UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

VALÉRIA TUDELLA UYEMURA

Efeito do extrato de *Tamarindus indica* L. sobre a
transição de permeabilidade de membrana em
mitocôndrias isoladas de fígado de rato e atividade
antioxidante *in vitro*

RIBEIRÃO PRETO
2007

VALÉRIA TUDELLA UYEMURA

**Efeito do extrato de *Tamarindus indica* L. sobre
a transição de permeabilidade de membrana em
mitocôndrias isoladas de fígado de rato e
atividade antioxidante *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Biociências
Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências
Aplicadas à
Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira
Uyemura

RIBEIRÃO PRETO

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Uyemura, Valéria Tudella.

Efeito do extrato de *Tamarindus indica* L. sobre a transição de permeabilidade de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e atividade antioxidante *in vitro* / Valéria Tudella Uyemura; orientador Sérgio Akira Uyemura - Ribeirão Preto, 2007.

99 p. il.; 30 cm

Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

1. *Tamarindus indica*. 2. Bioenergética.
3. Poro de transição de permeabilidade mitocondrial. 4. Atividade antioxidante.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Valéria Tudella Uyemura

Efeito do extrato de *Tamarindus indica* L. sobre a transição de permeabilidade de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e atividade antioxidante *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biociências
Aplicadas à
Farmácia

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____

Assinatura: _____

***Dedicatória e
Agradecimentos***

Dedico este trabalho à Deus...

“Posso, tudo posso, naquele que me fortalece.
Quero sem medo entregar meus projetos.
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou para mim.
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu para mim...
realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou e,
em meu lugar estar, a espera de um novo que vai chegar...”
(Celina Borges).

... e Agradeço

a todos os meus amigos, minha família e ao
meu esposo pelo incentivo, carinho e apoio
ao longo destes anos de convivência.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	i
Lista de figuras.....	iv
Resumo.....	vii
Abstract.....	x
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
<i>Tamarindus indica</i> Linn	2
Mitocôndria	6
Fosforilação oxidativa/Respiração mitocondrial ..	7
Regulação da homeostase de cálcio intracelular ..	12
Mitocôndria como fonte de ERONs	17
2. OBJETIVO	22
3. METODOLOGIAS	24
3.1. Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico do fruto.....	25
3.2. Análise do extrato bruto de tamarindo por CLAE	25
3.3. Isolamento da fração mitocondrial	26
3.4. Determinação da proteína.....	27
3.5. Respiração mitocondrial.....	27
3.6. Inchamento osmótico mitocondrial.....	28
3.7. Potencial de membrana mitocondrial.....	28
3.8. Avaliação do movimento de cálcio.....	29
3.9. Determinação do conteúdo de grupos tiólicos.....	30

3.10.	Produção de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria.....	31
3.11.	Determinação da lipoperoxidação da membrana mitocondrial.....	31
3.12.	Determinação do conteúdo de GSH.....	32
3.13.	Oxidação dos nucleotídeos de piridina....	33
3.14.	Determinação do ATP mitocondrial.....	34
3.15.	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de tamarindo.....	35
3.15.1.	Redução do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) .	35
3.15.2.	Capacidade <i>scavenger</i> de radical superóxido	36
3.15.3.	Capacidade <i>scavenger</i> de radical hidroxil	37
3.15.4.	Determinação da atividade quelante de Ferro	37
3.15.5.	Inibição da lipoperoxidação induzida pelo sistema Fe ²⁺ /citrato.	38
3.16.	Análise Estatística.....	39
4.	RESULTADOS	40
4.1.	Análise do extrato de tamarindo por CLAE	41
4.2.	Efeito do extrato de tamarindo sobre a mitocôndria.....	42
4.3.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de tamarindo.....	60

5. DISCUSSÃO	66
5.1. Efeito do extrato de tamarindo sobre a mitocôndria.....	67
5.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de tamarindo.....	75
6. CONCLUSÃO	78
7. BIBLIOGRAFIA	80

Lista de abreviaturas

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenosina 5'-difosfato
ANT	Translocador de nucleotídeos de adenina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BPS	Ácido dissulfônico da batofenantrolina
BSA	Albumina de soro bovino
β-OH	β -hidroxibutirato
CCCP	Carbonilcianeto- <i>m</i> -clorofenilidrazina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CsA	Cisclorsporina A
CAVD	Canal aniônico voltagem-dependente
DNP	2,4-dinitrofenol
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
E	Extrato de tamarindo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis-(β -aminoetil éter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FCCP	Carbonilcianeto- <i>p</i> -trifluormetoxifenilidrazina
GPx	Glutationala peroxidase
GRd	Glutationala redutase
GSH	Glutationala reduzida
GSSG	Glutationala oxidada
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina- <i>N'</i> - [etanossulfônico])

MDA	Malondialdeído
NBT	Nitroblue tetrazolium
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NAD (P) ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD (P) H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
PTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
O₂^{·-}	Radical superóxido
·OH	Radical hidroxil
ONOO⁻	Peróxido nitrito
·OH	Radical hidroxil
OPT	O-ftalaldeído
RCR	Razão de controle respiratório
SOD	Superóxido dismutase
Suc	Succinato de potássio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	tert-butil hidroperóxido
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TPMM	Transição de permeabilidade da membrana mitocondrial
Tris	Tris-(hidroximetil) aminoetano
Trolox	(ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
UCP	Proteína desacopladora
UQ	Ubiquinona

Lista de figuras

Lista de Figuras

Figura 1.	Cromatograma da CLAE do extrato de tamarindo ($\lambda = 190-450$ nm).....	41
Figura 2.	Efeito do extrato de tamarindo sobre os parâmetros respiratórios mitocondriais em meio contendo cálcio.	44
Figura 3.	Efeito do extrato de tamarindo sobre os parâmetros respiratórios mitocondriais em meio contendo EGTA.	46
Figura 4.	Efeito do extrato de tamarindo sobre a velocidade do estado 4 da respiração mitocondrial.	47
Figura 5.	Efeito do extrato de tamarindo no inchamento osmótico mitocondrial.	49
Figura 6.	Efeito do extrato de tamarindo sobre o potencial de membrana mitocondrial.	51
Figura 7.	Efeito do extrato de tamarindo no movimento de cálcio em mitocôndrias energizadas.	52
Figura 8.	Efeito do extrato de tamarindo sobre a liberação de H_2O_2	54
Figura 9.	Efeito do extrato de tamarindo sobre a oxidação dos grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial.	55

Figura 10.	Efeito do extrato de tamarindo sobre a lipoperoxidação mitocondrial.	56
Figura 11.	Efeito do extrato de tamarindo sobre o conteúdo de glutathiona reduzida.	57
Figura 12.	Efeito do extrato de tamarindo sobre a oxidação dos nucleotídeos de piridina.	58
Figura 13.	Efeito do extrato de tamarindo sobre o conteúdo de ATP mitocondrial.	59
Figura 14.	Capacidade do extrato de tamarindo como <i>scavenger</i> de radical DPPH.	60
Figura 15.	Capacidade do extrato de tamarindo como <i>scavenger</i> de radical superóxido.	61
Figura 16.	Capacidade do extrato de tamarindo como <i>scavenger</i> de radical hidroxil.	62
Figura 17.	Capacidade quelante de Fe^{2+} do extrato de tamarindo.	63
Figura 18.	Efeito do extrato de tamarindo sobre a lipoperoxidação mitocondrial induzida pelo sistema Fe^{2+} /citrato.	65

Resumo

UYEMURA, V.T. **Efeito do extrato de *Tamarindus indica* L. sobre a transição de permeabilidade de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e atividade antioxidante *in vitro*.** 2007. 99 F.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Tamarindus indica L. é um componente natural amplamente consumido por humanos, apresentando propriedade antiinflamatória, antidiabética e anti-hepatotóxica. Além disso, como nós demonstramos previamente, o extrato apresenta atividade hipolipêmica e antioxidante. Neste trabalho, nós demonstramos o efeito do extrato de *T. indica* sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Na presença de Ca^{2+} , o extrato causou um inchamento osmótico mitocondrial concentração-dependente, associado ao aumento da velocidade basal (V_4), dissipação do potencial de membrana e liberação do Ca^{2+} pré-acumulado, os quais foram inibidos por ciclosporina A (CsA) e assim atribuídos a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPMM). A indução do inchamento osmótico mitocondrial foi prevenida por EGTA e vermelho de rutênio, indicando a dependência da TPMM de Ca^{2+} . A oxidação de proteínas tiol mitocondrial, um mecanismo

bem estabelecido como causador da TPMM, foi detectado. Entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada no estado redox de GSH. A oxidação de NAD(P)H e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio produzidas pela mitocôndria foram observadas, em ambos os casos, foram prevenidas por CsA e/ou EGTA, indicando que são conseqüências da TPMM induzida pelo extrato de *T. indica*. Portanto, sem aparente envolvimento do estresse oxidativo no processo, sugerindo uma interação direta de compostos do extrato com grupos tiólicos de proteínas da membrana. O extrato de *T. indica* induziu uma depleção de ATP associada à TPMM, mostrando assim potencial para causar a morte celular por apoptose ou necrose, resultante da indução da TPMM por si ou pela depleção do ATP via TPMM.

In vitro, o extrato apresentou capacidade *scavenger* de radicais livres, verificado pelo ensaio do DPPH, radical superóxido e radical hidroxil; e ainda foi capaz de diminuir a lipoperoxidação mitocondrial. Além disso, em baixas concentrações, o extrato mostrou uma propriedade quelante de Fe^{2+} .

Palavras-chave: 1. *Tamarindus indica*, 2. Bioenergética, 3. Poro de transição de permeabilidade mitocondrial, 4. Atividade antioxidante.

Abstract

UYEMURA, V.T. **Effect of *Tamarindus indica* L. extract on the membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and in vitro antioxidant activity.** 2007. 99 P.

Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Tamarindus indica L. is a natural dietary component widely consumed by humans, presenting well established anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-hepatotoxic properties. In addition, as we have previously demonstrated, extract presents hypolipemic and antioxidant activities. We show here the effects of *T. indica* extract on isolated rat liver mitochondria. In the presence of Ca^{2+} , the extract caused mitochondrial concentration-dependent swelling, associated to, resting respiration increase (V_4), membrane potential dissipation and release of pre-accumulated Ca^{2+} , inhibited by cyclosporine A (CsA) and thus ascribable to mitochondrial permeability transition (MPT). This swelling induction was prevented by EGTA and ruthenium red, indicating strict dependence of MPT on Ca^{2+} . Oxidation of mitochondrial membrane protein thiols, a well established mechanism causing MPT was detected. However, no significant change was observed in the GSH

redox state, and the NADPH oxidation and accumulation of mitochondria-generated reactive oxygen species that was observed, were prevented by CsA and/or EGTA, indicating that they are consequence of the MPT induced by *T. indica* extract. Therefore, no apparent oxidative stress condition is involved as cause of this process suggesting that direct interaction with membrane protein thiol groups of the compounds responsible for MPT induction occurs. *T. indica* extract led to MPT-associated ATP depletion, thus showing the potential to cause cell death by apoptosis or necrosis resulting from MPT induction *per se* or from ATP depletion by MPT.

In vitro, the extract presented free radical scavenging ability, as assessed by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), superoxide radicals and radical hydroxyl assays, and led to decreased lipid peroxidation in mitochondria, as assessed by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. In addition, the extract showed an iron chelating property in low concentrations.

Key words: 1. *Tamarindus indica*, 2. Bioenergetic, 3. Mitochondrial permeability transition pore, 4. Antioxidant activity.

1. Introdução

***Tamarindus indica* Linn**

O tamarindo (*Tamarindus indica* L.) pertence à família leguminosae (caesalpinioideae), tem origem africana e desenvolve-se naturalmente em regiões tropicais e subtropicais. Na África e no sul da Índia, é uma das frutas mais consumidas como especiaria e fonte de alimento (TSUDA et al., 1994). Na Tailândia, as flores e as folhas são usadas na alimentação como vegetais, enquanto, o germe obtido da semente é usado para a produção da goma de tamarindo, a qual é um componente comumente utilizado no preparo da geléia de tamarindo (PHAKRUSCHAPHAN, 1982, *apud* SUDJAROEN et al., 2005). Praticamente todas as partes da planta têm uso na medicina popular, apresentando inúmeras aplicações terapêuticas em humanos, dentre elas o uso como digestivo, calmante, laxante, expectorante e tônico sangüíneo (KOMUTARIN et al., 2004).

