UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito do extrato de Azadirachta indica (nim) sobre resposta de
hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de
Rubus fruticosus

Veronica Paviani

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito do extrato de *Azadirachta indica* (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de *Rubus fruticosus*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Veronica Paviani

Orientadora: Profa. Dra. Carem Gledes

Vargas Rechia

Ribeirão Preto 2010

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.

Paviani, Veronica.

Efeito do extrato de *Azadirachta indica* (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de *Rubus fruticosus*. Ribeirão Preto, 2010.

122 f..: 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Vargas-Rechia, C.G.

1. Resposta de hipersensibilidade. 2. Morte celular programada. 3. Mitocôndrias. 4. EROs. 5. Nim. 6. *Azadirachta indica*. 7. *Rubus fruticosus*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

١.		•	D -	
ν	'eron	nca	Pa۱	<i>ı</i> ıanı
-	• • • •			

Efeito do extrato de *Azadirachta indica* (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de *Rubus fruticosus*

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientadora: Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia

Aprovada em://	
	Banca Examinadora
Prof. Dr	
	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que sempre me iluminou e me acompanhou em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais José Antonio Paviani e Lazará Benedita Ferreira Paviani que sempre se esforçaram para que eu pudesse cumprir meus objetivos.

A minha irmã Anaclaudia Paviani e ao meu cunhado Erivaldo da Silva Junior pelo companheirismo.

Ao meu noivo Plínio Nogueira de Arrumada Sampaio que sempre foi e continuará sendo uma benção na minha vida.

Este trabalho é dedicado a todos vocês, que sempre acreditaram que eu pudesse conquistar mais esta importante etapa em minha vida. Muito obrigado a todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Ana Maria Nogueira de Arruda Sampaio e José Sabino Sampaio Junior que me acolheram em sua casa por estes dois anos e me ajudaram. Sem a ajuda deles eu não teria tido coragem de vir para Ribeirão Preto em busca deste mestrado.

A minha orientadora Carem Gledes Vargas Rechia uma grande pessoa e profissional que permitiu que eu realizasse o sonho da minha vida de fazer um mestrado em uma faculdade tão conceituada.

A minha amiga Ângela Mitie Otta Kinoshita que despertou em mim o gosto pela pesquisa e que sempre acreditou que um dia eu poderia conquistar este título.

Aos grandes amigos que conheci em Ribeirão Preto: José Franciraldo Lima, Roberta de Mello, Viviane Cristina Gumiero, Wagner Rodrigo de Souza, muito obrigada pela amizade, companheirismo e pelas dicas que me deram enquanto eles estavam presentes no laboratório, muito obrigado.

Agradeço também a Cibele Aparecida Cesila que me ensinou muito bem isolar e trabalhar com as mitocôndrias.

Aos queridos colegas de laboratório: Vitor Francisco dos Santos, Amanda Henriques Cavalheiro e Rita de Cássia Rende pela boa relação profissional e pessoal que sempre tivemos e por sempre me ajudaram.

Ao professor Carlos Curti um excelente pesquisador que permitiu com muito boa vontade que eu utilizasse seu laboratório para realizar os experimentos com mitocôndrias e ainda me ajudou esclarecendo minhas dúvidas e discutindo comigo meus resultados. Aos seus alunos: Cezar Rangel Pestana, Fernando Postalli Rodrigues e Felipe Augusto Godoy por tudo que fizeram por mim, pela paciência que tiveram comigo todas as vezes que eu precisei deles.

Aos demais professores do laboratório de bioquímica: Ana Isabel de Assis Pandochi, Augusto César Cropanese Spadaro e Yara Maria Lucisano Valim pela atenção que eles sempre deram aos alunos e a pesquisa.

A professora Luciane Carla Alberici, recém chegada no laboratório de bioquímica, que foi muito prestativa comigo ajudando na correção deste trabalho.

Ao professor Oswaldo Baffa da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto que com muito boa vontade e atenção permitiu que eu utilizasse seu laboratório para os experimentos de atividade antioxidante.

As técnicas de laboratório Ana Cristina Morselli Polizello, leda Maria Razaboni Prado, Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini e Luciana Ceribeli pela grande competência, paciência que elas dedicam aos alunos, inclusive eu.

Ao Alcides Silva Pereira e a Nadir Mazzucato pelo ajuda que eles sempre prestaram ao nosso laboratório e pelas conversas que muitas vezes tivemos, que ajudaram muito.

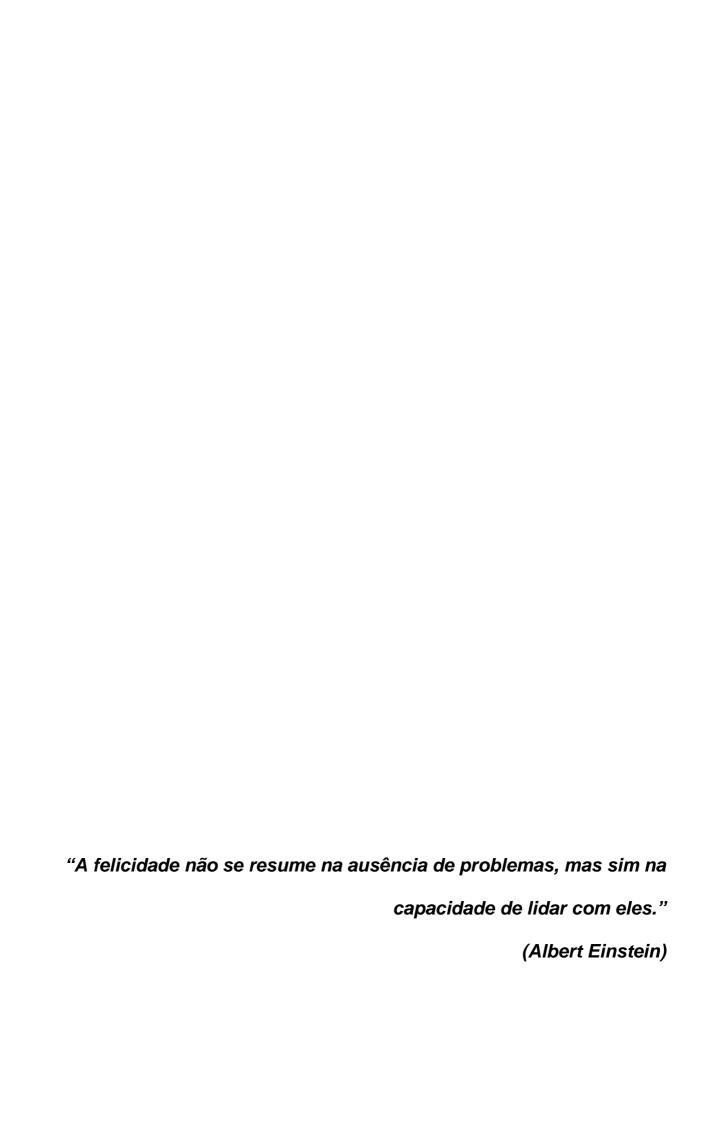
A Maria Regina de Pila Raphaloski funcionária muito competente que sempre me ajudou todas as vezes que recorri a ela.

Ao professor Sérgio Akira Uyemura, pela ajuda no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus queridos amigos de Taquaritinga: Mirian, Andre, Tiago, Valdir, Edvania e Ana Paula que sempre torceram por mim e sempre ficam felizes pelas minhas conquistas.

E finalmente a todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior, pelo auxilio financeiro durante estes dois anos.



RESUMO

PAVIANI, V. Efeito do extrato de Azadirachta indica (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de Rubus fruticosus. 2010. 122 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

As plantas, assim como outros organismos, possuem a capacidade de se defenderem contra ataque de patógenos. Uma das respostas desencadeadas pelo reconhecimento do patógeno pelas células vegetais é a hipersensibilidade (RH), que envolve a morte imediata das células do sítio primário de infecção, oferecendo resistência ao crescimento do patógeno. Muitas evidências sugerem a participação da mitocôndria neste processo de morte celular programa. O nim (Azadirachta indica) é conhecido devido as suas propriedades medicinais e inseticidas, sendo que os estudos sobre a ação inseticida dessa planta restringemse a análise de seus mecanismos de ação sobre insetos e também de seus efeitos sobre trabalhadores rurais que fazem uso de produtos a base de nim. Entretanto não há na literatura pesquisada, trabalhos de seus impactos sobre o sistema vegetal. A partir dos resultados previamente obtidos em nosso laboratório e com as análises dos dados da literatura, consideramos de grande importância dar continuidade a esse estudo do efeito do nim como elicitor, avaliando quais mecanismos que levam ao fenômeno de resistência vegetal. O extrato de nim (EB) foi preparado a partir das sementes, sendo caracterizado bioquimicamente pela quantificação de compostos fenólicos, açúcares e proteínas. A atividade antioxidante foi avaliada sendo possível observar que o extrato das sementes de nim possui forte atividade antioxidante de maneira dose-dependente com IC₅₀ de 14,85 mg/mL. Para os ensaios biológicos foi utilizado EB nas concentrações de 0,1 a 5 mg/mL isolado ou em associação com AS a 1 µmol/L ou 1 mmol/L. Para determinação da morte celular foi observado o efeito do EB nas concentrações de 5 e 0,1 mg/mL isolado ou em associação com AS 1 µmol/L nos tempos de 0 a 8 horas. Diante dos resultados foi observado que o EB na concentração de 0,1 mg/mL isolado ou em associação com AS 1 µmol/L foi capaz de causar morte celular em células de Rubus fruticosus de forma mais significativa do que o EB isolado ou em associação com AS na concentração de 5 mg/mL. No tempo de 8 horas, foi observado uma porcentagem de morte celular de 64 % para células elicitadas com EB 0,1 mg/mL isolado e 71 % para células elicitadas com EB 0,1 mg/mL em associação com AS. A diminuição da produção de EROs e da produção de AS endógeno bem como o aumento da produção de compostos fenólicos foi observado em células intactas elicitadas com EB isolado. No entanto quando a células foram elicitadas com EB em associação com AS observamos uma diminuição da produção de compostos fenólicos com o aumento da produção de AS endógeno. Em mitocôndrias isoladas foi avaliado o consumo de oxigênio, o potencial de membrana e a produção de EROs com o EB isolado e sua associação com AS 1 mmol/L. Foi observado que o EB isolado ou em associação com AS foi capaz de diminuir a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória sendo este efeito mais acentuado quando o nim foi administrado juntamente com AS, onde a porcentagem de inibição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória na presença de EB em associação com AS foi de 79 % no estado 3 da respiração e 62 % no estado 4. Sobre o potencial de membrana observamos que o

EB isolado ou em associação com AS foi capaz de diminuir o potencial de membrana, porém de forma pouco significativa. Para a produção de EROs observamos que o EB isolado foi capaz de diminuir a produção de EROs em mitocôndrias isoladas em cerca de 55 a 20 % na presença de antimicina A e 39 a 10 % na presença de rotenona, porém quando o EB foi administrado juntamente com AS observamos uma diminuição da produção de EROs somente para o EB nas concentrações de 0,5; 1 e 5 mg/mL. Com os resultados apresentados neste trabalho e os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório é possível sugerir que o extrato das sementes de nim possui um efeito protetor sobre células de *Rubus fruticosus*.

Palavras Chaves: Resposta de hipersensibilidade. Morte celular programada. Mitocôndrias. EROs. Nim. *Azadirachta indica. Rubus fruticosus*.

ABSTRACT

PAVIANI, V. Effect of Azadirachta indica extract (neem) on hypersensitivity response mediated by salicylic acid in cells of Rubus fruticosus. 2010. 122 f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Plants, like other organisms, have the capacity to defend themselves against attack by pathogens. One of the responses triggered by pathogen recognition by plant cells is the hypersensitive response (HR), which involves the immediate death of cells in the primary site of infection, providing resistance to the pathogen growth. In this regard, it has been well established that mitochondria are involved in cell death. The neem tree (Azadirachta indica) is known due to its medicinal and insecticidal properties; studies on the insecticidal action of this plant had been restricted to the analysis of their action mechanisms on insects and their effects on rural workers who use neem-based products. However, its impact on plant systems has not been addressed. Considering previous results from our laboratory and literature data we assessed the effects of neem as elicitor, particularly the mechanisms leading to the phenomenon of plant resistance. The neem extract (EB) was prepared from the seeds, characterized biochemically by quantification of phenolic compounds, sugars and proteins. The extract showed strong dose-dependent antioxidant activity (IC₅₀ of 14.85 mg/mL). EB concentrations of 0.1-5 mg/mL, alone or in association with 1 μmol/L or 1 mmol/L SA (salicylic acid), were used for the biological assays. For cell death assays, EB was employed in concentrations of 0.1 and 5.0 mg/mL, alone or in association with 1 μmol/L SA, during 0-8 hours. EB (0.1 mg/mL), alone or in association with 1 µmol/L SA, induced Rubus fruticosus cell death more efficiently than EB alone or in association with 5 mg/mL SA. After 8 hours, a 64% of death of cells elicited with 0.1 mg/mL EB and 71% of death of cells elicited with 0.1 mg/mL EB in association with SA, was observed. Decrease in ROS generation and production of endogenous SA, as well as increased production of phenolic compounds, was observed in intact cells elicited with EB alone. However, when cells were elicited with EB in association with SA, a decreased production of phenolic compounds and an increased production of endogenous SA, was observed. In isolated mitochondria, it was measured oxygen consumption, membrane potential and ROS production for EB alone or in association with 1 mmol/L SA. In either conditions, EB decreased oxygen consumption by the respiratory chain, an effect more pronounced in association with SA: ~79 % inhibition for state 3 and ~ 62 % for state 4 respiration. Also, either neem alone or in association with SA decreased mitochondrial membrane potential, as well as ROS generation to an extent of 55-20% in the presence of antimycin A and 39-10% in the presence of rotenone; in association with SA, EB decreased ROS at 5, 1 and 0.5 mg/mL. Together with our previous study, these results suggest that neem seeds extract has a protective effect on Rubus fruticosus cells by scavenging, via phenolic compounds, reactive oxygen species generated by SA, thereby decreasing its action as cell death inducer.

