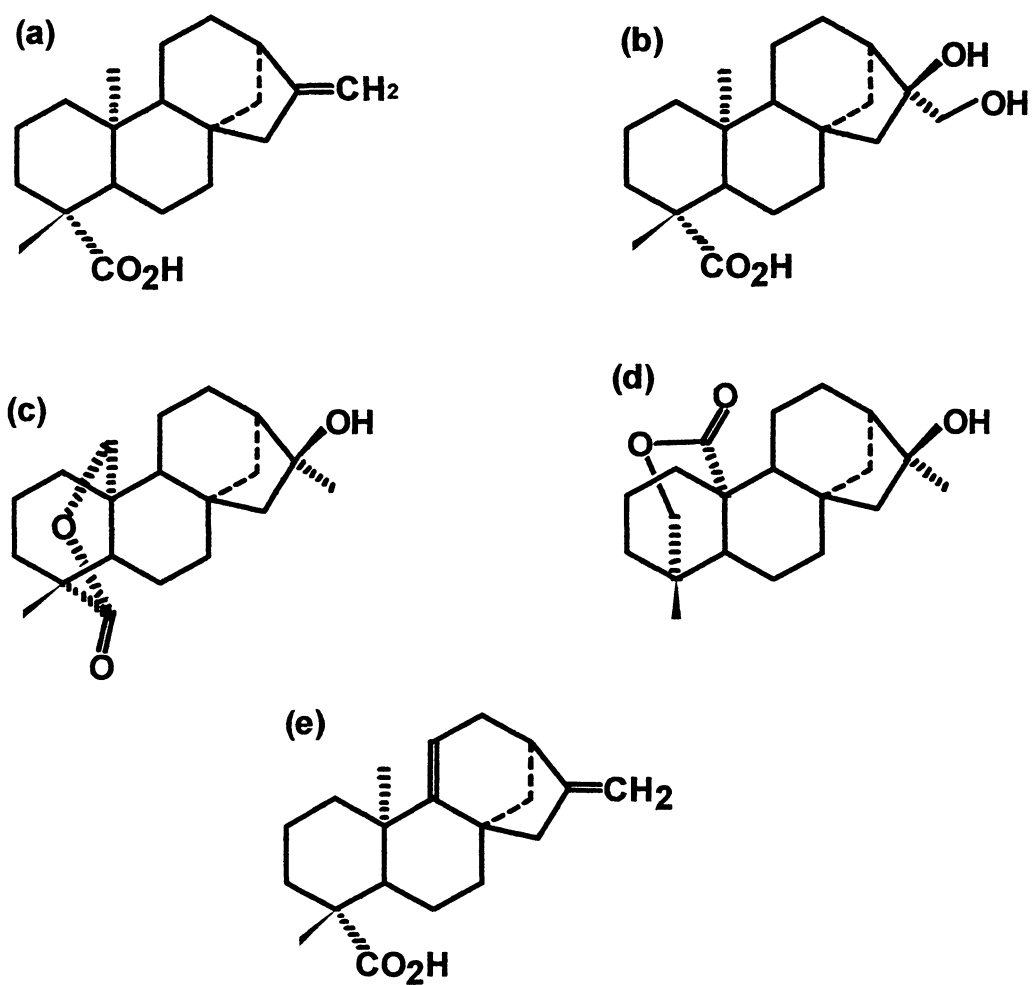


FIGURA 4 - ESTRUTURAS QUÍMICAS REPRESENTATIVAS DE COMPOSTOS CAURENÓIDES COM ATIVIDADE BIOLÓGICA.

(A) Ácido 19-Caurenóico; (B) Ácido Cauren-19-dióico; (C) Tripterifordina; (D) Neotripterifordina; (E) ácido Grandiflorênico.

FONTE: GHISALBERTI, 1997.

As giberelinas (figura 5) são diterpenóides naturais que geralmente apresentam um esqueleto com 20 átomos de carbono, como os cauranos, porém são conhecidas por possuir um esqueleto carbônico giberelano. Estas substâncias fazem parte do conjunto de hormônios das plantas que regulam seu crescimento e desenvolvimento (FOSKET, 1994).

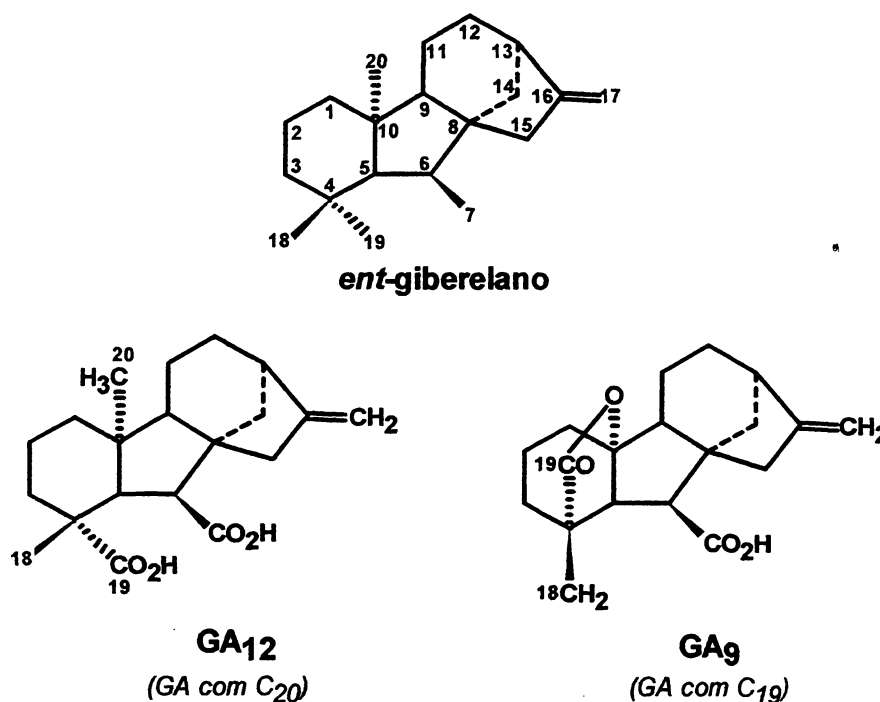


FIGURA 5 - ESTRUTURA GERAL PARA GIBERELINAS (*ent*-GIBERELANO) E ESTRUTURAS DE 2 DIFERENTES GIBERELANOS (GA₁₂ E GA₉).

Segundo VILLALOBOS *et al.* (1994), os baieranos representados na figura 6, isolados de espécies de *Elaeoselinum* (Umbelliferae) metil *ent*-baier-15-ene-19-oato (figura 6a), metil *ent*-14 β -tigloiloxibaier-15-ene-19-oato (figura 6b) e *ent*-baier-15-ene-14 β ,19-diol (figura 6c) apresentaram atividades semelhantes ou superiores às das giberelinas no crescimento e desenvolvimento de plantas, nas concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

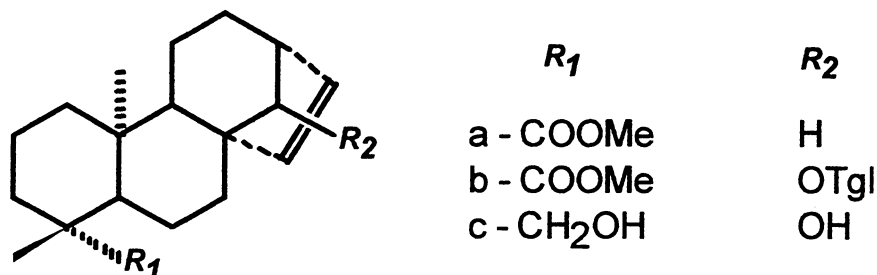


FIGURA 6 - ESTRUTURAS DOS BAIERANOS COM ATIVIDADE SEMELHANTES A GIBERELINA. Metil *ent*-baier-15-ene-19-oato (a), metil *ent*-14 β -tigloiloxibaier-15-ene-19-oato (b) e *ent*-baier-15-ene-14 β ,19-diol (c).

FONTE: VILLALOBOS *et al.* (1994)

Um outro baierano com atividade antimicrobiana comprovada é o 1-acetil-jativatriol (figura 7) obtido de uma subespécie de *Sideritis pusilla* (Lange) Pau. Segundo RODRÍGUEZ-LINDE *et al.* (1994) este composto mostrou atividade contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus*.

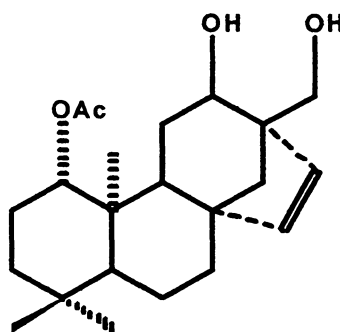


FIGURA 7 - ESTRUTURA DO 1-ACETIL-JATIVATRIOL

Uma série de baieranos derivados do isoesteviol, entre eles o metil éster do isoesteviol, 16-hidroxisoesteviol, 16,19-dihidroisoesteviol entre outros (figura 8), obtidos através de síntese química apresentaram atividade reguladora do crescimento e do desenvolvimento da *Capsicum annuum* (pimenta), *Lens culinaris medicus* (lentilha), *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Trifolium* spp. (trevo) e *Triticum vulgare* (trigo). Estes baieranos promoveram inibições na germinação de sementes e no desenvolvimento das raízes destas espécies segundo HERSHENHORN *et al.* (1997).

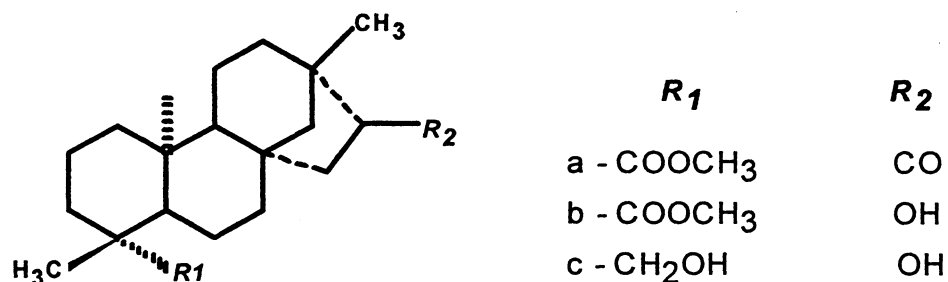


FIGURA 8 - DERIVADOS BAIERANOS DO ISOESTEVIOL COM ATIVIDADE BIOLÓGICA. Metil éster do isoesteviol (a), 16-hidroxiisoesteviol (b) e 16,19-dihidroisoesteviol (c). FONTE: HERSHENHORN *et al.* (1997).

Segundo ISHII *et al.* (1987a) o isoesteviol, obtido a partir do extrato de *Stevia rebaudiana*, promoveu inibição do transporte de glucose através da membrana celular em fígado de rato perfundido, assim como o esteviosídeo.

1.3 *Stevia rebaudiana* E SEUS GLICOSÍDEOS

O esteviosídeo, um glicosídeo diterpênico, é o principal componente doce nas folhas da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, nativa da região nordeste do Paraguai, foi primeiramente isolado por BRIEDEL e LAVIEILLE (1931). O extrato preparado das folhas desta planta tem sido amplamente utilizado como adoçante para uma variedade de alimentos e de bebidas para diabéticos e pessoas obesas no Japão, países da América Latina e outras partes do mundo (GHISALBERTI, 1997).

BRIEDEL e LAVIEILLE (1931), demonstraram que a hidrólise ácida do esteviosídeo, além de 3 moléculas de glucose, produz um composto de natureza não glicídica, semelhante ao esteviol, o qual denominaram isoesteviol. Recentemente, foi mostrado que a hidrólise ácida do esteviosídeo (figura 9a) gera o esteviol (figura 9b) que reage imediatamente, através do rearranjo de Wagner-Meerwein, produzindo o isoesteviol (figura 9c) (OGAWA *et al.*, 1980; AVENT *et al.*, 1990).

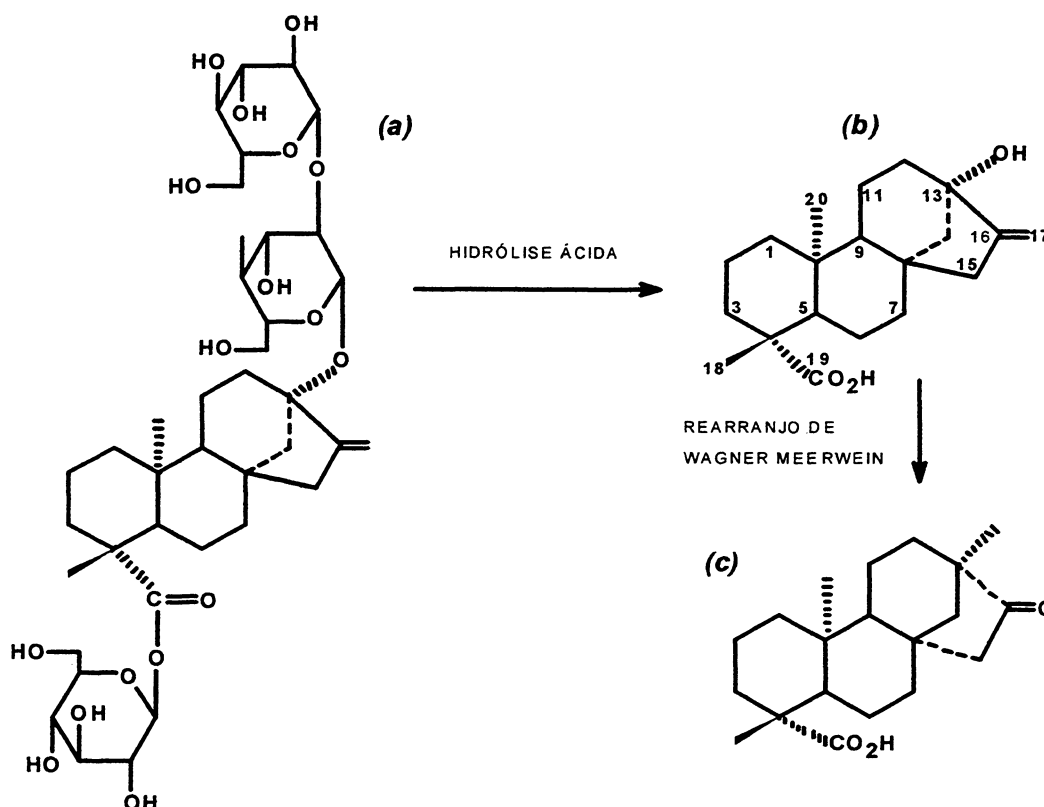


FIGURA 9 - HIDRÓLISE ÁCIDA DO ESTEVIOSÍDEO.

Em meio ácido o esteviosídeo (a) libera a aglucona - esteviol (b) - que sofre rearranjo químico originando o isoesteviol (c).

A estrutura e a configuração do esteviol e do isoesteviol foram estabelecidas por MOSETTIG e NES (1955), DOLDER *et al.* (1960), e MOSETTIG *et al.* (1961).

O presente trabalho avaliou o efeito do isoesteviol lactona (IEL) que é proveniente de uma reorganização oxidativa do isoesteviol de cetona a éster. O isoesteviol que é proveniente da hidrólise do esteviosídeo, foi incluído neste estudo com finalidade comparativa.

Dados da literatura relatam alguns efeitos para o isoesteviol a partir da década de oitenta, quando KELMER-BRACHT *et al.* (1981; 1984 e 1985ab) demonstraram efeitos deste composto sobre vários parâmetros do metabolismo

oxidativo mitocondrial, sendo alguns deles descritos adiante, no item 1.4.

Segundo MELIS (1992) e TOSKULKAO *et al.* (1994) o esteviosídeo produz hipotensão e diurese em ratos normais e hipertensos. A administração de esteviosídeo em ratos aumenta os níveis de uréia e a creatinina plasmática depois de 3 horas. Aumentos da atividade da fosfatase alcalina, γ -glutamil-transpeptidase e glicosúria também foram observados. O esteviosídeo também provoca uma degeneração das células dos túbulos proximais renais, provavelmente causada por um defeito na regulação do volume celular devido a diminuição intracelular de ATP.

O esteviosídeo e o esteviol afetam significativamente diversas funções mitocondriais. Em mitocôndria isolada de fígado de rato, a fosforilação oxidativa é inibida numa série de eventos os quais incluem: a) inibição da troca ADP/ATP; b) desacoplamento da respiração; c) inibição da NADH oxidase e glutamato desidrogenase e d) inibição do transporte de ácidos graxos (VIGNAIS *et al.*, 1966; CONSTANTIN *et al.*, 1991).

1.4 ISOESTEVIOL

O isoesteviol (ácido 16-cetobaier-19-óico) (figura 10), um dos compostos cujos efeitos serão analisados neste trabalho, é o produto obtido através da hidrólise ácida do esteviosídeo (KOHDA *et al.*, 1976), o glicosídeo obtido da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, sendo classificado como um diterpenóide tetracíclico baierano.

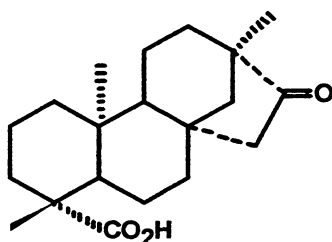


FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL

KELMER-BRACHT *et al.* (1981, 1984 e 1985ab) demonstrou que o isoesteviol apresenta atividade sobre uma série de parâmetros do metabolismo oxidativo mitocondrial. Os autores verificaram atividade de inibição da velocidade de respiração mitocondrial, quando succinato ou L-glutamato eram os substratos oxidáveis. Os valores do coeficiente de controle respiratório e relação ADP:O também diminuíram. Em relação a algumas atividades enzimáticas mitocondrias, observou-se uma inibição significativa: 85% na NADH-oxidase, 24% na succinato oxidase, 24% na succinato desidrogenase, 82% na NADH citocromo c redutase, 80% na ATPase mitocondrial (mitocôndrias intactas), 80% na L-glutamato desidrogenase (NADH) e 75% na L-glutamato desidrogenase (NADPH), utilizando uma dose de $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ de isoesteviol.

Em túbulos corticais renais de rato foi observado que o isoesteviol 1 mmol.l^{-1} produz uma inibição de mais de 90% sobre a produção de glucose (KELMER-BRACHT *et al.*, 1983; YAMAMOTO *et al.*, 1985). O isoesteviol $0,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ também diminuiu em 50% o consumo de oxigênio em túbulos corticais renais de rato, quando se utilizou o piruvato como um substrato exógeno (KELMER-BRACHT *et al.*, 1983).

ISHII *et al.* (1987a), ISHII e BRACHT (1984 e 1987b) e CONSTANTIN *et al.* (1991) realizaram uma investigação sistemática dos efeitos dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* sobre vários parâmetros relativos a perfusão em fígado de rato isolado. Estes autores observaram como principais efeitos: 1) interferência com o metabolismo energético em consequência da ação inibitória sobre funções mitocondriais, e 2) inibição do metabolismo do carboidrato em consequência da inibição do carreador de hexose (glucose e frutose) da membrana plasmática. Em ambos os casos o isoesteviol foi ativo (KELMER-BRACHT *et al.*, 1985b).

A interferência com o metabolismo energético foi demonstrada em análises nas quais o metabolismo do glicogênio endógeno foi avaliado utilizando-se isoesteviol ($0,1$ a 1 mmol.l^{-1}) onde se observou que a taxa de consumo de oxigênio

declina de maneira dose dependente, sob a infusão de cada concentração de isoesteviol. Simultaneamente a produção de L-lactato foi aumentada enquanto a produção de piruvato era inibida. A liberação de glucose aumenta com isoesteviol acima de $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, sendo inibida, no entanto, com 1 mmol.l^{-1} . Os autores observaram, porém, que os efeitos sobre a produção de L-lactato e piruvato são reversíveis, isto é, cessando a infusão de isoesteviol restauram-se os níveis iniciais (ISHII e BRACHT, 1984). A liberação de glucose, no entanto, é transitoriamente aumentada depois de interromper a infusão de isoesteviol (ISHII e BRACHT, 1984).

Experimentos com a infusão de $[^{14}\text{C}]$ -glucose em fígado de rato isolado, mostraram que o isoesteviol inibe em 90% o transporte de glucose através da membrana plasmática (KELMER-BRACHT *et al.*, 1985b).

Contudo, não foram concluídos as análises dos efeitos do isoesteviol sobre a fluidez e elasticidade de membranas e nem foi avaliada sua capacidade de influenciar na viabilidade celular e geração de radicais livres.

1.5 ISOESTEVIOL LACTONA

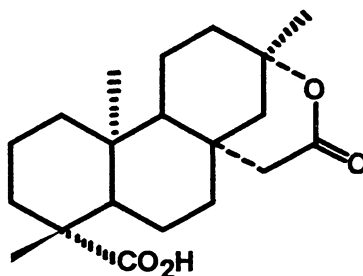


FIGURA 11 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL LACTONA

O composto a ser utilizado no presente estudo, isoesteviol lactona (ácido baieran-16-olídeo-19-óico) (figura 11), é obtido quimicamente como resultado de uma reação de lactonização do isoesteviol, ou seja, provém de uma reação de reorganização oxidativa de cetona a éster ou lactona por tratamento com peroxiácidos, através da reação conhecida como Reação de Baeyer-Villiger (MEISLISH *et al.*, 1994). Hidroxiácidos (γ e δ) que podem formar anéis com cinco ou seis átomos e reagir formando ésteres intramoleculares. Assim γ e δ -hidroxiácidos perdem água espontaneamente, produzindo um éster cíclico, conhecido por lactona (MORRISON & BOYD, 1973; FURNISS *et al.*, 1989).

O mecanismo de reação para a formação do isoesteviol lactona a partir do isoesteviol se dá pelo ataque nucleofílico pelo peroxiácido sobre o grupo carbonila dando um intermediário o qual se rearranja (rearranjo ácido de Baeyer-Villiger) com a expulsão do ânion de um ácido. Um número de peroxiácidos, incluindo ácido peroxiacético, monoperoxiftálico, e trifluoro-peroxiacético, podem ser empregados com sucesso na reação (COXON & NORMAN, 1993).