Estudos desenvolvidos por vários grupos descrevem outras atividades do tamarindo, tais como: atividade antibacteriana e antifúngica utilizando extratos da semente e do fruto (LANHERS et al., 1996); atividade cercaricida e miracida à partir de extrato do fruto (EL SHEIK et al., 1990) e atividade antiinflamatória

(RIMBAU et al., 1999). Recentemente foi descrito o efeito antidiabético e hipolipidêmico do extrato aquoso da semente de tamarindo (MAITI et al., 2004; 2005).

Compostos antioxidantes da semente foram isolados e identificados a partir da extração com acetato de etila, os quais foram caracterizados como (-)-epicatequina, 3,4-dihidroxifenil acetato, metil-3,4-dihidroxibenzoato e 2-hidroxi-3,4-dihidroxiacetofenona. Estes compostos apresentaram atividade antioxidante impedindo a peroxidação de lipídeos e protegendo as células dos danos oxidativos desencadeados por radicais livres *in vivo* (TSUDA et al., 1994). Recentemente, foi evidenciado também a presença de vários compostos com perfil polifenólico na semente e no pericarpo do tamarindo (SUDJAROEN et al., 2005).

Compostos fenólicos ou polifenóis constituem um grupo numeroso e amplo de compostos do metabolismo secundário de plantas, com mais de 8.000 estruturas conhecidas atualmente. Os polifenóis, incluindo flavonóides, taninos, ácidos fenólicos, cumarinas, entre outros, existem naturalmente em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal como frutas, legumes, sementes, flores e folhas, fazendo parte integral da

dieta humana. A quantidade de polifenóis em cada alimento varia enormemente, mesmo entre cultivares de mesma espécie (BRAVO, 1998; ROSS & KASUM, 2002).

Os flavonóides polifenólicos possuem um esqueleto de difenilpropano ($C_6C_3C_6$) e uma família com mais de 4.200 compostos fenólicos diferentes, incluindo os sub-grupos flavonas, flavononas, flavonóis, antocianidinas, diidroflavonóis e isoflavonas, entre outros (RICE-EVANS et al., 1996; PIETTA, 2000).

As propriedades biológicas, farmacológicas e terapêuticas dos flavonóides são amplamente discutidas em diversos estudos. Além de sua atividade *scavenger* de radicais livres, múltiplas atividades biológicas têm sido descritas, tais como antiinflamatória, vasodilatadora, antibacteriana, antidiarréica, antialérgica, antiviral e antioxidante, entre outras (CHANG et al., 1993; ROSS & KASUM, 2002). Estes compostos exercem seus efeitos atuando como seqüestradores (*scavengers*) de radicais peroxil, inibindo a peroxidação lipídica (TERAO et al., 1994). O efeito protetor dos flavonóides sobre a lipoperoxidação de membranas parece depender de sua estrutura e de sua

capacidade de interação e penetração na bicamada lipídica (SAIJA et al., 1995).

Estudos realizados em nosso laboratório evidenciaram atividades hipolipemiante e antioxidante do extrato hidroalcoólico da polpa do fruto do tamarindo em hamsters hipercolesterolêmicos, demonstrando uma atividade antioxidante expressiva *in vitro* e uma significativa melhora do perfil lipídico dos animais, reduzindo a concentração sérica de colesterol total, colesterol não-HDL e triacilglicerol, além de aumentar a concentração do colesterol HDL (MARTINELLO et al., 2006).

Os produtos naturais ou sintéticos que possuem atividade anti-aterosclerótica ou hipolipidêmica são efetivos e relativamente seguros, entretanto, alguns efeitos adversos podem ocorrer. Estas complicações podem envolver a função hepática, os músculos esqueléticos e os nervos periféricos (MUSCARI et al., 2002).

Neste sentido, tem sido descrito que as estatinas podem induzir apoptose por causar um aumento dos níveis citosólicos de cálcio e ativação da sinalização apoptótica mediada pela mitocôndria (DIRK & JONES, 2006). Recentemente, foi demonstrado que as estatinas

podem induzir a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (VELHO et al., 2006), um evento chave na indução da apoptose ou necrose.

Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas que na maior parte das células animais dominam o cenário intracelular em número total por célula, mais do que qualquer outra organela (PEDERSEN, 1999).

Estruturalmente estas organelas são constituídas por duas membranas e dois compartimentos por elas limitados. A membrana mitocondrial externa, permeável à água e solutos de baixo peso molecular, juntamente com a membrana mitocondrial interna, delimita o espaço intermembranas. O segundo compartimento que está envolto pela membrana mitocondrial interna, formando invaginações ou cristas mitocondriais, é a matriz mitocondrial, espaço no qual está presente as enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da oxidação de aminoácidos e enzimas da β -oxidação de ácidos graxos (LEHNINGER, 1964).

A membrana mitocondrial interna é altamente seletiva, onde mesmo os prótons só atravessam se

transportados por moléculas específicas, sendo esta membrana permeável somente ao oxigênio molecular, dióxido de carbono, óxido nítrico e água. Nesta membrana encontram-se os componentes enzimáticos da cadeia respiratória, bem como os transportadores específicos para o ATP, ADP, piruvato, cálcio e fosfato (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

As mitocôndrias participam de inúmeros processos diferentes, dentre estes, síntese de ATP através da fosforilação oxidativa; produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs); captação e liberação de cálcio; produção de NAD(P)H; síntese de DNA, RNA, e proteína; reparo de DNA; termogênese (em alguns casos) e também de algumas vias metabólicas (PEDERSEN, 1999; KOWALTOWSKI, 2000).

Fosforilação oxidativa / Respiração mitocondrial

Esta importante função foi atribuída à mitocôndria após o desenvolvimento de técnicas que tornaram possível o fracionamento de células em 1949, permitindo aos bioquímicos norte-americanos Eugene Kennedy e Albert Lehninger demonstrarem que a fosforilação oxidativa ocorria exclusivamente na fração mitocondrial isolada, e

que mais tarde LEHNINGER (1955) demonstra-se que o transporte de elétrons a partir da coenzima NADH ao oxigênio molecular era a fonte de energia utilizada.

Durante a síntese de ATP, no processo chamado de fosforilação oxidativa, os elétrons são removidos dos substratos oxidáveis e transferidos à cadeia respiratória com subsequente redução do oxigênio molecular. O sistema responsável por esse processo é composto por cinco complexos enzimáticos que incluem a cadeia respiratória (complexos I-IV) e a F_0F_1 -ATP sintase (complexo V). O complexo I (NADH desidrogenase) inicia o processo de fluxo de elétrons pela oxidação do NADH a NAD^+ . Em uma via alternativa, o succinato (substrato de sítio II) é oxidado pela succinato desidrogenase ligada a FAD (complexo II). Os complexos I e II transferem os seus elétrons à ubiquinona (UQ), sendo os mesmos transferidos seqüencialmente ao complexo III, citocromo *c*, complexo IV e finalmente ao oxigênio, com formação de água (HATEFI, 1985; PEDERSEN, 1999; LEHNINGER et al., 2002).

De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a hipótese do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons através dos

complexos I, III e IV é acompanhado de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico de H^+ . A energia livre liberada no retorno do H^+ à matriz mitocondrial induz a alteração conformacional do componente F_1 da F_0F_1 -ATP sintase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1973).

Inúmeros compostos interferem com a fosforilação oxidativa, seja por desacoplamento ou por inibição. Os desacopladores estimulam a respiração basal sem que ocorra a fosforilação do ADP. Os desacopladores clássicos são representados por ácidos fracos com propriedades hidrofóbicas, característica esta que permite que eles atravessem a membrana mitocondrial interna. Devido à alta concentração de prótons no espaço intermembranas, eles mantêm-se na forma protonada, atravessam a membrana, liberam o próton na matriz e dissipam o gradiente eletroquímico. Após a descrição do 2,4-dinitrofenol (DNP) como desacoplador da fosforilação oxidativa, numerosos outros compostos foram identificados, sendo os mais utilizados o carbonilcianeto-*p*-trifluormetoxifenilidrazina (FCCP) e o

carbonilcianeto-*m*-clorofenilidrazina (CCCP). Os ionóforos também causam desacoplamento, pois permitem que cátions inorgânicos atravessem facilmente a membrana mitocondrial interna, interferindo no componente elétrico do gradiente eletroquímico. Entre os mais utilizados estão a valinomicina, um ionóforo carreador específico para potássio; a nigericina, um trocador eletroneutro de prótons por potássio; a ionomicina e o A23187, os quais são ionóforos dicarboxílicos com alta especificidade para cátions divalentes. E em mitocôndrias de tecido adiposo marrom, presentes em animais hibernantes e mamíferos recém-nascidos, caracterizou-se uma proteína desacopladora chamada termogenina, que dissipa o gradiente eletroquímico de prótons fornecendo uma via de escape para os prótons retornarem à matriz sem passarem pela ATP-sintase, desta forma, a energia não é utilizada para a síntese de ATP, mas é dissipada na forma de calor. Até meados dos anos 90, a proteína desacopladora (UCP) só havia sido identificada no tecido adiposo marrom, contudo atualmente são conhecidas cinco proteínas desse tipo em mamíferos (UCPs 1 a 5), mas a única com função

termogênica estabelecida é a UCP1, nome atual da termogenina (KADENBACH, 2003; VERCESI, 2003).

Os inibidores interferem na respiração acoplada à síntese de ATP, atuando preferencialmente nos complexos da cadeia respiratória ou na F_0F_1 -ATP sintase. Assim, a rotenona bloqueia a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, a antimicina A atua bloqueando a transferência de elétrons da ubiquinona para o citocromo *c* e o cianeto bloqueia a redução do O_2 pelo citocromo aa_3 . Neste contexto, existem substâncias que inibem o ciclo de Krebs com conseqüente diminuição da geração de cofatores reduzidos, substâncias que inibem o complexo adenina nucleotídeo translocase (ANT) impedindo a troca de ADP/ATP e por fim substâncias que inibem a F_0F_1 -ATP sintase prejudicando a fosforilação oxidativa (LEHNINGER et al., 2002).

CHANCE & WILLIAMS (1955) produziram uma descrição completa da cinética de óxido/redução dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Além disso, definiram os conceitos operacionais do estado metabólico mitocondrial e controle respiratório. Em estudos realizados posteriormente, CHANCE & WILLIAMS (1956) desenvolveram o método polarográfico para medir a

fosforilação oxidativa, estabelecendo cinco condições ou estados que podem controlar a velocidade da respiração nas mitocôndrias. O estado 1, tanto o ADP quanto o substrato respiratório estão ausentes; o estado 2 é a condição em que o substrato respiratório é o fator limitante da respiração; o estado 3 onde todos os componentes estão presentes em concentrações adequadas, sendo a velocidade de fosforilação do ADP o fator limitante; o estado 4 (basal) é a condição em que a respiração é limitada pela disponibilidade de ADP, e o estado 5 caracterizado pela ausência de oxigênio (MORELAND, 1994). A relação entre a respiração de estado 3 e a de estado 4, Razão de Controle Respiratório (RCR), é um parâmetro da função mitocondrial que indica o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a produção de ATP. A relação ADP/O, um outro parâmetro, está associada com a eficiência da mitocôndria em sintetizar ATP.

Regulação da homeostase de cálcio intracelular.

Além de sintetizar ATP, a mitocôndria utiliza a energia do gradiente eletroquímico de prótons para realizar outros processos não associados à fosforilação

oxidativa como, por exemplo, o transporte de cálcio através da membrana mitocondrial interna. Visto que os íons cálcio possuem uma importância crucial no controle de vários processos biológicos, a regulação precisa dos seus níveis é de extrema importância.

A concentração de cálcio citosólico livre na célula é mantida em níveis extremamente baixos, aproximadamente 10.000 vezes menores, quando comparada à concentração de cálcio no fluído extracelular. Há muito tempo acredita-se que as mitocôndrias participem da manutenção da homeostase citosólica de Ca^{2+} , pois em algumas situações esta organela é capaz de captar rapidamente grandes quantidades do cátion, dessa forma protegendo a célula de grandes variações de Ca^{2+} citoplasmático causadas por períodos limitados de isquemia e outras condições patológicas (CARAFOLI, 1987; LITSKY & PFEIFFER, 1997; BROOKES et al., 2004; VERCESI et al., 2006).