Keywords: Hypersensitivity response. Programmed cell death. Mitochondria. ROS. Neem. *Azadirachta indica. Rubus fruticosus.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da molécula de azadiractina23
Figura 2 Resumo esquemático da via de transdução de sinal que leva a morte
celular30
Figura 3 Cadeia transportadora de elétrons em plantas33
Figura 4 Representação esquemática do envolvimento da mitocôndria na morte
celular36
Figura 5 Vias mitocondriais de produção de EROs e sistemas enzimáticos
antioxidantes em mitocôndrias de plantas39
Figura 6 Biossíntese do ácido salicílico em plantas42
Figura 7 Fluxograma do preparo do extrato das sementes de nim47
Figura 8 Protocolo para o isolamento de mitocôndrias das células de Rubus
fruticosus
Figura 9 Avaliação dos componentes do extrato bruto obtido a partir das sementes
de nim62
Figura 10 Espectros de Ressonância do Spin Eletrônico do DPPH após reação com
extrato bruto (EB) em diversas concentrações65
Figura 11 Gráfico da intensidade do sinal de ERP versus a concentração do extrato
de nim
Figura 12 Estrutura do DPPH em (A) - radical livre DPPH e em (B) - sua forma não
radicalar67
Figura 13 Efeito do extrato bruto isolado ou em associação com AS sobre a %
produção de AS endógeno em células de Rubus fruticosus69
Figura 14 Efeito do nim isolado (A) ou em associação com AS (B) sobre a produção
de AS endógeno70
Figura 15 Concentrações de compostos fenólicos extracelulares em amostras
elicitadas com nim isolado (A) ou em associação com AS (B) em comparação com
experimentos controle73
Figura 16 Porcentagem de produção de compostos fenólicos intracelulares das
amostras elicitadas com EB isolado ou em associação com AS75
Figura 17 Concentração de compostos fenólicos encontrados no meio intracelular.
(A) – EB isolado e (B) – EB em associação com AS77

Figura 18 Efeitos do EB isolado (A) e do EB em associação com AS (B) sobre a
produção de EROs em células intactas de Rubus fruticosus79
Figura 19 Determinação da morte celular mediada por EB e AS em células de
Rubus fruticosus82
Figura 20 Consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de células de Rubus
fruticosus em diferentes estados respiratórios86
Figura 21 Efeito do EB e AS sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas
no estado 3 da respiração, (A) EB isolado, (B) EB em associação com AS 1 mmol/L.
90
Figura 22 Porcentagem de inibição da velocidade de consumo de oxigênio pela
cadeia respiratória na presença de nim isolado versus nim em associação com AS 1
mmol/L no estado 392
Figura 23 Efeito da concentração EB e AS sobre o consumo de oxigênio de
mitocôndrias isoladas no estado 4 da respiração, (A) EB isolado, (B) EB em
associação com AS 1 mmol/L93
Figura 24 Porcentagem de inibição da velocidade de consumo de oxigênio pela
cadeia respiratória na presença de nim isolado versus nim em associação com AS 1
mmol/L no estado 494
Figura 25 Efeito do nim sobre o potencial de membrana mitocondrial. (A) - EB
isolado (B) - EB associação com AS97
Figura 26 Efeito do extrato bruto e do AS sobre a produção de EROs induzida por
cálcio e inibidores da cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias isoladas.
(A) - Rotenona e (B) - Antimicina A100
Figura 27 Porcentagem de inibição da produção de EROs em mitocôndrias isoladas
utilizando EB isolado. (A) – Rotenona e (B) – Antimicina A102
Figura 28 Efeito do nim em associação com AS sobre a produção de EROs em
mitocôndrias isoladas. (A) – Rotenona e (B) – Antimicina A103
Figura 29 Porcentagem de produção de EROs em mitocôndrias isoladas na
presença de nim em associação com AS 1 mmol/L. (A) - Rotenona e (B) -
Antimicina A

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantidades de macro e micronutrientes utilizados para preparação	do
meio de cultura de Rubus fruticosus.	51
Tabela 2 Compostos utilizados para análise do efeito do EB e do AS sobre	as
mitocôndrias de Rubus fruticosus.	57
Tabela 3 Caracterização bioquímica do extrato de nim obtido das sementes moí	das
	61
Tabela 4 Efeito do substrato succinato sob as mitocôndrias isoladas.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

 $^{1}O_{2}$ Oxigênio singleto $_{\Delta \Psi}$ Potencial de membrana

ABTS Radical Bis 2,2 '-azino-(3-

etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ADP Adenosina 5'-difosfato

AOX Oxidase alternativa

Apaf – 1 Fator indutor de apoptose

Adenosina 5'-trifosfato

ATP Adenosina 5'-trifosfato
Avr Gene de avirulência
BSA Albumina de soro bovina

CAT Catalase

CI₅₀ Concentração inibitória média (de

50%)

CLAE Cromatografia líquida de alta

eficiência

DMPO 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DPPH Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila

EB Extrato bruto

EGTA Ácido etilenoglicol bis (β-aminoetil

éter)-N,N,N',N'- tetracético

ELISA "Enzyme-linked Immunosorbent

Assay"

ERP Espectroscopia de Ressonância

paramagnética nuclear ou

Ressonância do spin eletrônico Espécies reativas de oxigênio

FCCP Carbonilcianeto-p-

EROs

trifluormetoxifenilidrazona

Gene R Gene de resistência

H₂DCFDA Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

HEPES Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-

(1)]-etanossulfônico

IAPAR Instituto Agronômico do Paraná

KCI Cloreto de potássio
KCN Cianeto de potássio
MCP Morte celular programada

MM Massa molecular

MMI Membrana mitocondrial interna

NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo,

forma oxidada

NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo.

forma reduzida

NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo

(fosfato), forma oxidada

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato, forma reduzida

O2⁻⁻ Radical superóxido
OH[•] Radical hidroxila
Pi Fosfato inorgânico

RCR Razão do controle respiratório RH Resposta de Hipersensibilidade RSA Resistência sistêmica adquirida

SHAM Ácido salicil-hidroxâmico SOD Superóxido dismutase

TPM Transição de permeabilidade

mitocondrial

UQ Ubiquinona

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	
SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1 O Nim <i>Azadirachta indica</i>	22
1.1.1 Efeito antioxidante	24
1.1.2 Efeito inseticida	25
1.2 Mecanismos de defesa em plantas	26
1.2.1 Resposta de Hipersensibilidade (RH) e Morte celular progra	amada
(MCP)	28
1.3 Participação da mitocôndria nos mecanismos de defesa	32
1.3.1 Mitocôndria	32
1.3.2 Cadeia transportadora de elétrons em plantas	33
1.3.3 Mitocôndria e morte celular programada em plantas	35
1.3.4 Produção e mecanismos de controle da produção de ERC)s em
mitocôndrias	38
1.4 Ácido salicílico e morte celular	40
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo geral	44
2.2 Objetivos específicos	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Preparação do extrato bruto (EB), a partir de sementes de Azad	irachta
indica, nim (SCALIZE, 2003)	46
3.2 Análise em espectrofotômetro de varredura do extrato de nim	47
3.3 Caracterização bioquímica do extrato de nim	47
3.3.1 Determinação do teor de Compostos fenólicos	47
3.3.2 Determinação do teor de açúcar total	48
3.3.3 Determinação do teor de açúcares redutores	49

		3.3	.4	Determinação do teor de proteinas totais49
		3.3	.5	Avaliação da atividade antioxidante pela técnica de ressonância
		par	amag	gnética nuclear50
	3.	.4	Pre	paração das células cultivadas de Rubus fruticosus50
		3.4	.1	Contagem e viabilidade celular51
		3.4	.2	Determinação de morte celular em células de Rubus fruticosus
		elic	itada	s com AS e EB52
		3.4	.3	Determinação da produção de AS endógeno em células de Rubus
		frut	icosu	s elicitadas com AS e EB52
		3.4	.4	Determinação da produção de compostos fenólicos em células de
		Rul	bus fi	ruticosus elicitadas com AS e EB53
		3.4	.5	Determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) em células
		inta	ctas	de Rubus fruticosus elicitadas com AS e EB53
	3.	.5	Isol	amento de mitocôndrias de células de <i>Rubus fruticosus</i> 54
		3.5	.1	Avaliação do efeito do extrato bruto das sementes de nim (EB) isolado
		ou (em a	ssociação com AS sobre mitocôndrias de Rubus fruticosus56
		3.5	.2	Determinação do consumo de oxigênio57
3.5.3		.3	Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \psi$)58	
		3.5	.4	Determinação da produção das espécies reativas de oxigênio59
	3.	.6		lise estatística59
4		RE	SULT	ΓADOS E DISCUSSÃO60
	4.	.1	Obt	enção e caracterização bioquímica do extrato hidroalcóolico de nim60
	4.	.2		liação da atividade antioxidante do extrato de Azadirachta indica63
	4.	.3		aios com células intactas de <i>Rubus fruticosus</i> 67
		4.3		Determinação da produção de AS endógeno em células de Rubus
fi		frut	icosu	us elicitadas com EB isolado ou em associação com AS68
		4.3		Determinação da produção de compostos fenólicos intra e extracelular
				as intactas de <i>Rubus fruticosus</i> na presença de EB e AS71
		4.3.		Determinação da produção de EROs em células intactas de Rubus
				us na presença de EB e AS78
		4.3.		Determinação de viabilidade e morte celular em células de Rubus
				us elicitadas com AS e EB
	4.	.4		aios em mitocôndrias isoladas de células de <i>Rubus fruticosus</i> 83
		4.4.	.1	Determinação do consumo de oxigênio84

6	RFFFR	ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS1	08
5	CONCL	.USÃO10	06
	de Rubus fruticosus99		
	4.4.4	Efeito do extrato EB e do AS na produção de EROs em mitocôndor	ias
	mitocon	drial	.95
	4.4.3	Efeito do extrato bruto (EB) e do AS sobre o potencial de membra	ana
	respiraç	ão celular	.89
	4.4.2	Efeito do extrato EB em diferentes concentrações e do AS sobre	э а

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Os inseticidas sintéticos vêm sendo utilizados à séculos na agricultura. Porém, o uso abusivo e indiscriminado pode levar a vários distúrbios maléficos ao homem e ao meio ambiente. Entre os problemas ambientais temos: contaminação do solo, rios e aqüíferos, intoxicação de animais e pessoas, desequilíbrio biológico e a formação de resíduos químicos que podem levar a contaminação dos produtos agrícolas e também favorecer a resistência das pragas (SHUMUTTERER, 1990; NEVES et al., 2003; SINGH & ABHILASH, 2009).

Devido a estes motivos o interesse por inseticidas naturais, em doses e quantidades adequadas, biodegradáveis e que sejam seletivos para determinados organismos sem afetar outros, vem crescendo com o passar dos anos (SAITO, 2004; MORGAN, 2008).

Embora estes inseticidas naturais possuam uma toxicidade baixa em relação aos inseticidas sintéticos, testes toxicológicos e de fitotoxicidade são sempre indispensáveis. Visto que estes produtos, a base de substâncias naturais, também contêm compostos biologicamente ativos que podem gerar efeitos inesperados ao ambiente (SAITO, 2004).

É bem conhecido que as plantas apresentam mecanismos de defesa contra patógenos e herbívoros, porém pouco se sabe sobre o efeito de fatores agronômicos tais como níveis de nitrogênio no solo, quantidade de água e inseticidas sobre os mecanismos de defesa das plantas (OLSON et al., 2009).

O entendimento sobre os mecanismos de defesa em plantas é importante, pois têm auxiliado na busca de novos métodos para o controle de pragas que sejam menos agressivos às plantas, assim como ao meio ambiente (SAITO, 2004). Os mecanismos de defesa em plantas podem ser desenvolvidos por uma variedade de estímulos bióticos e abióticos. Entretanto, a resistência induzida raramente fornece um controle total da infecção, sendo necessário muitas vezes, a utilização de substâncias que protejam as plantas (WALTERS, 2009).

Desse modo é fundamental avaliar o efeito de determinados compostos bioinseticidas, em induzir respostas de defesa em plantas, para que seja possível utilizar estas substâncias de maneira mais adequada.

1.1 O Nim Azadirachta indica

A Azadirachta indica é uma árvore perene popularmente conhecida como nim. Pertence a família Meliaceae, subfamília Melioideae, ordem Rutales e subordem Rutineae. É nativa da Índia podendo ser encontrada hoje em muitos países da Ásia e em regiões tropicais, sendo utilizada a séculos principalmente na Índia como planta medicinal, inseticida e adubo. Dados etnofarmacológicos afirmam que cada parte desta planta possui uma atividade biológica que pode ser explorada (BISWAS et al., 2002; MARTINEZ, 2002).

Possui de 15 a 20 metros de altura, com um tronco semi-reto a reto de 30-80 cm de diâmetro, cor marrom-avermelhado, vivendo cerca de 200 anos ou mais. A sua madeira é clara e o diâmetro de sua copa pode variar de 8 a 12 metros podendo atingir até 15 metros. Seu sistema radicular é composto de uma raiz pivotante e raízes laterais auxiliares, que proporciona a esta planta, sustentação e possibilita a retirada de água e nutrientes de áreas mais profundas do solo. Suas folhas são do tipo imparipinadas, com folíolos de coloração verde, as flores são brancas e de cor creme e arranjam-se em inflorescências de cerca de 25 cm de comprimento. O fruto pode ter de 1,5 a 2,0 cm de comprimento, e este quando se desenvolve apresenta cor verde tornando-se amarelo à medida que o fruto amadurece. A produção dos frutos é iniciada em 4 a 5 anos sendo que esta árvore se torna altamente produtiva quando está com 10 anos. A polpa do fruto é macia, amarga e quando rompe libera a semente que apresenta cor marrom (VAN DER NAT et al., 1991; MARTINEZ, 2002; MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005).

O nim é uma planta que se desenvolve em clima tropical podendo se adaptar bem em regiões de clima subtropical, porém a produção de seus frutos fica comprometida. Para ter um bom desenvolvimento ela necessita de solos profundos e bem drenados (MARTINEZ, 2002).

As pesquisas realizadas por Iqbal e colaboradores (2010) nos mostram que a poluição liberada por usinas ou fábricas pode dificultar a taxa fotossintética das folhas do nim, podendo afetar o metabolismo de nitrogênio e os processos de crescimento desta planta. Mudanças nas células da madeira também foram observadas. O autor sugere que estes efeitos podem ser estratégias de defesa desenvolvida por esta planta para superar as condições de estresse.

Trabalhos realizados visando a análise das sementes de *Azadirachta indica* após criopreservação, armazenagem de substâncias a baixas temperaturas, aponta uma taxa de sobrevivência das sementes de 45 % após 12 meses de preservação. No primeiro mês a taxa foi de 94-96 %, indicando que as sementes de nim apresentam uma boa viabilidade quando estas são expostas a baixas temperaturas (VARGHESE & NAITHANI, 2008).

Muitos compostos ativos já foram encontrados e isolados do nim dentre eles destaca-se a salanina, azadiractina, 14-epoxiazadiradiona, meliantrol, azadirona, zafaral e outros (LEY et al., 1993; KUMAR et al., 1996; SIDDIQUI et al., 2004).

A azadiractina, principal composto ativo encontrado, concentra-se principalmente nos frutos podendo também estar presente, em menor quantidade, em outras partes da planta (MARTINEZ, 2002). Pertence a um grupo de triterpenóides e acredita-se que estes são derivados de intermediários esteroidais. Como nos mostra a Figura 1 esta molécula complexa contém vários centros estereogênicos. São compostos fotossensíveis e contêm uma alta densidade de átomos de oxigênio (LEY, 1994).

Figura 1 Estrutura da molécula de azadiractina. (Martinez, 2002)

Yakkundi e colaboradores (1995) afirmaram que a produção de azadiractina se inicia apenas depois da 9ª semana de desenvolvimento do fruto, alcançando a produção máxima por volta da 17ª semana. Estudos sobre a variação do conteúdo de azadiractina durante a estocagem das sementes revelam que a quantidade de azadiractina pode ser influenciada por alguns fatores tais como: temperatura, umidade e luz. Fato este que pode ser confirmado através de experimentos que demonstraram que a azadiractina, sobre condições de armazenagem, pode ter seu

conteúdo diminuído em 55 % quando exposto a luz. Demais análises envolvendo nim, de diferentes procedências, mostraram que os efeitos genéticos também podem influenciar a produção de azadiractina (SIDHU et al., 2003).