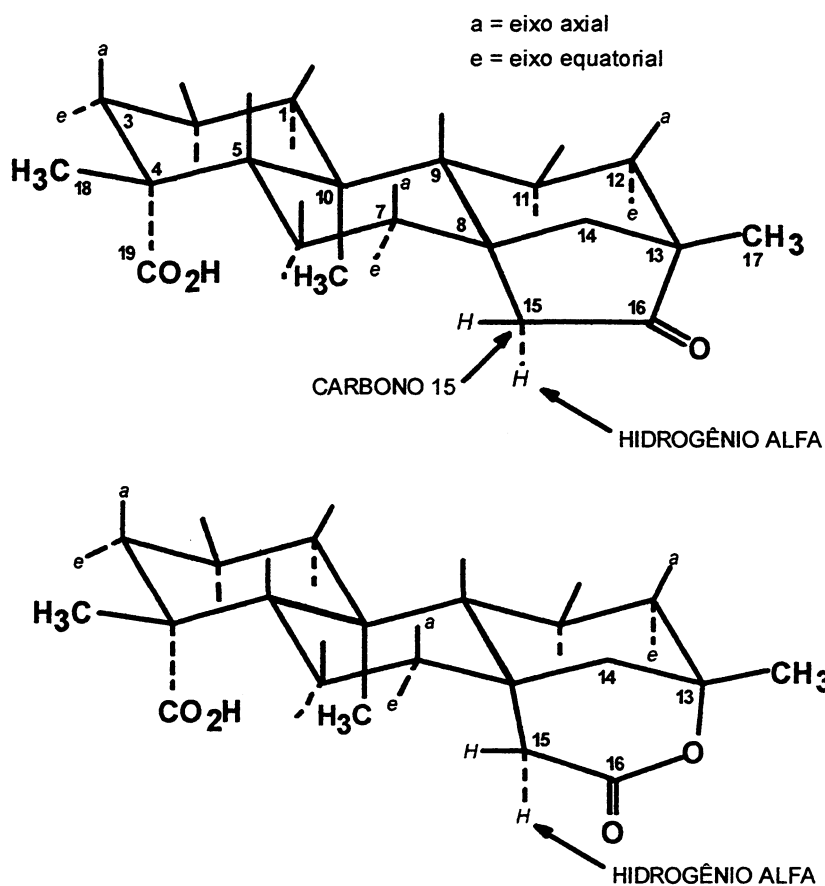
No caso do isoesteviol lactona, este foi tratado com ácido peroxiacético, gerado "in situ" a partir de peróxido de hidrogênio e ácido acético, obtendo-se o isoesteviol lactona. O isoesteviol lactona, faz parte do grupo dos diterpenos (C_{20}) que derivam de geranyl-geranyl pirofosfato, como o isoesteviol, entre os quais salientam-se as giberelinas (hormônios de crescimento de plantas que estão envolvidos no processo de floração) e os ácidos resínicos, constituintes da resina de *pinus* (ex. ácido abiético, de-hidroabiético, pimárico) os quais são muito importantes industrialmente. Possui fórmula empírica de $C_{20}O_4H_{30}$ e peso molecular de 334. Apresenta-se como pó de cor branca e quando solubilizado em DMSO não tem cor.

A estrutura espacial tanto do isoesteviol quanto do isoesteviol lactona estão representados na figura 12. A estrutura de ambos os compostos apresentam grupos metil angulares, indicados pelos números 17, 18 e 20, nos carbonos 13, 4 e 10, respectivamente. Nesta representação estrutural dos baieranos, os substituintes

orientados na posição β (para frente) estão indicados por uma linha cheia; os que possuem orientação α (para trás) estão representados por linhas pontilhadas. Assim as metilas angulares nos carbonos 4, 10 e 13 exibem orientação β , e a carboxila no carbono 4 apresenta orientação α . O isoesteviol e o isoesteviol lactona podem ser distinguidos através da análise de espectros de Ressonância Magnética Nuclear do ^1H (figura 13).

O composto semi-sintético, isoesteviol lactona (ácido baieran-16-olídeo-19-óico), foi sintetizado e teve sua estrutura química caracterizada no Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná (1999), e portanto ainda não existem estudos relatados sobre suas propriedades. A comparação dos efeitos deste novo composto com o isoesteviol (ácido 16-cetobaier-19-óico), para se verificar a influência do anel lactona é relevante, pois através deste estudo será possível verificar se a modificação feita na molécula do isoesteviol pode contribuir para uma mudança de atividade, atenuação ou mesmo intensificação de seus efeitos sobre a organela em estudo ou mesmo em células cultivadas, podendo vir a servir de guia no desenvolvimento de compostos biologicamente ativos.

A atividade das classes de compostos (diterpênicos e lactonas sesquiterpênicas) sobre células, principalmente os efeitos antiinflamatório, antimicrobiano e antiparasitário relatados anteriormente, permitiram direcionar a investigação destes compostos em macrófagos peritoneais, avaliando as vias de produção de radical superóxido e de óxido nítrico, uma vez que estas são vias envolvidas na destruição de patógenos e na atividade antitumoral.



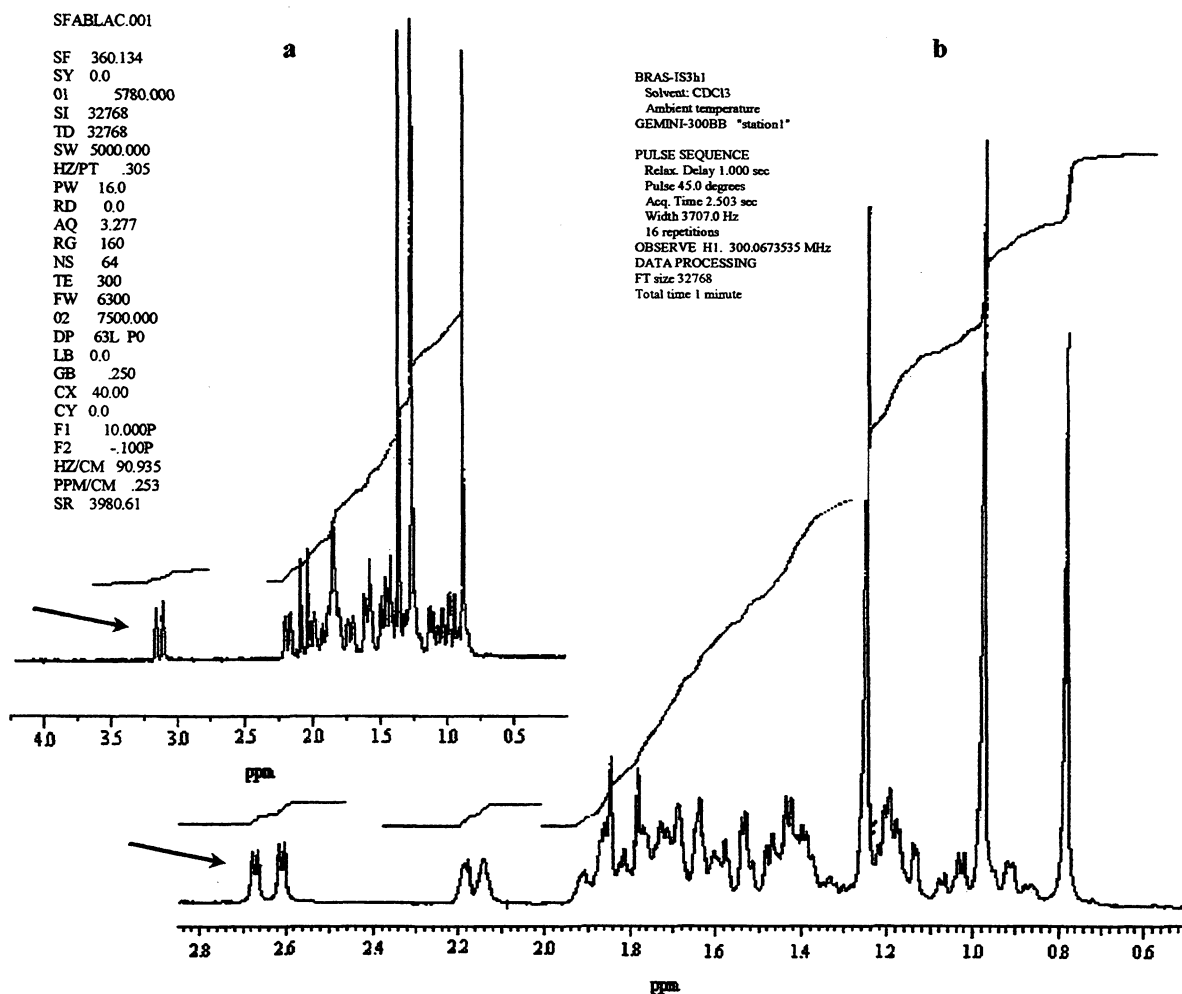


FIGURA 13 - (a) ESPECTRO DE RMN ^1H DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO (b) ISOESTEVIOL, OBTIDOS EM CDCl_3 .

Obtidos pelo Prof^o Dr. Brás Heleno de Oliveira do Departamento de Química da UFPR, e gentilmente cedido para este estudo, observam-se as diferenças entre os compostos que foram utilizados, referente ao hidrogênio α do carbono na posição 15 da molécula. Observar o sinal de deslocamento para o hidrogênio α do carbono 15 do isoesteviol entre 2,6 e 2,7 ppm (b), enquanto que o sinal de deslocamento para o hidrogênio α do carbono 15 do isoesteviol lactona aparece entre 3,0 e 3,25 ppm (a).

1.6 BIOQUÍMICA DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS

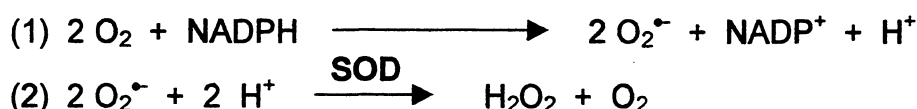
Os macrófagos são células que pertencem ao sistema fagocitário mononuclear, originam-se na medula óssea e localizam-se em diferentes tecidos, adquirindo nestes locais características funcionais específicas. Estas células estão envolvidas na defesa contra agentes infecciosos, na inflamação, no reparo de tecidos, nas reações imunológicas e na atividade citotóxica. Na ausência de estímulo, os macrófagos podem permanecer quiescentes, sendo conhecidos como macrófagos residentes (AUSTYN & WOOD, 1995).

Para exercer sua função de defesa do organismo contra agentes invasores, seja patógenos ou tumores, os macrófagos precisam ser ativados (SASADA *et al.*, 1983). Segundo KLEBANOFF (1992) na presença de um estímulo inflamatório ou imunológico, os macrófagos passam a desempenhar funções específicas.

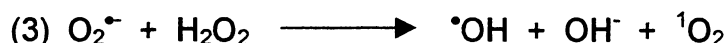
Na presença de substâncias particuladas e/ou solúveis (ésteres de forbol, fluoreto de alumínio, ácidos graxos insaturados e concavalina A), os macrófagos tornam-se ativados e desencadeiam o processo de fagocitose no caso de estímulo particulado ou ativação direta como acontece quando usa-se ésteres de forbol. Ambos os estímulos são evidenciados pelo aumento no consumo de O₂ (KARNOVSKY & BADWEY, 1986; DING & BADWEY, 1992). Este aumento no consumo de oxigênio, não é inibido por cianeto ou outros inibidores do transporte de elétrons mitocondrial, e é freqüentemente chamado de "burst" respiratório. Ao mesmo tempo ocorre um aumento no consumo de glucose pelas células devido a ativação da via das pentose fosfato (DING & BADWEY, 1992).

O aumento no consumo de oxigênio durante o "burst" respiratório, resulta do estímulo da NAD(P)H oxidase, enzima particulada na membrana plasmática da célula (KARNOVSKY e BADWEY, 1986), e que catalisa a redução do oxigênio a ânion superóxido (reação 1), através da oxidação do NADPH ou NADH. Dois

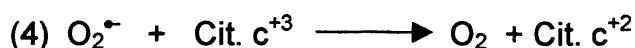
radicais superóxido podem interagir (reação 2) de tal modo que um ânion é reduzido e o outro é oxidado com a formação resultante de peróxido de hidrogênio e oxigênio (reação de dismutação) catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (FRIDOVICH, 1975; KARNOVSKY e BADWEY, 1986).



O radical superóxido e o peróxido de hidrogênio podem ainda reagir (reação 3) e gerar outras duas espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e um oxigênio "singleto" (1O_2), também envolvidos no processo de destruição de patógenos intracelulares (PICK & KEISARI, 1980).



O radical $O_2^{\bullet -}$ pode ser detectado fora dos macrófagos por sua capacidade de reduzir o citocromo c (reação 4) (SASADA *et al.*, 1983).



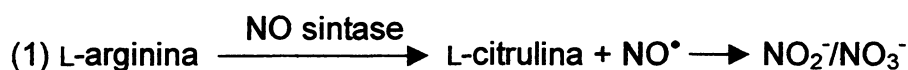
1.7 BIOQUÍMICA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS

O óxido nítrico é uma molécula pequena, relativamente instável, potencialmente tóxica e radical livre. Trata-se de um mensageiro biológico em um grande número de processos fisiológicos em humanos e outros animais. Entre as funções incluem-se: a de neurotransmissor, controlador da pressão sanguínea, regulador da agregação plaquetária e habilidade para destruir células tumorais e parasitas intracelulares (MACCARRONE *et al.*, 1997; MONCADA *et al.*, 1994).

O mecanismo preciso do efeito microbicida do NO^{\bullet} ainda não está claro.

Entretanto é provável que o mecanismo seja semelhante àquele em que o NO[•] de macrófagos ativados destróem células tumorais. O NO[•] produzido em macrófagos estimulados se difunde pelo tecido onde reage com os centros ferro-enxofre de várias macromoléculas importantes, incluindo a aconitase, uma enzima envolvida no ciclo do ácido cítrico, e com o complexo I e II da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A alta afinidade do NO[•] por íon Fe²⁺ provavelmente resulta na remoção de ferro de centros ferro-enxofre e a formação de espécies de dinitrosila-ferro com as proteínas envolvidas. A inibição da aconitase bloqueia o metabolismo da acetil coenzima A à dióxido de carbono, um importante passo na geração de NADH, o qual é necessário para dirigir a fosforilação oxidativa. A inibição do complexo I bloqueia o primeiro passo do processo de transporte de elétrons necessário na transdução da energia do NADH em ligações de alta energia do ATP. A inibição do complexo II também desconecta a transdução de energia de um número de processos, incluindo a oxidação de ácidos graxos, que libera energia na forma de flavinas reduzidas. Juntos, estes efeitos impedem, severamente, a habilidade das células sustentar o nível de ATP (MONCADA *et al.*, 1994). O NO[•] também inibe a ribonucleotídeo redutase, interferindo assim com a formação de desoxirribunucleotídeos necessários para a síntese de DNA e divisão celular (MONCADA *et al.*, 1994).

Este é um padrão de inibição metabólica que ocorre devido a perda de ferro pelas células tumorais induzido por macrófagos ativados. Esta inibição metabólica em células tumorais é dependente de L-arginina, uma vez que o NO[•] é produzido deste aminoácido pela enzima NO sintase (HIBBS *et al.*, 1987; YENGAR *et al.*, 1987).



Macrófagos podem ser induzidos a produzir NO[•]. O IFN- γ , por exemplo, é capaz de induzir a expressão de NO-sintase (NOS), porém em baixos níveis. Entretanto, níveis significativos da enzima são induzidos por esta citocina em

macrófagos quando na presença de um co-sinal como LPS (Lipopolissacarídeo) (YENGAR *et al.*, 1987; STUEHR e MARLETTA, 1985).

O nitrogênio imino removido da L-arginina é oxidado a nitrito. O nitrito pode ser dosado utilizando-se o reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982).

Algumas substâncias inibem a produção de NO. Macrófagos incubados com L-canavanina ou L-NMMA (N-monometil-L-arginina), por exemplo, inibem a produção de NO^{*} (MONCADA *et al.*, 1994; SCHMIDT *et al.*, 1989). Glucocorticóides como a dexametasona, hidrocortisona e cortisol, por exemplo, inibem a indução mas não a atividade da NOS "in vitro" em: células endoteliais vasculares (RADOMSKI *et al.*, 1990), macrófagos (Di ROSA *et al.*, 1990) e em células EMT-6 de adenocarcinoma (O' CONNOR & MONCADA, 1991), depois da estimulação com LPS somente ou em combinação com IFN- γ .

Finalmente, as implicações do estudo do isoesteviol e do isoesteviol lactona sobre a via de produção de ânion superóxido e sobre a via de produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados poderiam contribuir para uma avaliação do potencial de atividade antiinflamatória ou antitumoral destes compostos.

2 OBJETIVOS

O presente estudo pretende verificar a influência da adição do anel lactônico na estrutura do isoesteviol sobre as atividades biológicas deste composto e portanto tem como objetivos gerais: a) investigar os efeitos do isoesteviol lactona e compará-los com os efeitos do isoesteviol observados por KELMER-BRACHT *et al.* (1985a) e KELMER-BRACHT (1984), sobre o metabolismo oxidativo mitocondrial; b) analisar a capacidade do isoesteviol lactona de interagir com membranas influenciando na sua fluidez e elasticidade e complementar os estudos realizados com o isoesteviol e c) investigar se um ou ambos os compostos interferem na produção de ânion superóxido e de óxido nítrico em macrófagos peritoniais de camundongos.

Mais especificamente:

- a) avaliar os efeitos do isoesteviol lactona sobre parâmetros relacionados ao consumo de oxigênio e atividades das enzimas da cadeia respiratória envolvidas no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa;
- b) determinar por voltametria cíclica, o potencial redox do isoesteviol lactona e do isoesteviol;
- c) avaliar a interferência do isoesteviol lactona na permeabilidade e elasticidade de membrana mitocondrial;
- d) comparar os resultados existentes na literatura sobre o isoesteviol com os obtidos com o isoesteviol lactona sobre o metabolismo oxidativo;
- e) verificar se estes compostos podem estimular macrófagos quanto a produção de radical superóxido e óxido nítrico em macrófagos estimulados com PMA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Glutamato de sódio, succinato de sódio, NADH, ATP, ADP, EGTA, EDTA, rotenona, FCCP, manitol, sacarose, Hepes, BSA, fosfoenolpiruvato, valinomicina, oligomicina, citocromo c, ferricitocromo c, DPIP, PMA, LPS (lipopolissacarídeo), IFN- γ (interferon- γ), MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e Tris foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (EUA). Hidróxido de potássio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, molibdato de amônio, sulfato de ferro foram adquiridos da Merck do Brasil.

Os demais reagentes utilizados foram do melhor grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água desionizada através de sistema purificador Millipore MilliQ.

3.2 ISOESTEVIOL (ISO) E ISOESTEVIOL LACTONA (IEL)

O isoesteviol apresenta-se como pequenos cristais de cor amarelo clara, enquanto que o isoesteviol lactona apresenta-se na forma de pó branco.

O isoesteviol, e o isoesteviol lactona, substâncias utilizados neste estudo foram obtidos através da hidrólise ácida do esteviosídeo e de uma reação de lactonização a partir do isoesteviol, respectivamente, realizada pelo Professor Dr. Brás Heleno de Oliveira, do Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná, que também caracterizou os compostos por análise de RMN ^1H em CDCl_3 como demonstrado na introdução (figura 13).

As drogas foram solubilizadas em DMSO e utilizadas em concentrações

cuja unidade era de mmol.l^{-1} nos experimentos com mitocôndrias, em função das concentrações utilizadas por KELMER-BRACHT *et al* (1985ab) e KELMER-BRACHT (1981) serem em mmol.l^{-1} , facilitando a comparação dos dados. As concentrações utilizadas foram adequadas para cada situação experimental e incubadas por 2 minutos com as mitocôndrias em cada experimento.

3.3 ANÁLISES DOS EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E ISOESTEVIOL SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL

3.3.1 Animais

Para o isolamento de mitocôndrias utilizaram-se ratos brancos da linhagem Wistar, machos, pesando 200 a 300 g, mantidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com ração Purina® e antes dos experimentos foram colocados em jejum por 12 horas com água *ad libidum*. Os animais foram mortos por decapitação, sem anestesia, e o fígado foi rapidamente retirado e colocado no meio de extração, sendo mantidos em banho de gelo durante todo o processamento.

3.3.2 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato para Determinação do Consumo de Oxigênio e Atividades Enzimáticas

O isolamento de mitocôndrias para experimentos de determinação do consumo de O_2 e atividades enzimáticas foi realizado utilizando como meio de extração: D-Manitol 250 mmol.l^{-1} , Hepes 10 mmol.l^{-1} pH 7,2, EGTA 1 mmol.l^{-1} e soroalbumina bovina (BSA) 0,1g%.

Os animais foram sacrificados como já descrito; os fígados foram removidos, lavados com o meio de extração e cortados em pequenos pedaços sendo mantidos à temperatura máxima de 4°C. O homogeneizado de fígado foi obtido utilizando-se o homogeneizador de Van Potter Elvehjen por 3 vezes com o pistilo frouxo e 2 vezes com o apertado. O homogeneizado obtido foi então centrifugado em centrífuga refrigerada a 320 x g por 5 minutos. O sobrenadante desta centrifugação que contém as mitocôndrias, foi centrifugado novamente a 12600 x g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso com meio de extração e centrifugado a 8100 x g por 10 minutos. Este procedimento foi executado mais uma vez. Por fim, obteve-se uma suspensão mitocondrial, com concentração proteica final variando de 20 a 80 mg por mililitro.

3.3.3 Determinação do Consumo de O₂, Cálculo do Coeficiente de Controle Respiratório e Relação ADP:O

O consumo de O₂ por mitocôndrias intactas, foi determinado utilizando eletrodo de oxigênio, tipo Clark, em oxígrafo Gilson, termostatizado a 28°C. O sistema de reação foi constituído de: D-manitol 125 mmol.l⁻¹, KCl 65 mmol.l⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.l⁻¹, pH 7,2, EGTA 1 mmol.l⁻¹, EDTA 0,5 mmol.l⁻¹ e BSA 0,1g%.

O meio de reação foi suplementado com succinato de sódio 3 mmol.l⁻¹, rotenona 1 μmol.l⁻¹, Pi 0,8 mmol.l⁻¹ e ADP 0,08 mmol.l⁻¹ ou com glutamato de sódio 5 mmol.l⁻¹, Pi 1,6 mmol.l⁻¹ e ADP 0,16 mmol.l⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento, expressa com relação a concentração de proteínas, foi de 0,5 mg/ml quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e de 2 mg/ml quando substrato foi o glutamato de sódio.

As velocidades respiratórias foram expressas em nanomoles de O₂ consumidos . min⁻¹ . mg⁻¹ de proteína, considerando-se a solubilidade do O₂ na

água, à 28°C, a 1 atm (ESTABROOK, 1967) e a relação ADP/O foi determinada como descrito por CHANCE e WILLIAMS (1955). O coeficiente de controle respiratório (CCR), foi obtido da relação entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado III) e a velocidade após o consumo de ADP (estado IV).

As mitocôndrias foram pré-incubadas por 2 minutos na presença de Isoesteviol Lactona em concentrações que variaram de 0,1 a 1 mmol.l⁻¹. A respiração foi iniciada pela adição do substrato (L-glutamato ou succinato), sendo que os valores de velocidade da respiração (% do controle) foram representados contra as concentrações de Isoesteviol Lactona. Controles do solvente foram realizados em cada situação experimental, tendo sido observado que nas condições em que os experimentos foram desenvolvidos o DMSO não interferiu nas atividades avaliadas.

3.3.4 Obtenção de Mitocôndrias de Fígado de Rato Rompidas para Avaliação de Atividades Enzimáticas Mitocondriais

Mitocôndrias intactas isoladas de fígado de rato como descrito anteriormente (item 3.3.2) foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento de sua utilização, quando então foram rompidas por choque térmico (congelamento e descongelamento por 3 vezes) e mantidas a 0° C. Foram obtidos fragmentos de membrana, nos quais todos os componentes da cadeia respiratória apresentaram atividade satisfatória.

3.3.5 Determinação da Atividade das Enzimas Ligadas à Cadeia Respiratória

A determinação das atividades da NADH oxidase e da succinato oxidase foram realizadas polarograficamente através da determinação do consumo de

oxigênio no oxígrafo. As demais atividades foram realizadas espectrofotometricamente em aparelho HITACHI (2001 spectrophotometer).

3.3.5.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade da NADH oxidase foi determinada polarograficamente como recomendado por SINGER (1974).