O sistema de transporte de cálcio na mitocôndria é bastante ativo, regulando a distribuição do cátion entre o citosol e a matriz mitocondrial através da operação de mecanismos distintos de influxo e efluxo (CARAFOLI & CROMPTON, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1980; NICHOLLS & AKERMAN, 1982).

O mecanismo de influxo mais estudado é o *uniporter*, o qual, como indica seu próprio nome, transporta o Ca^{2+} em resposta ao interior alcalino na matriz mitocondrial, sem acoplar o transporte à troca com qualquer outro íon ou molécula. O *uniporter* permite um acúmulo rápido de cálcio, sendo este acúmulo, dependente da concentração externa de cálcio e do potencial de membrana ($\Delta\psi$), o qual direciona o acúmulo de cálcio intramitocondrial. Este processo pode ser inibido por Mg^{2+} e vermelho de rutênio, dentre outros inibidores descritos (GUNTER et al., 1994; JOUAVILLE et al., 1998).

O efluxo de Ca^{2+} da matriz mitocondrial pode ser mediado por vias de baixa ou de alta capacidade. Nas vias de baixa capacidade o efluxo pode ocorrer por troca com o H^+ do exterior da membrana externa (mecanismo Na^+ -independente), ou com o sódio do citosol (mecanismo Na^+ -dependente), sendo esses mecanismos aparentemente responsáveis pela manutenção dos níveis normais de Ca^{2+} na matriz mitocondrial quando ocorre oscilação fisiológica do cátion. A dissipação do gradiente eletroquímico decorrente da ativação desses mecanismos não é suficiente para inibir a síntese de ATP. As vias de efluxo de alta capacidade compreendem o *uniporter*

operando no sentido reverso, o efluxo induzido por pró-oxidantes, além do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP). Quando uma dessas vias é ativada, o Ca^{2+} é instantaneamente liberado, em associação com a dissipação do $\Delta\psi$ e desacoplamento da fosforilação oxidativa (NOVGORODOV & GUDZ, 1996; GUNTER et al., 2000).

Embora a presença de baixas concentrações de cálcio (aproximadamente 1 μM) na matriz mitocondrial estimule a atividade respiratória, a concentração intramitocondrial desse cátion deve ser cuidadosamente regulada, pois a presença de concentrações relativamente altas, presença de fosfato inorgânico, pró-oxidantes ou desacopladores da fosforilação oxidativa, induz uma rápida transição de permeabilidade da membrana mitocondrial. Esse fenômeno está associado à despolarização da membrana mitocondrial, desacoplamento da fosforilação oxidativa, liberação de intermediários metabólicos e de íons intramitocondriais. Essa perda de seletividade da membrana permite a entrada e saída de íons e solutos com peso molecular inferior a 1,5 kDa, resultando em um inchamento osmótico mitocondrial (ZORATTI & SZABÒ, 1995; BERNARDI et al., 1998; KOWALTOWSKI et al., 1999).

A composição molecular do poro de transição de permeabilidade (PTP) ainda é alvo de pesquisas. A hipótese mais aceita é que o PTP encontra-se inserido através das membranas mitocondrial interna e externa, sendo formado, em parte, por proteínas presentes em ambas as membranas e na matriz. Este complexo de proteínas inclui o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), localizado na membrana mitocondrial interna; um canal aniônico voltagem-dependente (CAVD), localizado na membrana mitocondrial externa; ciclofilina D na matriz mitocondrial e outras proteínas. O translocador de nucleotídeos de adenina é essencial para as trocas de ADP por ATP durante a fosforilação oxidativa. O canal aniônico voltagem-dependente permite que a membrana mitocondrial externa seja permeável a metabólitos, como ATP, ADP e substratos respiratórios, e que estes se movam para dentro e para fora da organela durante o metabolismo. A ciclofilina D é uma proteína que confere sensibilidade a ciclosporina A. Essas proteínas atuam em conjunto para a formação do poro de transição de permeabilidade, que apresenta sítios de ligação para ativadores e inibidores que regulam o estado aberto e fechado deste processo, respectivamente

(BRATTON & COHEN, 2001; McSTAY et al., 2002; KIM et al., 2003).

Mitocôndria como fonte de EROs.

A mitocôndria é o sítio principal de metabolismo de oxigênio, visto que a cadeia respiratória mitocondrial é responsável por aproximadamente 90% do oxigênio consumido pela célula. Nesta organela, em condições fisiológicas, a produção de EROs é um subproduto da redução incompleta do oxigênio molecular (O_2), resultando na formação de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), principalmente no complexo I da cadeia, envolvendo a NADH desidrogenase. Este subproduto também pode ser formado no ciclo da ubiquinona, que transporta elétrons dos complexos I e II para o complexo III (BOVERIS & CHANCE, 1973; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; SKULACHEV, 2006). Normalmente espera-se que a produção de radical superóxido seja controlada, pelo menos em parte, pela ação seqüencial de duas enzimas. A primeira destas é a superóxido dismutase mitocondrial (SOD), a qual converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. Visto que a mitocôndria não possui catalase, sua defesa contra as propriedades tóxicas do H_2O_2 é

realizada pela enzima glutathione peroxidase (GPx). Esta enzima converte o peróxido de hidrogênio em água, consumindo glutathione reduzida (GSH) e desta forma produzindo glutathione oxidada (GSSG), a qual é novamente reduzida através da glutathione reductase (GRd), usando NAD(P)H como fonte doadora de elétrons. O NADP⁺ assim gerado retorna ao seu estado reduzido através da NAD(P)⁺-transhidrogenase mitocondrial, a qual utiliza os elétrons provenientes do NADH. Assim, a mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante composto por superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRd), glutathione reduzida (GSH) e NAD(P)H, além das vitaminas C e E (KIRKINEZOS & MORAES, 2001; KIRSCH & DE GROOT, 2001; ANDREYEV et al., 2005).

Em algumas situações, a geração de EROs pode estar aumentada o suficiente para superar a capacidade da defesa antioxidante, ou a capacidade antioxidante da mitocôndria pode estar diminuída. Assim, o H₂O₂ que normalmente seria eliminado, acumula-se, podendo dar origem ao radical hidroxil (•OH) através da reação de Fenton-Haber-Weiss. O acúmulo de EROs pode levar a uma

situação conhecida como estresse oxidativo (GOLDSTEIN et al., 1993).

Nos últimos anos o óxido nítrico também tem sido relacionado a danos mediados por estresse nitroativo (ERNs). TATOYAN & GIULIVI (1998) demonstraram que a mitocôndria possui sua própria óxido nítrico sintase e pode produzir endogenamente duas outras espécies muito reativas, o óxido nítrico (NO) e o peróxido nitrito (ONOO⁻), sendo a principal fonte de ONOO⁻ através da reação do NO com o radical superóxido (GIULIVI, 1998; GIULIVI et al., 1998). Desta forma, o acúmulo de ERONS (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) na mitocôndria pode levar à oxidação de macromoléculas presentes na própria organela, bem como em outros ambientes intracelulares. No entanto, as proteínas, em particular àquelas presentes na membrana mitocondrial interna, são alvos primários do dano oxidativo induzido por ERONS gerados intramitocondrialmente, visto que a membrana interna é extremamente rica em proteínas. Grande parte do dano oxidativo nas proteínas da membrana mitocondrial interna envolve oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas e formação de carbonil, sendo que juntamente estes processos resultam no dano mitocondrial

causado pela inibição da cadeia respiratória (TYLER, 1975; SCHILD et al., 1997) e permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; ZORATTI & SZABÒ, 1995; KOWALTOWSKI et al., 2001; VERCESI et al., 2006).

Desta forma, o estudo dos efeitos do extrato de tamarindo em mitocôndrias isoladas é muito importante, uma vez que a polpa desta fruta é amplamente consumida no Brasil, África e países da Ásia, e as propriedades hipolipemiantes e antioxidantes são atribuídas ao alto conteúdo de flavonóides. Entretanto, tem sido descrito que alguns flavonóides causam um *burst* respiratório em mitocôndrias isoladas e sofrem auto-oxidação, gerando espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, também foi demonstrado que dependendo de suas propriedades antioxidantes, alguns flavonóides protegem a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPMM), sendo, portanto, capazes de atuarem potencialmente como agentes citoprotetores para a necrose e a apoptose. (SANTOS et al., 1998). Embora outros estudos demonstrem que alguns flavonóides podem promover apoptose, em decorrência das atividades pró-oxidante e indutora da TPMM (SALVI et al., 2002; LIGERET et al., 2004).

Recentemente diversos estudos têm discutido intensamente os efeitos de diferentes flavonóides e de outros polifenóis com a mitocôndria (DORTA et al., 2005; ANDREU et al., 2005; PARDO-ANDREU et al., 2006; CÁLGARO-HELENA et al., 2006; LAHOUEL et al., 2006).

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do extrato hidroalcoólico da polpa do fruto de *Tamarindus indica* L. em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, principalmente sobre a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato.

3. Metodologias

3.1. Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico do fruto

Os frutos de *Tamarindus indica* L. foram obtidos no CEASA de Ribeirão Preto, descascados e submetidos à maceração em álcool 70% (v/v), na proporção de 1:3 (p/v), recebendo agitação diária, por cinco dias. O macerado obtido foi filtrado em funil de Büchner e em seguida, submetido à evaporação rotatória a 40°C por 4 horas para extração do solvente.

3.2. Análise do extrato bruto de tamarindo por CLAE

O extrato bruto de tamarindo foi analisado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção em ultravioleta (UV). A CLAE foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu LC-6AD com um detector de Diode Array (SPD-M10Avp, Shimadzu), acoplado a um auto-injetor (SIL-10AF, Shimadzu) e utilizando um software CLASS-VP 6.14. Foi utilizada uma coluna Shim-pack ODS (5 µm, 4,6/250 mm; Shimadzu) acoplada à respectiva pré-coluna. O seguinte esquema de eluição foi realizado: 0 a 10 min: 2% B (isocrático), 10 a 90 min: 2 a 20% B (gradiente linear), 90 a 120 min: 20 a 100% B (gradiente linear); solventes: A = ácido acético 2% (v/v); B = acetonitrila em ácido acético 2% (v/v); fluxo: 1 mL/min. A faixa de

comprimentos de onda de detecção do UV foi de 190-450 nm.

3.3. Isolamento da fração mitocondrial

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial (PEDERSEN et al., 1978). Ratos Wistar machos de aproximadamente 200 g, foram sacrificados por decaptação, o fígado foi alcançado por incisão na cavidade abdominal, removido e cortado em pequenos fragmentos, imediatamente imersos em meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, e Hepes-KOH 10 mmol/L (pH 7,4). Os fragmentos foram lavados e homogeneizados no mesmo meio, três vezes em Potter-Elvehjen por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto. O homogeneizado foi centrifugado a 800 g por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 14.000 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento resultante foi ressuspenso em um meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L, e Hepes-KOH 10 mmol/L (pH 7,4), e centrifugado a 4.600 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento mitocondrial final foi ressuspenso em 1 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, e Hepes-KOH 10 mmol/L (pH 7,4).

3.4. Determinação da proteína

Uma alíquota (20 μ L) da amostra a ser determinada foi misturada a 100 μ L de uma solução de ácido deoxicólico 5% (p/v) e água q.s.p. 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL do reativo de biureto, composto por sulfato cúprico 0,15% (p/v), tartarato de sódio e potássio 0,6% (p/v) e NaOH 0,75 mol/L. Após 15 minutos, a absorvância foi determinada em 540 nm e a concentração foi determinada a partir de uma curva de calibração, utilizando BSA como padrão (CAIN & SKILLETER, 1987).

3.5. Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi monitorado polarograficamente a 30°C em um oxígrafo acoplado a um eletrodo tipo Clark (Gilson Medical Electronics, Middlenton, WI, USA), em um meio de reação contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, KH_2PO_4 2,0 mmol/L, e Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), adicionado de EGTA 0,2 mmol/L ou CaCl_2 10 μ mol/L (volume final de 1,8 mL) e os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com CHANCE & WILLIAMS (1956). A concentração de proteína mitocondrial utilizada foi 1,0 mg/mL e a

respiração de estado 3 foi iniciada pela adição de 400 nmoles de ADP. Diferentes concentrações de extrato de tamarindo foram adicionadas logo após o estímulo com ADP, para avaliar a velocidade do estado 3, ou no estado basal , para avaliar a velocidade do estado 4.