Trabalhos realizados por Sarais e colaboradores (2009), nos quais foi avaliada a persistência da azadiractina e outros limonóides do nim sobre as folhas e frutos de pêssego, apontaram que apenas 22 % dos princípios ativos do nim foram encontrados nas camadas epicuticular dessas folhas e frutos, sendo que estes resíduos não foram encontrados na cutícula indicando que estes componentes presentes no extrato não são capazes de penetrar na polpa dos frutos.

Azadirachta indica possui varias atividades farmacológicas e é utilizada na agricultura para controle de insetos e como remediador do solo. Recentemente relatou-se que o nim possui a capacidade de diminuir a atividade da urease e a nitrificação, em diferentes tipos de solo, reduzindo assim o risco de perdas de nitrogênio (MOHANTY et al., 2008). Outros estudos demonstraram que as cascas de nim possuem uma boa eficiência em remover metais como zinco, de soluções aquosas, podendo ser utilizado para descontaminação de rios (ARSHAD et al., 2008; KING et al., 2008).

Dentre as atividades farmacológicas estudadas pode-se citar: atividade antihelmíntica, quimiopreventiva, efeitos gastroprotetores, antifúngico e antibacteriano, cardioprotetor e antioxidante (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005).

Investigações utilizando extratos aquosos das folhas e cascas de nim nos mostram que os extratos possuem uma forte atividade anti-úlcera e anti-secretora de ácidos gástricos *in vivo*, inibindo em cerca de 98 % as lesões gástricas em ratos. Este efeito protetor pode ser atribuído a atividade anti-inflamatória e antioxidante do nim que diminui o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, causando uma inibição da liberação de histamina e aumento do tempo de vida das células que protegem a mucosa gástrica (MAITY et al., 2009).

1.1.1 Efeito antioxidante

Os extratos aquosos das folhas, cascas e sementes do nim demonstraram possuir forte atividade antioxidante e quimiopreventiva para várias linhagens de células cancerígenas.

O efeito da azadiractina e dos limonóides do nim sobre células de coriocarcinoma (BeWo) mostra uma inibição no crescimento destas células e com as análises morfológicas foi possível observar a fragmentação e condensação do núcleo. Um aumento nas espécies reativas do oxigênio (EROs) e uma diminuição da razão Bcl-2/Bax com a expressão do Apaf-1 e caspase-3 forneceu evidências que os limonóides do nim podem estar induzindo apoptose mediada por vias mitocondriais (KUMAR et al., 2009).

A atividade antioxidante e os efeitos de proteção contra a peroxidação lipídica, em hemácias e células pBR322 foram avaliados utilizando extratos de nim preparados com diferentes solventes. Todos os extratos das folhas de nim foram capazes de reduzir os radicais: DPPH*, ABTS*-, superoxido (O*-), hidroxil (OH*) e o óxido nítrico à formas não radicalares de maneira dose-dependente. A proteção contra a peroxidação lipídica foi observada para alguns extratos e segundo o autor pode ser atribuída a habilidade de alguns compostos em inibir vários radicais livres (MANIKANDAN et al., 2009).

1.1.2 Efeito inseticida

Extratos de muitas plantas têm sido utilizados na agricultura para controle de pragas e doenças, por produzirem substâncias chamadas metabólitos secundários que além de participarem ativamente no crescimento e desenvolvimento da planta, possuem a capacidade de repelir ou atrair outros organismos. Os efeitos do extrato de nim sobre insetos, ácaros e nematóides despertou o interesse de pesquisadores e agricultores como um meio eficaz para o controle de pragas. Diversos estudos demonstraram que o nim exerce uma variedade de efeitos sobre vários insetos, porém seu mecanismo de ação na célula vegetal ainda não está totalmente esclarecido (BISWAS et al., 2002).

Os produtos a base de nim interferem em várias fases da vida do inseto, podendo ter função direta ou indireta sobre as pragas, sendo que os efeitos indiretos se acumulam durante os estágios de desenvolvimento do inseto podendo finalmente causar a morte. A azadiractina torna o alimento impalatável, agindo diretamente nos quimiorreceptores das larvas. Quando administrada juntamente com o alimento, a azadiractina pode, por sua vez, diminuir o consumo do alimento (MARTINEZ, 2002).

O efeito regulador do crescimento é bem documentado. O princípio ativo presente no nim mostrou alterar os teores de ecdisona, hormônio que estimula a síntese de determinadas proteínas responsáveis pela metamorfose do inseto. Possivelmente por interferir na síntese e liberação de determinados hormônios essenciais para a síntese do hormônio ecdisona alterando assim sua produção. A atividade do nim sobre a reprodução de insetos ainda não é bem definida, mais é provável que a azadiractina afete os processos relacionados à maturação tanto de machos quanto de fêmeas (MARTINEZ, 2002).

Estudos descritos na literatura nos mostram que o uso de inseticidas químicos na agricultura pode causar drásticos efeitos na divisão celular de plantas submetidas a estes produtos. Recentes investigações realizadas por Ganguly e colaboradores (2010), onde foi avaliado o efeito dos inseticidas organofosforados e do extrato de nim sobre o comportamento cromossomal, níveis de proteínas nas folhas e atividade das enzimas antioxidantes da espécie *Lathyrus sativus* (leguminosa), mostram que tanto os inseticidas naturais quanto os inseticidas organofosforados foram capazes de induzirem mudanças no ciclo celular das plantas, sendo que os inseticidas sintéticos foram capazes de induzir mudanças cromossomais de forma mais significativa que o extrato de nim. A expressão de enzimas antioxidantes também foi aumentada pelos dois inseticidas. Segundo o autor este efeito pode ser proveniente de estratégias de defesa desenvolvidas pela planta durante a exposição destas aos inseticidas.

1.2 Mecanismos de defesa em plantas

As plantas, assim como outros organismos, vivem em um ambiente complexo no qual interagem, com vários outros organismos e estão freqüentemente sujeitas a determinadas agressões que podem ser causadas por agentes abióticos como radiação UV, metais pesados, variações de temperatura, umidade e produtos tóxicos, como também por agentes bióticos que são: fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos e herbívoros.

As relações entre plantas e microrganismos podem tanto ser benéficas como prejudiciais aos vegetais. Para sobreviver as agressões causadas pelos organismos patogênicos as plantas tiveram que desenvolver certos mecanismos de defesa, os

quais são adaptações que permitem que as mesmas sobrevivam, mesmo tendo muitas vezes seu desenvolvimento comprometido (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999; VAN DAM, 2009).

A maioria dos organismos patogênicos penetra na planta por meio das folhas, raízes, através de ferimentos ou outras aberturas. Uma rígida e complexa parede celular que atua como barreira para muitos agressores é observada em células vegetais, todavia alguns microrganismos conseguem vencer esta barreira por possuírem determinadas substâncias como toxinas e enzimas que degradam a parede (MUNDY et al., 2007). A presença de substâncias produzidas por fitopatógenos, conhecidas como elicitores podem também desencadear uma série de sinais que levam a ativação de mecanismos de defesa em plantas infectadas (HAMMERSCHMIDT, 1999).

Segundo Della Mea e colaboradores (2007), o bom desenvolvimento de um organismo multicelular depende do equilíbrio entre os sinais que causam destruição da célula e dos sinais que comandam a diferenciação e proliferação das células.

Pesquisas envolvendo diferentes interações planta-patógeno mostram, que os vegetais podem desenvolver diversas vias de sinalização capazes de deter seus agressores sendo estas vias dependentes do tipo de agente agressor (VAN DAM, 2009). Entre elas estão a síntese de substâncias com atividade antimicrobianas (metabólitos secundários), acúmulo de glicoproteínas, produção de radicais livres, alterações na composição da parede celular e a síntese de proteínas relacionadas a defesa e estas por sua vez, podem codificar genes específicos que são ativados por complexos mecanismos (BRUGGER et al., 2006).

Os mecanismos de resistência são geralmente divididos em dois grupos principais: 1- resistência constitutiva ou pré-formada, aquela que já está presente na planta antes do contato com o agente agressor, recebida por herança dos ancestrais. 2- resistência pós-formada, a qual é produzida somente após contato. As respostas pós-formadas podem ser locais, resposta de hipersensibilidade (RH), ou manifestadas além do local de infecção, resposta sistêmica adquirida (RSA) (PASCHOLATTI & LEITE, 1995; STICHER et al., 1997; HAMMERSCHIMIDT, 1999).

1.2.1 Resposta de Hipersensibilidade (RH) e Morte celular programada (MCP)

A morte celular programada é definida como uma seqüência de eventos que levam a destruição controlada e organizada das células, sendo este evento celular importante para limitar o desenvolvimento do patógeno na planta (REAPE, 2008; MCCABE, 2010).

Em plantas, a morte celular programada engloba um conjunto de mecanismos com características morfológicas que são bem definidas, tais como: a degradação nuclear e condensação da cromatina seguida da perda do DNA, degradação dos cloroplastos e o rompimento do vacúolo o qual libera enzimas (nucleases e proteases) que causam acidificação do pH, contribuindo para o rompimento do núcleo e do vacúolo (GUNAWARDENA et al., 2004).

Tanto em plantas como em animais, a morte celular programada é um mecanismo de grande importância para o desenvolvimento do organismo por controlar o número de células, formar ou eliminar células indesejadas. Uma das principais diferenças entre a morte celular em plantas e animais é a ausência de fagocitose pelas células vizinhas (LAM, 2004; MUNDY et al., 2007).

Durante as interações que ocorrem entre patógeno e hospedeiro, há uma complexa cascata de transdução de sinais que é ativada, quando da detecção de um patógeno. Um dos mecanismos mais bem aceitos de reconhecimento plantapatógeno foi proposto por H. H. Flor, na década de 50, que denominou sua hipótese de teoria gene-a-gene. De acordo com esta teoria, os patógenos possuem um gene dominante, denominado de gene de avirulência (gene Avr) que seria complementar a um gene dominante da planta, o gene de resistência (gene R). Os produtos do gene Avr, mais tarde denominado de elicitor raça-específico, são reconhecidos pelos produtos dos genes R (receptores) e tal reconhecimento desencadeia as respostas de defesa exibidas pela planta durante interação não compatível. A partir deste momento, diversos sinais são enviados através das células vegetais, provocando diversas respostas fisiológicas.

A resposta de hipersensibilidade é uma das mais bem estudadas reações de defesa desencadeada pelas plantas quando estas são agredidas por microrganismos invasores (PARK, 2005). Pode ser definida como morte celular rápida e localizada, com a finalidade de restringir ou mesmo impedir o crescimento

do patógeno, sendo frequentemente controlada por interações diretas ou indiretas entre os genes de resistência da planta e os genes de avirulência do patógeno.

Geralmente é reconhecida como pontos marrons ou células mortas no local de contato do patógeno. As lesões e a quantidade de células mortas variam com o tipo e a quantidade de microrganismos agressores. Porém é importante ressaltar que todos os mecanismos de defesa associados a resposta de hipersensibilidade podem ocorrer mesmo não havendo a morte celular (HEATH, 2000). Recentes estudos mostraram que a autofagia, um processo de degradação que ocorre na maioria dos eucariotos incluindo as plantas, é também necessária para o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade durante a resposta de defesa em plantas (Kumar et al., 2009).

Talvez o primeiro evento que ocorra, após o reconhecimento do patógeno pela planta seja a despolarização da membrana plasmática e o **fluxo de íons**. De um modo geral ocorre influxo de íons cálcio (Ca²⁺) para o citoplasma via ativação de canais de cálcio e, simultaneamente, efluxo de íons H⁺ e K⁺. Este mesmo mecanismo foi observado em cultura de células em suspensão de tabaco elicitadas por oligogalacturonídeos (MATHIEU et al.,1991; KAWANO E MUTO, 2000; KUMAR et al., 2009). A Figura 2 nos mostra um resumo esquemático da via de transdução de sinais desenvolvida quando células de tabaco foram elicitadas por uma substância chamada criptogeína, uma proteína de baixa massa molecular liberada pelo fungo *Phytophthora cryptogea*.

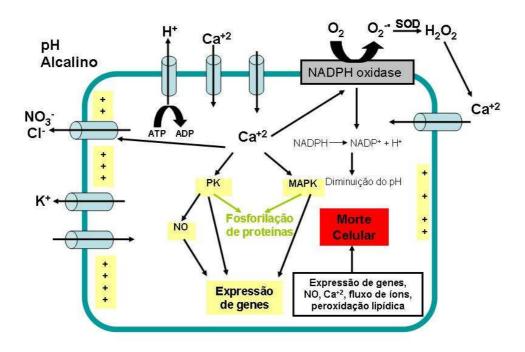


Figura 2 Resumo esquemático da via de transdução de sinal que leva a morte celular. (Adaptado de BRUGGER et al., 2006). NO-óxido nítrico; PK-proteína cinase; MAPK-proteína cinase mitógeno ativada.

A formação de **espécies reativas de oxigênio (EROs)** também é um importante sinal para a ativação dos mecanismos de defesa das plantas. Nas células, a produção de EROs ocorre normalmente como conseqüência de seu metabolismo, no entanto quando as plantas são submetidas a situações de estresse esta produção pode ser potencializada.

A produção de EROs inicia-se quando o oxigênio molecular absorve energia e forma uma espécie eletronicamente excitada chamada de oxigênio singleto ($^{1}O_{2}$). Durante a redução tetravalente do oxigênio a água, tem-se a formação do radical superóxido (O_{2}), do peróxido de hidrogênio ($H_{2}O_{2}$) e radical hidroxila (OH') (CHAVES et al, 2003).

O principal radical produzido é o **superóxido** (O₂·), que pode reagir com várias outras moléculas, preferencialmente íons metálicos e moléculas que possuem centros ferro-enxofre, podendo também desencadear a produção de outras EROs (BARTOSZ, 2009). Nas plantas o íon superóxido pode ser produzido por meio da NADPH-oxidases/sintases, peroxidases da parede celular e como resultado da

transferência de elétrons que ocorre nas mitocôndrias e cloroplastos (CLEMENTS & SAFFREY, 2001; GERSHENZON, 2002).

O **peróxido de hidrogênio**, embora não seja um radical livre, ele é um metabólito derivado do oxigênio e é extremamente prejudicial, pois é capaz de atravessar as camadas lipídicas. Nas plantas o H_2O_2 pode atuar como molécula sinalizadora durante o desenvolvimento da planta, adaptação ao estresse e favorecer a rápida resposta de defesa nos vegetais. Ele é formado pela dismutação do O_2 catalisada pela enzima superóxido desmutase (CHAVES et al., 2003; HILLE & GECHEV, 2005).

O radical hidroxila (OH') embora tenha um curto tempo de vida, é um dos radicais mais fortes e possui uma grande afinidade por biomoléculas. Ele pode ser formado quando o peróxido de hidrogênio reage com íons ferro (Reação de Fenton) ou quando alguns metais de transição catalisa a reação entre peróxido de hidrogênio e superóxido (Reação de Haber-Weiss) (CHAVES et al., 2003).

Para controlar os níveis de EROs e proteger as células que estão em condições de estresse, os tecidos vegetais contêm muitas enzimas captadoras de radicais livres, tais como: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase e glutationa peroxidase. Além de uma série de compostos de baixa massa molecular que atuam como antioxidantes, por exemplo: ascorbato, glutationa e compostos fenólicos (BLOKHINA et al., 2003). Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário e consistem em um grande número de compostos, tais como flavonóides, taninos, ésteres hidroxicinamatos, ligninas, entre outros (GRACE & LOGAN, 2000).