O sistema de reação a 28°C e em volume final de 1,3 ml foi constituído de: tampão fosfato 80 mmol.l⁻¹, pH 7,4, EDTA 50 μmol.l⁻¹, NADH 0,17 mmol.l⁻¹ e 20 μg de proteína mitocondrial. As mitocôndrias foram incubadas por 2 minutos com cada concentração da droga. A reação foi iniciada pela adição de NADH e a velocidade de consumo de oxigênio registrada pelo oxígrafo. Os resultados foram expressos em nanomoles de oxigênio consumido . min⁻¹ . mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando a solubilidade do O₂ em água e a 1 atm de 235 μmols.l⁻¹ a 28 °C (ESTABROOK, 1967).

3.3.5.2 NADH Citocromo c Redutase (NADH Citocromo c Óxido Redutase)

A atividade da NADH citocromo c redutase foi determinada pelo método descrito por SOMLO (1965). O sistema de reação em volume final de 1 ml era constituído de: tampão fosfato 50 mmol.l⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol.l⁻¹, NADH 50 μmol.l⁻¹, citocromo c (oxidado) 40 μmol.l⁻¹, NaCN 1 mmol.l⁻¹ e 20 μg de proteína mitocondrial. A enzima foi incubada por 2 minutos com cada concentração da droga. A reação foi realizada a 28 °C, e iniciada pela adição de NADH e citocromo c oxidado. A velocidade de redução do citocromo c foi acompanhada em 550 nm, e

para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{550} = 19000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. O resultado foi expresso em nanomoles de citocromo c reduzido $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial.

3.3.5.3 Citocromo c Oxidase (Ferrocitocromo c: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade da citocromo c oxidase foi determinada segundo o método espectrofotométrico de MASON *et al.* (1973). O sistema de reação em volume final de 1 ml foi constituído de: tampão fosfato 50 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pH 7,4, EDTA 2 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, ferrocitocromo c e 100 μg proteína mitocondrial. A enzima foi incubada por 2 minutos com cada concentração da droga. A reação foi acompanhada em 550 nm utilizando-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{550} = 19000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. A atividade foi expressa em nanomoles de citocromo c oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.3.5.4 Obtenção do Ferrocitocromo c

Citocromo c de coração bovino foi reduzido com ditionito de sódio e a solução aquosa filtrada em coluna de Sephadex G-25, separando-se o ferrocitocromo c do excesso de ditionito (YONETANI & RAY, 1965).

A concentração do citocromo c reduzido foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $27.700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para a hemoproteína reduzida (MARGOLIASH, 1954). O ferrocitocromo c preparado por este método contém menos de 5% da proteína oxidada.

3.3.5.5 NADH Desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido-Redutase)

A atividade da NADH-desidrogenase foi determinada pelo método espectrofotométrico de SINGER (1974), utilizando-se o ferricianeto como aceitador de elétrons e na presença de rotenona. O sistema de reação em volume final de 1 ml foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.l⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol.l⁻¹, NADH 150 µmol.l⁻¹, ferricianeto de potássio 600 µmol.l⁻¹, rotenona 1 µmol.l⁻¹ e 100 µg de proteína mitocondrial. A enzima foi incubada por 2 minutos em cada concentração da droga. A reação foi monitorada em 420 nm, a 28°C, e para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar para o ferricianeto $\epsilon_{420} = 1040 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nanomoles de ferricianeto reduzido . min⁻¹ . mg⁻¹ de proteína.

3.3.5.6 Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade do complexo succinato oxidase foi determinada através do registro polarográfico do consumo de O₂ pelo método de SINGER (1974).

O sistema de reação, em volume final de 1,3 ml, foi constituído de: tampão fosfato 80 mmol.l⁻¹, pH 7,4, EDTA 50 µmol.l⁻¹, succinato de sódio 20 mmol.l⁻¹, rotenona 1 µmol.l⁻¹ e 0,75 mg de proteína mitocondrial por ml. As mitocôndrias foram incubadas com cada concentração da droga por 2 minutos. A velocidade de consumo de oxigênio foi determinada a 28°C e iniciada pela adição do substrato. Os resultados foram expressos em nanomoles de oxigênio consumidos .min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando a solubilidade do O₂ em água e a 1 atm de 235 µmols.l⁻¹ a 28 °C (ESTABROOK, 1967).

3.3.5.7 Succinato Citocromo c Redutase (Succinato: Ferrocitocromo c Óxido-Redutase)

A atividade da succinato citocromo c redutase foi determinada pelo método de SOMLO *et al.* (1965), medindo-se a redução do citocromo c, após o bloqueio da cadeia respiratória com NaCN e rotenona.

O sistema de reação em volume final de 1 ml foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.l⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol.l⁻¹, NaCN 1 mmol.l⁻¹, succinato de sódio 5 mmol.l⁻¹, rotenona 1 µmol.l⁻¹ e 20 µg de proteína mitocondrial. Os reagentes e a droga presentes no sistema foram incubados por 2 minutos à 28°C. A reação foi iniciada pela adição de 40 µmol.l⁻¹ do citocromo c e acompanhada espectrofotometricamente em 550 nm. Para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{550} = 19000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. A atividade enzimática foi expressa em nanomoles de citocromo c reduzido . min⁻¹ . mg⁻¹ de proteína.

3.3.5.8 Succinato Desidrogenase (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido Redutase)

A atividade da succinato desidrogenase foi determinada pelo método de SINGER (1974), utilizando-se DCPIP e PMS como aceitadores artificiais de elétrons. O sistema de reação em volume final de 1 ml foi constituído de: tampão fosfato de sódio 50 mmol.l⁻¹, pH 7,4, succinato de sódio 20 mmol.l⁻¹, NaCN 1 mmol.l⁻¹, EDTA 2 mmol.l⁻¹ e 20 µg proteína mitocondrial. A mistura foi incubada por 2 minutos a 28°C para o controle e também com a droga, e a reação iniciada pela adição de DCPIP 60 µmol.l⁻¹ e PMS 1 mmol.l⁻¹. A velocidade de redução do DCPIP foi monitorada em 600 nm e os resultados foram expressos em µmols de PMS reduzidos . min⁻¹ . mg⁻¹ de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 19.100 M⁻¹.cm⁻¹ para o DCPIP reduzido (SINGER, 1974).

3.3.6 Determinação Espectrofotométrica da L-Glutamato Desidrogenase (E. C. 1.1.1.37)

A atividade da glutamato desidrogenase foi determinada pelo método de STRECKER (1955), utilizando-se a enzima pura e obtida comercialmente (Sigma) ou de mitocôndria de fígado de rato rompidas por congelamento. A velocidade de oxidação do NADH foi acompanhada por espectrofotometria em 340 nm.

O sistema de reação em volume final de 1 ml foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.l⁻¹, pH 7,6, 2-oxoglutarato 30 mmol.l⁻¹, sulfato de amônia 60 mmol.l⁻¹, EDTA 5 mmol.l⁻¹, 500 µg de proteína mitocondrial ou 1,84 unidades de enzima purificada. Rotenona na concentração de 4,2 µmol.l⁻¹ foi adicionada quando se utilizava mitocôndria rompida por congelamento como fonte de enzima. A enzima foi incubada por 2 minutos em cada concentração de droga. A temperatura foi mantida em 28°C e a reação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato. A atividade enzimática foi expressa em nanomoles de 2-oxoglutarato reduzido . min⁻¹ . mg⁻¹ proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

3.3.7 Determinação da Atividade da F₁F₀ ATPase

3.3.7.1 Determinação da Atividade da F₁F₀ ATPase em Mitocôndrias Intactas

A atividade da F₁F₀ ATPase em mitocôndrias intactas foi determinada através do método de PULMANN *et al.* (1960). O sistema de reação foi constituído de: sacarose 50 mmol.l⁻¹, tampão Tris-HCl 12 mmol.l⁻¹ pH 7,4, KCl 50 mmol.l⁻¹ e 2 mg proteína mitocondrial. O volume da reação foi de 1 ml e a temperatura mantida em 28°C.

A reação foi iniciada com a adição de ATP 3 mmol.l⁻¹ e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos, TCA foi adicionado em concentração final de

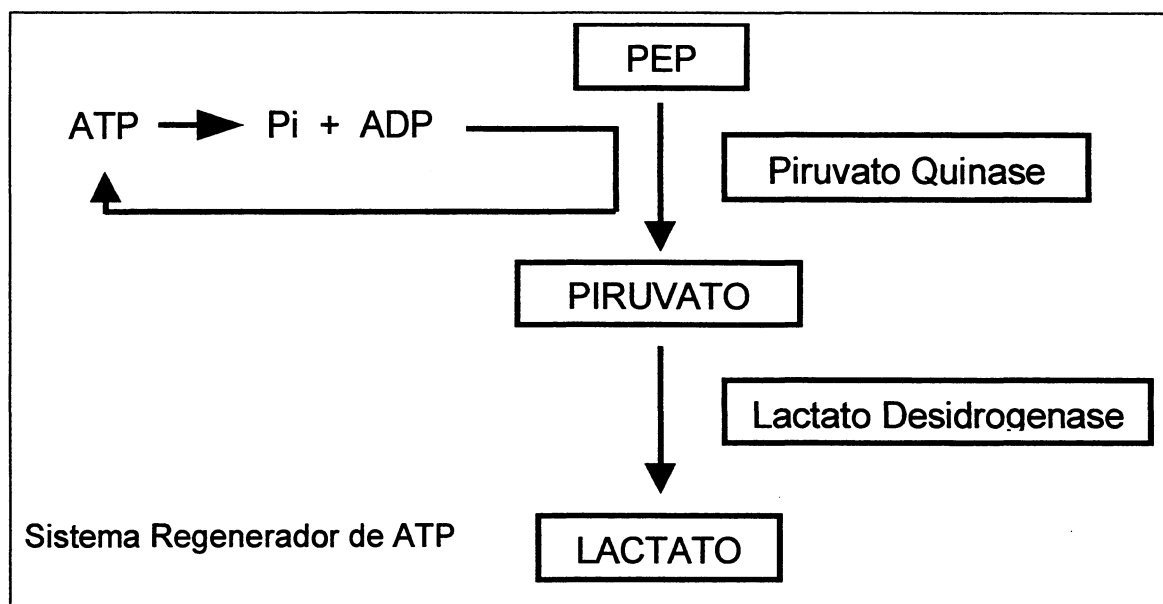
5%, com a finalidade de parar a reação. Em seguida, o material foi centrifugado a 7800 x g, durante 1 minuto e o fosfato inorgânico liberado dosado segundo o método de SUMMER (1944). Os resultados foram expressos em nanomoles de fosfato liberado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.3.7.2 Determinação da Atividade da F_1F_0 ATPase em Mitocôndrias Rompidas

A atividade da F_1F_0 ATPase em preparações mitocondriais rompidas por choque térmico, foi determinada na presença de um sistema regenerador de ATP segundo o método descrito por PULLMAN *et al.* (1960).

O sistema de reação e volume final de 1 ml foi constituído de: tampão Tris-HCl 50 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ e pH 8,4, MgSO_4 3 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, PEP 2,5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, piruvato quinase 3 unidades (1 unidade de PK converte 1 mol de PEP a piruvato em 1 minuto a 37°C em pH 7,6) e 2 mg proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de ATP 4 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, à 30°C e interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 5%. O material foi centrifugado a 7800 x g, por 1 minuto em temperatura ambiente e o fosfato inorgânico liberado dosado pelo método de SUMMER (1944).

Os resultados foram expressos em nanomoles de ATP hidrolisado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.



3.3.7.3 Determinação da Atividade da F_1F_0 ATPase em Mitocôndrias Tratadas com Carbonil Cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP)

A atividade da F_1F_0 ATPase em mitocôndrias desacopladas foi determinada através do método de PULMANN *et al.* (1960). O sistema de reação foi constituído de: sacarose 50 mmol.l^{-1} , tampão Tris-HCl 10 mmol.l^{-1} pH 7,4, KCl 50 mmol.l^{-1} , 2 mg de proteína mitocondrial e suplementado com FCCP $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$. O volume da reação foi de 1 ml e a temperatura mantida em 30°C .

A reação foi iniciada com a adição de ATP 3 mmol.l^{-1} e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos, TCA foi adicionado em concentração final de 5%. Em seguida, o material foi centrifugado a $7800 \times g$, durante 1 minuto e o fosfato inorgânico liberado foi dosado segundo o método de SUMMER (1944). Os resultados foram expressos em nanomoles de fosfato liberado $\text{.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.4 DETERMINAÇÃO DO INCHAMENTO MITOCONDRIAL (SWELLING)

Mitocôndrias de fígado de rato para determinação do inchamento mitocondrial, foram isoladas segundo o método descrito por MUSTAFA *et al.* (1966), com pequenas modificações. O meio de extração foi constituído de: sacarose 330 mmol.l^{-1} , Tris-HCl 1 mmol.l^{-1} pH 7,5 e EDTA 1 mmol.l^{-1} , sendo que na última centrifugação o EDTA foi retirado.

3.4.1 Determinação do Inchamento em Mitocôndria Energizada

Os experimentos visando avaliar o inchamento mitocondrial foram desenvolvidos em espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300, no comprimento de onda de 546 nm.

3.4.1.1 Determinação do Inchamento Mitocondrial na Presença de Acetato de Sódio

A determinação do inchamento mitocondrial, decorrente da entrada de íons sódio na matriz mitocondrial, foi realizada pelo método espectrofotométrico de SEPPALA *et al.* (1973), sendo a variação na densidade óptica acompanhada em 546 nm. O meio de reação em volume final de 3 ml foi constituído de: sacarose 100 mmol.l⁻¹, Tris-HCl 30 mmol.l⁻¹, EDTA 0,5 mmol.l⁻¹, acetato de sódio 50 mmol.l⁻¹ e 3 mg de proteína mitocondrial. O substrato utilizado para promover o inchamento foi o glutamato de sódio 15 mmol.l⁻¹ o qual foi adicionado depois de 2 minutos de incubação das mitocôndrias com a droga. Rotenona 4 µmol.l⁻¹ foi adicionado ao sistema em momento adequado para observação da contração da organela. Os resultados foram expressos como os traçados representativos de 4 experimentos independentes, e em percentagem de inibição, relativos ao controle.

3.4.1.2 Determinação do Inchamento na Presença de Valinomicina e K⁺

O inchamento mitocondrial devido a entrada de K⁺ na matriz, mediada pela valinomicina, foi acompanhado espectrofotometricamente como recomendado por MORENO & MADEIRA (1990). O meio de reação em volume final de 3 ml foi constituído de: KNO₃ 135 mmol.l⁻¹, tampão Hepes 5 mmol.l⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,1 mmol.l⁻¹, rotenona 4 µmol.l⁻¹, antimicina A 2 µg/ml e 1 mg de proteína mitocondrial. A mitocôndria foi incubada por 2 minutos com cada concentração da droga antes da adição de valinomicina. A reação foi iniciada pela adição da valinomicina 4 µg, e as variações na absorbância foram acompanhadas em 546 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição, relativos ao controle.

3.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDOX DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO ISOESTEVIOL POR VOLTAMETRIA CÍCLICA

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados a 25°C em tampão Hepes 10 mmol.l⁻¹, EGTA 0,1 mmol.l⁻¹ pH 7,2 e 8,5, e tampão fosfato de sódio pH 7,2, contendo 1% de DMSO. Eletrodos de platina (A=0,19 cm²) e de carbono vítreo (A=0,07cm²) foram utilizados nos experimentos. O eletrodo de carbono vítreo foi polido em feltro antes de cada experimento. Como eletrodo de referência foi utilizado o eletrodo de calomelano saturado (ECS) e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Para prevenir possível oxidação dos compostos no pH fisiológico pelo oxigênio do ar, nitrogênio livre de oxigênio foi usado para depurar as soluções em análise, antes e durante a execução dos voltamogramas (HODNICK *et al.* 1988). O isoesteviol lactona e o isoesteviol foram primeiramente dissolvidos em DMSO e depois diluídos em tampão (fosfato de sódio 50 mmol.l⁻¹ pH 7,2 ou Hepes 10 mmol.l⁻¹ e EGTA 0,1 mmol.l⁻¹ pH 7,2 e 8,5) para uma concentração final de 1 mmol.l⁻¹. Os experimentos foram realizados em um potenciostato/galvanostato EG & PAR (Princeton Applied Research) Modelo 173A. Estes experimentos foram realizados no Departamento de Físico-Química da UFPR, com a colaboração da Prof^a Dr^a Maria Aparecida B. Gomes.

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS

A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY *et al.*, (1951), utilizando-se espectrofotômetro Hitachi modelo U 2001 e albumina de soro bovino como padrão.

3.7 EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E ISOESTEVIOL SOBRE MACRÓFAGOS

3.7.1 Obtenção dos Macrófagos

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss com aproximadamente dois meses de idade. Após anestesia com éter até a morte, PBS (Solução Salina Tamponada) foi injetado na cavidade peritoneal dos animais, e após massagem vigorosa, o exsudato peritoneal contendo as células (CEP = células do exsudato peritoneal) foi aspirado e colocado em tubos de plástico mantidos em banho de gelo. A seguir as células foram centrifugadas a 480 g por 10 minutos a 4°C, utilizando centrífuga Beckman modelo J-21B ou Hitachi CR21E, o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" ressuspenso em HBSS (Solução Salina Balanceada de Hanks) ou em meio MEM (Meio mínimo essencial) adicionado de soro fetal bovino 5% e os antibióticos, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml e gentamicina 50 µg/ml. Após contagem, o número de células foi ajustado para a quantidade adequada a cada experimento. As células foram colocadas em placas de múltiplos poços (modelo Nunc), deixadas aderir por 2 horas. Após este tempo, as células foram lavadas 2 vezes com PBS à 37°C, tendo-se então os macrófagos aderidos à placa. Por este método mais de 90% das células aderidas são macrófagos, não necessitando a preparação de purificação posterior (ADAMS, 1979). Após esta etapa as condições dos experimento foram adequadas a cada tipo de avaliação.

3.7.2 Determinação da Viabilidade Celular

O teste do MTT (brometo de (3-[4-,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) avalia a função da enzima citocromo oxidase, a qual reduz o sal tetrazólio formando

cristais de formazan, que possuem cor roxa característica ao serem dissolvidos em DMSO. Após aderência em placas de 96 poços, os macrófagos (2×10^5 células/poço) foram incubados com o isoesteviol ou isoesteviol lactona nas concentrações indicadas, e preparadas em meio MEM. A incubação das células com as substâncias ocorreu por 2 ou 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 dependendo do experimento. Após estes tempos, o meio foi removido e adicionou-se MTT (500 $\mu\text{g/ml}$) dissolvido em HBSS (Solução Salina Balanceada de Hanks). As células foram então incubadas por mais 3 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 (REILLY *et al.*, 1998). A seguir, o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados, foram dissolvidos em DMSO. A leitura de absorbância foi feita em 550 nm em leitor de placas BIO-RAD modelo Benchmark, utilizando-se como branco, o solvente DMSO.

3.7.3 Determinação da Produção de Ânion Superóxido por Macrófagos Estimulados com PMA

A produção de ânion superóxido pelos macrófagos foi determinada como descrito por SASADA *et al.* (1983), através da redução extracelular do citocromo *c*. Em placas de 96 poços $4-5 \times 10^5$ CEP/poço foram colocadas para aderir. Após aderência foi adicionado às células meio de reação que constituía-se de: HBSS, citocromo *c* 80 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) 1 $\mu\text{g/ml}$ dissolvido em DMSO e o isoesteviol ou o isoesteviol lactona em diferentes concentrações. Controles constituídos de meio de reação com todos os reagentes citados exceto o PMA foram também realizados, assim como do solvente DMSO. As células foram incubadas por 75 minutos à 37°C com 5% CO_2 . Quando utilizado placas de 96 poços no tempo indicado 150 μl do meio de reação foram transferidos para outra placa, procedendo-se então a leitura de absorbâncias em 550 nm (citocromo *c* reduzido) em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Benchmark. A concentração de citocromo

c reduzido que corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos foi determinada utilizando o Coeficiente de Extinção Molar para mistura citocromo $C_{\text{oxid.red}}\Delta E = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (JOHNSTON *et al.*, 1978).

3.7.4 Dosagem de Óxido Nítrico (NO^{*})

Utilizando placas de 96 poços, $4-5 \times 10^5$ CEP/poço foram incubadas por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após aderência os macrófagos foram incubados com o isoesteviol ou isoesteviol lactona, diluídos em meio MEM. A incubação ocorreu por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este tempo, 100 µl do sobrenadante foram removidos, transferidos para outra placa e adicionados 100 µl do reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982), o qual é constituído de duas soluções: A) Naftiletlenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5% e B) sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5%, misturados na proporção 1:1 antes do uso. A reação foi lida após 10 minutos, em espectrofotômetro "Microplate Reader" da Bio-Rad Benchmark, a 550 nm. A concentração de NO^{*} foi calculada utilizando uma curva padrão de nitrito de sódio realizada em cada experimento. Como controle positivo para a produção de NO^{*} foi utilizado LPS (50 ng/ml) + INF-γ (26 U/ml).

3.7.5 Determinação da Concentração de Proteína Celular

A concentração de proteína celular total foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), o qual foi adaptado para uso em microplacas de 96 poços. A cada poço da microplaca foram adicionados de $4-5 \times 10^5$ CEP. Após a leitura correspondente aos experimentos em questão, as células aderidas foram lavadas 4 vezes com PBS a 37°C. Adicionou-se então 100 µl de Triton-X100 a 0,2 % por poço,

seguinte-se incubação a 56°C por 40 minutos. Após a digestão das células, a preparação foi homogeneizada e então 10 µl desta solução foi colocada em tubo de ensaio, à solução protéica adicionou-se 0,5 ml de reativo de Bradford diluído 1:4 em H₂O milli-Q e após 5 minutos transferiu-se 200 µl para placas de 96 poços que foram lidas em 595 nm em leitor de microplaca da BIO-RAD modelo Benchmark. No tubo branco foi adicionado 10 µl de solução de triton-X₁₀₀ a 0,2 %.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram expressos como a média ± desvio padrão (média ± dp), submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para a comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

Com a finalidade de avaliar o efeito do isoesteviol lactona sobre o metabolismo mitocondrial foram realizados inicialmente análises polarográficas utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As figuras 14 à 17 mostram os resultados obtidos quando foram analisados os seguintes parâmetros: velocidade de consumo de oxigênio na presença de ADP (estado III) e após o consumo do ADP (estado IV); coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O.

Na figura 14 pode-se observar que o isoesteviol lactona promove uma diminuição da velocidade respiratória em mitocôndrias isoladas, na presença de substrato (L-glutamato ou succinato) e ADP (estado III). Quando o glutamato foi utilizado como substrato, o isoesteviol lactona apresentou inibição significativa, em relação ao controle, em todas as doses utilizadas. Nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mmol.l⁻¹ as inibições da velocidade respiratória foram de 13, 20, 41, 56 e 65% em relação ao controle, respectivamente.

Quando o succinato de sódio foi utilizado como substrato (figura 14), foi observado um perfil de inibição semelhante ao observado com glutamato (figura 14). As inibições foram estatisticamente significativas a partir da concentração de 0,25 mmol.l⁻¹. Para as doses de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mmol.l⁻¹ as inibições foram de 26, 29, 39 e 44% em relação ao controle, respectivamente.