3.6. Inchamento osmótico mitocondrial

O inchamento osmótico mitocondrial foi avaliado em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650 PC, pela diminuição da absorvância das mitocôndrias (0,5 mg/mL de proteína, a 30°C) em 540 nm. O meio de reação (volume final de 2 mL) constituía-se de sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L e Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), adicionado de succinato 5 mmol/L, rotenona 2 μ mol/L e CaCl_2 10 μ mol/L.

3.7. Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana das mitocôndrias foi determinado monitorando-se as alterações na fluorescência da safranina O (concentração final 10 μ mol/L), em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 utilizando comprimento de onda excitação e emissão de 495 e 586 nm, respectivamente (PETRUSSA et al., 1992).

As mitocôndrias (1,0 mg/mL de proteína) foram incubadas a 30°C em um meio de reação contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), adicionado de CaCl₂ 10 µmol/L e rotenona 2 µmol/L (volume final 2,0 mL), e foram energizadas pela adição de succinato 5 mmol/L.

A calibração foi realizada de acordo com XKERMAN & WIKSTRÖM (1976), em um meio isento de potássio, contendo sacarose 200 mmol/L, fosfato de sódio 2,5 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L e Hepes-Na⁺ 10 mmol/L, pH 7,2.

3.8. Avaliação do movimento de cálcio

O cálcio livre extramitocondrial foi monitorado conforme MURPHY et al. (1996) utilizando Calcium Green 5N (Molecular Probes). O meio de reação foi composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), CaCl₂ 10 µmol/L, rotenona 2 µmol/L e Calcium Green 5N 0,1 µmol/L (volume final 2 mL). As mitocôndrias foram energizadas com succinato 5 mmol/L e a fluorescência foi monitorada continuamente a 30°C, em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, utilizando comprimento de onda de excitação e emissão de 506 e 532 nm, respectivamente.

3.9. Determinação do conteúdo de grupos tiólicos

A determinação de grupamentos tiólicos foi realizada através da adição do reagente ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), de acordo com PARDO-ANDREU et al. (2006). As mitocôndrias (1,0 mg/mL) foram pré-incubadas por 15 minutos, a 30 °C, com diferentes concentrações de extrato em um meio de reação contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), adicionado de succinato 5 mmol/L, rotenona 2 µmol/L e CaCl₂ 10 µmol/L (volume final 1 mL). Após o tempo de incubação, a suspensão mitocondrial foi submetida a 3 processos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido, para a liberação de proteínas da matriz. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 9.000 g por 2 minutos. O sedimento obtido foi adicionado de 200 µL de ácido tricloroacético 6,5% (p/v), sendo novamente centrifugado a 9.000 g por 2 minutos. O sedimento final foi ressuspenso em 1 mL de uma solução contendo Tris-HCl 0,5 mol/L (pH 8,3) e EDTA 0,5 mmol/L, e após a adição de 100 µmol/L de DTNB esperou-se 20 minutos para a determinação da absorvância em 412 nm.

3.10. Produção de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela mitocôndria foi monitorada utilizando Amplex Red (Molecular Probes) de acordo com VOTYAKOVA & REYNOLDS (2001). A fluorescência foi monitorada continuamente a 30°C, em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, utilizando comprimento de onda excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente. O meio de reação constituía-se de sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), succinato 5 mmol/L, rotenona 2 μ mol/L, $CaCl_2$ 10 μ mol/L, peroxidase de raiz forte 5 mU e Amplex Red 25 μ mol/L (volume final 2 mL).

3.11. Determinação da lipoperoxidação da membrana mitocondrial

A lipoperoxidação da membrana mitocondrial foi determinada pela formação do complexo entre o malondialdeído e o ácido tiobarbitúrico (complexo MDA-TBA). Uma suspensão mitocondrial (1,0 mg/mL de proteína) foi pré-incubada em 1 mL de meio contendo KCl 130 mmol/L e Hepes 10 mmol/L (pH 7,2), adicionado de $CaCl_2$ 10 μ mol/L, succinato 5 mmol/L e rotenona 2,0 μ mol/L, por 30 minutos (a temperatura ambiente). A peroxidação

lipídica foi induzida por $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ e citrato de sódio 2 mmol/L para o controle positivo, e para determinar a lipoperoxidação causada pelo extrato de tamarindo foi utilizado diferentes concentrações, na ausência do indutores. Após o tempo de incubação, foi adicionado 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (p/v) (preparado em NaOH 50 mmol/L no momento do uso), 0,04 mL de NaOH 10 mol/L e 0,5 mL de H_3PO_4 20% (v/v), seguido por incubação durante 20 minutos, a 85°C. Após resfriamento, o complexo foi extraído com 2 mL de *n*-butanol e a absorvância foi determinada em 535 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650 PC. A concentração do cromógeno foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do complexo MDA-TBA de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

3.12. Determinação do conteúdo de GSH

O conteúdo de glutathiona reduzida nas mitocôndrias foi determinado por fluorescência utilizando o o-ftalaldeído (OPT) como indicador em 350 e 420 nm como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente (HISSIN & HILF, 1976). As mitocôndrias (1,0 mg/mL) foram pré-incubadas por 30 minutos, a 30°C,

com diferentes concentrações de extrato de tamarindo em um meio de reação contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), adicionado de succinato 5 mmol/L, rotenona 2 μ mol/L e CaCl_2 10 μ mol/L (volume final 1 mL). Após o tempo de incubação, foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético 13% (p/v), em seguida as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 5 minutos, para a precipitação de proteínas. Após a centrifugação, alíquotas do sobrenadante (100 μ L) foram retiradas e adicionadas a um meio composto por KH_2PO_4 0,1 mol/L e EDTA 5 mmol/L (1,8 mL), adicionado de 25 μ L de KOH 1 mol/L e 100 μ L de OPT (1,0 mg/mL). A fluorescência foi determinada após 15 minutos em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 e a concentração de glutatona reduzida foi estimada a partir de uma curva de calibração utilizando GSH como padrão.

3.13. Oxidação dos nucleotídeos de piridina

O estado redox dos nucleotídeos de piridina na suspensão mitocondrial (1,0 mg/mL) foi monitorado a 30°C em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, utilizando comprimento de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2005). O meio

de reação contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), succinato 5 mmol/L, rotenona 2 μ mol/L e CaCl_2 10 μ mol/L (volume final 2 mL). A calibração interna foi realizada pela adição de NADH 2 e 4 μ mol/L.

3.14. Determinação do ATP mitocondrial

O ATP mitocondrial foi determinado por luminescência utilizando o sistema luciferina-luciferase, de acordo com DORTA et al. (2005). Uma suspensão contendo proteína mitocondrial (1,0 mg/mL) foi pré-incubada por 15 minutos, a 30°C, com diferentes concentrações de extrato de tamarindo, em um meio de reação contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4) adicionado de succinato 5 mmol/L, rotenona 2 μ mol/L e CaCl_2 10 μ mol/L (volume final 1 mL). Em seguida, a suspensão mitocondrial foi centrifugada a 9.000 g por 5 minutos, a 4°C, e ao sedimento foi adicionado 1 mL de ácido perclórico 1 mol/L. As amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 g por 5 minutos, a 4°C, e alíquotas do sobrenadante (100 μ L) foram retiradas e neutralizadas com 70 μ L de KOH 2 mol/L. Após a neutralização, foi

adicionado 1 mL de tampão Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7,8) e uma nova centrifugação foi realizada. Para determinação do ATP mitocondrial 100 μ L do sobrenadante resultante foi retirado, e a luminescência foi mensurada em um luminômetro AutoLumat LB953, utilizando o "Kit" da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

3.15. Determinação da atividade antioxidante in vitro do extrato de tamarindo

3.15.1. Redução do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)

A capacidade *scavenger* ou doadora de hidrogênio ao radical difenilpicrilidrazil foi determinada espectrofotometricamente de acordo com PAREJO et al. (2002). O meio de reação (volume final de 2,25 mL) constituía-se de 1,5 mL de uma solução etanólica de DPPH (50 μ g/mL), adicionada de 0,75 mL de extrato de tamarindo em diferentes concentrações (0,5-10 mg/mL). Para cada concentração foi preparado um branco. A reação foi incubada por 20 minutos, e a absorvância determinada em um espectrofotômetro Hitachi U-2001, em comprimento de onda de 517 nm. A atividade *scavenger* do DPPH foi calculada como porcentagem da redução do radical e como padrão de comparação de atividade antioxidante, foi

utilizado o ácido ascórbico (Vitamina C) na concentração de 1,0 mg/mL.

3.15.2. Capacidade *scavenger* de radical superóxido

A capacidade *scavenger* de radical superóxido foi determinada de acordo com YAGI et al. (2002). Nesse método, os radicais superóxido foram gerados *in vitro*, pelo sistema xantina/xantina oxidase. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) reduz o corante nitroblue tetrazolium (NBT) produzindo o formazan, um composto azul que foi medido em espectrofotômetro Hitachi U-2001, em comprimento de onda de 560 nm. O meio de reação (volume final de 3 mL) contendo tampão fosfato de sódio 100 mmol/L (pH 7,8), EDTA 0,1 mmol/L, NBT 0,05 mmol/L, BSA 0,1% (p/v), xantina 0,3 mmol/L e extrato de tamarindo em diferentes concentrações (0,5-10,0 mg/mL) foi incubado a 37°C por 20 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 6 mU de xantina oxidase e 20 minutos depois foi finalizada pela adição de CuCl 0,2 mmol/L. Para cada amostra foi preparado um branco, e como padrão de comparação de atividade antioxidante, foi utilizado trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-

tetrametilcromano-2-carboxílico) um análogo da Vitamina E, na concentração de 1,0 mg/mL.

3.15.3. Capacidade *scavenger* de radical hidroxil

A capacidade *scavenger* de radical hidroxil foi determinada pelo método da desoxiribose de acordo com VALENTÃO et al. (2002). O meio de reação (volume final de 1,5 mL), constituía-se de tampão fosfato de sódio 60 mmol/L, FeCl₃-EDTA 1 mmol/L, desoxiribose 1 mmol/L e extrato de tamarindo (0,5-10 mg/mL). A reação foi iniciada pela adição de 1 mmol/L de H₂O₂ e após a incubação por 1 hora a 37°C, foram adicionados 0,75 mL de ácido tricloroacético 2,8% (p/v) e 0,75 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (p/v) (preparado em NaOH 50 mmol/L no momento do uso). A mistura foi aquecida a 100°C por 15 min, e após resfriamento, o produto da reação foi determinado em um espectrofotômetro Beckman DU-70 em comprimento de onda de 520 nm.

3.15.4. Determinação da atividade quelante de Ferro

A atividade quelante de íons Fe²⁺ foi determinada através de um ensaio competitivo utilizando o indicador ácido dissulfônico da batofenantrolina (BPS), no qual é

monitorado a ausência da formação do complexo $\text{Fe}_2(\text{BPS})_3$ (CASAGRANDE et al., 2006). Ao meio de reação (volume final 2,0 mL) contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L e Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4) foi adicionado $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ e diferentes concentrações do extrato de tamarindo (0,05-1,0 mg/mL), durante um período de incubação de 5 minutos. Em seguida, foi adicionado BPS 0,2 mmol/L e a absorvância foi determinada após 15 minutos em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650 PC em 530 nm com correção a 700nm.

3.15.5. Inibição da lipoperoxidação induzida pelo sistema Fe^{2+} /citrato.

A lipoperoxidação da membrana mitocondrial foi avaliada por fluorimetria de acordo com YAGI (1998), com algumas modificações. Neste método, uma suspensão mitocondrial (1,0 mg/mL de proteína), foi pré-incubada em 1 mL de meio de reação contendo KCl 130 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L (pH 7,2), adicionado de succinato 5 mmol/L, rotenona 2,0 $\mu\text{mol/L}$, e diferentes concentrações do extrato de tamarindo (0,5-10 mg/mL), por 30 minutos. A peroxidação lipídica foi induzida por $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ e citrato de sódio 2 mmol/L. Para a determinação de espécies reativas ao ácido

tiobarbitúrico (TBARS), esta mistura foi precipitada pela adição de 4 mL de H_2SO_4 12 N e 0,5 mL de ácido fosfotúngstico 10% (p/v) e centrifugada a 1.900 g, por 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 4 mL de água/1 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (p/v) (preparado em NaOH 50 mmol/L no momento do uso) e aquecido por 1 hora a 95°C. Após este tempo, os tubos foram resfriados e o produto da reação, ou seja, o complexo entre o malondialdeído e o ácido tiobarbitúrico (complexo MDA-TBA), foi extraído com 5 mL de *n*-butanol. A formação do complexo foi avaliada em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, em comprimento de onda de excitação em 515 nm e emissão em 553 nm. As concentrações das amostras foram obtidas a partir de uma curva padrão, utilizando-se o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como padrão e o conteúdo de lipoperóxidos foi expresso em μmol de malondialdeído por mg de proteína.