Os polifenóis possuem a estrutura química ideal para a captação de radicais livres e têm se mostrado mais eficientes como antioxidantes do que o ascorbato, em estudos realizados *in vitro* (BLOKHINA et al., 2003).

As propriedades antioxidantes dos polifenóis são provenientes da sua alta reatividade como doadores de hidrogênio ou de elétrons e também da habilidade de seus radicais em estabilizar e re-localizar os elétrons desemparelhados dos radicais livres, além da capacidade de agir como redutor de alguns metais, como por exemplo, ferro durante a reação de Fenton (RICE-EVANS et al., 1999).

Estudos têm demonstrado que compostos fenólicos podem estar envolvidos na captação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante sinalizações em plantas, onde esta molécula é necessária (TAKAHAMA & ONIKI, 1997). Como a geração de

EROs é extremamente importante durante a morte celular associada à RH, provavelmente os compostos fenólicos também estão envolvidos no controle deste fenômeno nas células vegetais.

1.3 Participação da mitocôndria nos mecanismos de defesa

1.3.1 Mitocôndria

Os principais processos responsáveis pela conversão de energia livre nas células são realizados pelas mitocôndrias. Estas organelas são fundamentais para as células eucarióticas e possuem toda a maquinaria necessária para a respiração celular e produção de ATP.

Normalmente as mitocôndrias medem cerca de 0,5 a 0,1 µm de diâmetro e até 3,0 µm de comprimento e apresentam formas esféricas ou formas de bastão. Assim como os cloroplastos, elas são consideradas organelas semi-autônomas devido ao fato das mesmas possuírem ribossomos, RNA e DNA que codificam algumas proteínas mitocondriais (TAIZ & ZEIGER, 2003).

Semelhante as mitocôndrias animais, as mitocôndrias vegetais possuem 2 membranas celulares: a **membrana mitocondrial externa**, lisa, permeável a pequenas moléculas e íons que são capazes de se movimentar através da membrana por poros formados por proteínas denominadas porinas e a **membrana mitocondrial interna** que possui "pregas" denominadas cristas mitocondriais.

Diferente da membrana mitocondrial externa a membrana interna é impermeável a maioria das moléculas e íons, somente as moléculas que possuem transportadores específicos poderão se movimentar através desta membrana, e por ser maior do que a membrana externa está apresenta mais que 50 % das proteínas mitocondriais. O espaço aquoso compreendido entre a membrana mitocondrial interna e externa é denominado **espaço intermembranas**. A fase aquosa compreendida dentro da membrana mitocondrial interna é denominada de **matriz mitocondrial** e ela contém as enzimas do ciclo do ácido cítrico, o complexo da piruvato desidrogenase, as vias de oxidação dos aminoácidos e da β-oxidação dos ácidos graxos (NELSON & COX, 2002).

1.3.2 Cadeia transportadora de elétrons em plantas

A cadeia respiratória mitocondrial em plantas, assim como em animais, é formada por transportadores de elétrons localizados na membrana mitocondrial interna. Esses transportadores são proteínas de membrana, integrais (complexos) ou móveis, compostas por grupos prostéticos que atuam como centros de oxidoredução, recebendo e doando elétrons. Os elétrons seguem numa seqüência de transportadores que é definida pelo aumento progressivo da afinidade por elétrons de cada transportador (NELSON & COX, 2002).

Como pode ser visto na Figura 3, nos vegetais a cadeia transportadora de elétrons contém quatro complexos (I-IV) com características semelhantes à cadeia respiratória de outros organismos, porém em vegetais é possível observar a presença de cinco enzimas que não estão presentes em mitocôndrias animais: duas NADH e duas NADPH desidrogenase, sendo uma NADH e NADPH localizadas na face externa e uma NADH e NADPH localizadas na face interna da membrana mitocondrial interna, que não realizam o bombeamento de prótons e são insensíveis a rotenona e uma oxidase alternativa (AOX) (MOLLER, 2001).

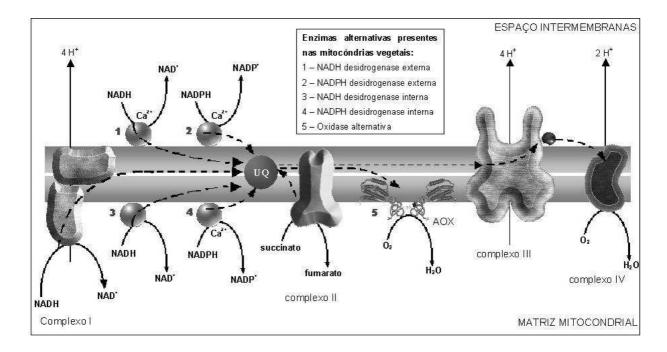


Figura 3 Cadeia transportadora de elétrons em plantas. (Mariano, 2005).

A fosforilação oxidativa em plantas tem início quando os elétrons provenientes do NADH são doados ao complexo I (NADH desidrogenase) ou quando elétrons provenientes do FADH2 são doados ao complexo II (succinato desidrogenase). Os complexos I e II transferem seus elétrons à ubiquinona, uma coenzima que se difunde livremente pela parte hidrofóbica da membrana. A ubiquinona reduzida (ubiquinol) segue até o complexo III (complexo de citocromo bc₁) onde doa seus elétrons, passando para a forma oxidada. O complexo III por sua vez transfere esses elétrons ao complexo IV (citocromo oxidase) através do citocromo c, uma proteína periférica móvel, localizada na parte externa da membrana mitocondrial interna. No complexo IV o oxigênio, aceptor final de elétrons da cadeia respiratória, é reduzido a água por redução tetravalente. A passagem de elétrons pelos complexos da cadeia induz o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas: quatro prótons são bombeados pelo complexo I, quatro pelo complexo III e dois pelo complexo IV. Dessa forma o fluxo de elétrons que ocorre através dos complexos da cadeia respiratória gera um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna (TAIZ & ZEIGER, 2003).

A energia livre contida no gradiente eletroquímico de prótons pode ser utilizada para síntese de ATP, por um complexo enzimático localizado na membrana interna, chamado F_0F_1 -ATP sintase. A F_0F_1 -ATP sintase, também chamada de complexo V, é formada por dois componentes principais F_0 (proteína periférica) e F_1 (proteína integral de membrana). Quando o ADP se encontra ligado ao complexo F_0F_1 -ATP sintase, os prótons passam por esse complexo e a energia produzida é utilizada para sintetizar ATP. Portanto o complexo V catalisa a síntese de ATP a partir de ADP e Pi (fosfato inorgânico) acoplada ao retorno de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial (NELSON & COX, 2002; TAIZ & ZEIGER, 2003).

Bonner e Voss em 1961 observaram pela primeira vez a atividade das NADH e NADPH desidrogenase alternativas. Em seus estudos foi possível evidenciar que as mitocôndrias de plantas eram capazes de oxidar o NADH e o NADPH externamente adicionado. Estudos realizados posteriormente mostraram também que certos inibidores do complexo I não eram capazes de inibir totalmente a oxidação do NADH. Posteriormente com as pesquisas realizadas por Roberts e colaborados (1995) foi possível confirmar a presença de diferentes NADH e NADPH

desidrogenases com afinidade por diferentes substratos, o que permitia diferentes taxas de oxidação do NADH e NADPH em diferentes tecidos sob diferentes condições.

As NADH e NADPH desidrogenases localizadas na parte externa da membrana mitocondrial interna possuem a capacidade de oxidar o NADH e o NADPH exógeno e transferir seus elétrons direto para a ubiquinona. Por sua vez as NADH e NADPH desidrogenases internas oxidam o NADH e o NADPH proveniente da matriz mitocondrial competindo assim com o complexo I.

A oxidase alternativa (AOX) é uma enzima mitocondrial encontrada em plantas que catalisa a oxidação do ubiquinol reduzindo diretamente o oxigênio molecular a água. Com isso dois sítios de bombeamento de prótons (complexo III e IV) são contornados e a energia que seria utilizada para produzir ATP é liberada na forma de calor. Estudos realizados afirmam que a AOX pode prevenir o prolongado estado de redução da ubiquinona diminuindo assim a probabilidade da produção de EROs (MATSUKAWA et al., 2009).

Apesar das NADH e NADPH terem sido descobertas já a alguns anos, pouco é conhecido sobre elas. Alguns estudos sugerem que a atividade da NADH interna e externa e a AOX é aumentada quando a atividade do complexo I é completamente ou parcialmente inibida por inibidores específicos (MOLLER, 2001).

1.3.3 Mitocôndria e morte celular programada em plantas

Vários estudos envolvendo fatores bioquímicos, morfológicos e genéticos têm apontado que em animais a mitocôndria exerce um papel chave na morte celular programada, integrando diversos sinais de estresse celular que levam a morte da célula (LAM et al., 2001). Em plantas, evidências apontam que a mitocôndria está associada à manifestação da resposta de hipersensibilidade, principalmente por causar mudanças no estado redox das organelas, levando a disfunção metabólica das células (MUR et al., 2007). A liberação de proteínas mitocondriais tem tido grande importância na morte celular e é bem caracterizada em alguns modelos experimentais, pois estas proteínas são capazes de ativar reações metabólicas que causam a degradação de importantes macromoléculas.

O principal evento que leva a morte celular, através da mitocôndria, envolve a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, onde este interage com

Apaf1 (fator ativador de apoptose) resultando na ativação de proteínas pró-caspases que causam a morte celular em animais (Figura 4) (FERRI & KROEMER, 2001).

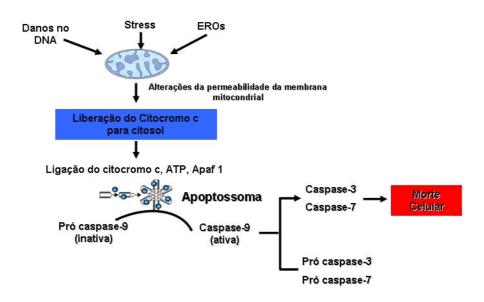


Figura 4 Representação esquemática do envolvimento da mitocôndria na morte celular. (Adaptado de NELSON & COX, 2007).

O papel do citocromo *c* na morte celular em plantas ainda não está completamente esclarecido. Em alguns modelos de culturas de células de plantas foi observado a liberação do citocromo *c* da mitocôndria após estímulos de morte tais como: aquecimento e tratamentos com algumas substâncias como ceramida, heparina dentre outras (MCCABE, 2010). Este efeito também foi avaliado por Sun e colaboradores (1999), onde seus estudos mostraram que a liberação do citocromo *c*, e a ativação de um substrato especifico para metacaspase ocorre de maneira dosedependente quando protoplastos de tabaco foram elicitados com uma vitamina K chamada menadiona.

Outros estudos demonstraram que em plantas há algumas proteases com características semelhantes às caspases denominadas de metacaspases. Vários inibidores específicos para caspases bloquearam o processo de morte celular em plantas sugerindo que estas proteases podem estar envolvidas neste processo (DEL POZO & LAM, 1998; VAN BREUSEGEM et al., 2007 HEREDIA et al., 2008; GALLOIS et al., 2008).

Durner e colaboradores (2004) reforçam as evidências que a mitocôndria está envolvida na morte celular. Em seus trabalhos, utilizando células em suspensão de *Arabidopsis*, foi observado que o aumento da concentração de cálcio e o estresse oxidativo contribuem para a abertura do poro de transição de permeabilidade e a despolarização da membrana mitocondrial interna levando ao inchaço mitocondrial e a morte das células (KRAUSE & DURNER, 2004).

Alterações mitocondriais relacionadas à morte celular também foram avaliadas por Panda e colaboradores (2008), onde células de tabaco foram tratadas com alumínio e a toxicidade causada foi avaliada através da análise de mitocôndrias isoladas. Foi possível observar que o alumínio levou a alterações nos parâmetros mitocondriais, tais como: inibição da taxa de respiração associada com uma queda na concentração de ATP, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e abertura do poro de transição de permeabilidade, os quais finalmente causaram a morte das células analisadas.

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) tem sido demonstrada ser um evento essencial no processo de morte celular (LAM et al., 2001). A TPM é induzida pelo acúmulo de Ca²⁺ intramitocondrial associado ao aumento do estresse oxidativo, o que ocasiona um aumento da permeabilidade inespecífica da membrana mitocondrial interna. Essa elevada permeabilidade permite a passagem de íons, suporte osmótico e moléculas de baixa massa molecular (mm < 1,5 kDa) o que leva ao inchamento mitocondrial seguido da ruptura das membranas mitocondriais (VERCESI, 1995).

Outra evidência para o envolvimento das mitocôndrias de plantas na regulação da morte celular, associada à RH, é proveniente de estudos envolvendo a enzima oxidase alternativa (AOX), uma proteína presente na membrana mitocondrial interna (MMI) que não é encontrada em mitocôndrias animais. A AOX catalisa o fluxo de elétrons diretamente da ubiquinona para o oxigênio, criando um fluxo de elétrons alternativo sem a participação dos complexos III e IV da cadeia transportadora de elétrons, resultando assim numa via de fluxo eletrônico insensível a cianeto. A ativação da AOX por tratamento das mitocôndrias com cianeto durante a RH pode ajudar a diminuir a morte celular durante a fase propagativa da formação da lesão, restringindo assim o tamanho desta (CHIVASA & CARR, 1998; WHELAN et al., 2009).

1.3.4 Produção e mecanismos de controle da produção de EROs em mitocôndrias

Em plantas as organelas que possuem uma alta atividade metabólica e um intenso fluxo de elétrons tais como cloroplastos e as mitocôndrias são os principais sítios de produção de espécies reativas de oxigênio (MITTLER et al., 2004).

Quando o oxigênio é consumido nos tecidos de plantas estima-se que uma pequena fração dele é reduzido incompletamente gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs) (MOLLER, 2001). Diferentemente do oxigênio atmosférico que é não reativo devido a sua distribuição eletrônica, as espécies reativas de oxigênio por terem a sua configuração instável são capazes de interagir com várias moléculas essenciais para o organismo como lipídeos, proteínas e DNA, levando ao aumento da permeabilidade da membrana, diminuição da atividade de algumas enzimas e a mutações que podem destruir as células (MITTLER, 2002; BLOKHINA et al., 2003).

Em mitocôndrias animais, é bem relatado que a primeira EROs formada pela mitocôndria, resultante da redução monovalente do oxigênio, é o ânion superóxido (O2*). Este por sua vez sofre ação das enzimas superóxido dismutase localizadas na matriz (Mn-SOD) e no espaço intermembranas (Cu/Zn-SOD) sendo transformado em peróxido de hidrogênio (H2O2). O peróxido de hidrogênio gerado na matriz pode ser detoxificado pelos sistemas glutationa/NADPH ou, quando em excesso, pode se difundir pelas membranas mitocondriais e ser removido por sistemas antioxidantes citosólicos como catalase, glutationa e tioredoxina peroxidase dentre outros. Quando o H2O2 não é metabolizado pelos sistemas antioxidantes, ocorre a formação do radical hidroxil (OH*), na presença de Fe²+ (Reação de Fenton), que é uma molécula extremamente reativa (KOWALTOWSKI et al., 2009).