Na figura 15 observa-se um discreto aumento na velocidade do consumo de oxigênio após a fosforilação do ADP (estado IV). O estímulo observado foi estatisticamente significativo a partir da concentração de 0,25 mmol.l⁻¹, para ambos os substratos. Na concentração de 1 mmol.l⁻¹ do isoesteviol lactona verificou-se 17 e 38% de estímulo durante a oxidação do glutamato e succinato, respectivamente.

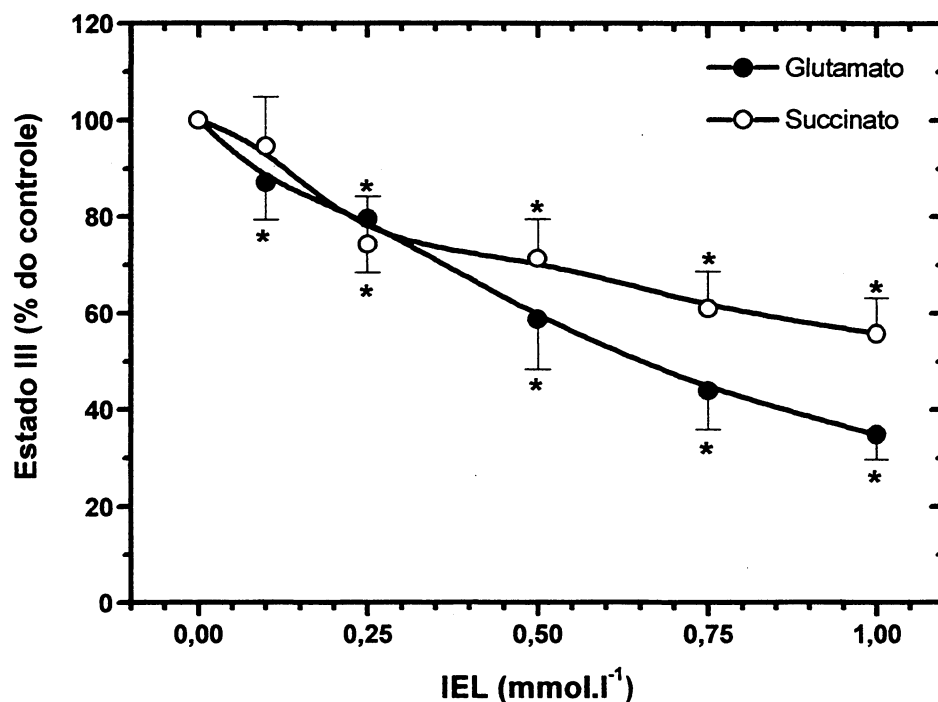


FIGURA 14 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO III EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.

Sistema: D-manitol 125 mmol.l⁻¹, KCl 65 mmol.l⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.l⁻¹, pH 7,2, EGTA 0,1 mol.l⁻¹, BSA 0,1g% suplementado com succinato de sódio 3 mmol.l⁻¹, rotenona 1 μmol.l⁻¹, Pi 0,8 mmol.l⁻¹ e ADP 0,08 mmol.l⁻¹ ou com glutamato de sódio 5 mmol.l⁻¹, Pi 1,6 mmol.l⁻¹ e ADP 0,16 mmol.l⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 0,5 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de sódio.

- Consumo de Oxigênio na presença de ADP e substrato (Estado III). 100% corresponde a 78,38 ± 1,8 e 175,84 ± 5,1 nmols de oxigênio consumidos por minuto por miligrama de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato, respectivamente.

Cada valor representa a média ± dp de seis experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle (p<0,05).

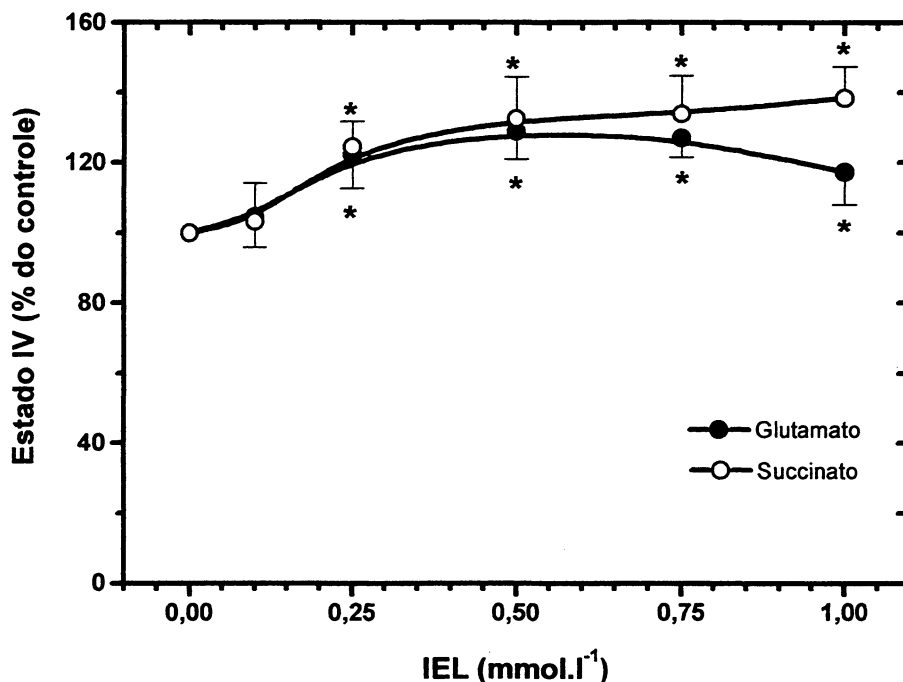


FIGURA 15 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO IV EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.

Sistema: D-manitol 125 mmol.l⁻¹, KCl 65 mmol.l⁻¹, tampão Hapes 10 mmol.l⁻¹, pH 7,2, EGTA 0,1 mol.l⁻¹, BSA 0,1g% suplementado com succinato de sódio 3 mmol.l⁻¹, rotenona 1 μmol.l⁻¹, Pi 0,8 mmol.l⁻¹ e ADP 0,08 mmol.l⁻¹ ou com glutamato de sódio 5 mmol.l⁻¹, Pi 1,6 mmol.l⁻¹ e ADP 0,16 mmol.l⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 0,5 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de sódio.

- Consumo de Oxigênio após a fosforilação de ADP (Estado IV). 100% corresponde a 16,75 ± 4,3 e 32,94 ± 4,5 nmols de oxigênio consumidos por minuto por miligrama de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato, respectivamente.

Cada valor representa a média ± dp de seis experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle (p<0,05).

As figuras 16 e 17 mostram os efeitos do isoesteviol lactona sobre o CCR e sobre a razão ADP/O, respectivamente. Na figura 16 verifica-se uma diminuição do CCR, sendo de 16, 34, 55, 68 e 74% para as concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mmol.l⁻¹, respectivamente, utilizando-se L-glutamato como substrato, e de 20, 41, 52 e 64% nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mmol.l⁻¹, respectivamente, para o succinato. Estes resultados são consequência dos efeitos do isoesteviol lactona sobre a velocidade de consumo de oxigênio (inibição do estado III e estímulo do estado IV) observados anteriormente.

Pode-se verificar também uma diminuição do valor da razão ADP/O (figura 17) com ambos os substratos sendo de 16, 31, 56 e 60% para as concentrações de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mmol.l⁻¹, para o L-glutamato, e de 21, 29 e 36% para as concentrações de 0,5, 0,75 e 1 mmol.l⁻¹ para o succinato, respectivamente.

Os resultados obtidos até então indicam que o isoesteviol lactona afeta tanto o consumo de oxigênio quanto a síntese de ATP com ambos os substratos. Contudo, as inibições observadas na velocidade de consumo de oxigênio no estado III e CCR foram maiores quando o L-glutamato foi utilizado como substrato.

Sendo assim, algumas hipóteses puderam ser aventadas sobre a maneira pela qual o IEL estaria exercendo estes efeitos. Entre estas hipóteses podemos destacar:

- a) inibição da atividade de complexos enzimáticos e conseqüentemente restrição parcial no fluxo de elétrons na cadeia respiratória;
- b) efeito sobre a atividade da ATPase;
- c) restrição parcial no fornecimento de elétrons à cadeia respiratória por afetar a metabolização do substrato em etapa anterior a cadeia ;
- d) alteração da fluidez de membrana mitocondrial que afetaria não só o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória como a translocação de íons e síntese acoplada de ATP;
- e) desvio de elétrons da cadeia respiratória de forma direta, através de reações de óxido-redução.

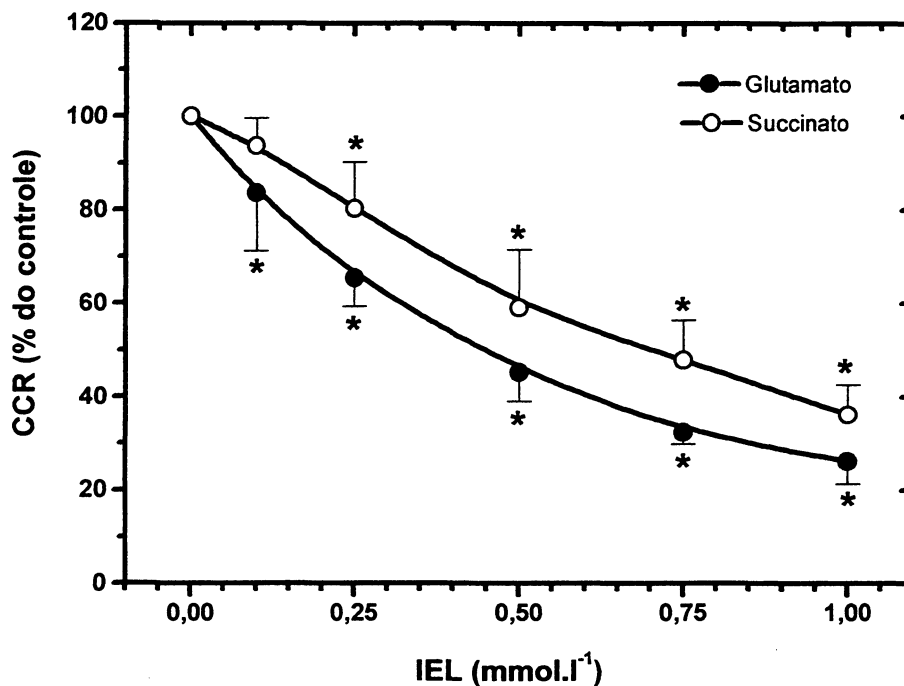


FIGURA 16 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) SOBRE O CCR DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

Sistema: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.l⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.l⁻¹, pH 7,2, EGTA 0,1 mol.l⁻¹, BSA 0,1g% suplementado com succinato de sódio 3 mmol.l⁻¹, rotenona 1 μ mol.l⁻¹, Pi 0,8 mmol.l⁻¹ e ADP 0,08 mmol.l⁻¹ ou com glutamato de sódio 5 mmol.l⁻¹, Pi 1,6 mmol.l⁻¹ e ADP 0,16 mmol.l⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 0,5 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de sódio.

- Coeficiente de Controle Respiratório (RCC). 100% corresponde a $4,73 \pm 0,3$ e $5,47 \pm 0,4$ para o glutamato e succinato, respectivamente.

Cada valor representa a média \pm dp de seis experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

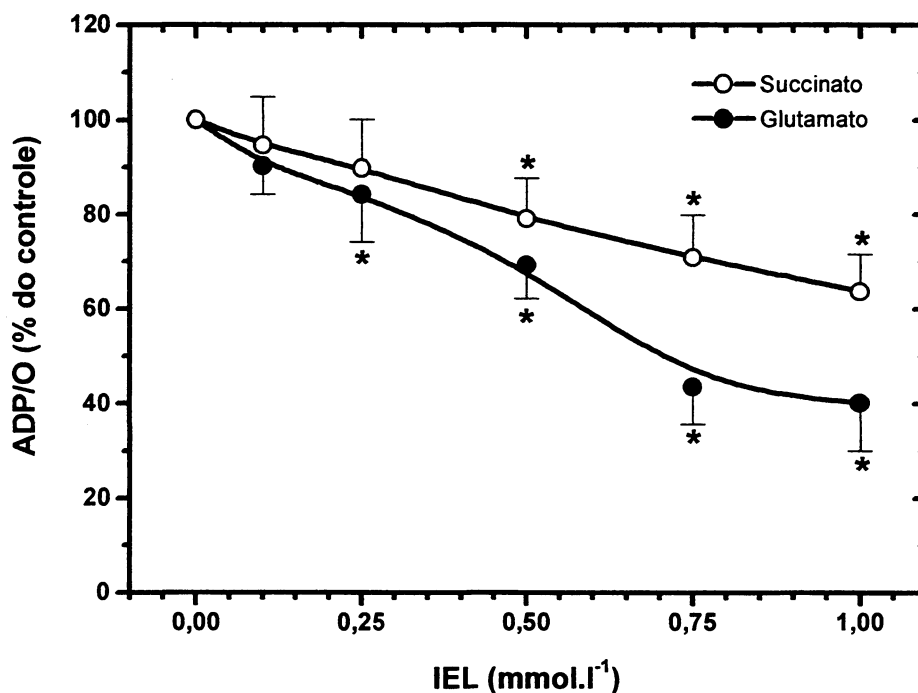


FIGURA 17 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) SOBRE A RAZÃO ADP/O DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.

Sistema: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.l⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.l⁻¹, pH 7,2, EGTA 0,1 mol.l⁻¹, BSA 0,1g% suplementado com succinato de sódio 3 mmol.l⁻¹, rotenona 1 μmol.l⁻¹, Pi 0,8 mmol.l⁻¹ e ADP 0,08 mmol.l⁻¹ ou com glutamato de sódio 5 mmol.l⁻¹, Pi 1,6 mmol.l⁻¹ e ADP 0,16 mmol.l⁻¹. A quantidade utilizada de mitocôndrias em cada experimento foi de 0,5 mg quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e, de 2 mg quando o substrato foi o glutamato de sódio.

- Concentração de ADP/consumo de oxigênio (ADP/O). 100% corresponde a 3,01 ± 0,3 e 1,23 ± 0,1 para o glutamato e succinato, respectivamente.

Cada valor representa a média ± dp de seis experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle (p<0,05).

A seguir, visando avaliar melhor as hipóteses apresentadas acima foram analisados inicialmente os efeitos do isoesteviol lactona sobre os complexos enzimáticos relacionados com a cadeia respiratória.

4.2 EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS À CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Os efeitos promovidos pelo isoesteviol lactona sobre os complexos enzimáticos relacionados com a cadeia respiratória estão resumidos na tabela 2.

O isoesteviol lactona promoveu inibições estatisticamente significativas na atividade da NADH oxidase que foram de 17, 43 e 45% para as concentrações de 0,5, 0,75 e 1,0 mmol.l⁻¹ de IEL, respectivamente. A NADH desidrogenase, succinato oxidase e succinato desidrogenase tiveram suas atividades inibidas de forma estatisticamente significativa somente nas concentrações de 0,5, 0,75 e 1,0 mmol.l⁻¹, sendo inibidas em 13, 34 e 13% na concentração máxima, respectivamente. A atividade da NADH citocromo c redutase foi diminuída em 21% com 0,75 mmol.l⁻¹ e 33% com 1,0 mmol.l⁻¹, enquanto que a atividade enzimática da citocromo c oxidase foi inibida em 10% com 1 mmol.l⁻¹ de isoesteviol lactona.

A succinato citocromo c redutase foi inibida nas doses de 0,75 mmol.l⁻¹ e 1 mmol.l⁻¹ de isoesteviol lactona, sendo observada inibição de 15% e 22%, respectivamente.

Entre as enzimas solúveis da matriz mitocondrial, interessa para o presente trabalho, a L-glutamato desidrogenase, uma vez que com o substrato L-glutamato utilizado nos estudos de respiração mitocondrial (item 4.1) os efeitos inibitórios foram mais intensos. Como mostrado na tabela 2, a L-glutamato desidrogenase foi inibida em 85% pelo isoesteviol lactona na dose de 1 mmol.l⁻¹. Essa inibição foi semelhante a inibição promovida pelo isoesteviol (tabela 3) segundo KELMER-BRACHT *et al.* (1981, 1984 e 1985). Sendo assim, através destes resultados verifica-se que o isoesteviol lactona é capaz de inibir atividades enzimáticas nas regiões dos complexos da cadeia respiratória, sendo os complexos I, II e III os mais inibidos.

TABELA 2 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA

IEL (mmol.l ⁻¹)	VALORES EM % RELATIVOS AO CONTROLE (100%)								
	NADH Oxidase	NADH desidrogenase	NADH citocromo c redutase	Succinato oxidase	Succinato desidrogenase	Succinato citocromo c redutase	Citocromo c Oxidase	Glutamato desidrogenase	
0,1	79 ± 6*	93 ± 11	101 ± 3	103 ± 7	93 ± 9	93 ± 2	101 ± 5	104 ± 13	
0,25	69 ± 8*	95 ± 12	93 ± 5	94 ± 9	91 ± 14	96 ± 8	95 ± 2	41 ± 8*	
0,5	55 ± 10*	83 ± 3*	93 ± 3	85 ± 7*	85 ± 5*	86 ± 9	95 ± 3	28 ± 8*	
0,75	52 ± 10*	87 ± 11*	79 ± 5*	71 ± 5*	82 ± 4*	84 ± 3*	91 ± 3*	16 ± 4*	
1,0	55 ± 4*	87 ± 4*	67 ± 3*	66 ± 4*	87 ± 4*	77 ± 9*	90 ± 3*	15 ± 7*	

As condições experimentais estão descritas no item 3.2.4 da seção 3. Materiais e Métodos. 100% corresponde a atividade dos controles: NADH oxidase – 131,25 nmol de Oxigênio consumido x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína mitocondrial. NADH desidrogenase – 1,20 nmol de ferricianeto reduzido x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína mitocondrial. NADH citocromo c redutase – 231,26 nmol citocromo c reduzido x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína mitocondrial. Succinato Oxidase – 62,59 nmol de oxigênio consumido x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína mitocondrial. Succinato desidrogenase – 149,58 :mol PMS reduzido x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína mitocondrial. Succinato citocromo c redutase – 166,78 nmol citocromo c reduzido x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína mitocondrial. Citocromo c oxidase – 64,54 nmol citocromo c oxidado x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína mitocondrial. Glutamato desidrogenase – 2,37 nmol α-cetoglutarato reduzido x min⁻¹ x mg⁻¹. Os resultados estão expressos em percentagem relativos aos controles (100%) e são médias ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. * Valores estatisticamente significativos relativos ao controle (100%) – p<0,05.

KELMER-BRACHT *et al.* (1981, 1984 e 1985) observaram inibições destas enzimas, porém, os valores observados para a concentração de 0,5 mmol.l⁻¹ foram maiores do que os com o isoesteviol lactona para todas as enzimas testadas, exceto para a NADH desidrogenase.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) E OS EFEITOS DO ISOESTEVIOL (ISO) SOBRE ALGUMAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Enzima	% de inibição	
	IEL 0,5 mmol.l ⁻¹	* ISO 0,5 mmol.l ⁻¹
NADH oxidase	17	85
NADH desidrogenase	17	0
NADH cit c redutase	NS	82
Succinato oxidase	15	24
Succinato desidrogenase	15	24
Citocromo c Oxidase	NS	0
Glutamato desidrogenase	72	80

* Resultados obtidos por KELMER-BRACHT *et al.*, 1981, 1984 e 1985. NS = não significativo estatisticamente

O efeito do isoesteviol lactona sobre a oxidação do L-glutamato em mitocôndrias intactas, a exemplo do que ocorre com o isoesteviol (KELMER-BRACHT *et al.*, 1981, 1984 e 1985), pode ser devido ao efeito desta substância sobre a etapa de metabolização do substrato anterior a cadeia respiratória, catalisada pela L-glutamato desidrogenase. Portanto, os efeitos sobre esta enzima explicam as maiores inibições da velocidade de consumo de oxigênio no estado III verificadas anteriormente quando comparadas com as obtidas com succinato.

Estes resultados mostram que o IEL afeta mais de um sítio ou atividade enzimática. Assim, a possibilidade da ação do IEL sobre a atividade ATPásica, é uma hipótese atrativa de ser avaliada.

4.3 EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE O COMPLEXO F_1F_0 - ATPASE

De acordo com a teoria quimioosmótica (MITCHELL, 1961), o transporte de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial gera um gradiente eletroquímico de prótons no espaço entre as membranas interna e externa, e a utilização deste gradiente pela ATP sintase leva à síntese de ATP. Por outro lado, protonóforos, desacopladores, translocadores de prótons, substâncias que aumentam a condutância de prótons através da membrana, desfazem o gradiente eletroquímico, dissipam a força próton motriz, impedindo a síntese de ATP (NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

Desta maneira a avaliação da atividade da ATPase mitocondrial permite verificar a influência da droga sobre a enzima ou sobre a permeabilidade da membrana a prótons, além de colaborar para explicar os resultados obtidos na investigação dos efeitos do isoesteviol lactona sobre a respiração mitocondrial.

Neste trabalho avaliou-se os efeitos do isoesteviol lactona sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias de fígado de rato intactas, rompidas por congelamento e em mitocôndrias intactas tratadas com FCCP. Os resultados de tais experimentos estão apresentados na figura 18.

O isoesteviol lactona apresentou discreto efeito inibidor e estatisticamente significativo da atividade ATPásica de mitocôndrias intactas, da ordem de 20% na concentração de $0,25 \text{ mmol.l}^{-1}$ (figura 18), efeito que se manteve aproximadamente neste valor até a concentração de 1 mmol.l^{-1} de isoesteviol lactona. Considerando o estímulo da velocidade respiratória observado durante o estado IV (figura 15) que caracteriza uma ação desacopladora (TZAGOLLOF, 1982), o efeito inibidor da ATPase de mitocôndrias intactas não deixa de ser surpreendente. Portanto, este resultado poderia ser conseqüência de uma ação do isoesteviol lactona sobre o translocador de nucleotídeos de adenina, no sítio de catálise, ou mesmo sobre a membrana mitocondrial interna. A primeira possibilidade pode ser convenientemente

avaliada com o uso de preparações mitocondriais desacopladas por FCCP, um conhecido desacoplador que em baixas doses permite que a ATPase funcione em velocidade maior que em mitocôndria intacta. Os resultados da figura 18 mostram que nestas condições o isoesteviol lactona não exerce efeitos sobre a atividade da ATPase, exclui-se portanto qualquer efeito indireto do isoesteviol lactona sobre o translocador de ADP^3-/ATP^4- . Por outro lado, quando se utilizou fragmentos de membrana mitocondrial em que a organela havia sido rompida por choque térmico, um efeito inibidor, não dependente da concentração do isoesteviol lactona, se fez presente, da ordem de 38% na concentração de $0,25 \text{ mmol.l}^{-1}$ de isoesteviol lactona. Este resultado sugere que o isoesteviol lactona poderia afetar a atividade da ATPase desde que seu acesso à mitocôndria seja facilitado por danos à membrana, a qual representa uma barreira para o acesso do isoesteviol lactona à enzima.