3.16. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se a análise de variância entre os grupos (ANOVA) e o teste complementar de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análise do extrato de tamarindo por CLAE.

A análise do extrato bruto de tamarindo por CLAE, utilizando coluna de fase reversa, demonstrou a presença de nove componentes principais e quinze minoritários (Figura 1).

Figura 1. Cromatograma da CLAE do extrato de tamarindo ($\lambda = 190-450$ nm).

Um espectro de UV foi obtido para cada um dos principais picos observados no cromatograma e todos mostraram um padrão similar de absorção, com duas bandas de absorção máxima em torno de 230 e 290 nm, com exceção do pico em 12,15 minutos, o qual apresentou uma única banda de absorção em 282 nm. Estes dados e as características das bandas A e B, sugerem que os compostos predominantes são flavonóides, os quais ocorrem como metabólitos secundários em plantas.

4.2 Efeito do extrato de tamarindo sobre a mitocôndria.

A Figura 2 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico de tamarindo sobre o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato, usando succinato como substrato oxidável, adicionado de rotenona para inibição do complexo I. A respiração mitocondrial foi avaliada após o estímulo com ADP (V_3) e no estado basal (V_4), em meio contendo cálcio. A adição de cálcio não alterou a velocidade de estado 3 (V_3), no entanto, estimulou a velocidade do estado 4 (V_4) significativamente em relação ao controle na presença de EGTA ($p < 0,001$). Em virtude deste efeito, a Razão de Controle Respiratório (RCR) após adição de cálcio, foi conseqüentemente reduzida (aproximadamente 20%) em relação ao controle com EGTA ($RCR = 5,92 \pm 0,18$). A adição de extrato de tamarindo (1,0 e 0,5 mg/mL) na presença de cálcio acentuou o aumento da velocidade do estado 4 ($p < 0,01$), contudo na ausência de cálcio, 1,0 mg/mL de extrato não afetou o consumo de oxigênio, sendo a velocidade de estado 4 significativamente menor em relação ao controle com cálcio ($p < 0,001$). Este efeito é compatível ao observado no RCR, visto que na presença de EGTA, a adição de extrato 1,0 mg/mL não

causou nenhuma alteração deste parâmetro respiratório, sendo o RCR = $5,81 \pm 0,25$ comparável ao controle com EGTA (RCR = $5,92 \pm 0,18$). O efeito do extrato de tamarindo na presença de cálcio se mostrou mais evidente na redução do RCR, onde as concentrações de 1,0 mg/mL e 0,5 mg/mL diminuíram em média 34% e 27%, respectivamente, o RCR em relação ao controle com cálcio (RCR = $4,73 \pm 0,21$). A concentração de 0,25 mg/mL de extrato de tamarindo, de forma menos pronunciada, também se mostrou capaz de afetar significativamente o RCR em relação ao controle com cálcio, demonstrando uma redução de aproximadamente 18%. O efeito do extrato de tamarindo em mitocôndrias isoladas utilizando substratos do complexo I (glutamato 5 mmol/L e malato 5 mmol/L), na presença de 10 $\mu\text{mol/L}$ de Ca^{2+} , foi semelhante ao encontrado para o substrato do complexo II (resultados não apresentados).

Figura 2. Efeito do extrato de tamarindo sobre os parâmetros respiratórios mitocondriais em meio contendo cálcio.

As mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg/mL de proteína) foram adicionadas a um meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, KH_2PO_4 2,0 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4) e $CaCl_2$ 10 μ mol/L, a 30°C.

A.Efeito do extrato de tamarindo sobre a velocidade do estado 3 da respiração mitocondrial, após estímulo com ADP 700 nmoles.

B.Efeito do extrato de tamarindo sobre a velocidade do estado 4 da respiração mitocondrial.

C.Efeito do extrato de tamarindo sobre a Razão de Controle Respiratório (RCR).

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de experimentos com diferentes preparações (n = 3); **ns** = não significativo, ******* = p < 0,001, ****** = p < 0,01.

Com intuito de confirmar a dependência de cálcio para o efeito do extrato de tamarindo sobre os parâmetros respiratórios mitocondriais avaliados, o consumo de oxigênio foi monitorado na presença de EGTA (Figura 3). Na Figura 3A, pode-se observar que a adição de extrato de tamarindo (0,1-1,0 mg/mL) após o estímulo com ADP, causou uma diminuição de aproximadamente 20% da velocidade do estado 3. Porém, após análise estatística, este efeito não se mostrou significativo. A Figura 3B e 3C demonstram, respectivamente, a velocidade de estado 4 e o RCR, as quais evidenciam que o extrato de tamarindo não foi capaz de estimular o estado 4 e não causou nenhuma alteração do RCR na presença de EGTA. Desta forma, estes resultados confirmam os resultados demonstrados anteriormente, e sugerem que a capacidade do extrato, dependente de cálcio, em estimular o estado 4 da respiração pode estar relacionado a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) na membrana mitocondrial interna.

Figura 3. Efeito do extrato de tamarindo sobre os parâmetros respiratórios mitocondriais em meio contendo EGTA.

As mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg/mL de proteína) foram adicionadas a um meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, KH_2PO_4 2,0 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4) e EGTA 0,2 mmol/L, a 30°C.

A. Efeito do extrato de tamarindo sobre a velocidade do estado 3 da respiração mitocondrial, após estímulo com ADP 700 nmoles.

B. Efeito do extrato de tamarindo sobre a velocidade do estado 4 da respiração mitocondrial.

C. Efeito do extrato de tamarindo sobre a Razão de Controle Respiratório (RCR).

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de experimentos com diferentes preparações (n = 3); **ns** = não significativo.

Assim, na Figura 4 a capacidade do extrato de tamarindo estimular o estado 4, foi observado na presença de EGTA, um quelante de cálcio e ciclosporina A (CsA), um inibidor clássico da transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPMM). Demonstrando que a presença de EGTA (letra g) ou CsA (letra h), adicionados antes do extrato 1,0 mg/mL, inibiram o efeito do extrato no estado 4 da respiração mitocondrial na presença de cálcio.

Figura 4. Efeito do extrato de tamarindo sobre a velocidade do estado 4 da respiração mitocondrial.

As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 2.

- a.** FCCP 1 $\mu\text{mol/L}$; **b.** Extrato 1,0 mg/mL;
c. Extrato 0,5 mg/mL; **d.** Extrato 0,25 mg/mL;
e. Extrato 0,1 mg/mL; **f.** CaCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$;
g. EGTA 0,2 mmol/L + Extrato 1,0 mg/mL;
h. CsA 1 $\mu\text{mol/L}$ + Extrato 1,0 mg/mL

A seta indica a adição de extrato.

A Figura 5 mostra que o inchamento osmótico mitocondrial induzido pelo extrato de tamarindo é compatível com o aumento da velocidade de estado 4 demonstrado na figura anterior, sendo a extensão de ambos os fenômenos estreitamente correlacionados com a concentração de extrato utilizada. Desta forma, pode-se observar que após a adição de 1,0 mg/mL de extrato de tamarindo (letra f), em uma suspensão mitocondrial pré-incubada em meio contendo cálcio e succinato, ocorreu uma diminuição quase imediata da absorvância inicial monitorada, em relação aos controles contendo EGTA (letra a) ou cálcio (letra b). Esse efeito foi indicativo do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, causando um inchamento osmótico mitocondrial de grande amplitude. Entretanto, a absorvância inicial foi quase totalmente recuperada na presença de CsA (letra i) e N-etilmaleimida (NEM) (letra j), os quais são moduladores clássicos da TPMM. Além disso, EGTA (letra g) ou vermelho de rutênio (letra h) um inibidor do *uniporter*, adicionados antes do extrato, mantiveram a absorvância inicial inalterada.

A adição de extrato 0,5 mg/mL (letra e) mostrou um retardo do processo, mas não afetou sua extensão. As

concentrações mais baixas de extrato (0,25 mg/mL e 0,1 mg/mL) exerceram seu efeito, porém de forma bem mais lenta e menos expressiva.

Figura 5. Efeito do extrato de tamarindo no inchamento osmótico mitocondrial.

As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas a 30°C em um meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L e Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), adicionado de succinato 5 mmol/L, rotenona 2 µmol/L e CaCl₂ 10 µmol/L (volume final 2,0 mL).

a. EGTA 0,2 mmol/L; **b.** CaCl₂ 10 µmol/L; **c.** Extrato 0,1 mg/mL; **d.** Extrato 0,25 mg/mL; **e.** Extrato 0,5 mg/mL; **f.** Extrato 1,0 mg/mL; **g.** EGTA 0,2 mmol/L + E 1,0 mg/mL; **h.** Vermelho de rutênio 1 µmol/L + E 1,0 mg/mL; **i.** CsA 1 µmol/L + E 1,0 mg/mL; **j.** NEM 20 µmol/L + E 1,0 mg/mL.

A seta indica a adição de extrato de tamarindo.

O traçado é representativo de três experimentos com preparações mitocondriais diferentes.

O inchamento osmótico mitocondrial induzido pelo extrato de tamarindo causou a despolarização da membrana mitocondrial interna (Figura 6) e o efluxo do cálcio pré-acumulado (Figura 7). Na Figura 6, a adição de extrato de tamarindo (0,1-1,0 mg/mL) foi seguida pela dissipação do potencial de membrana e o efeito concentração-dependente foi evidente, demonstrando correlação com os experimentos anteriores, visto que, a despolarização da membrana mitocondrial interna foi inibida quando CSA foi adicionada anteriormente à adição de extrato 1,0 mg/mL. O mesmo efeito foi observado na presença de EGTA (dado não apresentado).

A Figura 7 mostra o efluxo do cálcio acumulado pelas mitocôndrias, induzido pelo extrato de tamarindo. O extrato foi adicionado posteriormente à captação do cálcio pelas mitocôndrias energizadas com succinato, e pode-se observar que as concentrações de 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL de extrato causaram o efluxo do cálcio pré-acumulado em poucos minutos, sendo o efeito mais expressivo na concentração de 1,0 mg/mL. Entretanto, esse efeito foi completamente inibido por CSA.

Figura 6. Efeito do extrato de tamarindo sobre o potencial de membrana mitocondrial.

As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 5, exceto mitocôndria (1,0 mg/mL).

As mitocôndrias foram energizadas com succinato 5 mmol/L + rotenona 2,0 $\mu\text{mol/L}$.

Succinato, extrato e FCCP 1 $\mu\text{mol/L}$, foram adicionados onde indicam as setas.

O traçado é representativo de três experimentos com preparações mitocondriais diferentes.

- a- $CaCl_2$ 10 μ mol/L ou
CsA 1 μ mol/L + E 1,0 mg/mL
- b- E 0,25 mg/mL
- c- E 0,5 mg/mL
- d- E 1,0 mg/mL

Figura 7. Efeito do extrato de tamarindo no movimento de cálcio em mitocôndrias energizadas.

O cálcio livre foi monitorado em mitocôndrias isoladas (1,0 mg/mL), incubadas a 30°C, em meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), adicionado de rotenona 2 μ mol/L, $CaCl_2$ 10 μ mol/L e Calcium Green 5N 0,1 μ mol/L (volume final 2 mL). A captação foi iniciada pela adição de succinato 5 mmol/L.

Extrato e FCCCP 1 μ mol/L foram adicionados onde indicam as setas.

O traçado é representativo de três experimentos com preparações mitocondriais diferentes.