Os dois principais sítios de produção de EROs em mitocôndrias são o complexo I, através do transporte reverso de elétrons (do complexo II para o complexo I), e por meio do ciclo da coenzima Q no complexo III (MOLLER, 2001). Na Figura 5 podemos observar a produção de EROs e os mecanismos de detoxificação de EROs.

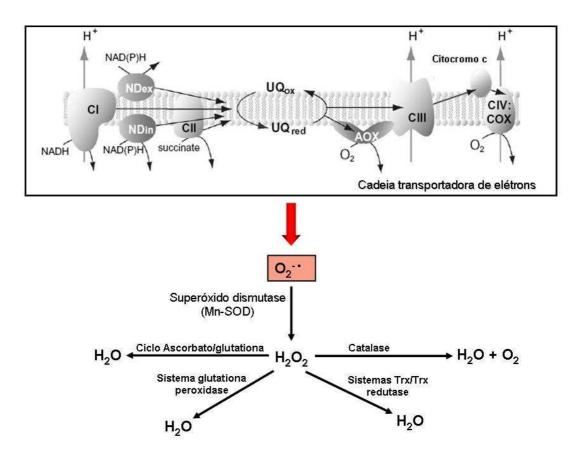


Figura 5 Vias mitocondriais de produção de EROs e sistemas enzimáticos antioxidantes em mitocôndrias de plantas. (Adaptado de Moller, 2001 e Noguchi & Yoshida, 2008 por De Souza, 2009).

Em mitocôndrias de vegetais pouco se sabe sobre a produção de EROs, entretanto algumas características são conhecidas. De acordo com Moller (2001) as mitocôndrias de plantas produzem $O_2^{-\bullet}$ e H_2O_2 em proporção igual ou até maior do que as mitocôndrias animais. A quantidade de EROs produzida por mitocôndrias vegetais é menor na presença de ADP (estado 3 da respiração) do que na ausência de ADP (estado 4).

Uma forma de minimizar a produção de EROs pelas mitocôndrias é evitar a alta redução da cadeia transportadora de elétrons principalmente nos complexos I e III. Em alguns casos a adição de KCN pode tanto inibir completamente a produção de EROs - podendo sugerir a produção pelo complexo III - e em outros casos pode ocorrer um aumento na produção de EROs, indicando que o complexo I e/ou outras desidrogenases são os principais sítios de produção de EROs (MOLLER, 2001).

Korshunov e colaboradores (1998) também observaram que a produção de EROs pode diminuir pela ativação da UCP por ácidos graxos, com isso é possível sugerir que o desacoplamento moderado pode ser uma forma de diminuir a produção de EROs.

Segundo Purvis e colaboradores (1995) a produção de EROs diminui quando a oxidase alternativa é ativada. Quando é adicionado KCN foi observado que a produção de O₂-, pela mitocôndria que estava oxidando o NADH pode ser completamente inibida indicando que a NADH desidrogenase externa não produz EROs.

Em plantas os mecanismos enzimáticos que levam a detoxificação de EROs envolvem a presença de algumas enzimas como: catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase e ascorbato peroxidase. Através da ação destas enzimas antioxidantes o organismo mantém a concentração de EROs dentro dos limites fisiológicos normais. A primeira enzima que atua é a superóxido dismutase que converte o radical O_2^{-1} a H_2O_2 . Por sua vez a catalase, o ciclo da ascorbato/glutationa e o sistema tioredoxina/tioredoxina redutase podem converter o H_2O_2 em H_2O . Entretanto se a produção de EROs estiver acima dos limites fisiológicos necessários para a sobrevivência do organismo é observado o fenômeno de estresse oxidativo que leva a sérios danos as células (MOLLER, 2001; HIRT & APEL, 2004; RIBEIRO et al., 2005).

1.4 Ácido salicílico e morte celular

O ácido salicílico é um composto natural que exerce um papel central nos processos fisiológicos e em certas respostas de defesa em plantas (SHIRASU et al., 1997; ZHU & SHIN, 2008). Ele pode influenciar a germinação das sementes, crescimento celular, abertura dos estômatos, expressão de genes associados a senescência e a produção de frutos (KLESSIG et al., 2009).

Os eventos iniciais desencadeados pela interação planta-patógeno envolvem dentre outros mecanismos a síntese do ácido salicílico, do metil jasmonato e do etileno. Estes por sua vez regulam a expressão de um conjunto de genes que codificam proteínas e enzimas que produzem metabólitos responsáveis pela defesa da planta (DHONDT et al., 2002).

O papel do AS na sinalização durante as respostas de defesa em plantas foi primeiramente observado por White e colaboradores, onde em seus experimentos foi possível observar que folhas de tabaco, quando incubadas com AS ou aspirina causavam uma estimulação da expressão de genes PR relacionados a defesa e estas plantas tiveram resistência ao vírus mosaico do tabaco (TMV), causando 90 % de redução das lesões (RASKIN, 1992).

Estudos mostraram claramente que o AS é uma molécula essencial para desenvolvimento tanto da resposta de hipersensibilidade (RH) como da resistência sistêmica adquirida (RSA). Deste modo tem sido proposto que o AS tem a capacidade de se ligar as enzimas catalase e ascorbato peroxidase que são responsáveis pela detoxificação do H₂O₂ inibindo-as. Com isso tem-se o acúmulo proposital destas espécies levando a resistência em plantas (DURRANT & DONG, 2004).

Esse efeito também foi observado por Zhue e colaboradores (2009) onde o pré-tratamento de sementes de arroz com AS inibiu a atividade da catalase e aumentou os níveis de peróxido de hidrogênio, aumentando a resistência em plantas tratadas com cádmio, portanto aliviando o estresse oxidativo e aumentando a tolerância destas plantas ao cádmio.

A aplicação de AS exógeno também tem mostrado aumentar a resistência em plantas. O efeito do AS exógeno aplicado em raízes de tomate que foram infectadas pelo fungo *Fusarium oxysporum f.* foi avaliado por Mandal e colaboradores (2009). Seus estudos tiveram como objetivo verificar se o AS era capaz de induz resistência as plantas que foram inoculadas com o fungo. Com os resultados foi verificado que o AS exógeno aumentou a concentração de AS endógeno, e a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) e da peroxidase (POD) em raízes de tomate. O aumento da atividade destas enzimas juntamente com o aumento da concentração de AS foi responsável pela indução da resistência ao fungo diminuindo significativamente a severidade da doença.

A biossíntese do ácido salicílico nas plantas, pode ocorrer por duas vias enzimáticas distintas que exige o corismato. O corismato é um metabólito primário derivado da fenilalanina e pode ser convertido a AS pela via do corismato, considerada a mais importante durante a RSA, ou pela via dos fenilpropanóides que é responsável pela produção rápida de AS associada com a morte celular local (RH) (LEE et al., 1995; WILDERMUTH et al., 2001; KLESSIG et al., 2009). Um resumo esquemático da via de biossíntese do ácido salicílico está representado na Figura 6.

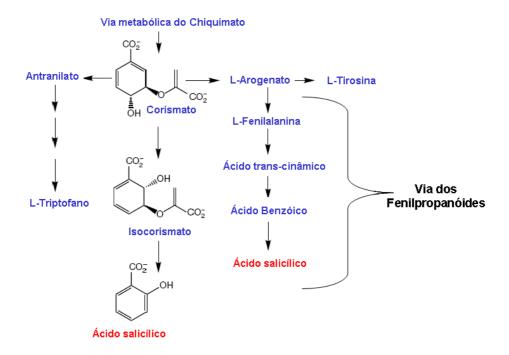


Figura 6 Biossíntese do ácido salicílico em plantas. (Adaptado de WILDERMUTH et al., 2001).

A produção de compostos fenólicos, AS endógeno e a atividade de proteínas relacionadas a patogênese foram avaliadas em células de *Rubus fruticosus* submetidas ao tratamento com AS exógeno por De Souza 2005. Em seus resultados foi possível observar que o AS na concentração de 1 μmol/L foi capaz de levar a uma diminuição da produção de compostos fenólicos. Entretanto para a produção de AS endógeno foi observado um aumento de 50 % na produção de AS endógeno em células de *Rubus fruticosus* tratadas com AS durante 1 horas. Uma indução da atividade de duas enzimas relacionadas a patogênese a laminarinase (β-1,3 glucanase), enzima que degrada polímeros presentes na parede celular, e da quitinase, que catalisa a hidrolise de quitina um componente estrutural encontrado na parede celular, foi verificada também em células de *Rubus fruticosus*.

O efeito do AS sobre a produção de EROs em células intactas de *Rubus fruticosus* foi observado por De Souza 2007. Em seus estudos foi verificado que o AS na concentração de 1 µmol/L causou um aumento de 30 % na produção de espécies reativas de oxigênio em células intactas elicitadas com AS durante o tempo de 15 minutos.

Estudos afirmam que o ácido salicílico também está envolvido nas vias de sinalização que ocorrem na mitocôndria durante a resposta de defesa

desencadeada pela planta. A hipótese sugerida é que a oxidase alternativa pode estar envolvida na resistência induzida, pois se observou que a inibição da oxidase alternativa induzida por AS causou diminuição da resistência ao vírus do tabaco (TMV) em células tabaco (ALVAREZ, 2002).

Matos e colaboradores (2009) também estudaram o efeito do AS em mitocôndrias isoladas de sementes de soja (*Glycine max (L.) Merr. cv Cresir*) e com seus resultados foi observado que o AS é capaz de alterar alguns parametros mitocondriais pois a adição de AS no sistema em estudo foi capaz de induzir a modificações na composição de ácidos graxos das membranas mitocondriais e a diminuição da capacidade de oxidação do NADH.

Experimentos utilizando mitocôndrias isoladas sugerem também que o AS exerce vários efeitos sobre os parâmetros mitocondriais de células de *Rubus fruticosus*. Foi observado que o AS, nas concentrações testadas dissipou completamente o potencial elétrico de membrana gerado por mitocôndrias, bem como diminuiu a produção de EROs induzida por antimicina A e cálcio. Além disso, o AS foi capaz de modular a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória na presença de succinato e NADH respectivamente (DE SOUZA, 2009).

A literatura conta com estudos que mostram os efeitos biológicos do nim como bioinseticida. Porém, pouco se sabe sobre seu impacto sobre o metabolismo vegetal, a literatura apenas o trata como não nocivo, nas concentrações de campo.

Gumiero (2008), mostrou que o extrato de nim apresentou uma forte atividade antioxidante devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos encontrados. Em células intactas de *Rubus fruticosus* o nim causou um aumento de compostos fenólicos intracelulares e açúcares redutores juntamente com a diminuição das espécies reativas de oxigênio. Com isso pode-se concluir que em células de *Rubus fruticosus* o nim possa estar atuando como antioxidante e protetor.

Todos estes resultados nos motivaram a dar continuidade aos estudos envolvendo o extrato de nim em células intactas de *Rubus fruticosus* e também observar se o nim é capaz de alterar alguns parâmetros mitocondriais em mitocôndrias isoladas de células de *Rubus fruticosus* em presença ou não de AS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Devido ao fato do nim ser amplamente utilizado na agricultura e de haver poucos relatos na literatura sobre seus efeitos em sistemas vegetais, o objetivo geral deste trabalho é dar continuidade aos estudos do efeito do extrato de *Azadirachta indica*, nim, sobre resposta de hipersensibilidade, em cultura de células de *Rubus fruticosus*, analisando os possíveis mecanismos do efeito protetor sugerido pelos resultados obtidos até o momento em nosso laboratório.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato hidroalcóolico (EB), a partir de sementes moídas de nim;
- Caracterizar bioquimicamente o extrato com a quantificação de fenólicos totais, proteínas totais, açúcares totais e açúcares redutores;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto;
- Determinar a viabilidade e morte celular em células de Rubus fruticosus elicitadas com AS e EB, isolado ou em associação;
- Determinar a liberação de EROs em células intactas de Rubus fruticosus elicitadas com AS e EB, isolado ou em associação;
- Determinar o efeito de AS e EB sobre a produção de AS e compostos fenólicos intracelulares em células de Rubus fruticosus;
- Avaliar em mitocôndrias isoladas o efeito do EB isolado ou associado com AS sobre:
 - A respiração;
 - Potencial de membrana;
 - Produção de Espécies reativas de oxigênio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos:

- Agitador AS 850 (Biolafitte)
- Agitador de tubos, modelo AP 56 (Phoenix)
- Autoclave, modelo SB Luperco (Phoenix)
- Balança analítica, modelo BG 4000 (Gehaka)
- Balança analítica, modelo Libror AEL-40 SM (Shimadzu)
- Bomba a vácuo, modelo 141 (Primar)
- Capela de fluxo laminar (Engelab)
- Centrífuga, modelo 5810R (Eppendorf)
- Centrífuga, modelo J2-21 (Beckman)
- Câmara de Neubauer (Bioblock)
- Eletrodo tipo Clark em oxígrafo (Gilson Medical Eletronics)
- Espectrofluorímetro, modelo F-4500 (Hitachi)
- Espectrofotômetro DU-70 (Beckman)
- Espectrofotômetro ERS 300 banda X
- Espectrofotômetro, Spectronic 20 (Genesys)
- Estufa, modelo 002 (Fanem)
- Homogeneizador Van potter-Elvehjem
- Leitor de microplacas, modelo EIA muti-well reader (Sigma Diagnostics)
- Liofilizador, modelo 202 (Virtis)
- Manta aquecedora, modelo 202 (Fisatom)
- Microscópio óptico (Olympus CH2)
- Rotaevaporador (Tecnal)
- Sonicador Vibra Cell (Sonic & Materials Inc.)
- Sistema de filtração MILLI-Q (Millipore)

Soluções e Reagentes:

Todos os reagentes citados foram comprados da marca Sigma-Aldrich, exceto o Coomassie Blue R250 utilizado para a quantificação de proteínas totais, que pertence à marca Biorad.

3.1 Preparação do extrato bruto (EB), a partir de sementes de Azadirachta indica, nim (SCALIZE, 2003)

As sementes de nim foram cedidas pela Dra Sueli Martinez do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) – Londrina – PR., sendo colhidas em abril de 2008 na cidade de Xambrê – Paraná.

O extrato hidroalcóolico foi preparado de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 7. As sementes foram selecionadas pela sua integridade, pesadas e lavadas em água corrente sendo posteriormente secas em estufa a 37℃ por 24 horas, moídas em liquidificador doméstico e diluídas em uma solução de etanol:água (1:1 v/v).

A mistura foi deixada sob agitação por aproximadamente 20 minutos, sendo a seguir filtrada a vácuo. O extrato foi concentrado em rotaevaporador e liofilizado. O material liofilizado foi suspenso em água para as análises de caracterização bioquímica e ensaios biológicos posteriores.

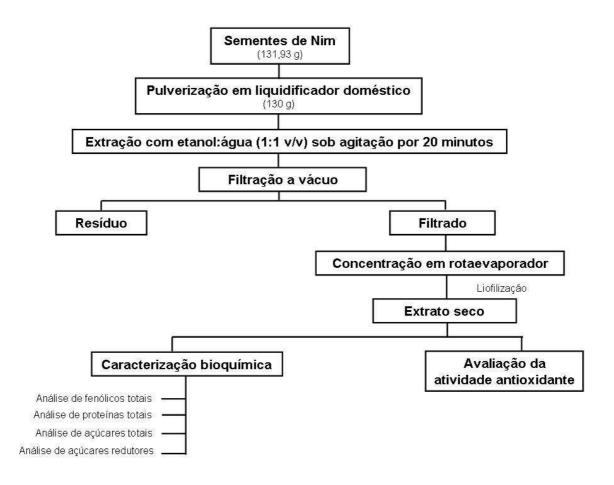


Figura 7 Fluxograma do preparo do extrato das sementes de nim.