Quando se compara o efeito exercido pelo isoesteviol sobre a ATPase, observado por KELMER-BRACHT *et al.* (1985a), e o efeito exercido pelo isoesteviol lactona, mostrado neste trabalho a diferença é bastante significativa. Enquanto o isoesteviol lactona na concentração de $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ apresentou 22% de inibição da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas e que se manteve neste valor aproximado até a concentração de 1 mmol.l^{-1} , por outro lado o isoesteviol segundo KELMER-BRACHT (1985a) apresentou inicialmente um estímulo acentuado na atividade hidrolítica da ATPase na dose de $0,06 \text{ mmol.l}^{-1}$ seguido de inibição até a dose de 1 mmol.l^{-1} em mitocôndrias intactas e nas mesmas condições experimentais, característica de um desacoplador clássico (KELMER-BRACHT *et al.* 1985a). Portanto, a modificação na estrutura química do isoesteviol (adição do anel lactônico) revelou um efeito diferente de um desacoplador clássico, que caracteriza-se por um aumento na taxa de hidrólise de ATP (MORELAND, 1994). A ação de substâncias que interferem com a fosforilação oxidativa diferentemente dos desacopladores clássicos é complexa podendo ocorrer um amplo espectro de respostas diferentes. Tais substâncias são classificadas como desacopladores

inibitórios e caracterizam-se por satisfazerem a maioria dos critérios estabelecidos para desacopladores em baixas concentrações molares, mas em altas concentrações, agem como inibidores do transporte de elétrons. Portanto o isoesteviol lactona por não estimular a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas pode ser classificado como um desacoplador inibitório.

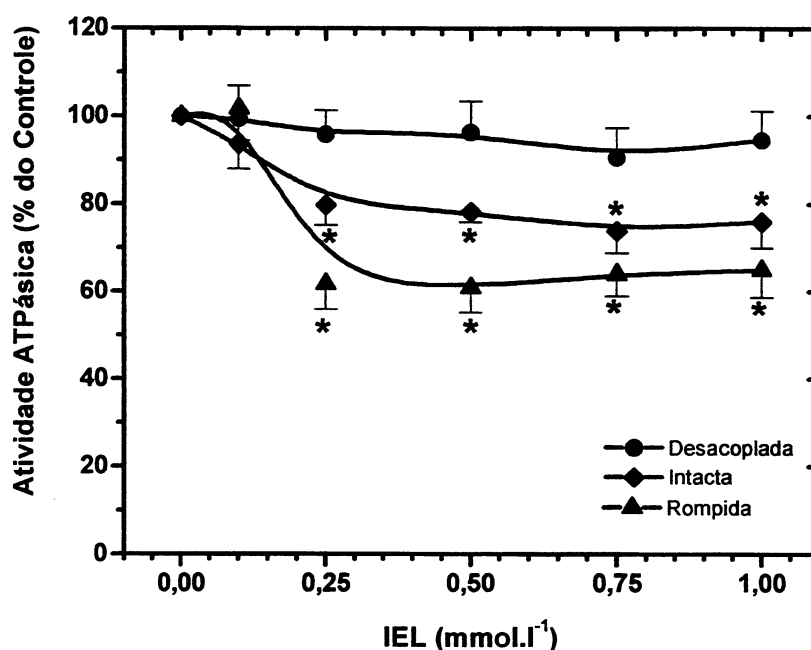


FIGURA 18 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE O COMPLEXO F_1F_0 - ATPase DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.

Sistemas: Mitocôndrias intactas e tratadas com FCCP: sacarose 50 mmol.l^{-1} , tampão Tris-HCl 10 mmol.l^{-1} pH 7,4, KCl 50 mmol.l^{-1} e proteína mitocondrial em quantidade adequada. O FCCP foi adicionado na concentração final de $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$. A reação foi iniciada com a adição de ATP $3,0 \text{ mmol.l}^{-1}$, e mantida sob agitação constante a 30°C . Após 10 minutos, TCA foi adicionado em concentração final de 5%, com a finalidade de parar a reação.

Mitocôndrias rompidas: tampão Tris-HCl $50,0 \text{ mmol.l}^{-1}$, MgSO_4 $3,0 \text{ mmol.l}^{-1}$, PEP $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, piruvato quinase 3 unidades e proteína mitocondrial em quantidade adequada. A reação foi iniciada pela adição de ATP $4,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ e interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 5%.

Mitocôndrias rompidas - 100% corresponde a $723,5 \pm 65,76 \text{ nmol de Pi liberado.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. Mitocôndrias intactas - 100% corresponde a $15,18 \pm 0,75 \text{ nmol de Pi liberado.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. Mitocôndrias desacopladas com FCCP - 100% corresponde a $98,6 \pm 1,65 \text{ nmol de Pi liberado.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial.

Os dados representam a média \pm dp de 3 experimentos independentes. *Todos os valores foram estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Considerando os efeitos observados sobre a cadeia respiratória, uma avaliação do potencial redox do isoesteviol e do isoesteviol lactona seria relevante. Na literatura não existem relatos sobre os valores de potencial de redução do isoesteviol lactona e do isoesteviol e nem se eles possuem a capacidade de desviar elétrons do seu fluxo normal na cadeia respiratória através de reações de oxido-redução. Sendo assim, foi analisada a seguir a possibilidade destes compostos serem eletroativos na faixa de potencial encontrada na cadeia respiratória.

4.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDOX DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO ISOESTEVIOL POR VOLTAMETRIA CÍCLICA

O sistema de transporte de elétrons mitocondrial envolve reações de oxido-redução que ocorrem quando existe uma transferência de elétrons de um doador para um aceitador. As formas oxidadas e reduzidas dos componentes ou grupos que fazem parte das reações de oxidação e redução são chamados de pares redox. A facilidade com a qual um doador de elétron doa seus elétrons para um aceitador de elétrons é expressa quantitativamente como o potencial de oxidação-redução do sistema. Esse potencial de oxidação-redução é medido em volts. O redutor de um par de oxidação-redução com grande potencial negativo doará seus elétrons mais rapidamente do que pares com menores potenciais negativos ou potenciais redox positivos. Por outro lado, um forte oxidante (caracterizado por um grande potencial positivo) tem alta afinidade por elétrons (HATEFI, 1985; CALHOUN *et al.*, 1994).

Como os sistemas enzimáticos da cadeia respiratória são eletroativos, e como algumas das atividades biológicas podem ser dependentes de atividade de oxido-redução, foi analisada também neste trabalho a hipótese dos efeitos do isoesteviol e do isoesteviol lactona sobre o consumo de oxigênio serem devido ao potencial redox do isoesteviol e do isoesteviol lactona de maneira que permitisse o

desvio do fluxo de elétrons da cadeia respiratória. Para tanto, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica com o objetivo de determinar o valor do potencial padrão (E°) tanto do isoesteviol lactona quanto do isoesteviol em meio aquoso. É conhecido que que as substâncias que participam na reação total catalisada pela cadeia respiratória mitocondrial possuem valores de E° entre -0,320 V a +0,820 V vs ENH (Eletrodo Normal de Hidrogênio) (DEVLIN, 1997). A voltametria cíclica é uma das técnicas eletroanalíticas mais versáteis para o estudo de espécies eletroativas. Sua efetividade resulta da sua capacidade de verificar o comportamento redox sobre uma ampla faixa de potencial (KISSINGER & HEINEMAN, 1983). Basicamente, a técnica consiste da aplicação de uma voltagem ao eletrodo de trabalho, variando-a linearmente de um valor inicial, E_i (figura 19), até um limite pré-determinado, $E_{\lambda 1}$ (conhecido como potencial de inversão), onde a direção da varredura é revertida (MABBOTT, 1983).

Como resposta ao potencial aplicado tem-se um sinal de corrente associado a cada valor de potencial. A corrente depende tanto da transferência do material eletroativo do seio da solução até a superfície do eletrodo de trabalho, como também do processo de transferência de carga na interface eletrodo de trabalho/solução (MABBOTT, 1983). A figura 19 ilustra um voltamograma onde estes parâmetros podem ser observados.

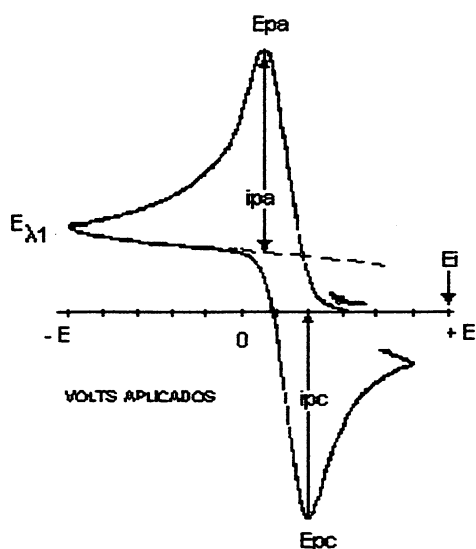


FIGURA 19 - VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DO $K_3Fe(CN)_6$ (1mmol.l^{-1}) EM ELETRODO DE PLATINA EM SOLUÇÃO DE KCl 0,1 M, MOSTRANDO O PICO ANÓDICO E O PICO CATÓDICO.

E_{pa} e E_{pc} são potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente. i_{pa} e i_{pc} são corrente de pico anódico e catódico, respectivamente.

Os resultados estão representados pelos voltamogramas cíclicos nas figuras 20 e 22, onde foi utilizado como eletrodo de trabalho o eletrodo de platina, e na figura 21 o eletrodo de carbono vítreo. As concentrações dos tampões e o pH foram semelhantes àqueles encontrados nos sistemas experimentais utilizados anteriormente com mitocôndrias e a quantidade de solvente não aquoso (DMSO) foi mantida em baixa concentração (1%). A velocidade de varredura de potenciais foi mantida constante e igual a 50 mV/s. As análises com tampão fosfato foram realizadas com a finalidade de verificar se o íon fosfato não poderia colaborar na catálise da reação de óxido-redução como observado por ROCHA *et al.* (2000) para o ácido 5-aminolevulínico.

Na figura 20a, que mostra resultado referente ao tampão Hepes, pH 7,2, pode-se observar uma corrente de oxidação para potenciais mais positivos do que +0,7 V, sendo que esta aumenta com o aumento do potencial aplicado. Invertendo-se a varredura de potenciais para valores mais negativos (em +3,0 V) observa-se um decréscimo da corrente. Para valores de potenciais mais negativos do que 0,0 V surge um sinal de corrente de redução apresentando um pico em torno de -0,4 V associado à redução do eletrólito (tampão). Da mesma forma que o tampão apresentou processos de óxido-redução sobre o eletrodo de platina quando aplicou-se potenciais entre -1,0 V à +3,0 V, estes mesmos processos foram observados quando o isoesteviol lactona (figura 20b) ou o isoesteviol (figura 20c) estavam presentes no eletrólito, não sendo observado nenhum processo de oxidação ou de redução adicional. Assim, conclui-se que estes compostos não são eletroativos neste meio reacional sobre uma superfície de platina.

Alterando-se o pH do meio (tampão Hepes) de 7,2 para 8,5 e mantendo-se o eletrodo de trabalho (eletrodo de platina) não se verificou também nenhuma eletroatividade para estas substâncias (dados não mostrados).

Uma outra estratégia utilizada foi a mudança do eletrodo de platina para um eletrodo de carbono vítreo, utilizando-se o mesmo meio reacional (tampão

Hepes) em pH 7,2. Como verifica-se na figura 21, não foram verificados picos de óxido-redução para o isoesteviol lactona (figura 21b) nem para o isoesteviol (figura 21c). Mudando-se o pH do tampão Hepes de 7,2 para 8,5, também não foram verificados picos de oxidação-redução (dados não mostrados).

Um outro meio reacional que foi utilizado nos experimentos com mitocôndrias foi o tampão fosfato pH 7,2, o qual também foi utilizado para efetuar medidas de voltametria cíclica com o objetivo de identificar processos de oxidação e de redução do isoesteviol e do isoesteviol lactona. A figura 22 mostra os voltamogramas cíclicos utilizando um eletrodo de platina, utilizando tampão fosfato pH 7,2 como eletrólito. Novamente, não se observou nenhuma diferença entre os voltamogramas cíclicos obtidos com o tampão fosfato e DMSO 1% e os registrados na presença de isoesteviol e isoesteviol lactona. Utilizando eletrodo de carbono vítreo com este mesmo tampão, também não foram registradas alterações no perfil observado quando somente tampão e DMSO 1% foram submetidos a uma varredura (dados não mostrados).

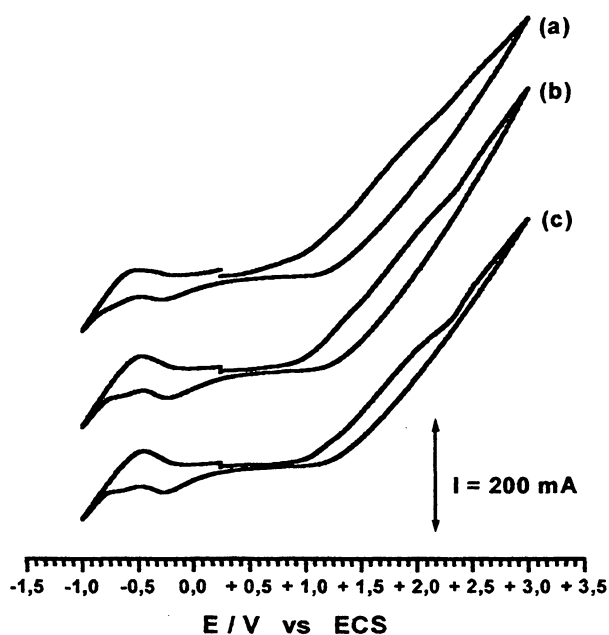


FIGURA 20 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA UTILIZANDO ELETRODO DE PLATINA E TAMPÃO HEPES pH 7,2.

Sistema: Tampão Hepes 10 mmol.l^{-1} pH 7,2 com EGTA $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ suplementado com (a) DMSO 1%; (b) isoesteviol lactona 1 mmol.l^{-1} + DMSO 1% e (c) isoesteviol 1 mmol.l^{-1} + DMSO 1%, a 25°C . O eletrodo de referência e o auxiliar utilizados foram o $\text{Hg/Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Cl}^-$ e o de platina, respectivamente, e a velocidade de varredura foi de 50 mV.s^{-1} .

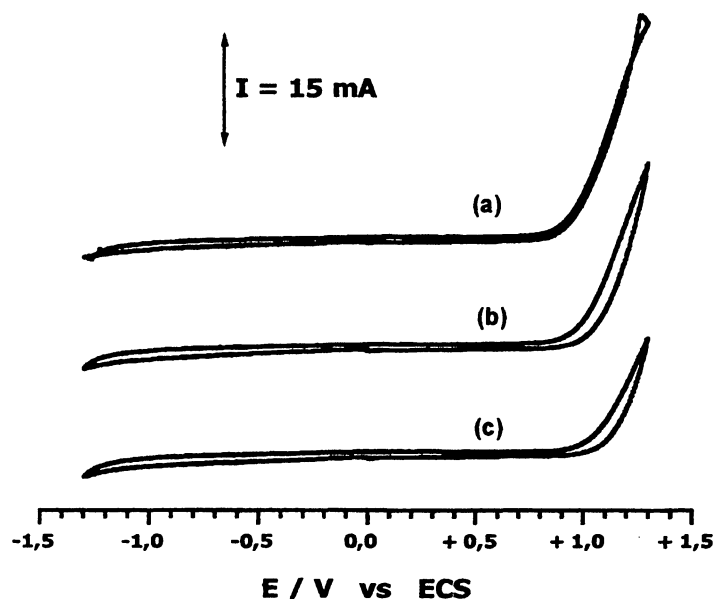


FIGURA 21 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO E TAMPÃO HEPES pH 7,2

Sistema: Tampão HEPES 10 mmol.l^{-1} pH 7,2 com EGTA $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ suplementado com (a) DMSO 1%; (b) isoesteviol lactona 1 mmol.l^{-1} + DMSO 1% e (c) isoesteviol 1 mmol.l^{-1} + DMSO 1%, a 25°C . O eletrodo de referência e o auxiliar utilizados foram o $\text{Hg/Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Cl}^-$ e de platina, respectivamente, e a velocidade de varredura foi de 50 mV.s^{-1} .

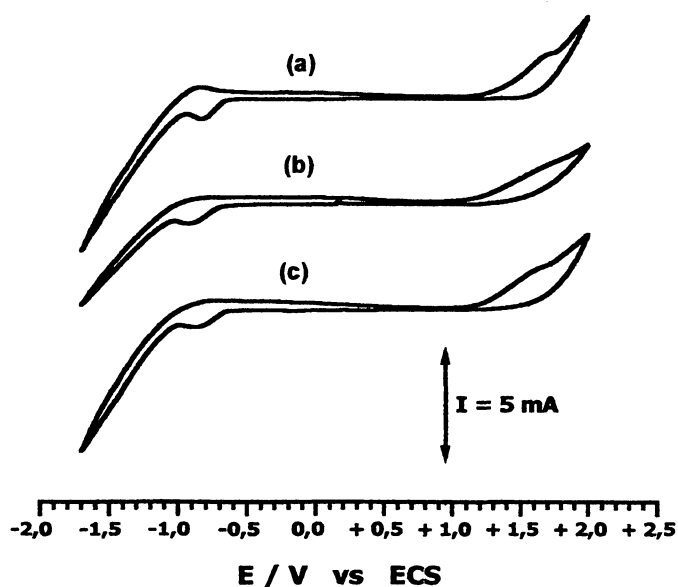


FIGURA 22 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA UTILIZANDO ELETRODO DE PLATINA E TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO pH 7,2

Sistema: Tampão fosfato de sódio pH 7,2 suplementado com (a) DMSO 1%; (b) isoesteviol lactona 1 mmol.l^{-1} + DMSO 1% e (c) isoesteviol 1 mmol.l^{-1} + DMSO 1%, a 25°C . O eletrodo de referência e o auxiliar utilizados foram o $\text{Hg/Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Cl}^-$ e de platina, respectivamente, e a velocidade de varredura foi de 50 mV.s^{-1} .

Portanto, dos experimentos de voltametria cíclica podemos concluir que tanto o isoesteviol quanto o isoesteviol lactona não são eletroativos nas condições experimentais utilizadas podendo-se assim descartar a possibilidade destes compostos de agirem desviando elétrons da cadeia respiratória diretamente.

KELMER-BRACHT *et al.* (1985a) verificou, contudo, que o isoesteviol afeta parâmetros relacionados com a fluidez de membrana através da técnica de inchamento mitocondrial induzido por substrato oxidável, conseqüente ao efeito inibidor sobre a cadeia de transporte de elétrons. Utilizando a técnica de indução do inchamento mitocondrial foram realizadas análises à seguir para verificar a influência do isoesteviol lactona sobre a elasticidade e permeabilidade mitocondrial. Como um dos objetivos deste trabalho é comparar os efeitos do isoesteviol lactona com os do isoesteviol, na seqüência foram realizadas análises utilizando a técnica de inchamento mitocondrial induzido por substrato na presença de isoesteviol lactona e induzido por valinomicina e potássio na presença de isoesteviol ou de isoesteviol lactona.

4.5 EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO ISOESTEVIOL SOBRE PARÂMETROS OSMÓTICOS DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

O transporte de cátions e ânions através da membrana mitocondrial interna produz alterações osmóticas, que induzem o fluxo de água, resultando em mudanças no volume da matriz (MUSTAFA *et al.*, 1966; GOOCH & PACKER, 1974). Este fenômeno osmótico de inchamento das mitocôndrias somente é possível devido à elasticidade da membrana mitocondrial interna, a qual está associada ao desdobramento das cristas desta membrana, permitindo, assim, um aumento considerável do volume da matriz, sem que ocorra o rompimento da organela (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Este evento é dependente do deslocamento vetorial de prótons (ΔpH) induzido pelo fluxo de elétrons pela cadeia transportadora

de elétrons, que ocorre na direção do oxigênio, pela oxidação de substratos, ou na direção contrária, impulsionado pela hidrólise de ATP (PARKER *et al.*, 1966; MUSTAFA *et al.*, 1966). Os ácidos fracos, como por exemplo o ácido acético, podem sofrer uma redistribuição entre os espaços intra e extra mitocondrial, devido ao gradiente de prótons gerado pela energia derivada do transporte de elétrons. Desta forma, o íon acetato distribui-se entre os espaços intra e extra mitocondrial de acordo com a diferença de pH entre os dois compartimentos, enquanto a forma protonada, por ser neutra, distribui-se igualmente entre os dois espaços (KLINGENBERG & ROTTENBERG, 1977). Como a forma protonada é a forma que atravessa a membrana, o trânsito de acetato sempre será acompanhado de um próton, e desta forma o pH do meio externo tende à acidificação ao mesmo tempo que aumenta a concentração de acetato no interior da mitocôndria. A pressão osmótica gerada por tal aumento é um fator determinante para o inchamento da organela.

Mudanças no volume da matriz mitocondrial provenientes de alterações osmóticas induzindo o fluxo de água, podem ser alcançadas pela entrada de cátions, como o Na^+ , como também de ânions permeantes na matriz mitocondrial, onde o inchamento dependerá do potencial elétrico gerado (MUSTAFA *et al.*, 1966). Dependendo das condições experimentais, o processo de entumescimento mitocondrial pode ocorrer com outros cátions permeáveis como Ca^{2+} ou K^+ mais valinomicina (TZAGOLOFF, 1982 ; NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

A turbidez da suspensão mitocondrial produz dispersão da luz. Esta dispersão ocorre em função da diferença do índice de refração entre o conteúdo da matriz mitocondrial e o meio. Eventos que promovam a diminuição desta diferença, como por exemplo o aumento do volume da matriz mitocondrial, devido à entrada de solutos permeáveis, resultam na diminuição da dispersão da luz, com o índice de refração da matriz aproximando-se ao do meio (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Desta forma, medidas da dispersão da luz por suspensões mitocondriais constituem

o fundamento da técnica que avalia o grau de inchamento mitocondrial. Deste modo, esta metodologia é bastante útil e fornece informações valiosas sobre o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, os processos envolvidos na fosforilação oxidativa, bem como sobre a elasticidade e permeabilidade da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

Em virtude dos resultados anteriores sugerirem que o isoesteviol e o isoesteviol lactona são capazes de interagir com a membrana mitocondrial interna, foram realizados experimentos de inchamento mitocondrial com a finalidade de verificar se o isoesteviol e o isoesteviol lactona podem comprometer as propriedades da membrana mitocondrial interna, isto é, sua elasticidade e permeabilidade. Para isto foram utilizadas preparações mitocondriais energizadas pela oxidação de substrato e não energizadas.

4.5.1 Efeitos do Isoesteviol e do Isoesteviol Lactona Sobre o inchamento de Mitocôndrias Energizadas

As medidas de inchamento mitocondrial foram realizadas conforme sugerido por MUSTAFA *et al.* (1966). O inchamento mitocondrial foi conduzido na presença de acetato de sódio e, como substrato oxidável foi utilizado glutamato de sódio.

Foram avaliados apenas os efeitos do isoesteviol lactona sobre o inchamento de mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato de sódio uma vez que para o isoesteviol já haviam sido realizados por KELMER-BRACHT *et al.* (1981 e 1984), e os resultados com o isoesteviol lactona estão representados na figura 23. O traçado A da figura 23 mostra um experimento típico de inchamento mitocondrial induzido por glutamato de sódio na ausência do composto lactônico. Nas condições do experimento, observou-se que a adição de glutamato de sódio

desencadeou um acentuado decréscimo na absorbância, caracterizando o inchamento mitocondrial. A adição de rotenona, por sua vez, inverte o processo de inchamento, indicando a dependência do transporte de elétrons através da NADH desidrogenase.