Atualmente é bem conhecido que o acúmulo de ERONs na mitocôndria pode levar a uma extensiva oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial e conseqüentemente promover a TPMM. Assim, a capacidade do extrato de tamarindo em gerar espécies reativas de oxigênio, mais especificamente peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e conseqüentemente provocar a oxidação dos grupamentos tiólicos das proteínas da membrana mitocondrial foi monitorado e os resultados estão demonstrados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. A Figura 8 mostra que na presença do extrato de tamarindo ocorreu a liberação de H_2O_2 nas concentrações de 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL (letras c e d, respectivamente) e que este efeito é dependente de cálcio, visto que na sua ausência (letra b) a produção deste radical é comparável ao controle sem adição de extrato (letra a). Além disso, a produção desta espécie reativa foi inibida por CsA (letra b). A produção de H_2O_2 junto à inibição do inchamento osmótico mitocondrial por NEM, um agente redutor de grupos tióis, sugerem a capacidade do extrato de tamarindo induzir a oxidação de grupamentos tiólicos da membrana mitocondrial. A Figura 9 demonstra que na presença de extrato ocorreu uma oxidação de

aproximadamente 16% destes grupos tiólicos em relação ao controle com EGTA, e que este efeito somente acontece na presença de cálcio. Na ausência deste, a adição de extrato não teve nenhum efeito, sendo a resposta semelhante aos controles contendo EGTA ou Ca^{+2} .

Figura 8. Efeito do extrato de tamarindo sobre a liberação de H_2O_2 .

As mitocôndrias (1,0 mg/mL), foram incubadas a 30°C, em meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), adicionado de succinato 5 mmol/L, rotenona 2 $\mu\text{mol/L}$, CaCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, peroxidase de raiz forte 5 mU e Amplex Red 25 $\mu\text{mol/L}$ (volume final 2 mL).

a. controle (sem adição de extrato), **b.** EGTA 0,2 mmol/L + Extrato 1,0 mg/mL ou CsA 1 $\mu\text{mol/L}$ + Extrato 1,0 mg/mL, **c.** Extrato 0,5 mg/mL, **d.** Extrato 1,0 mg/mL.

O traçado é representativo de três experimentos com preparações mitocondriais diferentes.

Figura 9. Efeito do extrato de tamarindo sobre a oxidação dos grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial.

As condições de incubação e a metodologia estão descritas no item 3.9.

C + = CaCl₂ 10 μ mol/L + KH₂PO₄ 1,0 mmol/L

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de experimentos com diferentes preparações (n = 3);

ns = não significativo, *** p < 0,001, * p < 0,5.

Considerando o efeito do extrato de tamarindo em relação à oxidação de grupamentos tiólicos das proteínas da membrana mitocondrial e sobre a liberação de H₂O₂ pelas mitocôndrias, o seu comportamento em relação à lipoperoxidação da membrana mitocondrial, oxidação da glutathiona reduzida (GSH) e oxidação dos nucleotídeos de

piridina (NAD(P)H) foram avaliados. Os resultados demonstram que o extrato de tamarindo na mesma faixa de concentração utilizada (0,1-1,0 mg/mL) não causou lipoperoxidação da membrana mitocondrial (Figura 10), bem como, não afetou o conteúdo de glutathiona reduzida (Figura 11).

Figura 10. Efeito do extrato de tamarindo sobre a lipoperoxidação mitocondrial.

As condições de incubação e a metodologia estão descritas no item 3.11.

C+ = $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ + citrato 2,0 mmol/L
Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de experimentos com diferentes preparações (n = 3);
ns = não significativo em relação ao controle com CaCl_2 ou EGTA, **a.** em relação ao C+, *** p < 0,001.

Figura 11. Efeito do extrato de tamarindo sobre o conteúdo de glutathiona reduzida.

As condições de incubação e a metodologia estão descritas no item 3.12.

C+ = CaCl₂ 10 µmol/L + *t*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH) 250 µmol/L.

Os valores correspondem à média ± DPM de experimentos com diferentes preparações (n = 3); **ns** = não significativo, ******* p < 0,001.

A Figura 12 mostra que o extrato de tamarindo (1,0 mg/mL) causou a oxidação dos nucleotídeos de piridina. A pré-incubação das mitocôndrias com β-hidroxibutirato e isocitrato, os quais são capazes de restabelecer o conteúdo de nucleotídeos de piridina, preveniu a diminuição da oxidação dos nucleotídeos de

piridina pelo extrato. Além disso, na presença de CsA, EGTA ou NEM observou-se que o extrato de tamarindo não afetou o conteúdo de NAD(P)H.

Figura 12. Efeito do extrato de tamarindo sobre a oxidação dos nucleotídeos de piridina.

A oxidação dos nucleotídeos de piridina foi monitorado a 30°C, em mitocôndrias (1,0 mg/mL), em meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 25 mmol/L, Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4), succinato 5 mmol/L, rotenona 2 μ mol/L e CaCl_2 10 μ mol/L.

Isocitrato 2,0 mmol/L e β -hidroxibutirato (β -OH) 10 mmol/L; NEM 20 μ mol/L ou EGTA 0,2 mmol/L foram adicionados antes da adição do extrato.

O traçado é representativo de três experimentos com preparações mitocondriais diferentes.

A Figura 13 mostra a redução do conteúdo de ATP mitocondrial causada pelo extrato de tamarindo. Este efeito se mostrou mais significativo na concentração de 1,0 mg/mL de extrato, também foi mais evidente quando comparado com o controle onde as mitocôndrias foram pré-incubadas na ausência de extrato e na presença de EGTA + CsA.

Figura 13. Efeito do extrato de tamarindo sobre o conteúdo de ATP mitocondrial.

As condições de incubação e a metodologia estão descritas no item 3.14.

C = EGTA 0,2 mmol/L + CsA 1 μ mol/L; **C** = EGTA 0,2 mmol/L; **C** = CaCl₂ 10 μ mol/L; **C+** = FCCP 1,0 μ mol/L.

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de experimentos com diferentes preparações (n = 3);

ns = não significativo, ******* p < 0,001,

***** p < 0,5.

4.3. Atividade antioxidante *in vitro* do extrato de tamarindo

A capacidade *scavenger* ou doadora de hidrogênio do extrato de tamarindo foi avaliada usando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (Figura 14). O extrato atuou como *scavenger* de radical DPPH na faixa de concentração de 0,5-10 mg/mL, porém, somente nas concentrações mais altas (7,5 e 10,0 mg/mL) apresentou capacidade antioxidante semelhante à da vitamina C 1,0 mg/mL ($\cong 97\%$), com aproximadamente 90% de seqüestro de radical livre.

Figura 14. Capacidade do extrato de tamarindo como *scavenger* de radical DPPH.

As condições experimentais estão descritas na metodologia (item 3.15.1)

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de três determinações realizadas em triplicata.

Visto que o radical superóxido participa ativamente na fase de iniciação da peroxidação lipídica, o extrato de tamarindo foi avaliado como *scavenger* deste radical através da redução do nitroblue tetrazolium (NBT). A Figura 15 mostra que o extrato de tamarindo na faixa de concentração analisada foi efetivo como *scavenger* deste radical, mas somente em concentrações acima de 5,0 mg/mL, sua inibição foi semelhante à do antioxidante trolox ($\cong$ 86% de inibição).

Figura 15. Capacidade do extrato de tamarindo como *scavenger* de radical superóxido.

As condições experimentais estão descritas na metodologia (item 3.15.2)

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de três determinações realizadas em triplicata.

Além de atuar como *scavenger* de radical DPPH e radical superóxido, o extrato de tamarindo também foi capaz de seqüestrar radical hidroxil, os quais foram gerados pela reação de Fenton no método da desoxiribose (Figura 16). Nesta metodologia o radical hidroxil, gerado na reação de Fenton pelo complexo ferro-EDTA com H_2O_2 , ataca a desoxiribose dando origem a produtos que sob aquecimento com o ácido tiobarbitúrico em pH ácido, forma um cromógeno de cor rosa. As substâncias *scavenger* de radical hidroxil competem com a desoxiribose pelo radical produzido, diminuindo a formação do cromógeno.

Figura 16. Capacidade do extrato de tamarindo como *scavenger* de radical hidroxil.

As condições experimentais estão descritas na metodologia (item 3.15.3)

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de três determinações realizadas em triplicata.

A capacidade quelante de Fe^{2+} do extrato de tamarindo foi avaliada através de um ensaio competitivo utilizando o indicador ácido dissulfônico da batofenantrolina (BPS). A Figura 17 mostra que o extrato de tamarindo possui capacidade quelante de Fe^{2+} em uma faixa de concentração surpreendentemente mais baixa, comparada à utilizada para os ensaios anteriores, indicando que esta é a atividade antioxidante mais expressiva deste extrato.

Figura 17. Capacidade quelante de Fe^{2+} do extrato de tamarindo.

As condições experimentais estão descritas na metodologia (item 3.15.4)

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de três determinações realizadas em triplicata.

Entre os muitos alvos biológicos do estresse oxidativo, os lipídeos estão entre as principais biomoléculas envolvidas. O malondialdeído (MDA) é o principal e mais estudado produto da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, pois este aldeído é uma molécula altamente tóxica, considerada um marcador da lipoperoxidação (DEL RIO et al., 2005). Desta forma, a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato de tamarindo foi avaliada através da inibição da lipoperoxidação da membrana mitocondrial induzida pelo sistema ferro/citrato (Figura 18). O extrato, na faixa de concentração analisada (0,5-10 mg/mL), inibiu a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e a proteção completa contra a peroxidação foi observada na concentração de 10,0 mg/mL.

Figura 18. Efeito do extrato de tamarindo sobre a lipoperoxidação mitocondrial induzida pelo sistema Fe^{2+} /citrato.

As condições experimentais estão descritas na metodologia (item 3.15.5).

C- = sem indução da lipoperoxidação.

C+ = $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ + citrato 2,0 mmol/L.

Os valores correspondem à média $\pm$ DPM de experimentos com diferentes preparações (n = 3);

ns = não significativo em relação ao C+;
******* p < 0,001, ****** p < 0,01, ***** p < 0,5 em relação ao C+.

5. Discussão

5.1. Efeito do extrato de tamarindo sobre a mitocôndria.

O estudo dos efeitos do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* L. sobre as mitocôndrias isoladas de fígado de rato evidenciaram que, na presença de cálcio, o extrato induz o inchamento osmótico mitocondrial, sendo o efeito concentração-dependente. O inchamento osmótico mitocondrial é um evento dependente da presença de cálcio no espaço intramitocondrial associado a um aumento repentino, transitório ou não, da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a solutos com peso molecular inferior a 1,5 kDa (HAWORTH & HUNTER, 1979), levando a abertura de um extenso poro protéico. A consequência primária da abertura deste poro é a despolarização da membrana mitocondrial, ocasionada pela perda da homeostase iônica promovendo a entrada de íons para o interior da matriz mitocondrial, este movimento de íons, em função da manutenção da osmolaridade, é acompanhado pelo movimento de água em direção a matriz, que por fim, acarreta no inchamento osmótico mitocondrial ou *swelling* mitocondrial (HALESTRAP, 2006; KAASIK et al., 2007). O poro de transição mitocondrial (PTP), por conseguinte pode levar a uma disfunção mitocondrial irreversível.

Este evento primário induzido pelo extrato de tamarindo, demonstrou correlação tanto com o estímulo da velocidade do estado 4 da respiração mitocondrial com conseqüente redução do RCR, quanto com a dissipação do potencial de membrana mitocondrial, visto que ambos os processos foram inibidos por CsA, um imunossupressor que se liga à proteína ciclofilina D, um componente essencial do agregado protéico que forma o PTP, prevenindo a abertura deste. A dissipação do potencial de membrana induzida pelo PTP pode levar ao efluxo de cálcio pré-acumulado (BERNARDI, 1999; RIZZUTO et al., 2000). Neste sentido, o extrato de tamarindo causou a liberação do cálcio pré-acumulado, a qual foi inibida por CsA, associando este processo também à abertura do PTP.

O inchamento osmótico mitocondrial induzido pelo extrato de tamarindo foi prevenido por EGTA e por vermelho de rutênio, confirmando a dependência de cálcio para o processo. A inibição deste por NEM, um reagente tiol monofuncional hidrofóbico e modulador clássico da TPMM, foi um indício que o extrato de tamarindo possivelmente estava oxidando os grupos tiólicos das proteínas da membrana mitocondrial interna. A oxidação

destes grupamentos pode ser originada por alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, causada por cálcio na presença de oxidantes de nucleotídeos de piridina mitocondrial e está associada à formação de agregados protéicos, devido à oxidação de tióis. O cálcio na presença de oxidantes parece ligar-se a algumas proteínas da membrana, favorecendo a formação de ditióis e induzindo conseqüentemente a mudança conformacional destas proteínas, devido à diminuição da distância entre grupos sulfidrilas críticos (FAGIAN et al., 1990; VALLE et al., 1993). Assim, a oxidação dos grupos tiólicos das proteínas tem um papel crítico sobre a abertura do PTP (CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1996).

A oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial induzida pelo extrato de tamarindo, na presença de cálcio, parece ter sido causada por compostos fenólicos presentes no *Tamarindus indica*, corroborando outros estudos da literatura. A análise de extratos da semente e do pericarpo do tamarindo demonstraram a presença de inúmeros polifenóis, incluindo flavonóides monoméricos (catequina, epicatequina, apigenina, luteolina e

narigina) e flavonóides oligoméricos (procianidinas) (SUDJAROEN et al., 2005) e a CLAE do extrato hidroalcoólico de tamarindo utilizado neste trabalho demonstrou a predominância de compostos com característica de flavonóides.

Nos últimos anos, o efeito desses compostos fenólicos sobre o PTP tem sido relacionado em muitos estudos em relação ao seu potencial antioxidante e protetor, mas também ao seu efeito pró-oxidante e indutor deste fenômeno. A curcumina, por exemplo, atuou como um indutor da TPMM em virtude da interação de produtos de oxidação deste polifenol com a membrana mitocondrial interna, causando a oxidação de grupamentos tiólicos estimulada na presença de baixas concentrações de cálcio, um efeito contraposto à sua atividade antioxidante (MORIN et al., 2001). Os flavonóides taxofolina e catequina (DORTA et al., 2005), este último um importante componente do extrato de tamarindo, bem como, o Vimang e seu principal componente, mangiferina (ANDREU et al., 2005; PARDO-ANDREU et al., 2006) também mostraram capacidade de induzir o PTP.

Tendo em vista que a mitocôndria em condições fisiológicas ou patológicas é uma importante fonte

geradora de ERONs, a oxidação de grupos tiólicos da membrana mitocondrial induzida pelo extrato de tamarindo na presença de cálcio poderia estar relacionado a um efeito pró-oxidante do extrato associado à produção de EROs. Contudo, a liberação de H_2O_2 pelas mitocôndrias foi inibida na presença EGTA e CsA, demonstrando que a produção desta espécie reativa de oxigênio foi decorrente da abertura do PTP. Atualmente, é conhecido que a TPMM provoca a liberação de moléculas pertencentes ao sistema oxidante como a glutathione, responsável pela detoxificação de H_2O_2 . Além disso, a cadeia transportadora de elétrons parece produzir maior quantidade de EROs, devido a perda de componentes como o citocromo *c* (LUETJENS et al., 2000). Embora o extrato de tamarindo tenha promovido um aumento da liberação de H_2O_2 , a mesma foi inibida por CsA. Esse efeito esclarece o fato do extrato não ter causado lipoperoxidação e também não ter alterado o conteúdo de GSH, confirmando que nestes eventos não há envolvimento de EROs.

Os mecanismos pelos quais oxidantes induzem a abertura do PTP é favorecido pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina mitocondrial (LEHNINGER et al., 1978), principalmente do NAD(P)H (VERCESI, 1987). Assim,

o estudo do efeito do extrato de tamarindo sobre a oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondrial demonstrou que a oxidação destes foi prevenida por CsA e NEM, moduladores da TPMM, e também foi dependente de cálcio, confirmando que este evento também, mais do que causa, ele é uma consequência da abertura do PTP. Na presença de β -hidroxibutirato um redutor específico de NAD^+ , o qual atua através de sua desidrogenase correspondente, gerando NADH e de isocitrato, o qual reduz NADP^+ nas mitocôndrias isoladas de fígado de rato, gerando NAD(P)H, o extrato não alterou o conteúdo dos nucleotídeos de piridina, sendo, portanto este evento de fato uma consequência da abertura do PTP.

A conservação da energia acoplada na forma de ATP é a mais importante função mitocondrial. Portanto, o desequilíbrio do metabolismo energético ou do *status* redox celular ativa mecanismos que levam à morte celular por necrose ou apoptose, com importante envolvimento da TPMM, através da liberação de proteínas pró-apoptóticas como citocromo *c* ou via depleção de ATP. Neste contexto, a TPMM tem sido associada à necrose ou apoptose dependendo do conteúdo de ATP celular, cuja depleção é favorável à indução da necrose (SUSIN et al., 1998;

KOWALTOWSKI, 2000; GRATAGLIANO et al., 2002). A redução do conteúdo de ATP mitocondrial induzida pelo extrato de tamarindo foi inibida por CsA, sendo portanto, uma consequência do inchamento osmótico mitocondrial, o qual é um fenômeno bem conhecido como capaz de prejudicar a fosforilação oxidativa. Assim, o extrato de tamarindo mostra um potencial para causar a morte celular tanto por apoptose quanto por necrose, associado tanto à indução do inchamento osmótico mitocondrial por si, quanto pela depleção de ATP resultante deste evento. Embora este efeito possa ser considerado tóxico para as células normais, o mesmo apresenta um potencial terapêutico contra as células tumorais, as quais podem não possuir os mecanismos de defesa para a morte da célula (HSU et al., 2004; YU et al., 2004; PARDO-ANDREU et al., 2006).

Em estudos anteriores nós demonstramos que o extrato de tamarindo possui atividade antioxidante em diferentes sistemas (MARTINELLO et al., 2006), em concentrações mais altas do que as utilizadas neste estudo, caracterizando a ação pró-oxidante do extrato de tamarindo, avaliada em relação ao PTP neste estudo. Este efeito duplo é comum nos polifenóis (AMES et al., 1995),

e deve ser levado em conta, mais especificamente no caso do extrato de tamarindo, visto que as concentrações necessárias para realizar a ação pró-oxidante são bem mais baixas do que aquelas necessárias para realizar a atividade antioxidante.

5.2. Atividade antioxidante *in vitro* do extrato de tamarindo.

Atualmente é bem conhecido que radicais livres e espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio desenvolvem um papel importante na etiologia de numerosas doenças humanas. Estas espécies reativas são formadas no corpo como consequência do metabolismo aeróbico, causando danos em muitos componentes intracelulares, como ácido nucléico, proteínas e lipídeos. Embora o organismo possua sua própria defesa antioxidante, em algumas situações, a produção de espécies reativas pode estar tão aumentada, que esgota a capacidade antioxidante desses sistemas de defesa. Em virtude desta agressão, tem sido de grande relevância para a prevenção e terapêutica das doenças, a procura por novas fontes de antioxidantes sintéticos e naturais. Nesse sentido, o *Tamarindus indica* L. se mostrou um antioxidante promissor nos estudos *in vitro* e *in vivo* em hamsters hipercolesterolêmicos (MARTINELLO et al., 2006).

A capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto de tamarindo foi avaliada através de métodos analíticos freqüentemente usados em outros estudos. Além disso, levou-se em consideração a necessidade de se analisar

vários métodos capazes de fornecer um perfil da atividade antioxidante do extrato. Visto que, o processo de oxidação-antioxidação é complexo e pode envolver várias vias. Primeiro, o extrato bruto de tamarindo foi avaliado frente ao radical estável difenilpicrilidrazil. A variação na absorvância do DPPH, na presença de uma substância antioxidante, torna-o um método apropriado para avaliar a capacidade *scavenger* de radicais livres gerados independentes de qualquer sistema enzimático ou baseado em metais (MELLORS & TAPPEL, 1966). O extrato de tamarindo foi capaz de seqüestrar o radical livre DPPH em todas as concentrações analisadas (0,5-10,0 mg/mL). Entretanto, a sua capacidade antioxidante não foi comparável à da vitamina C na mesma concentração (1,0 mg/mL), uma vez que o extrato mostrou uma redução do DPPH de aproximadamente 35% frente à redução de aproximadamente 97% da vitamina C (dados não apresentados). Somente nas concentrações mais altas (7,5 e 10,0 mg/mL) o extrato atingiu a mesma capacidade *scavenger* de radicais DPPH obtidas para a vitamina C. Este mesmo perfil antioxidante foi observado para a inibição da lipoperoxidação mitocondrial, confirmando os dados já descritos na literatura que indicam que estes

dois métodos apresentam uma boa correlação (REKKA & KOUROUNAKIS, 1991).

Tem sido sugerido que os compostos fenólicos presentes em extratos possuem capacidade *scavenger* devido à disposição destes de doar hidrogênio, desta maneira acelerando a conversão da H_2O_2 em H_2O . A análise do extrato bruto de tamarindo em relação à capacidade *scavenger* de radical hidroxil e radical superóxido demonstrou as mesmas características na curva dose-resposta, atingindo aproximadamente 90% de inibição na concentração de 7,5 mg/mL. Assim, o extrato bruto de tamarindo mostrou-se capaz de seqüestrar radical hidroxil, bem como seu precursor o radical superóxido.

A atividade antioxidante do extrato de tamarindo mais surpreendente observada neste estudo foi com relação à atividade quelante de Fe^{2+} , a qual foi evidente em concentrações bem menores comparados aos outros estudos anteriores.

Em resumo, *in vitro*, o extrato de tamarindo apresentou atividade *scavenger* de radical DPPH, radical superóxido e radical hidroxil, e ainda protegeu a lipoperoxidação de membrana e demonstrou propriedade quelante de ferro.

6. Conclusões

Neste estudo, o efeito do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* em mitocôndrias isoladas de fígado de rato foi concentração-dependente e estritamente dependente de cálcio, causando a indução do PTP na membrana mitocondrial e acarretando outros processos mitocondriais como:

1. Aumento da velocidade de estado basal (V_4);
2. Dissipação do potencial de membrana mitocondrial;
3. Liberação do cálcio pré-acumulado;
4. Acúmulo de EROs nas mitocôndrias, sem contudo estar associado à condição de estresse oxidativo;
5. Oxidação dos nucleotídeos de piridina e proteínas tiol da membrana mitocondrial;
6. Depleção do conteúdo de ATP mitocondrial, a qual pode causar a morte celular por necrose ou apoptose.

Em relação à atividade antioxidante *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* observou-se a capacidade *scavenger* de radical livre DPPH, radical superóxido e radical hidroxil, e ainda a inibição da lipoperoxidação mitocondrial induzida, porém a atividade mais expressiva foi em relação à capacidade quelante de Fe^{2+} .

7. Bibliografia

ÅKERMAN, K.E.O.; WIKSTRÖM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.68, p.191-197, 1976.

AMES, B.N.; GOLD, L.S.; WILLET, W.C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.92, p.5258-5265, 1995.

ANDREU, G.; DELGADO, R.; VELHO, J.; CURTI, C.; VERCESI A.E. Mangiferin, a natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.439, p.184-193, 2005.

ANDREYEV, A.YU.; KUSHNAREVA, YU.E.; STARKOV, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry**, Washington, v.70, p.246-264, 2005.

BERNARDI, P.; BASSO, E.; COLONNA, R.; CONSTANTINI, P.; DI LISA, F.; ERIKSSON, O.; FONTAINE, E.; FORTE, M.; ICHAS, F.; MASSARI, S.; NICOLLI, A.; PETRONILLI, V.; SCORRANO, L. Perspectives on the mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1365, p.200-206, 1998.

BERNARDI, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v.79, p.1127-1155, 1999.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, London, v.134, p.707-716, 1973.

BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.70, p.2837-2839, 1973.

BRATTON, S.B.; COHEN, G.M. Apoptotic death sensor: An organelle's alter ego? **TRENDS in Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v.22, p.306-315, 2001.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Reviews**, Baltimore, v.56, p. 317-333, 1998.

BROOKES, P.S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, Bethesda, v.287, p.C817-C833, 2004.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (ED.). **Biochemical Toxicological**, Oxford: IRL Press, 1987, p.217-254.

CALGARO-HELENA, A.F.; DEVIENNE, K.F.; RODRIGUES, T.; DORTA, D.J.; RADDI, M.S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. Effects of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chem. Biol. Interact.**, Clare, v.161, p.155-64, 2006.

CARAFOLI, E.; CROMPTON, M. The regulation of intracellular calcium by mitochondria. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.307, p.269-284, 1978.