3.2 Análise em espectrofotômetro de varredura do extrato de nim

Alíquotas do extrato na concentração de 2 mg/mL, foram submetidas a análise de varredura em espectrofotômetro DU-70 e os espectros obtidos foram comparados com os resultados previamente obtidos em nosso laboratório onde se utilizou como padrão azadiractina A 1 mg/mL (SIGMA). O aparelho foi zerado com água deionizada como branco e o tempo de varredura foi de aproximadamente 10 minutos.

3.3 Caracterização bioquímica do extrato de nim

3.3.1 Determinação do teor de Compostos fenólicos

Princípio do método: O método Folin Ciocalteau (1977), é baseado em reações de óxido-redução. O reagente de Folin é composto por uma mistura de

tungstato, molibdato e ácido fosfórico. Estas substâncias apresentam camadas de valência livre, portanto eles são capazes de oxidar uma série de compostos dentre eles compostos fenólicos e polifenóis que se encontram sob condições alcalinas. Está oxidação causa uma mudança de cor do amarelo para o azul sendo facilmente monitorada por espectrofotometria (IKAWA et al., 2003).

Metodologia: Para a determinação dos compostos fenólicos foram utilizados: ácido acético glacial 7 %, reagente de Folin-Ciocalteau diluído 1:5 (v/v), solução de Na₂CO₃ saturado, água deionizada e o extrato bruto. Para curva analítica utilizou-se padrões de ácido gálico nas concentrações de 100 a 1000 μg/mL e como branco utilizou-se água deionizada.

Foi pipetado 50 μ L dos padrões, das amostras e dos controles em triplicatas em tubos de 2 mL. A seguir adicionou-se 50 μ L ácido acético, 50 μ L reagente Folin, 50 μ L Na₂CO₃ e completou-se o volume para 1 mL acrescentando-se 800 μ L de água deionizada. As amostras foram mantidas em repouso por 90 minutos, sob abrigo da luz e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de 725 nm (SLINKARD & SINGLETON, 1977).

3.3.2 Determinação do teor de açúcar total

Princípio do método: Os açúcares apresentam vários grupos hidroxila, estes podem ser facilmente desidratados quando colocados em contato com ácidos concentrados formando furfural (quando o açúcar for uma pentose) ou hidroximetilfurfural (quando o açúcar for uma hexose). O furfural e/ou o hidroximetilfurfural são moléculas incolores e são capazes de reagir com fenóis produzindo compostos coloridos. A mudança de cor da solução é medida na região visível e é proporcional a quantidade de açúcares presentes na amostra (DUBOIS et al., 1956).

Metodologia: Para a quantificação de açúcares totais foi utilizado o método de fenol sulfúrico (1956), onde foram pipetados 0,5 mL de amostra, padrão ou branco (água deionizada) em tubos de ensaio longo. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de fenol 5 % em água, sendo posteriormente homogeneizadas em mixer. Foi acrescentado 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e as amostras foram resfriadas por 10 minutos.

A leitura foi procedida em espectrofotômetro com comprimento de onda 490 nm. A quantidade de açúcares foi determinada através da curva analítica preparada com solução de glucose nas concentrações de 20 a 100 µg/mL.

3.3.3 Determinação do teor de açúcares redutores

Princípio do método: Os açúcares que contêm grupos hidroxila do carbono anomérico não envolvidos em ligações químicas possuem a capacidade de reduzir íons metálicos tais como cobre e ferro. Com o aquecimento dos açúcares redutores com o reagente de ferricianeto que contêm íons ferro, o ferro é reduzido e o açúcar é oxidado, sendo possível observar uma mudança de coloração que é proporcional a quantidade de açúcar redutor presente na amostra (KIDBY & DAVIDSON, 1973).

Metodologia: Para a analise dos açúcares redutores pelo método de ferricianeto (1973), utilizou-se como reagente ferricianeto de potássio e padrões de glucose nas concentrações de 5 a 250 μg/mL para confecção da curva analítica. Adicionaram-se em tubos de ensaio 100 μL dos padrões, das amostras ou do controle (água deionizada) e 3 mL de reagente de ferricianeto. Em seguida, estas foram aquecidas, em banho-maria, a 100°C por sete m inutos sendo posteriormente resfriadas em banho de gelo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de 420 nm. Traçou-se a curva analítica para, calcular as concentrações de açúcares nas amostras.

3.3.4 Determinação do teor de proteínas totais

Princípio do método: A determinação do teor de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), se baseia na interação do corante de Coomassie com as proteínas que contêm aminoácidos com cadeias laterais ácidas, a interação do corante com as proteínas causa um deslocamento de equilíbrio do corante para a forma aniônica que causa uma mudança de cor que é absorvida em 600 nm.

Metodologia: Na quantificação das proteínas foi utilizado o reagente de Coomassie Brilhant Blue G-250, padrões de albumina bovina nas concentrações de 5 a 25 μg/mL para confecção da curva analítica e amostras do extrato bruto.

Pipetou-se 160 μL dos padrões, amostras ou controle em microplacas, em seguida adicionou-se 40 μL do reagente Coomassie e incubou-se em temperatura

ambiente por 5 minutos. A leitura foi realizada em leitor de microplacas no comprimento de 600 nm.

3.3.5 Avaliação da atividade antioxidante pela técnica de ressonância paramagnética nuclear

Os experimentos para avaliação da atividade antioxidante foram realizados na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Matemática em colaboração com o Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho e sob a orientação da Dra. Ângela Mitie Otta Kinoshita.

A técnica de ressonância paramagnética nuclear ou ressonância do spin eletrônico (ERP) é uma técnica muito eficiente para quantificação de radicais livres, pois esta técnica torna possível a detecção de espécies que contêm elétrons desemparelhados (espécies paramagnéticas). A energia absorvida é monitorada e convertida no espectro ERP (BACIC et al., 2008).

Metodologia: A avaliação da atividade antioxidante foi feita de acordo com Renew e colaboradores (2005) com algumas modificações. As medidas de ressonância paramagnética foram realizadas em espectrofotômetro ERS 300 banda – X. O espectro foi registrado com freqüência de modulação: 100000 Hz, amplitude de modulação de 2G, com potência de microondas de 50 mW, com tempo de varredura de 60 segundos.

Para as análises foram utilizadas soluções de extrato bruto de nim (EB), nas concentrações de 0,5 a 150 mg/mL. 60 µL de uma solução etanólica de 1 mmol/L de DPPH (radical 1,1 difenil-2-picrilidrazila) reagiu com 60 µL de EB, sendo os espectros registrados 120 segundos após o inicio da reação.

3.4 Preparação das células cultivadas de Rubus fruticosus

Para os ensaios biológicos foram utilizadas células de *Rubus fruticosus* cultivadas *in vitro* a partir de calos cedidos pelo Dr. Paul Joseleau do Centre de Recherches sur les Macromolécules Vegétales (CERMAV), Grenoble, França, pela técnica de suspensão celular (HUSTACHE et al., 1975).

As células foram cultivadas em meio Heller, que é composto por macronutrientes, ou seja, elementos que estão em grande quantidade no meio

(cálcio, potássio, magnésio, sódio e fósforo) e micronutrientes, que estão em pequenas quantidades (alumínio, cobre, boro, manganês, níquel e zinco), ambos na forma de sais cujas concentrações estão descritas na Tabela 1. Além destes componentes foi adicionado ferro (FeCl₃.6H₂O 1 mg/L), vitamina B12 (cloridrato de tiamina 1 mg/L) e glucose como fonte de carbono (50 g/L). Os frascos com os inóculos foram mantidos sob agitação contínua de 60 ciclos/minuto, a 25℃, sob iluminação durante 12 horas, sendo retirados para os testes biológicos na fase exponencial de crescimento, entre 18-21 dias de subcultura.

Tabela 1 Quantidades de macro e micronutrientes utilizados para preparação do meio de cultura de *Rubus fruticosus*.

Macronutrientes	Quantidade (mg/L)	Micronutrientes	Quantidade (µg/L)
CaCl ₂	56,5	AICI ₃ .6H ₂ O	0,054
KCI	750,0	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,030
$MgSO_4$	121,5	H_3BO_3	1
$NaNO_3$	600,0	KI	0,010
NaH ₂ PO ₄	108,7	MnSO ₄ .H ₂ O	0,075
		NiCl ₂ .6H ₂ O	0,030
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	1

3.4.1 Contagem e viabilidade celular

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer com utilização de microscópio óptico (aumento de 10X) tendo sua viabilidade testada através do corante azul de Evans (KANAI & EDWARDS, 1973). Foram adicionados 20 μL de azul de Evans a 1 % (m/v) a 200 μL de suspensão celular, e a porcentagem de células viáveis foi determinada pelo número de células não coradas (viáveis) para cada 10 células contadas.

3.4.2 Determinação de morte celular em células de Rubus fruticosus elicitadas com AS e EB

Para determinação de morte celular foram utilizadas células em suspensão entre 18-21 dias de subcultura. Estas células foram filtradas em membrana de 100 µm, sendo em seguida lavadas com o tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5,9, contendo 2 % de sacarose.

Aproximadamente 1 g destas células foram pesados e colocados em 10 mL do tampão em frascos pretos para evitar o efeito da luz como elicitor. As amostras foram deixadas em repouso por 2 horas antes do inicio dos ensaios, para minimizar o estresse metabólico causado durante a preparação. Em seguida foi adicionado 1 mL dos elicitores nas seguintes concentrações AS 1 µmoL/L, EB 5 mg/mL e 0,1 mg/mL e água deionizada como controle. As suspensões foram mantidas em temperatura ambiente durante o período de 1 a 8 horas, sob agitação.

Cada elicitação foi realizada em triplicata e as induções foram interrompidas nos tempos indicados de 0, 2, 4, 6 e 8 horas colocando-se as amostras no gelo. Aproximadamente 40 µL da suspensão de células foram corados com 20 µL do corante azul de Evans (1 % m/v). As leituras foram realizadas em microscópio óptico com aumento de 10 X, e a porcentagem de células viáveis foi determinada pelo número de células não coradas.

3.4.3 Determinação da produção de AS endógeno em células de Rubus fruticosus elicitadas com AS e EB

As análises do teor de ácido salicílico em células intactas de *Rubus fruticosus* foram realizadas por espectrofluorescência segundo SCHOCH e colaboradores (2002) utilizando células em suspensão durante a fase exponencial de crescimento entre 18-21 dias.

As suspensões celulares foram preparadas em frascos pretos com a finalidade de evitar o efeito da luz como elicitor. Foram suspensas 1,08 g de células em 15 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5,9, contendo 2 % de sacarose. Estas células foram mantidas em repouso por 2 horas para evitar o estresse metabólico causado durante a preparação. Após este período foram acrescentados 1 mL dos elicitores: extrato bruto (EB) nas concentrações de 5; 1; 0,5; e 0,1 mg/mL

isolado ou em associação com AS na concentração de 1 µmol/L. Para controle dos experimentos as amostras foram elicitadas com 1 mL água deionizada. As suspensões celulares foram mantidas sobre agitação no período de 1 hora. Em seguida as induções foram interrompidas colocando-se as amostras em banho de gelo. Após as células serem decantadas, o sobrenadante (meio extracelular) foi retirado para posterior análise de compostos fenólicos extracelulares totais.

As células decantadas (meio intracelular) foram lavadas 4 vezes com tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,2. Em seguida 5 mL das células no mesmo tampão foram sonicadas 5 vezes a 60 W, por 25 segundos. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado em membranas de ultrafiltração com poro de 10 KDa e 3 mL dos filtrados foram utilizados para quantificação de ácido salicílico.

Para curva analítica foi utilizado AS nas concentrações de 0,25 a 10 μmol/mL. Tanto para a determinação da curva analítica quanto para a quantificação de AS endógeno foi utilizado comprimento de onda de excitação de 258 nm e a emissão foi feita nos comprimentos de onde de 280 a 550 nm. A abertura de fenda foi de 5 nm para excitação e 10 nm para emissão. E os resultados foram expressos através da média de 6 experimentos independentes.

3.4.4 Determinação da produção de compostos fenólicos em células de Rubus fruticosus elicitadas com AS e EB

Para a quantificação de compostos fenólicos foi utilizado o método Folin-Ciocalteau 1977, descrito no item 3.3.1 e as células foram preparadas como descrito no item 3.4.3 e os resultados obtidos foram expressos através da média de 6 experimentos independentes.

3.4.5 Determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) em células intactas de Rubus fruticosus elicitadas com AS e EB

As espécies reativas de oxigênio foram determinadas conforme descrito por Lee e Murata (2001) e seus colaboradores, com algumas modificações, utilizando como sonda fluorescente o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (H₂DCF-DA).

As células de *Rubus fruticosus* foram retiradas do meio de cultura para os experimentos na fase exponencial de crescimento entre 18-21 dias sendo lavadas com tampão citrato de sódio contendo 2 % de sacarose e filtradas em membranas de 100 µm. Para cada experimento pesou-se 28,8 mg de células que foram suspensas em 2 mL de tampão citrato de sódio contendo 2 % de sacarose, segundo a padronização realizada anteriormente em nosso laboratório por De Souza (2007).

O sistema foi mantido em repouso em tampão por 2 horas. Em seguida, 1,8 mL da suspensão celular foram transferidos para uma cubeta e juntamente com $H_2DCF-DA$ 2 μ mol/L foram incubados por 20 minutos. Após este período acrescentou-se o elicitor AS 1 μ mol/L em associação com extrato bruto de nim nas concentrações de 5; 1; 0,5 e 0,1 mg/mL, os quais foram analisados em experimentos independentes.

Cada amostra foi submetida a cinética com um tempo de corrida de 20 minutos. A fluorescência foi medida em fluorímetro com comprimento de onda de excitação de 503 nm e emissão de 529 nm e abertura de fenda de excitação de 5 nm e emissão 10 nm. Para o controle dos experimentos as análises foram feitas utilizando água deionizada como controle e os experimentos são representados como média de 6 experimentos independentes.

3.5 Isolamento de mitocôndrias de células de Rubus fruticosus

As mitocôndrias de células de *Rubus fruticosus* foram isoladas através de centrifugações diferenciais baseadas em uma técnica de isolamento de mitocôndrias de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifólia* (Mariano, 2005), com algumas modificações realizadas por De Souza 2009, como mostrado na Figura 8.

Esta técnica permite a separação de organelas baseando-se na diferença de velocidade com que as partículas se sedimentam no fundo de um tubo de centrifugação. O comportamento de uma partícula num campo de centrifugação depende de seu tamanho, de sua densidade e de sua forma. Assim sendo, utiliza-se uma série de estágios de centrifugação com velocidades sucessivamente maiores, cada um produzindo um precipitado e um sobrenadante (BRACHT & IWAMOTO, 2003).