Os traçados de B a F da figura 23, representam os experimentos na presença de isoesteviol lactona. Em todos os traçados (B a F) o isoesteviol lactona foi incubado por 2 minutos com as preparações mitocondriais, em meio contendo acetato de sódio, antes de ser adicionado glutamato. Nestas condições, o isoesteviol lactona não promoveu nenhum grau de inchamento mitocondrial (figura 23 B a F).

Por outro lado, após a adição de glutamato, os traçados de B a F da figura 23 mostram que o isoesteviol lactona promoveu uma diminuição gradativa no inchamento, e que esta diminuição foi dependente da concentração de isoesteviol lactona utilizada. Pela análise do traçado F, por exemplo, na concentração de $0,75 \text{ mmol.l}^{-1}$ de isoesteviol lactona, inibiu quase que totalmente o inchamento, sendo este aproximadamente 10% do valor do controle. Estes resultados são compatíveis com a inibição do transporte de elétrons observada quando o glutamato é o substrato oxidável (figura 14).

A capacidade de contração da membrana mitocondrial, por sua vez, pode igualmente ser avaliada através da reversão do inchamento mitocondrial. Esta contração resulta da adição de inibidores da cadeia respiratória ou da $F_1 F_0$ ATPase. Nestes experimentos, a reversão do inchamento mitocondrial foi alcançada pela adição do inibidor de transporte de elétrons, a rotenona.

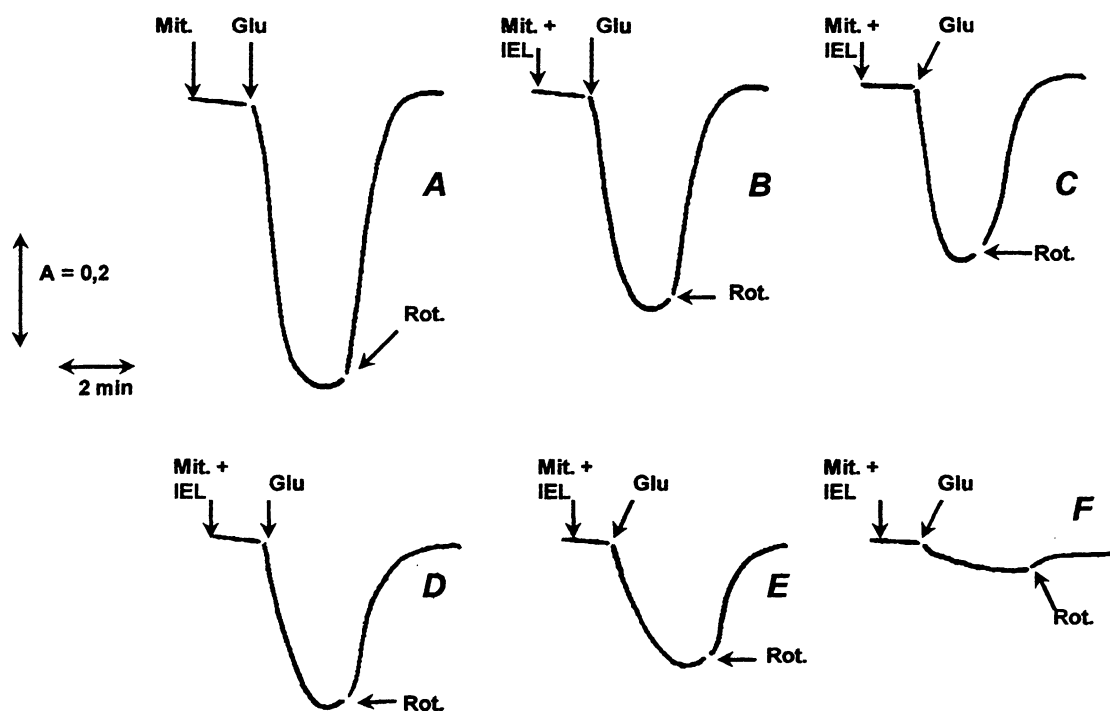


FIGURA 23 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS, NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO.

Sistema em volume final de 3 ml: sacarose 100 mmol.l^{-1} , Tris-HCl 30 mmol.l^{-1} , EDTA $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, acetato de sódio 50 mmol.l^{-1} e 3 mg de proteína mitocondrial, suplementado com glutamato de sódio 15 mmol.l^{-1} , e rotenona $4 \mu\text{mol.l}^{-1}$, adicionada ao sistema em momento adequado para observação da contração da organela. A mitocôndria foi inicialmente incubada por 2 minutos com a droga, antes da adição do glutamato. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes. Isoesteviol lactona estava presente nas concentrações: a. 0 ; b. 0,05 ; c. 0,1 ; d. 0,25 ; e. 0,5 e f. $0,75 \text{ mmol.l}^{-1}$. Mit. - mitocôndria; Glu. - glutamato de sódio; Rot. - rotenona.

Os traçados representativos dos experimentos de inchamento mostrados pela figura 23 de B à F, também mostram o grau de contração da organela quando adicionado rotenona. Como pode ser observado nos traçados B-F da figura 23 onde o isoesteviol lactona foi adicionado a contração ocorreu de forma equivalente ao inchamento correspondente, sugerindo que aparentemente apenas o inchamento mitocondrial é diminuído em velocidade e amplitude, enquanto que a contração não é afetada pela droga.

Os efeitos produzidos pelo isoesteviol lactona sobre o inchamento mitocondrial podem ser interpretados como conseqüência da ação do isoesteviol lactona sobre a respiração, reduzindo o fluxo de elétrons a nível do complexo I da cadeia respiratória, devido a ação local e/ou inibição da L-glutamato desidrogenase. Estes efeitos estariam inibindo o inchamento decorrente da energização por glutamato.

É portanto, importante salientar que as velocidades de oxidação do glutamato sendo influenciadas pelo efeito inibidor deste composto a nível da desidrogenase envolvida no metabolismo deste substrato (L-glutamato desidrogenase), se soma ao efeito já relatado sobre os complexos da cadeia respiratória.

Segundo KELMER-BRACHT (1981 e 1984), o isoesteviol promoveu uma drástica redução do inchamento, sendo de 50% na concentração de $0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$ (tabela 5). Com $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ de isoesteviol, estes autores verificaram que não havia mais inchamento após a adição de L-glutamato. Em comparação com os resultados do presente trabalho, o isoesteviol lactona reduziu o inchamento em 51% com $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, concentração aproximadamente 10 vezes maior que a de isoesteviol que promoveu quase o mesmo efeito. Esta comparação dos efeitos do isoesteviol sobre o inchamento energizado por glutamato de sódio, obtidos por KELMER-BRACHT (1981), com os observados neste trabalho com o isoesteviol lactona

utilizando os mesmos sistemas de reação, revela que ambas as substâncias afetam a permeabilidade da membrana mitocondrial a íons, porém, as inibições foram sempre maiores com o isoesteviol do que com o seu derivado, o isoesteviol lactona (tabela 4). A explicação para esta diferença de atividade das duas substâncias pode ser explicada pela presença do anel lactônico no isoesteviol lactona, de maneira que este anel estaria diminuindo os efeitos observados para o isoesteviol.

Portanto, a inibição do trabalho osmótico pelo isoesteviol lactona resulta redução do gradiente de prótons, e considerando que a entrada de Na^+ está na dependência do potencial formado, a diminuição nos parâmetros analisados poderia ser esperada.

TABELA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA E DO ISOESTEVIOL SOBRE O INCHAMENTO INDUZIDO POR GLUTAMATO DE SÓDIO EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

Conc. (mmol.l^{-1})	% de diminuição do inchamento	
	IEL	ISO*
0,05	23	50
0,1	25	80
0,2	**	100
0,25	37	**
0,5	51	**
0,75	91	**

*Resultados obtidos por KELMER-BRACHT (1981). **Não realizado.

Estes resultados reforçam a hipótese de que o anel lactônico presente na molécula do isoesteviol lactona diminui os efeitos tóxicos do isoesteviol, nos modelos experimentais utilizados neste trabalho, como verificado com os demais parâmetros analisados anteriormente.

Considerando os efeitos do IEL sobre a cadeia respiratória e desidrogenase do glutamato, análises do inchamento mitocondrial utilizando

valinomicina e K^+ em mitocôndrias desenergizadas, seriam importantes para se avaliar o efeito da droga em um sistema independente da cadeia de transporte de elétrons e da oxidação de substratos.

4.5.3 Efeito do Isoesteviol Lactona e do Isoesteviol sobre o Inchamento Mitochondrial Induzido por Valinomicina na Presença de Nitrato de Potássio

Mitocôndrias intactas são pouco permeáveis aos íons K^+ , sendo esta impermeabilidade importante para a função mitocondrial. De acordo com PRESSMAN (1976), esta restrição à penetração do K^+ se deve aos componentes fosfolipídicos da membrana que tornam energeticamente desfavorável a passagem deste cátion pela matriz mitocondrial. Entretanto, na presença do peptídeo macrocíclico, valinomicina, ocorre a formação do complexo valinomicina- K^+ onde a carga está concentrada no interior da molécula. A formação deste complexo lipossolúvel reduz a necessidade energética para o transporte, facilitando a transferência do K^+ através da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

Assim, a velocidade do transporte de K^+ é determinada pela rapidez com que o complexo se move na bicamada lípidica, sendo esta mobilidade dependente da fluidez da membrana (TZAGOLOFF, 1982). O complexo sofre dissociação e o K^+ é liberado na matriz mitocondrial. A velocidade de transporte de K^+ poderia ser um parâmetro indireto para a avaliação do grau de fluidez da membrana (PRESSMAN, 1976). Tanto a forma complexada, como a não complexada da valinomicina são capazes de transitar pela membrana mitocondrial (NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

Suspensão de mitocôndrias em meio isosmótico na presença de valinomicina é capaz de captar K^+ determinando um estado de inchamento mitocondrial, quando na presença de ânion permeante com o NO_3^- . A velocidade e amplitude deste inchamento indicam a velocidade do transporte de K^+ . Esta

propriedade foi utilizada neste trabalho como possível indicador do grau de fluidez da membrana mitocondrial interna, considerando que tanto o isoesteviol como o isoesteviol lactona, são substâncias lipossolúveis e podem interagir com componentes fosfolipídicos da membrana e provocar alteração em suas propriedades estruturais e físicas. Para eliminar uma eventual interferência do potencial eletroquímico de prótons, gerado pela oxidação de substratos endógenos, foram incluídos nos experimentos os inibidores da cadeia respiratória, rotenona e antimicina.

A figura 24 A e B mostra os efeitos do isoesteviol e do isoesteviol lactona, respectivamente, sobre a amplitude do inchamento induzido pela valinomicina, na presença de nitrato de potássio, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

Os resultados da figura 24 A mostram que o isoesteviol lactona promove uma redução de 21% na amplitude do inchamento com a concentração de 1 mmol.l^{-1} . Enquanto que os resultados da figura 24 B mostram que o isoesteviol promove uma redução de 47% na amplitude do inchamento em relação a mesma concentração. É importante salientar que estes efeitos foram dependentes da concentração empregada de ambos os compostos em estudo. Este resultado sugere que os dois compostos possam interferir no movimento do ionóforo através da membrana, dificultando o acesso dos íons K^+ à matriz mitocondrial. Como o movimento do ionóforo, por sua vez, depende da fluidez da membrana, é razoável propor que o isoesteviol e o isoesteviol lactona ao interferir no inchamento, dirigido pelo potencial de difusão de K^+ mais valinomicina, esteja afetando a fluidez desta membrana.

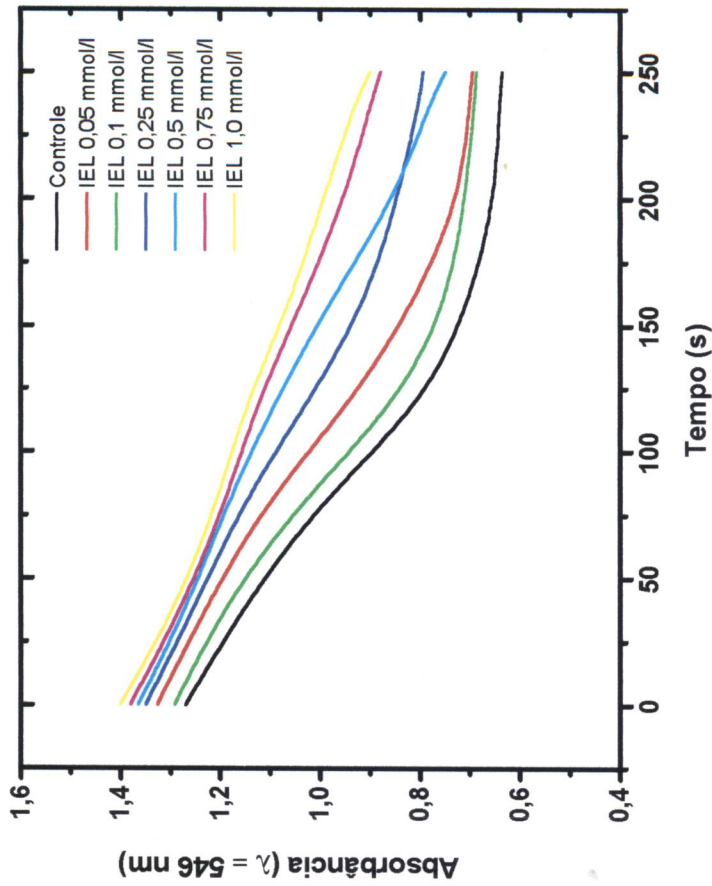
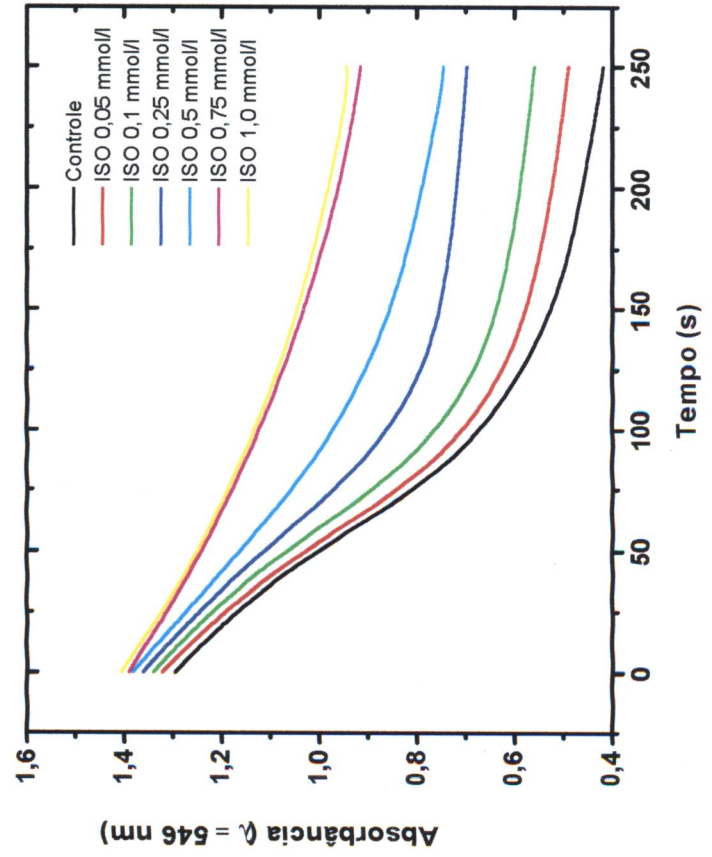


FIGURA 24: EFEITOS DO ISOESTEVIOL LACTONA (A) E ISOESTEVIOL (B) SOBRE O INCHAMENTO INDUZIDO POR VALINOMICINA, NA PRESENÇA DE NITRATO DE POTÁSSIO, EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO DESENERGIZADAS.

Sistema: KNO_3 135 mmol.l^{-1} , tampão HEPES 5 mmol.l^{-1} , pH 7,4, EDTA 0,1 mmol.l^{-1} , rotenona 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, antimicina A 2 $\mu\text{g/ml}$ e 1 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição da valinomicina 4 $\mu\text{g/ml}$. Os traçados representam o perfil de 3 experimentos independentes.

Estas alterações provocadas por ambos os compostos também reforçam a hipótese de que o anel lactônico na molécula de isoesteviol lactona promove uma redução nos efeitos tóxicos sobre parâmetros relacionados a fluidez de membrana.

Considerando os efeitos do isosteviol e do isosteviol lactona sobre mitocôndrias uma avaliação referente a função de sistemas celulares mais complexos seria pertinente. Optou-se por verificar a possibilidade do isoesteviol e do isoesteviol lactona afetarem a viabilidade e a produção de ânion superóxido e óxido nítrico de macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos.

4.6 EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM PMA

Os fenômenos inflamatórios derivam da liberação de muitas substâncias, que modulam a atividade do sistema imunológico, a produção de prostanóides, a atividade de enzimas produtoras de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, bem como enzimas digestivas. Naturalmente, substâncias que interfiram nas vias implicadas na função de macrófagos, são boas candidatas a exibirem ação antiinflamatória e/ou outros efeitos de utilidade farmacológica.

Considerando que algumas das atividades biológicas relacionadas aos cauranos e às lactonas sequiterpênicas é o efeito antiinflamatório (GHISALBERTI, 1997), uma avaliação dos efeitos sobre macrófagos é relevante, posto que estas células tem efeito central neste processo (JOHNSON e SUNG, 1987). Quando os macrófagos são estimulados à fagocitose, várias alterações bioquímicas ocorrem. As células exibem um acentuado estímulo no consumo de oxigênio, o qual é inibido por cianeto e portanto não está relacionado ao transporte mitocondrial de elétrons. Este

estímulo no consumo de oxigênio é conhecido como “Burst” respiratório e justamente por não ser relacionado às atividades mitocondriais, alguns autores consideram esta denominação equivocada (HOIDAL *et al.*, 1978). O “Burst” respiratório ocorre devido a estímulos celulares apropriados e entre outros agentes pode ser desencadeado por agentes químicos como o éster de forbol (PMA) (NATHAN *et al.*, 1979; HOIDAL *et al.*, 1978) e ocorre devido a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, que oxida o NADPH gerado no citosol, sendo os elétrons utilizados para reduzir o oxigênio a radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

Vale destacar que o PMA vem sendo utilizado como estímulo inflamatório cerca de vinte anos. Estudado pela primeira vez por HOIDAL *et al.* (1978), a influência de um agente carcinogênico, de ação em membrana, o éster de forbol 12-meristato 13-acetato (PMA), tornou-se um dos mais importantes modelos para ativação de macrófagos *in vitro*, de atividade comparável a outro conhecido agente indutor da ativação de macrófagos – zimozam (PHILIPS & HAMILTON, 1989; DIETER *et al.*, 1991). Este agente (PMA) foi utilizado neste trabalho como modelo para estimular a produção de ânion superóxido, que pode ser convenientemente avaliado acompanhando-se a reação extracelular do citocromo c como aceitador de elétrons (JOHNSTON *et al.*, 1978).

A figura 25 apresenta os efeitos do isoesteviol e do isoesteviol lactona sobre a produção de ânion superóxido. Verifica-se que na ausência de PMA os macrófagos não produzem ânion superóxido, como seria de se esperar. A adição de PMA usado como controle positivo da produção de ânion superóxido, induz o acentuado estímulo, que é resultante da ativação da NADPH oxidase. Nestes experimentos o isoesteviol e o isoesteviol lactona foram utilizados às concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ e apenas na concentração de 75 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de ambas as drogas foram encontrados efeitos estatisticamente significativos, onde se observou uma diminuição de 45% na produção de $O_2^{\cdot-}$ pelo isoesteviol e de 20% pelo isoesteviol

lactona, em relação ao controle com PMA.

Os efeitos do isoesteviol e do isoesteviol lactona sobre a produção de $O_2^{\bullet -}$ poderiam ser decorrentes da perda da viabilidade celular, causada pelo tratamento com os compostos. Com a finalidade de verificar tal possibilidade, foram desenvolvidos experimentos de viabilidade celular em condições de incubação similares às aquelas de determinação do ânion superóxido. Os resultados de tais experimentos, estão mostrados na figura 26, onde se verifica a ausência de efeitos significativos sobre a viabilidade celular para ambos, isoesteviol e isoesteviol lactona, nas condições do experimento.

Várias substâncias são conhecidas como inibidores da produção de ânion superóxido por macrófagos estimulados com PMA. Por exemplo, pode-se citar o ambroxol, substância de utilidade em processos asmáticos, que exercem efeitos inibidores em concentrações situadas entre 18 e 26 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (SUZUKI *et al.*, 1998). Outra substância bastante conhecida é a aspirina que quando pré-incubada com as células, exibe também efeito de diminuir a produção do radical livre, mediante a determinação espectrofotométrica do citocromo *c* reduzido (SAINI *et al.*, 1998).

Em relação aos cauranos, não há relatos sobre os efeitos quanto à produção de ânion superóxido, posto que os dados disponíveis de atividade antiinflamatória são provenientes de experimentos *in vivo*, isto é, inibição da formação de edema na pata de rato induzida por carragenina (GHISALBERTI, 1997).

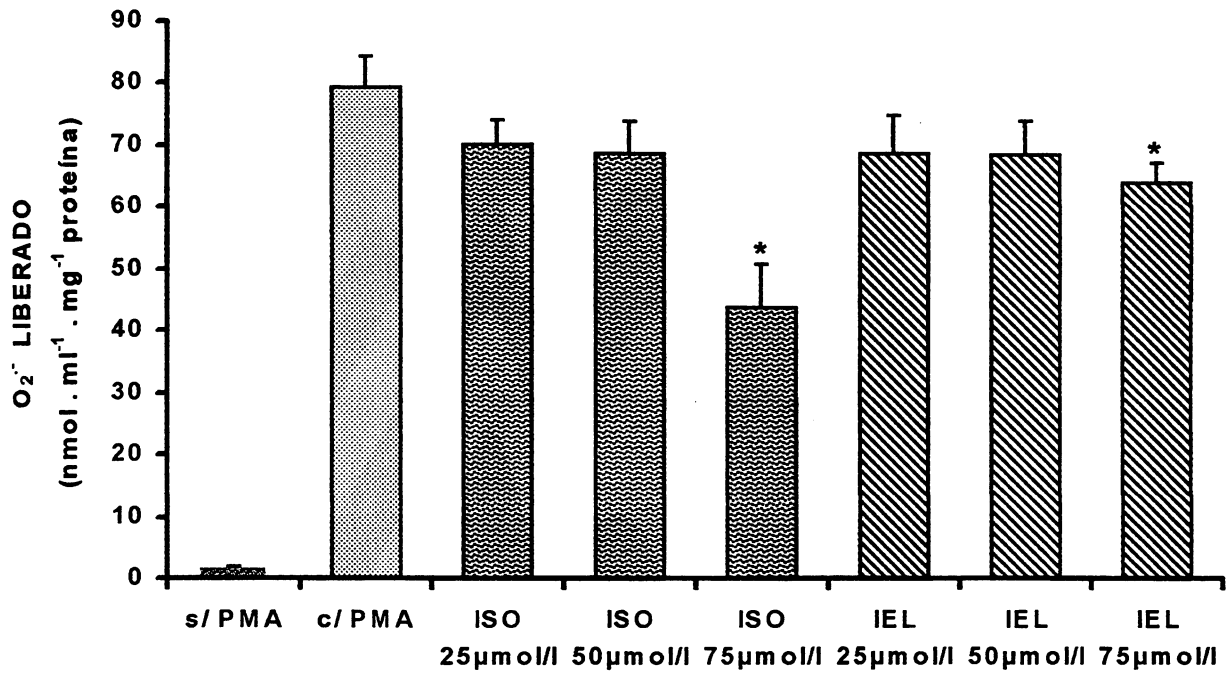


FIGURA 25 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM PMA "IN VITRO".