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.56, p.395-433, 1987.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A.; JABOR, J.R.; SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS PharmSciTech.**, Alexandria, v.7, p.1-8, 2006.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.18, p.479-486, 1995.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.217, p.383-427, 1955.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.**, New York, v.17, p.65-134, 1956.

CHANG, W.S.; LEE, Y.J.; LU, F.J.; CHIANG, H.C. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. **Anticancer Res.**, Athens, v. 13, p. 2165-2170, 1993.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Heidelberg, v.15, p.316-328, 2005.

DIRK, A.J.; JONES, K.M. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, Bethesda, v.291, p.1208-1212, 2006.

DORTA, D.J.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E. RODRIGUES, T.; PRADO, I.M.; CALGARO-HELENA, A.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. **Chem. Biol. Interac.**, Clare, v.152, p.67-78, 2005.

EL SHEIK, H.S.H.; BASSHIR, A.K.; SULIMAN, S.M.; WASSILA, M.E. Toxicity of certain Sudanese plant extracts to cercarie and miracidia of *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Crude Drug Res.**, Lisse, v.28, p.241-245, 1990.

FAGIAN, M.M.; PEREIRA-da-SILVA, L.; MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.265, p.19955-19960, 1990.

FISKUM, G.; LEHNINGER, A.L. The mechanisms and regulation of mitochondrial Ca^{2+} transport. **Fed. Proc.**, Washington, v.39, p.2432-2436, 1980.

GIULIVI, C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. **Biochem. J.**, London, v.332, p.673-679, 1998.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.11038-11043, 1998.

GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton reagents. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.15, p.435-445, 1993.

GRATTAGLIANO, I.; PORTINCASA, P.; PALMIERI, V.O.; PALASCIANO, G. Overview on the mechanisms of drug-induced liver cell death. **Ann. Hepatol.**, México, p.162-168, 2002.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S-S.; GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: Physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, Baltimore, v.267, p.C313-C339, 1994.

GUNTER, T.E.; BUTINAS, L.; SPARAGNA, G.; ELISEEV, R.; GUNTER, K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. **Cell Calcium**, Edinburgh, v.28, p.285-296, 2000.

HALESTRAP, A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v.34, p.232-237, 2006.

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

HAWORTH R.A.; HUNTER, D.R. The Ca^{2+} -induced membrane transition of rat liver mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.195, p.460-467, 1979.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, San Diego, v.74, p.214-226, 1976.

HSU, Y-L.; KUO, P-L.; LIN, C-C. Acacetin inhibits the proliferation of HepG2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.67, p.823-829, 2004.

JOUAVILLE, L.S.; ICHAS, F.; MAZAT, J.P. Modulation of cell calcium signals by mitochondria. **Mol. Cell Biochem.**, Dordrecht, v.184, p. 371-376, 1998.

KAASIK, A.; SAFIULINA, D.; ZHARKOVSKY, A.; VEKSLER, V. Regulation of mitochondrial matrix volume. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, Bethesda, v.292, p.157-163, 2007.

KADENBACH, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1604, p.77-94, 2003.

KIM, J.S.; HE, L.; QIAN, T.; LEMASTERS, J.J. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. **Curr. Mol. Med.**, Hilversum, v.3, p.527-535, 2003.

KIRKINEZOS, I.G.; MORAES, C.T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Semin. Cell Dev. Biol.**, London, v.12, p.449-457, 2001.

KIRSCH, M.; DE GROOT, H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? **FASEB J.**, Bethesda, v.15, p.1569-1574, 2001.

KOMUTARIN, T.; AZADI, S.; BUTTERWORTH, L.; KEIL, D.; CHITSOMBOON, B.; SUTTAJIT, M.; MEADE, B.J. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo*. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.42, p.649-658, 2004.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; GRIJALBA, M.T.; BECHARA, E.J.; VERCESI, A.E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.271, p.2929-2934; 1996.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.26, p.463-471, 1999.

KOWALTOWSKI, A.J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: Beyond ATP production. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.33, p.241-250, 2000.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.495, p.12-15, 2001.

LAHOUEL, M.; AMEDAH, S.; ZELLAGUI, A.; TOUIL, A.; RHOUATI, S.; BENVACHE, F.; LEGHOUCHI, E.; BOUSSEBOUA, H. The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxydant effect and flavonoids concentration. **Therapie**, Auckland, v.61, p.347-55, 2006.

LANHERS M.C.; FLEURENTIN J.; GUILLEMI F. *Tamarindus indica* L. **Ethnopharmacologia**, Paris, v.18, p.42-57, 1996.

LEHNINGER, A.L. Oxidative phosphorylation. **Harvey Lect.**, New York, v.49, p.176-215, 1955.

LEHNINGER, A.L. The mitochondrion. **WA Benjamin Inc**, New York, 1964.

LEHNINGER, A.L.; VERCESI, A.E.; BABABUNMI, E.A. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, Washington, v.75, p.1690-1694, 1978.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **In: Principle of Biochemistry. 3th edição**, New York: Worth Publishers, cap. 19, p.515-539, 2002.

LIGERET, H.; BARTHELEMY, S.; ZINI, R.; TILLEMENT, J.P.; LABIDALLE, S.; MORIN, D. Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.36, p.919-929, 2004.

LITSKY, M.L.; PFEIFFER, D.R. Regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by external adenine nucleotides: The uniportes behaves like a gated chanel wich is regulated by nucleotides and divalent cations. **Biochemistry**, Washington, v.36, p.7071-7080, 1997.

LUETJENS, C.M.; BUI N.T.; SENGPIEL, B.; MUNSTERMANN, G.; POPPE, M.; KROHN, A.J.; BAUERBACH, E.; KRIEGLSTEIN, J.; PREHN, J.H. Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: Cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. **J. Neurosc.**, v.20, Washington, p.5715-5723, 2000.

MAITI, R.; JANA, D.; DAS, U.K.; GHOSH, D. Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.92, p.85-91, 2004.

MAITI, R.; DAS, U.K.; GHOSH, D. Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.28, p.1172-1176, 2005.

MARTINELLO, F.; SOARES, S.M.; FRANCO, J.J.; SANTOS, A.C.; SUGOHARA, A.; GARCIA, S.B.; CURTI, C.; UYEMURA, S.A. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.44, p.810-818, 2006.

McSTAY, G.P.; CLARKE, S.J.; HALESTRAP, A.P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochem. J.**; London, v.367, p.541-548, 2002.

MELLORS, A.; TAPPEL, A.L. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.241, p.4353-4356, 1966.

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

MORELAND, D.E. Effects of toxicants on oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Hodgson, E.; LEVI, P.E. In: **Introduction to Biochemical Toxicological**, Norwalk, C.T., Appleton & Lange, p.345-366, 1994.

MORIN, D.; BARTHÉLÉMY, S.; ZINI, R.; LABIDALLE, S.; TILLEMENT, J-P. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.495, p.131-136, 2001.

MURPHY, A.N.; BREDESEN, D.E.; CORTOPASSI, G.; WANG, E.; FISKUM, G. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.93, p.9893-9898, 1996.

MUSCARI, A.; PUDDU, G.M.; PUDDU, P. Lipid-lowering drugs: are adverse effects predictable and reversible? **Cardiology**, Basel, v.97, p.115-121, 2002.

NICHOLLS, D.G.; AKERMAN, K. E. O. Mitochondrial calcium transport. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.683, p.57-88, 1982.

NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. Proton current and respiratory control. In: **Bioenergetics 3**, London, Academic Press Inc., 3th edition, p.69-75, 2002.

NOVGORODOV, S.A.; GUDZ, T.I. Permeability transition pore of the inner membrane can operate in two open state with different selectivities. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v.28, p.139-146, 1996.

OLIVEIRA, H.C.; COSSO, R.G.; ALBERICI, L.C.; MACIEL, E.N.; SALERNO, A.G.; DORIGHELLO, G.G.; VELHO, J.A.; DE FARIA, E.C.; VERCESI, A.E. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J.**, Bethesda, v.19, p.278-280, 2005.

PARDO-ANDREU, G.; DORTA, D.J.; DELGADO, R.; CAVALHEIRO, R.; SANTOS, A.C.; VERCESI, A.E.; CURTI, C. Vimang (*Mangifera indica* L. extract) induces permeability transition in isolated mitochondria, closely reproducing the effect of mangiferin, Vimang's main component. **Chem. Biol. Interact.**, Clare, v.159, p.141-148, 2006.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; FLERLAGE, N.; BURILLO, J.; CODINA, C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.50, p.6882-6890, 2002.

PEDERSEN, P.L.; GRENAWALT, J.W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMANTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Meth. Cell Biol.**, New York, v.20, p.411-481, 1978.

PEDERSEN, P.L. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: A brief overview. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v.31, p.291-303, 1999.

PETRUSSE, E.; BRAIDOT, E.; NAGY, G.; VIANELLO, A.; MACRI, F. Electrical potential dissipation induced by free fatty acids in pea stem mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.307, p.267-271, 1992.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.63, p.1035-1042, 2000.

RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCIA, A.; RODRIGUEZ, C.A.; RIVERO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.87, p.241-246, 2003.

REKKA, E.; KOUROUNAKIS, P.N. Effect of hydroxyethyl rutosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v.43, p.486-491, 1991.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.20, p.933-956, 1996.

RIMBAU V.; CERDAN C.; VILA, R.; IGLESIAS J. Anti-inflammatory activity of some extracts from plants used in the traditional medicine of North-African countries. **Phytother. Res.**, London, v.13, p.128-132, 1999.

RIZZUTO, R.; BERNARDI, P.; POZZAN, T. Mitochondria as all-round players of the calcium game., **J. Physiol.**, Paris, v.529, p.37-47, 2000.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Ann. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.22, p.19-34, 2002.

SALVI, M.; BRUNATI, A.M.; CLARI, G.; TONIELLO, A. Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1556, p.187-196, 2002.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, D.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.19, p.481-486, 1995.

SANTOS, A.C.; UYEMURA, S.A.; LOPES, J.L.; BAZON, J.N.; MINGATTO, F.E.; CURTI, C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.24, p.1455-1461, 1998.

SCHILD, L.; REINHECKEL, T.; WISWEDEL, I.; AUGUSTIN, W. Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation, involvement of oxidative protein modification. **Biochem. J.**, London, v.328, p.205-210, 1997.

SKULACHEV, V.P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**, Dordrech, v.11, p.473-485, 2006.

SUDJAROEN, Y.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; HULL, W.E.; ERBEN, G.; SPIEGELHALDER, B.; CHANGBUMRUNG, S.; BARTSCH, H.; OWEN, R.W. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed and pericarp. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.43, p.1673-1682, 2005.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1366, p.151-165, 1998.

TATOYAN, A.; GIULIVI, C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.11044-11048, 1998.

TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. **Arch. Bioch. Biophys.**, New York, v.308, p.278-284, 1994.

TSUDA, T.; WATANABLE, M.; OHSHIMA, K.; YAMAMOTO, A.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Antioxidative components isolated from the seed of tamarind (*Tamarindus indica* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.42, p.2671-2674, 1994.

TYLER D.D. A protective function of superoxide dismutase during respiratory chain activity. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.396, p.335-346, 1975.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L. Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.25, p.1320-1323, 2002.

VALLE, V.G.R.; FAGIAN, M.M.; PARENTONI, L.S.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.307, p.1-7, 1993.

VERCESI, A.E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.252, p.171-178, 1987.

VERCESI, A.E. Mitocôndria: ATP, calor e morte celular. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.34, p.16-23, 2003.

VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; OLIVEIRA, H.C.F. CASTILHO, R.F. Mitochondrial Ca^{2+} transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. **Front. Biosc.**, Manhasset, v.11, p.2554-2564, 2006.

VOTYAKOVA, T.V.; REYNOLDS, I.J. Ca²⁺-induced permeabilization promotes free radical release from rat brain mitochondria with partially inhibited complex I. **J. Neurochem.**, Oxford, v.93, p.526-537, 2001.

YAGI, K. *In: Free radical and antioxidant protocols in methods in molecular biology*. 1st edition, Totowa, v.108, p.101-106, 1998.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, S.M.; KHALIFA, T.I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. **Planta Med.**, Stuttgart, v.68, p.957-960, 2002.

YU, Z.; LI, W.; LIU, F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v.215, p.159-166, 2004.

ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1241, p.139-176, 1995.