As células de Rubus fruticosus foram filtradas e transferidas para um béquer na presença do meio de extração gelado, contendo sacarose 250 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 2 mmol/L, cisteína 3 mmol/L e BSA 0,2 g %. As células foram então homogeneizadas utilizando-se homogeneizador van Potter-Elvehjem (3 vezes com o pistilo apertado, com repouso de 1 minuto entre um ciclo e outro). O homogenato foi filtrado através de uma membrana de 100 µm e centrifugado por 10 minutos a 1000 x g. Logo após o sobrenadante foi centrifugado por 10 minutos a 15000 x g e o precipitado foi suspenso em meio de isolamento, composto por sacarose 250 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), EGTA 0,25 mmol/L e BSA 0,2 g %, sendo então centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado pela última vez a 15000 x g por 10 minutos sendo que o precipitado (fração mitocondrial) foi ressuspenso em 1 mL do meio de ressuspensão, composto por sacarose 250 mmol/L, HEPES 10 mmol/L e BSA 0,2 g % de modo a obter-se uma suspensão correspondente a cerca de 15-20 mg de proteína por mL, que foram determinadas pelo método de Lowry et al. (1951). A qualidade das mitocôndrias isoladas foi testada através da determinação da razão de controle respiratório (RCR), obtido pela razão entre a velocidade de respiração no estado 3 e estado 4 (CHANCE & WILLIAMS, 1955).

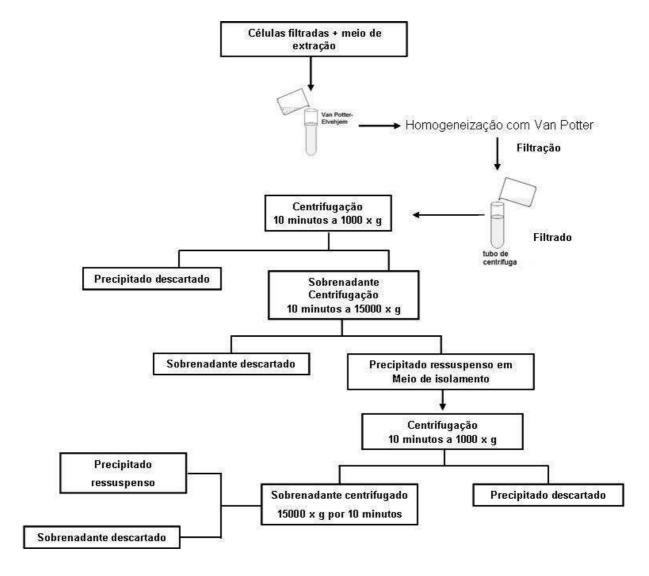


Figura 8 Protocolo para o isolamento de mitocôndrias das células de *Rubus fruticosus*. (De Souza, 2009)

3.5.1 Avaliação do efeito do extrato bruto das sementes de nim (EB) isolado ou em associação com AS sobre mitocôndrias de Rubus fruticosus

O extrato bruto obtido de sementes de nim (EB), em diferentes concentrações, isolado ou em associação com AS 1 mmol/L, foi testado diretamente sobre as mitocôndrias isoladas para a determinação do consumo de oxigênio e do potencial de membrana utilizando diferentes substratos, inibidores e desacopladores listados na Tabela 2.

Tabela 2 Compostos utilizados para análise do efeito do EB e do AS sobre as mitocôndrias de *Rubus fruticosus*.

Substrato (S), Inibidor (I) e Desacoplador (D)	Concentrações utilizadas para cada mg/mL de proteína mitocondrial	
Succinato (S)	5 mmol/L	
Rotenona (I)	2 μmol/L	
Oligomicina (I)	2,5 µmol/L	
GTP (I)	1 µmol/L	
FCCP (D)	1 µmol/L	
KCN	1 mmol/L	
SHAM (I)	2 mmol/L	

3.5.2 Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de O₂ pelas mitocôndrias incubadas com elicitores foi determinado a uma temperatura de 28°C com eletrodo tipo Clark em dispositivo polarográfico.

O eletrodo de Clark é constituído por cátodo de platina acoplado a um ânodo de prata que circunda a platina. Revestindo o terminal há uma membrana de teflon e entre a membrana de teflon e o eletrodo, adiciona-se uma solução saturada de cloreto de potássio que faz a ponte eletrolítica entre os dois metais. Quando uma diferença de potencial de 0,8 volt é aplicada entre os dois metais o oxigênio é reduzido de acordo com as reações:

Ânodo:
$$4 \text{ Ag} + 4 \text{ Cl}^{-} \rightarrow 4 \text{ AgCl} + 4 \text{e}^{-}$$

Câtodo: $4 \text{ H}^{+} + 4 \text{e}^{-} + \text{O}_{2} \rightarrow 2 \text{ H}_{2}\text{O}$
 $4 \text{ Ag} + 4 \text{ Cl}^{-} + 4 \text{ H}^{+} + \text{O}_{2} \rightarrow 4 \text{ AgCl} + 2 \text{ H}_{2}\text{O}$

Dentro de uma determinada faixa de polarização a concentração de oxigênio e o fluxo de elétrons, ou seja, a corrente elétrica gerada é proporcional a concentração de oxigênio (BRACHT & IWAMOTO, 2003).

O sistema reacional foi constituído por sacarose 250 mmol/L, KCl 2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), EGTA 500 μ mol/L, NaH₂PO₄ 1 mmol/L, ADP 400

nmol/L, BSA 0,2 g % e 1 mg/mL de proteína mitocondrial. Este meio reacional foi suplementado com succinato 5 mmol/L como substrato oxidável. Nessas condições experimentais, a respiração mitocondrial foi avaliada na presença do substrato, inibidores e desacopladores descritos na Tabela 2. As velocidades respiratórias foram expressas em ng átomo de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, na presença do EB isolado em diversas concentrações ou em associação com AS 1 mmol/L, considerando-se que a solubilidade do oxigênio em água a 28°C e 1 atm é de 253 μmol/L (ESTABROOK, 1967).

3.5.3 Determinação do potencial de membrana mitocondrial (Δψ)

O potencial de membrana foi acompanhado pela espectrofluorescência da safranina O em fluorímetro Hitachi F-4500 utilizando-se os comprimentos de onda de 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão) com abertura de fenda de 5 nm (excitação e emissão). O sistema de incubação foi composto por sacarose 250 mmol/L, EGTA 500 μ mol/L, KCI 2 mmol/L, NaH2PO4 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), BSA 0,2 g %, rotenona 5 μ mol/L e safranina O 5 μ mol/L. A medida do potencial de membrana foi iniciada com succinato 5 mmol/L. A calibração para os ensaios de $\Delta \psi$ foi realizada através das variações na fluorescência causadas por adições consecutivas de KCl. O $\Delta \psi$ foi calculado em função das concentrações de KCl adicionadas (0,15-5 mmol/L) e da concentração mitocondrial interna de K⁺ (120 mmol/L), através da equação de Nernst: $\Delta \psi = \log 60 \ [\text{K}^+_{\text{int}}] \ [\text{K}^+_{\text{ext}}]^{-1}$ (AKERMAN & WIKSTRON, 1976).

A captação da safranina *O* pelas mitocôndrias ocorre em decorrência do potencial de membrana, acompanhada pela diminuição do sinal de fluorescência no meio. No início quando o potencial ainda não está formado, a safranina distribui-se nos dois lados da membrana mitocondrial interna. Quando um substrato oxidável como succinato é adicionado, ocorre uma mudança de cargas, fato que provoca passagem da safranina para a matriz, o que é acompanhado pela diminuição da emissão de luz pela safranina *O* (AKERMAN & WIKSTRON, 1976).

3.5.4 Determinação da produção das espécies reativas de oxigênio

A detecção da geração de EROs foi realizada em espectrofluorímetro Hitachi F-4500, com comprimento de onda de 503 nm (excitação) e 529 nm (emissão) e aberturas de fenda de 5 nm (excitação) e 10 nm (emissão). Avaliou-se EB isolado em diferentes concentrações ou em associação com AS 1 mmol/L, em presença ou não de rotenona 2,5 μmol/L ou antimicina A 1 μmol/L. As mitocôndrias isoladas foram colocadas em meio contendo sacarose 250 mmol/L, KCl 2 mmol/L, NaH₂PO₄ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), 2,7-diclorofluoresceína (H₂DCFDA) 2 μmol/L e cálcio 2 mmol/L. A produção basal de EROs foi determinada monitorando-se a fluorescência por 10 minutos a 28 °C após adição de succinato 10 mmol/L, servindo como controle.

O DCFH₂-DA é uma sonda não fluorescente que atravessa facilmente a membrana mitocondrial, sendo hidrolisada por esterases intracelulares ou da matriz mitocondrial a 2',7'- diclorodiidrofluoresceína (DCFH₂) que é incapaz de atravessar a membrana mitocondrial acumulando-se assim no interior das células. Na presença de diversas EROs a DCFH₂ é oxidada a 2',7'- diclorofluoresceína que apresenta fluorescência intensa (BASS et al., 1983).

3.6 Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados dados experimentais obtidos de diferentes preparações independentes. As comparações foram realizadas utilizando ANOVA (one-way) seguidas pelo teste de Dunnett (Comparação das amostras versus controle) e quando necessário foi utilizado o teste de Bonferroni (Comparação de pares selecionados de colunas) utilizando como software GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e caracterização bioquímica do extrato hidroalcóolico de nim

Em nosso laboratório, vem sendo desenvolvido estudos com moléculas elicitoras para o entendimento dos mecanismos de defesa vegetal. Os dados descritos na literatura nos mostram que o nim apresenta um grande potencial bioinseticida, porém poucos relatos descrevem seu efeito em plantas. Essa falta de dados fez com que passássemos a utilizá-lo como um dos nossos focos de estudo e este trabalho aqui apresentado dá continuidade a estas análises.

Para obtenção do extrato de *Azadirachta indica* foi utilizado solvente hidroalcóolico (1:1 v/v) nas proporções indicadas anteriormente, a fim de se obter o extrato bruto das sementes amplamente utilizado nas lavouras.

Dentre as várias formas de preparo do extrato de nim descritas na literatura, o método utilizado em nosso laboratório para o preparo do extrato mostrou-se bem eficiente devido ao bom rendimento obtido de 19 %. A partir de 130 g de sementes secas foi possível obter uma massa de aproximadamente 25,23 g de extrato.

A padronização da preparação do extrato de *Azadirachta indica* foi realizada anteriormente em nosso laboratório por Gumiero (2008) e os extratos obtidos apresentaram um rendimento médio de 4,7 %. Esta diferença de rendimento pode ser proveniente de algumas modificações na preparação do extrato tais como: aumento da quantidade de solvente utilizada, aumento do tempo de extração e tipo de equipamento utilizado para a moagem.

Para a moagem das sementes foi utilizado liquidificador doméstico e neste tipo de sistema foi observado que a perda de massa das sementes em virtude da pulverização foi muito baixa aproximadamente 1,5 %. Na padronização realizada anteriormente por Gumiero na qual a pulverização foi realizada por moinho de facas está perda foi bem mais acentuada cerca de 50 g, advindo deste fato o rendimento inferior de extrato durante o processo de preparação.

A Tabela 3 nos mostra os resultados da caracterização bioquímica do extrato de nim através da quantificação de compostos fenólicos, proteínas totais, açúcar total e açúcar redutor.

16,82

	Proteínas totais (mg/mL)	Compostos fenólicos (mg/mL)	Açúcar total (mg/mL)	Açúcar redutor (mg/mL)
--	--------------------------------	-----------------------------------	-------------------------	------------------------------

9,85

20,02

Extrato

bruto

8,62

Tabela 3 Caracterização bioquímica do extrato de nim obtido das sementes moídas

De acordo com a Tabela acima podemos verificar que a quantidade de açúcar total e açúcar redutor presente no extrato apresentou a maior porcentagem (13,35 % e 11,21 %) comparada com os outros compostos analisados no extrato bruto. A percentagem entre açúcares totais e redutores comprovam a presença de carboidratos de baixa massa molecular como mono e dissacarídeos, resultado este que está de acordo com aqueles obtidos por Gumiero (2008) e deve-se ao tipo de extração realizada utilizando 50 % de etanol, o qual favorece a extração de oligossacarídeos.

Nas análises colorimétricas realizadas por Gumiero também foi possível observar a presença de açúcares e fenólicos em grandes quantidades. Os açúcares foram analisados por CLAE e os picos obtidos, quando comparados com padrões, pode-se determinar serem de glucose, manose e maltose. Desta forma foi possível concluir com suas análises que os picos eram correspondentes a mono e dissacarídeo, porém sua estrutura não pode ser estabelecida. Pelas análises de massas foi sugerido tratar-se de fenólicos glicosilados.

Uma variedade de monossacarídeos tem sido identificada nos extratos de nim dentre eles pode-se destacar: D-glucose, D-galactose, L-arabinose e L-fucose, manose e xilose (VAN DER NAT et al, 1991).

Na literatura podemos encontrar dados que afirmam que os extratos das folhas de nim apresentam altos conteúdos de carboidratos totais sendo que sua quantidade pode variar com o tipo de extração realizada. Pesquisadores também afirmam que a atividade antimicrobiana dos extratos analisados está relacionada com o alto conteúdo de carboidratos presentes nos extratos (HELMY et al., 2007).

Com relação ao conteúdo de proteínas totais estes apresentaram menor porcentagem (5,74 %) em relação aos demais componentes encontrados no extrato bruto. Van der Nat e colaboradores (1991) em uma revisão apontam que as

proteínas contidas no extrato de nim apresentam-se fortemente ligadas aos carboidratos e que técnicas utilizadas para separação destes compostos não tem sido bem sucedidas.

Recentes estudos afirmam que o conteúdo de compostos fenólicos encontrados no nim está intimamente correlacionado com sua atividade antioxidante. Sithisarn e colaboradores (2007) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos presentes em espécies de Azadirachta indica de diferentes localizações e os valores encontrados variam de 12-97 mg/mL. Nossas análises revelaram uma quantidade de compostos fenólicos inferior а relatada Sithisarn por (aproximadamente 10 %), porém, avaliação da atividade antioxidante do nim mostranos que o extrato das sementes de nim possui uma boa atividade antioxidante, podendo esta atividade estar correlacionada com os fenólicos presentes no extrato.

O gráfico da Figura 9 reúne a quantidade de fenólicos, proteínas e açúcares encontrados no extrato das sementes de nim. Os resultados foram expressos em porcentagem e são representados como média de três experimentos:

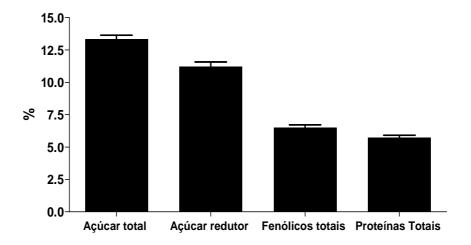


Figura 9 Avaliação dos componentes do extrato bruto obtido a partir das sementes de nim. As dosagens foram realizadas com o extrato hidroalcoolico (1:1 v/v) das sementes de nim na concentração de 150 mg/mL.

O extrato preparado foi submetido à análise de varredura para verificar o comprimento de onda de absorção dos compostos presentes no extrato. De acordo com os experimentos realizados pode-se verificar que o extrato apresentou um pico máximo de absorção em 279 nm, o que segue o mesmo perfil dos resultados obtidos

anteriormente por Gumiero (2008), onde seu extrato apresentou o maior pico de absorção em 271 nm e o padrão de azadiractina apresentou seu maior pico em 254 nm.