Sistema: 5×10^5 CEP / poço foram incubados por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂, com meio de reação contendo citocromo c $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$ em HBSS na ausência ou na presença de PMA (1 μg/ml) e Isoesteviol e Isoesteviol Lactona na presença de PMA. Os controles foram realizados com células tratadas com PMA ($79,44 \pm 4,89$ ânion superóxido liberado em $\text{nmol.ml}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína) e sem PMA. Os resultados são a média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes ($p < 0,05$). *Valores estatisticamente significativos.

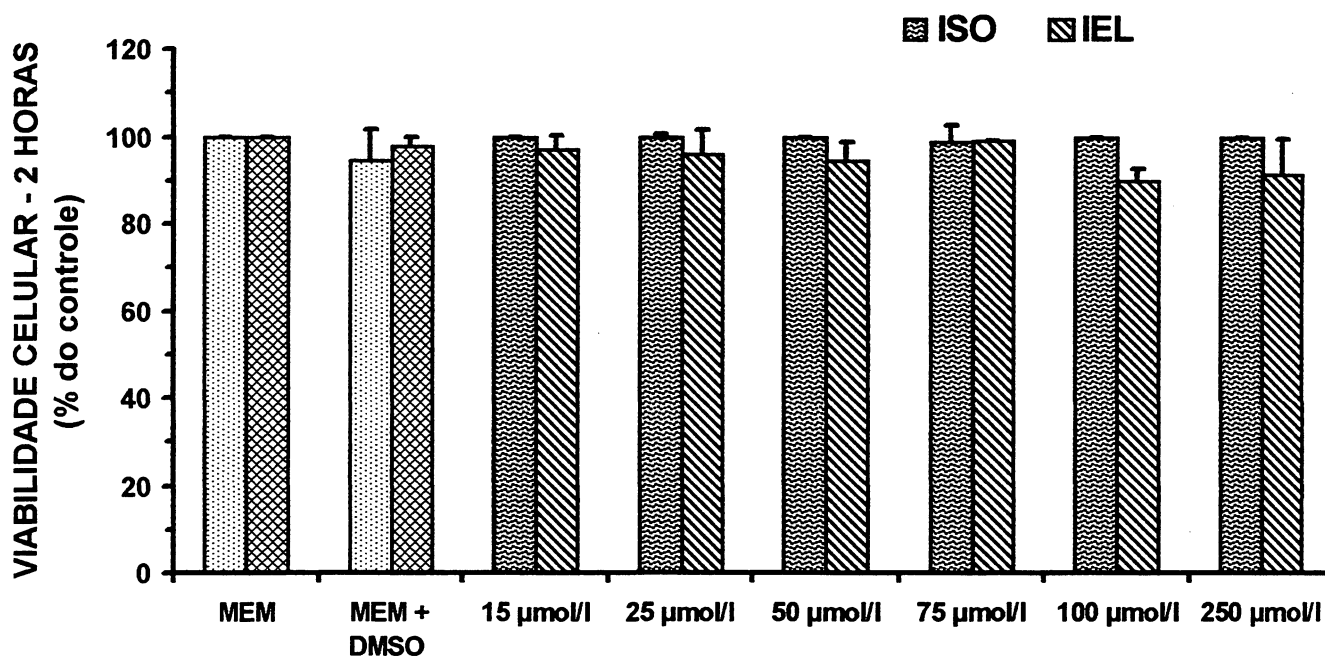


FIGURA 26 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES "IN VITRO", APÓS INCUBAÇÃO DE 2 HORAS.

Sistema: 2×10^5 CEP / poço foram incubadas na presença de isoesteviol e isoesteviol lactona nas concentrações indicadas diluídas em meio MEM. Após 2 horas foi removido o meio e adicionado MTT 500 µg/mL em HBSS e incubadas por mais 3 horas. Após este tempo o excesso de MTT foi removido e adicionado 200 µL de DMSO para dissolver o formazan formado. A leitura foi realizada em 550 nm em espectrofotômetro para microplaca da Bio Rad Benchmarck. Os resultados são média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes ($p < 0,05$).

4.7 EFEITOS DO ISOESTEVIOL E ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS

Um outro parâmetro para medir a ativação de macrófagos é a sua capacidade de produzir óxido nítrico (NO^{*}) quando convenientemente estimulado.

As evidências experimentais dos últimos anos indicam que o óxido nítrico é formado a partir do grupamento guanidino da L-arginina. Esta reação é catalisada por uma enzima citosólica, a óxido nítrico sintase, que para a sua ação requer a presença de um cofator essencial, o NADPH. Esta enzima por sua vez tem duas isoformas uma constitutiva, dependente de cálcio e outra induzível, que é expressa depois da estimulação com interleucina-1, LPS e fator de necrose tumoral (SALVEMINI *et al.*, 1993). Sendo uma molécula altamente reativa, o óxido nítrico participa dos efeitos citotóxicos contra microorganismos e outros patógenos intracelulares, bem como células tumorais (STUEHR e MARLETTA, 1985). Como o óxido nítrico é rapidamente convertido a nitrato e nitrito na presença de oxigênio, a atividade secretora dos macrófagos quanto à produção de óxido nítrico pode ser estimada pela determinação das concentrações de nitrato e nitrito pela reação Griess (STUEHR e MARLETTA, 1985).

Está bem estabelecido através de análises de "Northern e Western blot", que a produção de óxido nítrico em resposta a lipopolissacarídeo/interferon- γ ocorre devido ao aumento da expressão do RNAm de proteína referentes a uma forma induzível e citosólica de óxido nítrico sintase e é dependente da presença de L-arginina e bloqueada por inibidores específicos da enzima.

Para selecionar as concentrações de isoesteviol e de isoesteviol lactona que não afetariam a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos, foram realizados inicialmente experimentos buscando avaliar quais concentrações poderiam ser utilizadas nos experimentos de produção de NO^{*}, desta maneira esta análise foi realizada com 48 horas de incubação, ou seja, o mesmo tempo de

incubação utilizado para o experimento de produção de NO[•]. A figura 27 mostra que os macrófagos foram incubados com concentrações de isoesteviol e de isoesteviol lactona que variaram de 15 a 75 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, e com concentrações de DMSO de 25 a 75 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (controles do solvente). No entanto, até a concentração de 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, tanto o isoesteviol quanto o isoesteviol lactona não afetaram de maneira estatisticamente significativa a viabilidade das células. Porém, as concentrações de 50 e 75 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ causaram efeitos sobre as células levando a perda de viabilidade.

Os controles realizados com o solvente DMSO nesta condição de incubação (48 horas), mostraram que na concentração de 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ não existe efeito sobre a viabilidade, porém com uma concentração maior (75 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), a viabilidade foi afetada em 30% em relação ao controle. Concentrações de DMSO menores que 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ também foram testadas, e mostraram não afetar a viabilidade das células, como era de se esperar. Portanto os efeitos das drogas e do solvente utilizado sobre a viabilidade, inviabilizam o uso de concentrações maiores que 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ para a avaliação da produção de NO[•].

Os efeitos do isoesteviol e do isoeteviol lactona sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos, estão mostrados na figura 28. Nos resultados destes experimentos observou-se que macrófagos não tratados com LPS/interferon- γ apresentam uma certa produção de NO[•], da ordem de 475 $\text{nmol.ml}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína. A adição de LPS/interferon- γ , no entanto, promoveu o estímulo esperado. A incubação dos macrófagos com isoesteviol e isoesteviol lactona ao meio na ausência de LPS/interferon- γ , nas concentrações de 15 e 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, não promove efeito estimulador, estatisticamente significativo, sobre a NAD(P)H oxidase, ou seja, sobre a via de produção de óxido nítrico, em relação ao controle positivo (com LPS/interferon- γ). Da mesma forma observa-se que o solvente utilizado, DMSO, na concentração de 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, não promoveu efeito sobre este parâmetro, levando a conclusão que os compostos estudados não atuam estimulando a via de produção de NO[•].

Com a finalidade de verificar a possibilidade destes compostos terem um efeito semelhante ao LPS, ou seja, de co-sinal que induziria a produção de níveis significativos da NAD(P)H oxidase quando associado ao IFN- γ , os macrófagos foram incubados com concentrações de isoesteviol, e isoesteviol lactona, na presença apenas de INF- γ . Como pode ser observado na figura 29, os testes com as drogas nas concentrações de 15 e 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ incubadas na presença de IFN- γ não promoveram efeito semelhante ao LPS de maneira estatisticamente significativa quando comparada ao controle positivo (macrófagos + IFN- γ), o que se observa é somente a diferença de estímulo na via de produção de NO $^{\circ}$ que o LPS promove em relação ao estímulo pelo IFN- γ .

Sendo assim, podemos concluir que tanto o isoesteviol quanto o isoesteviol lactona não afetam a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ , descartando uma possibilidade de atividade farmacológica, como a atividade anti-tumoral destes compostos, através deste mecanismo.

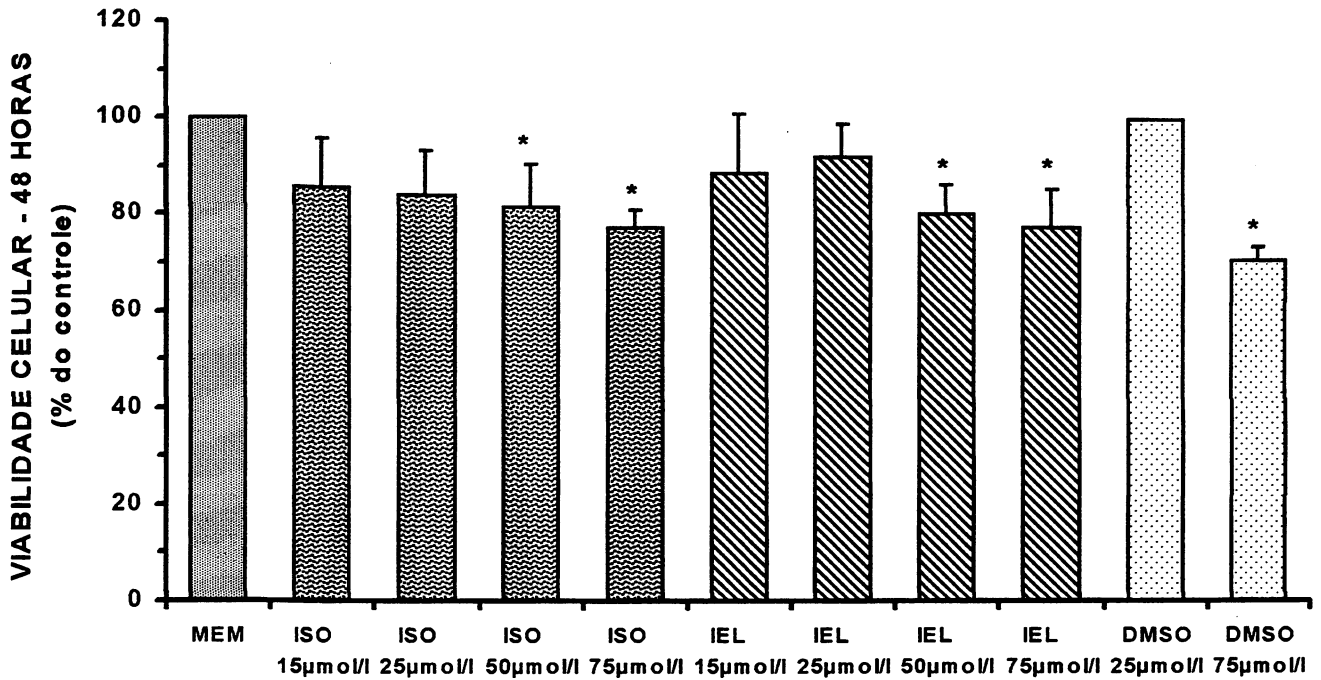


FIGURA 27 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL (ISO) E DO ISOESTEVIOL LACTONA (IEL) SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS "IN VITRO", APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO.

Sistema: 2×10^5 CEP / poço foram incubadas na presença de isoesteviol e isoesteviol lactona nas concentrações indicadas diluídas em meio MEM. Após 48 horas foi removida o meio e adicionado MTT 500 µg/mL em HBSS e incubadas por mais 3 horas. Após este tempo o excesso de MTT foi removido e foram adicionados 200 µL de DMSO para dissolver o formazan formado. A leitura foi realizada em 550 nm. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes.

* Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

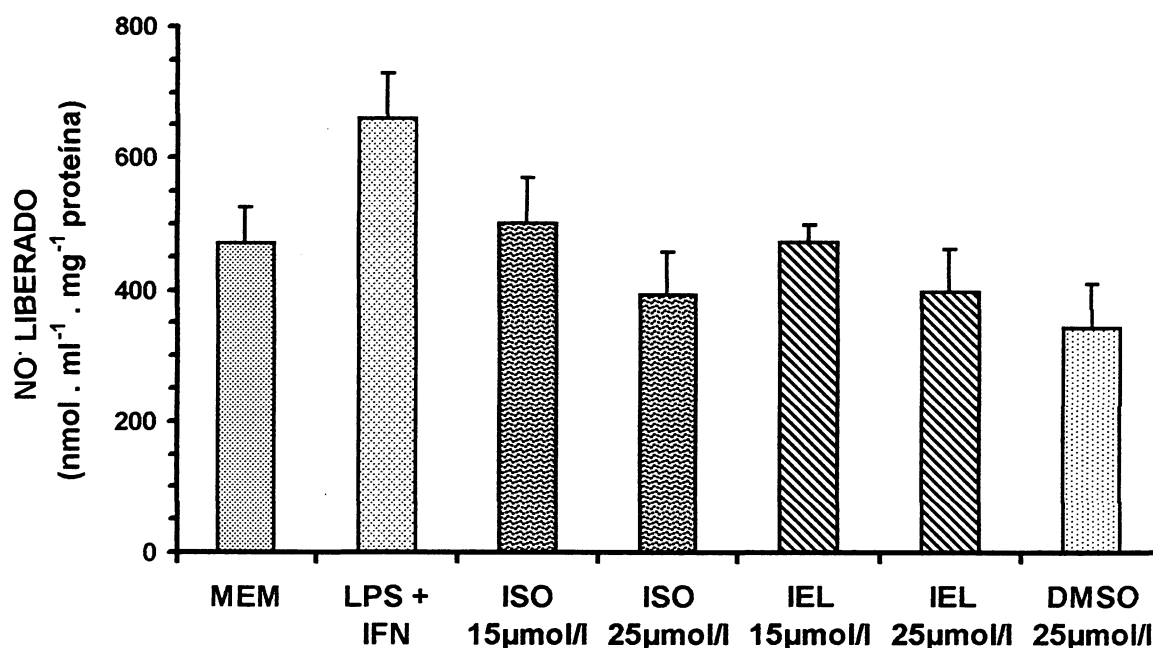


FIGURA 28 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS "IN VITRO".

Sistema: 2×10^5 CEP / poço foram incubados por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após foi adicionado meio de reação, Isoesteviol e Isoesteviol Lactona nas concentrações indicadas e incubado por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Os controles foram realizados com células tratadas com LPS + $\text{IFN-}\gamma$ (controle +) e apenas meio de reação (controle -). Controle com o solvente DMSO também foi realizado, estando este presente na mesma concentração usada na maior dose das drogas utilizadas ($25 \mu\text{mol.l}^{-1}$). A dosagem de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ foi realizada utilizando-se o reagente de Griess e a leitura em espectrofotômetro para microplaca da Bio Rad Benchmarck, utilizando filtro de 550 nm. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes ($p < 0,05$).

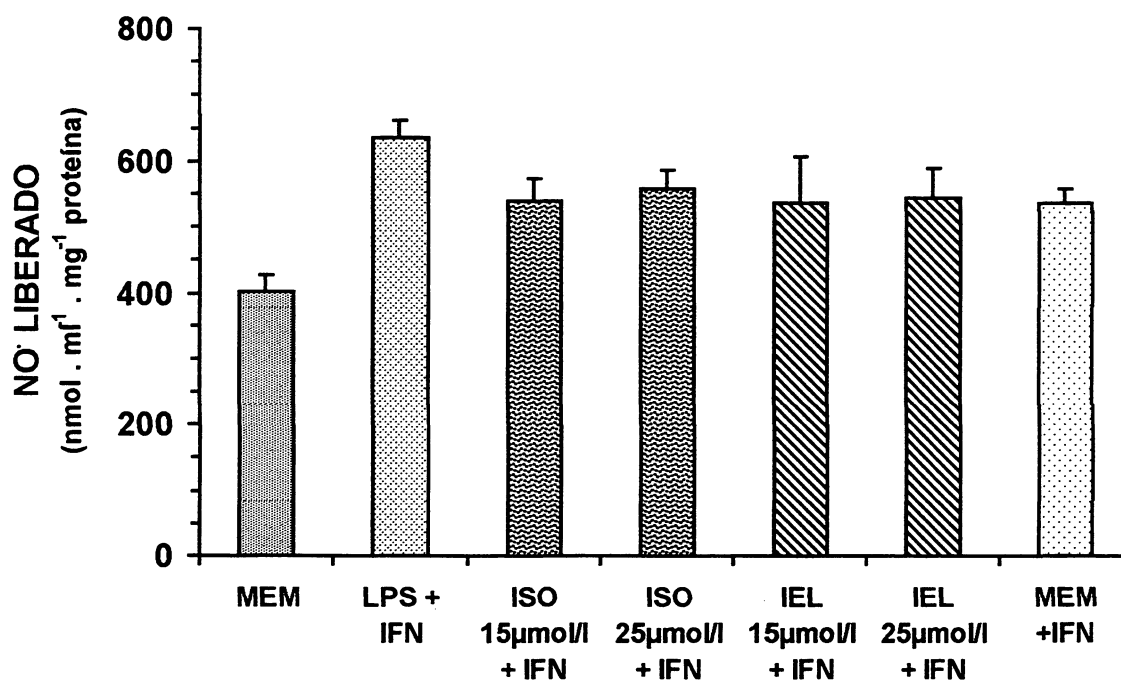


FIGURA 29 - EFEITOS DO ISOESTEVIOL E DO ISOESTEVIOL LACTONA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES ESTIMULADOS COM IFN- γ "IN VITRO".

Sistema: 2×10^5 CEP/ poço foram incubados por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂. Após foi adicionado meio de reação, Isoesteviol e Isoesteviol Lactona nas concentrações indicadas e incubado por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A dosagem foi realizada). A dosagem de NO₂⁻/NO₃⁻ foi realizada utilizando-se o reagente de Griess e a leitura em espectrofotômetro para microplaca da Bio Rad Benchmarck, utilizando filtro de 550 nm. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO FINAL

O isoesteviol, obtido através da hidrólise ácida do esteviosídeo, segundo KELMER-BRACHT *et al.* (1985a), promove uma diminuição do consumo de oxigênio na presença de desacoplador (2,4-dinitrofenol) da ordem de 50% com 0,5 mmol.l⁻¹ de isoesteviol quando utilizando succinato como substrato e com 0,4 mmol.l⁻¹ de isoesteviol quando utilizando glutamato como substrato. Sem desacoplador no meio de incubação, no entanto, uma ativação do consumo de oxigênio ocorre em concentrações baixas (0,25 mmol.l⁻¹), e somente em concentrações maiores (1 mmol.l⁻¹), uma inibição em relação ao controle foi observada por estes autores. Em relação as atividades de enzimas relacionadas a cadeia respiratória, estas também foram afetadas pelo isoesteviol. Em virtude destes efeitos, KELMER-BRACHT *et al.* (1985a) classificaram o isoesteviol como desacoplador, verificado pela diminuição na relação ADP/O e estímulo da atividade ATPásica em baixas concentrações, em mitocôndrias intactas. Segundo estes autores, dentre os compostos (derivados do esteviosídeo), o isoesteviol é o mais potente desacoplador.

O isoesteviol lactona por sua vez, promoveu uma diminuição da velocidade respiratória no estado III, porém inibiu atividades enzimáticas relacionadas com a cadeia respiratória (tabela 2); estimulou a velocidade respiratória no estado IV e diminuiu a relação ADP/O, porém estas inibições foram menores do que as obtidas com o isoesteviol (tabela 3). Em relação a atividade ATPásica, o isoesteviol lactona promoveu a inibição desta atividade em mitocôndrias intactas e rompidas. Segundo TERADA (1981) desacopladores clássicos estimulam a atividade ATPásica, portanto este efeito de inibição provocado pelo isoesteviol lactona pode estar relacionado um outro tipo de desocoplamento, conhecido como desocoplamento inibitório (MORELAND, 1994). A inibição da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas pode estar acontecendo a nível da enzima e/ou do translocador de nucleotídeos de adenina, porém, quando se utilizou mitocôndrias desacopladas com FCCP, o isoesteviol lactona não exerceu efeito estatisticamente significativo. Este resultado indica que o isoesteviol lactona provavelmente não estaria afetando o translocador

de nucleotídeos de adenina. O isoesteviol, porém, segundo KELMER-BRACHT *et al.* (1985a) inibe o translocador de ADP^{-4}/ATP^{-3} .

Tanto o isoesteviol quanto o isoesteviol lactona inibem a atividade da L-glutamato desidrogenase (tabela 3). Estes resultados justificam juntamente com as inibições enzimáticas observadas no complexo I as maiores percentagens de inibição do consumo de oxigênio observadas quando, na presença do isoesteviol lactona, o glutamato foi utilizado como substrato em comparação com os resultados obtidos com succinato.

Além dos efeitos citados anteriormente, as análises de inchamento mitocondrial mostraram que o isoesteviol lactona inibe este parâmetro como uma consequência de seu efeito sobre a geração do potencial eletroquímico de prótons. Aparentemente, a elasticidade da membrana não é afetada pela droga.

A avaliação dos potenciais de oxidação-redução do isoesteviol e do isoesteviol lactona neste trabalho, revelaram que estes compostos não se auto-oxidam, pelo menos na faixa de potenciais encontrados na cadeia respiratória e nas condições experimentais utilizadas. Desta forma eles não seriam capazes de desviar elétrons da cadeia respiratória de forma direta comprometendo o consumo de oxigênio e a síntese de ATP.

Quanto ao inchamento na presença do ionóforo valinomicina e KNO_3 , tanto o isoesteviol como o isoesteviol lactona apresentaram o mesmo perfil de inibição da amplitude do inchamento, sendo, no entanto, este efeito mais intenso para o isoesteviol do que para seu derivado lactônico. Este dado vem se somar aos outros já citados, e sugere que estes compostos podem afetar a fluidez da membrana mitocondrial interna, no entanto com intensidades diferentes. Esta diferença, como colocado para as outras situações experimentais, aponta para a adição do anel lactônico como o atenuador dos efeitos do isoesteviol. A explicação para a diferença de efeito pode ser referida em relação a maior distribuição de cargas negativas (maior eletronegatividade) no anel lactônico (anel α) do isoesteviol lactona, fazendo

com este composto se acomode mais na superfície do que no interior hidrofóbico da bicamada lipídica da mitocôndria, causando menores efeitos sobre o metabolismo energético do que o isoesteviol, que possui uma densidade eletrônica menor na região do anel *d*, e portanto pode estar se acomodando mais no interior hidrofóbico da membrana lipídica mitocondrial e tornando-a mais desorganizada. Por outro lado, esta explicação não serviria para a inibição da L-glutamato desidrogenase, por que esta atividade enzimática foi inibida de maneira semelhante com ambos os compostos.

No contexto celular, a avaliação dos possíveis efeitos do isoesteviol e do isoesteviol lactona sobre a via de produção de ânion superóxido em macrófagos peritoneais ativados com PMA, mostrou uma inibição parcial na via de produção desta espécie reativa maior com o isoesteviol do que o isoesteviol lactona, no entanto este efeito foi observado apenas na concentração de $75 \mu\text{mol.l}^{-1}$, para ambos os compostos. A produção de óxido nítrico por macrófagos ativados não foi alterada por nenhum dos dois compostos nas concentrações testadas. Desta forma pode-se verificar que a alteração na estrutura do isoesteviol também é capaz de afetar seus efeitos sobre a produção de superóxido importantes para atividades microbicidas e bactericidas.

Finalmente pode-se concluir que o isoesteviol lactona apresenta efeitos semelhantes ao isoesteviol, tanto no contexto do metabolismo energético como na produção de radicais por macrófagos, porém todos os efeitos observados foram sempre menores para o isoesteviol lactona, exceto o observado na análise da atividade da NADH desidrogenase, na qual a inibição foi da ordem de 17% com o isoesteviol lactona, podendo-se assim afirmar que a modificação química deste composto reduz os efeitos tóxicos do isoesteviol.

6 CONCLUSÕES

Os compostos utilizados neste trabalho afetam vários parâmetros do metabolismo de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Sobre os efeitos observados com o isoesteviol lactona pode-se concluir que este composto:

- a) inibe da velocidade respiratória no estado III, estimula o estado IV e reduz o controle respiratório, durante a oxidação do L-glutamato e do succinato;
- b) reduz o índice de fosforilação oxidativa, determinada pela relação ADP/O;
- c) inibe parcialmente a atividade ATPásica de mitocôndrias intactas e rompidas;
- d) inibe as atividades enzimáticas da cadeia respiratória nos complexos I, II, III e IV.
- e) não é eletroativo na faixa de potencial observada na cadeia respiratória;
- f) Pode estar afetando a fluidez da membrana mitocondrial;

Sobre os efeitos observados neste trabalho com o isoesteviol pode-se concluir que ele:

- g) não é eletroativo na faixa de potencial observada na cadeia respiratória;
- h) pode estar afetando a fluidez da membrana mitocondrial.

Quando se faz as análises comparativas entre os efeitos observados com os dois compostos verifica-se que os efeitos tóxicos de modo geral são mais acentuados com o isoesteviol do que com o seu derivado lactônico.

Utilizando macrófagos como modelo experimental pode-se concluir que:

- j) o isoesteviol e o isoesteviol lactona inibem a produção de ânion superóxido e esta inibição foi maior com o isoesteviol do que com isoesteviol lactona, indicando que estudos objetivando avaliar a atividade antiinflamatória destes compostos seriam importantes;

h) ambos os compostos não influenciaram a via de produção de radicais do nitrogênio nas doses testadas, descartando-se a possibilidade de atividade antitumoral destes compostos através deste mecanismo.

Sendo assim pode-se concluir finalmente que a adição do anel lactônico na molécula do isoesteviol promoveu um importante efeito atenuador da toxicidade deste composto.

ais

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. O. Macrophages. In: Colowick S.P. and Kaplan, N.O. *Methods Enzymol.*, Bethesda v. LVIII, p 494-506, 1979.

ALVES, T. M.; CHAVES, P. P.; SANTOS, L. M.; NAGEM, T. J.; MURTA, S. M.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.*, v. 61, p. 85-87, 1995.

AUSTYN, J. M. e WOOD, K. J. *Principles of Cellular and Molecular Immunology*. New York: Oxford University Press, 1995.

AVENT, A. G.; HANSON, J. R.; OLIVEIRA, B. H.. Hidrolysis of the diterpenoid glycoside, stevioside. *Phytochemistry*, 29, p. 2712-2715, 1990.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMLEY, P. M. Isoprenoid Metabolism. In: DEY, P. M. e HARBORNE, J. B. *Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1997. P. 417-437.

BRIEDEL, M.; and LAVIEILLE, R.. Le principe à saveur sucrée du kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, v.13, p. 636-655, 1931.

CALHOUN, M. W.; THOMAS, J. W.; GENNIS, R. B. The cytochrome oxidase superfamily as redox-driven proton pumps. *Trends Biochem. Sci.*, v. 19, p. 325, 1994.

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

CHEN, K.; SHI, Q. KASHIWADA, Y. ZHANG, D. C., HU, C. Q.; JIN, J. Q.; NOZAKI, H.; KILKUSKIE, R. E.; TRAMONTANO, E. e CHENG, Y. C. Salaspermic acid, an anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*, and the structure-activity correlation with its related compounds. *J. Nat. Prod.*, v. 55, nº 3, p. 340-346, 1992.

CHEN, K.; SHI, Q.; FUJIOKA, T.; NAKANO, T.; HU, C. Q.; JIN, J. Q.; KILKUSKIE, R. E. e LEE, K. H. Neotripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*: isolation and structural elucidation. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 3, nº 10, p. 1345-1348, 1995.

CONSTANTIN, J.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; FERRARESI-FILHO, O.; KELMER-BRACHT, A. M.; BRACHT, A. Sensitivity of ketogenesis and citric acid cycle to stevioside inhibition of palmitate transport across the cell membrane. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 24, p. 767, 1991.

COXON, M. J.; NORMAN, R. O. C. *Principles of organic synthesis*. Londres: ed. Blackie Academic & Professional; 1993. Pg. 445-446.

DEVLIN, T. M. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. New York: ed. Wiley-Liss, 1997. Pg. 246-264.

DIETER, P.; SPECKING, A. S. e FITZKE, E.. Activation of phospholipase C is not correlated to the formation of prostaglandins and superoxide in cultured rat liver macrophages, *Cell Signal*, v. 3, n. 1, p. 65-71, 1991;

DI ROSA, M.; RADOMSKI, M.; CARNUCCIO, R. e MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v. 172, p. 1246-1252, 1990.

DING, J.; BADWEY, J. A. Effects of Antagonists of Protein Phosphatases on Superoxide Release by Neutrophils. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, nº 9, p. 6442-6448, 1992.

DOLDER, F.; LICHTI, H; MOSETTIG, E. e QUITT, P. The structure and stereochemistry of steviol. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 82, p. 246-247, 1960.

ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. In: *Methods Enzymology*, New York, v. 10, p. 41-47, 1967.

FOSKET, D. E. *Plant Growth and Development: A Molecular Approach*. New York: Academic Press, 1994.

FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutases. In: SNELL, E. E.; BOYER, P. D.; MEISTER, A.; RICHARDSON, C. C. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 44, p. 147-159, 1975.

FUJITA, E.; NODE, M.; Diterpenoids of *Rabdosia* species, *Org. Nat. Prod.*, v. 46, nº 77, p. 145-149, 1984.

FURNISS, B. S., HANNAFORD, A. J., SMITH, P. W. G., TATCHELL, A. R. – VOGEL'S, *Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5ª edição. Longman Scientific & Technical, 1989.

GALLEGOS, A. J. The zoapatle VI, Revisited. *Contraception*, Londres, v. 31, p. 487-497, 1985.

GHISALBERTI, E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia – The Biological*, Milano, v. 23, nº 4, p. 303-325, 1997.

GIORDANO, O. S.; GUERREIRO, E.; PESTCHANKER, M. J. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Nat. Prod.*, v. 53, nº 4, p. 803-809, 1990.

GOOCH, V. D.; PACKER, L. Oscillatory systems in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 346, p. 245-260, 1974.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGONSKI, P. L.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. e TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, v. 126, p. 131-138, 1982.

HANS-WALTER, H. Isoprenoids. In: HANS-WALTER, H. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. New York: Oxford University Press, 1997. P. 360-376.

HANSON, R. L.; LARDY, H. A. e KUPCHAN, S. M. Inhibition of phosphofructokinase by quinone methide and alpha-methylene lactone tumor inhibitors. *Science*, Washington, v. 168, p. 378-380, 1970.

HANSON, J. R.. The biosynthesis of the diterpenes. New York: Edit. W. Herz, 1971.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 54, p. 1015-1069, 1985.

HERSHENHORN, J.; ZOHAR, M.; CRAMMER, B.; ZIV, Z.; WEINSTEIN, V.; KLEIFELD, Y.; LAVAN, Y. e IKAN, R. Plant-growth regulators derived from the sweetener stevioside. *Plant Growth Regulation*, v. 23, p. 173-178, 1997.

HIBBS JR., J. B. ; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage Cytotoxicity: Role for L-Arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science*, v. 235, p.473-476, 1987.

HODNICK, W. F.; MILOSAVLJEVIC, E. B.; NELSON, J. H.; PARDINI, R. S.. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 37, nº 13, p. 2607-2611, 1988.

HOIDAL, J. R.; REPINE, J.E.; BEALL, G. D.; RASP, F. L. J. R. e WHITE, J. G.. The effect of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of human alveolar macrophages, *Am. J. Pathol*, v. 91, n. 3, p. 469-82, 1978;

ISHII, E. L. and BRACHT, A.. *Stevia rebaudiana* natural products and liver metabolism. I. Effect of steviol and stevioside on glycolysis and gluconeogenesis in

perfused rat liver. Abstracts of the XIII Annual Meeting of the Brazilian Biochemical Society. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v. 27, nº 2, p. 170, 1984.

ISHII, E. L.; SCHWAB, A. J.; BRACHT, A. Inhibition of Monosaccharide Transport in the Intact Rat Liver by Stevioside. *Biochem. Pharmacol.*, v. 36, nº 9, p. 1417-1433, 1987a.

ISHII, E. L.; BRACHT, A. Glucose Release by the Liver Under Conditions of Reduced Activity of Glucose 6-Phosphatase. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 20, p. 837-843, 1987b.

JOHNSON, W. J. e SUNG, C. P.. Rat macrophage treatment with lipopolysaccharide leads to a reduction in respiratory burst product secretion and a decrease in NADPH oxidase affinity, *Cell Immunol.*, v. 108, n. 1, p. 109-19, 1987;

JOHNSTON, R. B.; GODZIK, C.A. and COHN, Z.A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.*, v.148, p.115-127, 1978.

KANORVSKY, M.L. and BADWEY, J.A . Respiratory burst during phagocytosis: an overview . In: *Methods Enzymology*, New York, v. 132, p. 353-364, 1986.

KELMER-BRACHT, A. M. K.; ALVAREZ, M.; BRACHT, A. Efeito de produtos naturais da *Stevia rebaudiana* sobre mitocôndrias isoladas. *Revista Unimar*, vol. 6, nº1, p. 99-121, 1984.

KELMER-BRACHT, A. M. *Efeitos de Produtos da Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni sobre mitocôndrias de fígado de rato*. Curitiba, 1981, 104 páginas. Dissertação de Mestrado em Bioquímica – UFPR.

KELMER-BRACHT, A. M.; ALVAREZ, M.; BRACHT, A. Effects of *Stevia Rebaudiana* Natural Products on Rat Liver Mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 34, nº 6, p. 873-882, 1985a.

KELMER-BRACHT, A. M.; KEMMELMEIER, F. S.; ISHII, E. L.; ALVAREZ, M. e BRACHT, A. Effect of *Stevia rebaudiana* Natural Products on Cellular and Sub-cellular Metabolism. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v. 3, nº 28, 1985b.

KELMER-BRACHT, A. M.; ALVAREZ, M.; YAMAMOTO, N. S.; KEMMELMEIER, F. S. e BRACHT, A. Hypoglycemic effect of *Stevia rebaudiana*: inhibition of gluconeogenesis in isolated renal tubules. Proceedings of the 18th Congress of the Sociedade Brasileira de Fisiologia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 16, nº 5-6, p. 522, 1983.

KE CHEN, QIAN SHI, FUJIOKA, T., Anti-aids agents, tripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterigium wilfordii* isolation and structural elucidation. *J. Nat. Prod.*, vol. 55, nº 1, p. 88-92, 1992.

KLEBANOFF, S.J. *Oxygen metabolites from phagocytes*. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press, p. 541-588, 1992.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. Cyclic Voltametry. *J. Chem. Educ.*, v. 60, nº 9, p. 702-706, 1983.

KLINGENBERG, M.; ROTTENBERG, H. Relation between the Gradient of the ATP/ADP Ratio and the Membrane Potential across the Mitochondrial Membrane. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v. 73, p. 125-130, 1977.

KOHDA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; MURAKAMI, K. e TANAKA, O. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, v. 15, p. 981-983, 1976.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Dois S. A.; 1982. Pg. 3.

KUBOTA, T.; KUBO, L.; The two bitter principles of *Isodon shikokianus* Kudo. *Short Commun.*, v. 42, nº 6, p. 1778, 1969.

LOURENÇO, A. M. *Problemas em Biossíntese de Produtos Naturais*. Disponível em: <http://www.dq.fct.unl.pt/qoa/biossin/2i.html>> Acesso em: 20 out. 1999.

LOWRY, O. H.; RESENBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, T.; VARGAS, D.; FRANZBLAU, S. G. e FISCHER, N. H. Diterpenes from *Solidago rugosa*. *Phytochemistry*, v. 38, p. 451-456, 1995.

MABBOTT, G. A. An Introduction to Cyclic Voltametry. *J. Chem Educ.*, v. 60, nº 9, p. 697-702, 1983.

MACCARRONE, M.; PUTTI, S.; AGRÒ, A. F. Nitric oxide donors activate the cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. *FEBS Letters*, v. 410, p. 470-476, 1997.

MARGOLIASH, E. The chromatographic behavior of cytochrome c on cation exchangers. *Biochem. J.*, Colchester, v. 56, p. 535-543, 1954.

MASON, T. L.; POYTON, R. O.; WHARTON, D. C.; SCHATZ, G. Cytochrome C oxidase from bakers yeast. I- isolation and properties. *J. Biol. Chem.* Baltimore, v. 248, nº 4, p. 1346-1354, 1973.

MELIS, M. S. Stevioside effect on renal function of normal and hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.*, nº 3, v. 36, p. 213-217, 1992.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. *Nature*, London, v. 191, p. 144-148, 1961.

MITSCHER, L. A.; RAO, G. S.; VEYOSOGLU, T.; DRAKE, S. e HAAS, T. Isolation and Identification of Trachyloban-19-oic- and (-)-kaur-16-en-19-oic acids as anti-microbial agents from the prairie sunflower, *Heleanthus annuss.* *J. Nat. Prod.*, nº 46, p. 745, 1983.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, p. 109-142, 1994.

MORELAND, D. E. Effects of Toxicants on Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: HODGSON, E. & LEVI, P. E. *Biochemical Toxicology*, Connecticut: ed. Appleton & Lange; 1994. Pg. 345-379.

MORENO, A. J. M.; MADEIRA, V. M. C. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1015, p. 361-367, 1990.

MORRISON, R. T., BOYD, R. N. – *Química Orgânica*. 7ª edição. Londres: Fundação Clouste Gulbenkian, 1973.

MOSETTIG, E. & NES, W. R. Stevioside. II. The structure of the aglucon. *J. Org. Chem.*, v.20, p. 884-899, 1955.

MOSETTIG, E.; QUITT, P.; BEGLINGER, U. e 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.*,v. 83, p. 3163-3164, 1961.

MUSTAFA, M. G., UTSUMI, K. & PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial repiration and volume. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*; Orlando, v. 117 ,nº 24, p. 381-385, 1966.

NANAYAKKARA, N. P. D., KLOCKE, J. A., COMPADRE, C. M., HUSSAIN, R. A., PEZZUTO, J. M. e KINGHORN A. D. Characterization and Feeding Deterrent Effects on the Aphid, *Schizaphis graminum*, of some Derivatives of the Sweet Compounds, Stevioside and Rebaudioside A. *J. Nat. Prod.*, v. 50, nº 3, p. 434-441, 1987.

- NATHAN, C. F.; BRUKNER, L. H.; SILVERSTEIN, S. C. e COHN, Z. A.. Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide, *J. Exp. Med.*, v. 149, n. 1, p. 84-99, 1979;
- NICHOLLS, D. G. e FERGUSON, S. J. *Bioenergetics 2*. San Diego: Academic Press, 1992.
- NODE, M.; SAI, M.; FUJI, K.; FUJITA, E.; TAKEDA, S.; UHEMI, N.. Antitumor activity of diterpenoids, trichorabols a, b and c, and the related compounds: Synergism of two sites. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 31, n° 4, p. 1433-1437, 1983.
- O'CONNOR, K. J. e MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase and the related cell damage in adenocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 3, n° 1097, p. 227-231, 1991.
- OGAWA, T.; NOZAKI, M.; MATSUI, M.. Total synthesis of stevioside. *Tetrahedron*, vol 36, p. 2641-2648, 1980.
- PHILLIPS, W. A.; HAMILTON, J. A.. Phorbol ester-stimulated superoxide production by murine bone marrow-derived macrophages requires preexposure to cytokines, *J. Immunol.*, v. 142, n. 7, p. 2445-9, 1989;
- PHILLIPSON, J. D. Natural products as drugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, p. 17-19, 1994.
- PARKER, L.; UTSUMI, K.; MUSTAFA, M. G. *Archs. Biochem. Biophys.*, v. 117, p. 381, 1966.
- PICK, E. e KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods*, v. 38, p. 161-170, 1980.
- PICMAN, A. K.. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Biochem. System. Ecol.* v. 14, n° 3, p. 255-281, 1986.
- PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 45, p. 501-530, 1976.
- PULMAN, M. E.; PENEFSKY, H. S.; DATTA, A.; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I- Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosina triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 235, n° 11, p. 3322-3329, 1960.

RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M. J. e MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of na inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 87, p. 10043-10047, 1990.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the *In Vitro* Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. *Biochem. Pharmacol.*, v. 55, p. 803-810, 1998.

ROCHA, M. E. M.; FERREIRA, A. M. D. C.; BECHARA, E. J. H. Roles of Phosphste and na Enoyl Radical in Ferritin Iron Mobilization by 5-aminolevulinic Acid. *Free Radical Biol. Med.*, v. 29, nº 12, p. 1272-1279, 2000.

RODRÍGUES-LINDE, M. E.; DÍAZ, R. M.; GARCIA-GRANADOS, J.; QUEVEDO-SARMIENTO, E. M.; ONORATO, M. R.; PARRA, A. e RAMOS-CORMENZANA, A. Antimicrobial activity of natural and semisynthetic diterpenoids from *Sideritis* spp. *Microbios*, v. 77, p. 7-13, 1994.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. Biological Activities of Sesquiterpenes Lactones. *Phytochemistry*, Londres, v. 15, p. 1573-1580, 1976.

SAINI, T.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D.; JAEGER, S.; HOSOYAMA, S. e STOHS, S.J.. Protective ability of acetylsalicylic acid (aspirin) to scavenge radiation induced free radicals in J774A.1 macrophage cells, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, v. 101, n. 3, p. 259-68, 1998;

SALVEMINI, D.; MISKO, T. P.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M. e NEEDLEMAN, P.. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 7240-7244, 1993;

SASADA, M.; PABST, M.J.; JOHNSTON, R.B.Jr. Activation of peritoneal macrophages by lipopolisaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 258, n. 16, p. 9631-9635, 1983.

SCHIMIDT, H. H. H. W.; SEIFERT, R.; BOHME, E. Formation and release nitric oxide from human neutrophil and HL-60 cells induced by chemotacty peptide, platelet activating factor and leukotriene B₄. *FEBS Letters*, v. 244, p. 357-360, 1989.

SEPALLA, A. J.; WIKSTROM, M. K. F.; SARIS, N. E. L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propanolol and related compounds. In: CHANCE, B.; PYE, E. K.; GHOSH, A. K.; HESS, B. (eds). *Biological and Biochemical Oscillators*, New York: Academic Press, p. 115-124, 1973.

SINGER, T. P.; Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenase. *Meth. Biochem. Anal.*, New York:, v. 22, p. 125-175, 1974.

SLIMESTAD, R., MARSTON, A.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Med.*, nº 6, v. 61, 1995.

SMITH, C. L.; LARNER, J.; THOMAS, A. M.; KUPCHAN, S. M. Inactivation of Glycogen Synthase by the Tumor Inhibitor Vernolepin. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 276, p. 94-104, 1972.

SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome c reductases (D- et L-) de la levure aerobie par les lactates (D- et L-). *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, nº 97, p. 183-201, 1965.

STRECKER, H. J. L-glutamic dehydrogenase from liver. *Meth. Enzymol.*; New York, v. 2, p. 220-221, 1955.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 82, nº 22, 1985.

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

SUZUKI, M.; TERAMOTO, S.; MATSUSE, T.; OHGA, E.; KATAYAMA, H.; FUKUCHI, Y. e OUCHI, Y.. Inhibitory effect of ambroxol on superoxide anion production and generation by murine lung alveolar macrophages, *J. Asthma*, v. 35, n. 3, p. 267-72, 1998;

TERADA, H. The Interaction of Highly Active Uncouplers with Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 639, p. 225-242, 1981.

TOSKULKAO, C.; DEECHAKAWAN, W.; LEARDKAMOLKARN, V. e GLINSUKON, T. The Low Calorie Natural Sweetener Stevioside: Nephrotoxicity and its Relationship to Urinary Enzyme Excretion in the Rat. *Phytotherapy Res.*, v. 8, p. 281-286, 1994.

TZAGOLLOF, A. *Mitochondria*. New York: ed. Plenum Press; 1982. Pg. 233.

VIGNAIS, P. V.; DUEE, E. D.; VIGNAIS, P. M.; HUET, J. Effects of atractylgenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and on the translocation of adenine nucleotide in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 118, p. 465-483, 1966.

VILLALOBOS, N.; MARTÍN, L.; MACÍAS, M. J.; MANCHEÑO, B.; GRANDE, M. Gibberellin-like Activity of Some Tetracyclic Diterpenoids from *Elaeoselinum* Species and Their Derivatives. *Phytochemistry*, Londres, v. 37, nº 3, p. 635-339, 1994.

WU, Y. C.; HUNG, Y. C.; CHANG, F. R.; COSENTINO, M.; WANG, H. K. e LEE, K. H. Identification of ent-16 beta, 17-dihydroxykauran-19oic acid as na anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *J. Nat. Prod.*, v. 59, nº 6, p. 635-637, 1996.

YAMAMOTO, N. S.; KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII, E. L.; KEMMELMEIER, F. S.; ALVAREZ, M. e BRACHT, A. Effect of steviol and its structural analogues on glucose production and oxygen uptake in rat renal tubules. *Experientia*, v. 41, p. 55-57, 1985.

YENGAR, R.; STUEHR, D. J.; and MALETTA, M. A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v.84, p.6369-6373, 1987.

YONETANI, T.; RAY, G. S. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome C oxidase. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 240, nº 7, p. 3392-3398, 1965.

ZHEN, Q. S.; YE, X. e WEI, Z. J. Recent progress in research on *Tripterygium*: a male antifertility plant. *Contraception*, v. 51, p. 121-129, 1995.