A identificação e a quantificação da azadiractina dos extratos por CLAE foi realizada por Gumiero (2008) e de acordo com os resultados, em todos os cromatogramas obtidos, tanto o EB quanto o padrão de azadiractina, mostraram o mesmo pico com tempo de retenção semelhante por volta de 9,5 minutos, podendo desta forma sugerir a presença da azadiractina nas mesmas proporções encontradas em preparações anteriores do extrato bruto.

4.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato de Azadirachta indica

Os antioxidantes são compostos que possuem a capacidade de proteger as células contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio tais como, radical superóxido e radical hidroxila dentre outros. Atualmente grande atenção tem sido dada a estes compostos, pois estes podem prevenir sérios danos oxidativos que podem levar a graves distúrbios biológicos (MOON et al., 2009; ORHAN et al., 2009).

Em plantas, os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos podem exercer um papel muito importante por participar no crescimento e desenvolvimento das plantas além de atuar nos mecanismos de defesa desenvolvido pelas plantas, protegendo-as contra o estresse oxidativo causado pelas EROs (HONG-BO et al., 2008). Seus mecanismos de ação podem incluir: barreiras físicas para a geração de EROs e sua chegada até os alvos biológicos, seqüestros dos metais catalisadores da formação de radicais livres, sistemas catalíticos que neutralizem estes radicais formados, dentre outros mecanismos que podem atuar em conjunto (KARADAG et al., 2009).

A atividade antioxidante do extrato de nim pode ser atribuída a presença de compostos fenólicos (SINGH et al., 2005). Há estudos que revelam que estes compostos podem ser encontrados no nim em várias partes da planta, sendo a maior quantidade presente nas sementes, e o potencial antioxidante destas substâncias se deve principalmente as suas propriedades de óxido-redução as quais podem neutralizar os radicais livres (DEGÁSPARI & WASZCZNSKY, 2004).

O potencial antioxidante do nim foi avaliado pela capacidade do extrato EB em diminuir a quantidade do radical livre DPPH diminuindo a intensidade do sinal ERP gerado, como pode ser visto no gráfico das Figuras 10 e 11. Na Figura 10 é possível observar que com concentração zero de EB a intensidade do pico central foi maior, sendo diminuída com o aumento da concentração do extrato, sendo que na concentração de 150 mg/mL o sinal de ERP foi completamente suprimido.

Com o gráfico apresentado na Figura 11 onde temos a intensidade do sinal de ERP em função da concentração do EB, é possível observar que o extrato apresentou uma forte atividade antioxidante de maneira dose-dependente com IC₅₀ na concentração de 14,85 mg/mL.

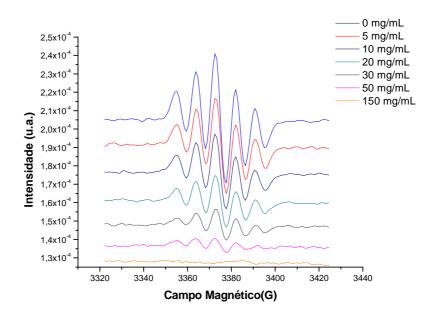


Figura 10 Espectros de Ressonância do Spin Eletrônico do DPPH após reação com extrato bruto (EB) em diversas concentrações.

60,0 μL de EB foram reagidos com 60,0 μL de DPPH 1 mmol/L, o espectro foi registrado 3 minutos após a incubação do extrato com o radical DPPH e as medidas de ressonância paramagnética foram realizadas em espectrofotômetro ERS 300 banda – X, utilizando freqüência de modulação: 100000 Hz, amplitude de modulação de 2G, com potência de microondas de 50 mW e tempo de varredura de 60 segundos.

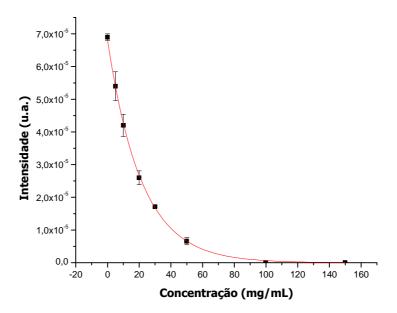


Figura 11 Gráfico da intensidade do sinal de ERP versus a concentração do extrato de nim. As condições experimentos foram as mesmas citadas na Figura 10.

A atividade antioxidante do extrato das sementes de nim foi avaliada anteriormente nos estudos realizados por Gumiero (2008), através do teste de quimioluminescência, onde a quimioluminescência gerada é dependente da concentração de radicais livres, e quando uma substância antioxidante é adicionada ao sistema em estudo, uma diminuição da quimiluminescência pode ser observada, o que pode ser relacionado a diminuição da produção de EROs (KROL, 1994).

De acordo com Gumiero (2008) alíquotas do EB em várias concentrações, reagiram com a enzima HRP (*Horseradish peroxidase*) na presença de H₂O₂ sendo capaz de oxidar o luminol produzindo a quimioluminescência que foi detectada em luminômetro. Em seus resultados foi possível observar uma diminuição da quimioluminescência com aumento da concentração do EB. Porém nesta situação não foi possível detectar qual mecanismo o extrato de nim apresenta sua atividade, sendo sugerido também que o extrato de nim possa estar atuando como modulador da enzima HRP impedindo que ela exerça seu papel, obtendo uma porcentagem de inibição de EROs aparentemente maior devido a diminuição na produção destas espécies. Entretanto quando foi avaliado o efeito do EB na produção de EROs em células de *Rubus fruticosus* foi observado uma diminuição da produção de EROs pelas células, demonstrando desta forma que o extrato de nim foi capaz de exibir atividade antioxidante.

A espectrofotometria de ressonância paramagnética nuclear permite a detecção de espécies paramagnéticas, ou seja, espécies que possuem elétrons desemparelhados, tais como radicais livres. Quando uma solução de DPPH é reagida com uma substância capaz de doar um elétron ou um átomo de hidrogênio como os polifenóis, o DPPH pode aceitar um elétron ou um átomo de hidrogênio (Figura 12) e ser reduzido a sua forma não reativa.

(A) (B)
$$O_{2}N \longrightarrow \stackrel{NO_{2}}{\longrightarrow} NO_{2} \longrightarrow \stackrel{NO_{2}}{\longrightarrow} NO_{2}$$

$$O_{2}N \longrightarrow \stackrel{NO_{2}}{\longrightarrow} NO_{2} \longrightarrow NO_{2}$$

Figura 12 Estrutura do DPPH em **(A)** – radical livre DPPH e em **(B)** – sua forma não radicalar. (Molyneux, 1994).

Como o extrato de nim possui uma grande quantidade de compostos fenólicos acredita-se que os fenólicos presentes no extrato possa estar transferindo um átomo de hidrogênio ou um elétron ao DPPH reduzindo este composto e diminuindo o sinal de ERP, dessa forma com base neste experimento nós podemos sugerir que o nim atua como "scavenger" ou captador de radicais livres.

Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Manikandan e colaboradores (2009) onde o extrato de nim também foi capaz de reduzir o radical DPPH pela capacidade do extrato de nim em doar um átomo de hidrogênio ao DPPH.

4.3 Ensaios com células intactas de Rubus fruticosus

Estudos desenvolvidos no laboratório de bioquímica vegetal (FCFRP – USP) por De Souza (2005) e De Souza (2007) tem mostrado que as células de *Rubus fruticosus* frente a diferentes tipos de elicitores como, metil jasmonato, o polissacarídeo (F-1) obtido de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) e o ácido salicílico (AS), desenvolve mecanismos que são essenciais para as respostas de defesa em plantas, tais como: produção de EROs e de compostos fenólicos, ativação de enzimas relacionadas a defesa e liberação de fragmentos que podem atuar como sinalizadores para o espessamento da parede. Diante do conhecimento do efeito de alguns elicitores neste sistema biológico é que nós consideramos

relevante dar continuidade aos estudos do efeito de nim utilizando como modelo biológico células em suspensão de *Rubus fruticosus*.

Segundo Martinez (2002) concentrações de até 10 mg/mL de extrato bruto são utilizadas na lavoura para controle de insetos e não foi observada nenhuma toxicidade aos trabalhadores rurais que estão diretamente em contato com este extrato.

No entanto em estudos realizados por Gumiero (2008) as soluções de EB na concentração de 10 mg/mL apresentaram-se muito viscosas inviabilizando a utilizando do EB nesta concentração nos ensaios com células intactas. Assim foi utilizado EB nas concentrações de 5; 1; 0,5 e 0,1 mg/mL para os ensaios biológicos.

4.3.1 Determinação da produção de AS endógeno em células de Rubus fruticosus elicitadas com EB isolado ou em associação com AS

Estudos realizados por De Souza (2005) mostraram que o AS exógeno é capaz de levar a um aumento da produção de AS endógeno em células de *Rubus fruticosus*. Este aumento ocorreu em virtude do aumento da concentração de AS exógeno, e do tempo de elicitação, sendo que a melhor resposta ocorreu para as células que foram elicitadas com AS 1 µmol/L, onde durante o tempo de elicitação de 1 hora um aumento de 50 % foi observado e em maiores tempos de elicitação este aumento da produção de AS endógeno chegou alcançar 95 %. Com base nestes estudos e na literatura que nos mostra que, um aumento da produção de AS está envolvido nos mecanismos de defesa em plantas principalmente na RSA, foram realizados experimentos para avaliar o efeito do EB isolado e do EB em associação com AS 1 µmol/L em células de *Rubus fruticosus*.

O efeito do EB isolado ou em associação com AS foi comparado com o controle no qual se utilizou água deionizada como elicitor (Figura 13) e também foi comparado com as amostras elicitadas com AS isolado na concentração de 1 µmol/L (Figura 14 **A** e **B**).

Com os estudos apresentados neste trabalho nós podemos verificar que o AS 1 µmol/L foi capaz de levar a um aumento de aproximadamente 20 % na produção de AS endógeno. Nós observamos também que quando as células foram elicitadas com EB isolado, em todas as concentrações testadas, o nim foi capaz de diminuir a produção de AS endógeno em cerca de 34, 20, 7 e 5 % para as concentrações de 5;

1; 0,5 e 0,1 mg/mL respectivamente, quando comparado com controle no qual utilizou água deionizada como elicitor. Porém para as amostras que foram elicitadas com EB em associação com AS nós observamos um aumento na produção de AS endógeno de 14, 32, 38 e 55 % para as concentrações de 5; 1; 0,5 e 0,1 mg/mL respectivamente quando comparada as células que foram elicitadas com água deionizada (Figura 13).

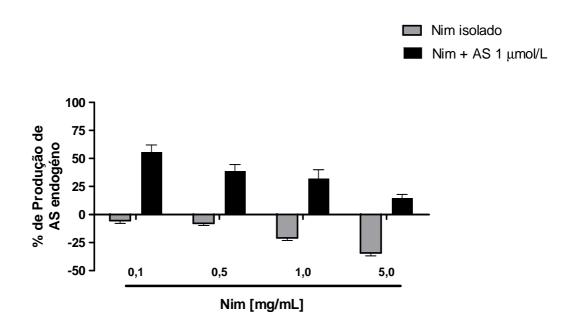


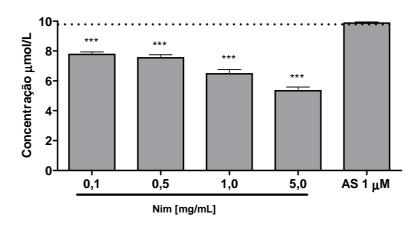
Figura 13 Efeito do extrato bruto isolado ou em associação com AS sobre a % produção de AS endógeno em células de *Rubus fruticosus*.

As células foram mantidas em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5,9, contendo 2 % de sacarose. 1,08 g de células foram colocadas em 15 mL de tampão, 2 horas após 1 mL dos elicitores AS 1 μmol/L e nim isolado e em associação com AS nas concentrações indicadas acima foram adicionados nas suspensões. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante (fração intracelular) foi submetido a analise por espectrofluorescencia com λ excitação de 258 nm e λ emissão 280 a 550 nm. A abertura de fenda foi de 5 nm e 10 nm (excitação/emissão). Os resultados são representados como média de 6 experimentos independentes.

Quando comparamos o efeito do EB isolado com AS 1 µmol/L isolado foi possível observar uma inibição de 42, 30, 23 e 21 % na produção de AS endógeno para concentrações de 5,0; 1,0; 0,5 e 0,1 mg/mL respectivamente (Figura 14 **A**).

E para as amostras que foram elicitadas com EB em associação com AS a diminuição na produção de AS endógeno foi de 48, 39, 36 e 32 % para concentrações de 5,0; 1,0; 0,5 e 0,1 mg/mL respectivamente quando comparada com as células que foram elicitadas com AS 1 μmol/L (Figura 14 **B**).

(A)



(B)

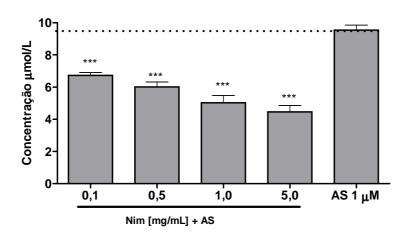


Figura 14 Efeito do nim isolado (A) ou em associação com AS (B) sobre a produção de AS endógeno.

As condições experimentais são as mesmas descritas na Figura 13 e os resultados são representativos de 6 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós teste Dunnet onde comparou-se as amostras versus AS (*) sendo que *** refere-se a P < 0,001.

Na literatura é bem relatado que o aumento da produção de AS endógeno ou aplicação de AS exógeno causa um aumento da expressão de proteínas relacionadas a defesa com a subseqüente indução da RSA em diversos modelos biológicos (SMITH et al., 2008). Estes resultados foram observados em células de

Rubus fruticosus onde a aplicação de AS exógeno levou a um aumento da atividade de algumas enzimas relacionadas ao sistema de defesa em plantas (DE SOUZA, 2005).

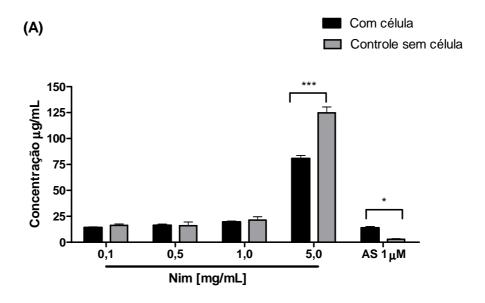
Com os resultados apresentados neste trabalho e os resultados obtidos por De Souza (2005) e baseando-se na literatura, pode ser concluído com este experimento que o AS exógeno isolado ou em associação com nim, neste sistema celular, pode ser um potente indutor de resposta sistêmica adquirida pelo fato de se observar um aumento da produção de AS endógeno em relação ao controle. Entretanto quando o nim é administrado isoladamente sobre as células de *Rubus fruticosus*, a produção de AS endógeno torna-se inibida em relação ao controle, sugerindo desta forma que o nim possa estar minimizando o desenvolvimento da RSA por diminuir a produção de AS endógeno, conferindo assim as células um efeito protetor.

4.3.2 Determinação da produção de compostos fenólicos intra e extracelular em células intactas de Rubus fruticosus na presença de EB e AS

Compostos fenólicos podem exercer várias funções nas plantas, tais como: proteger as plantas do ataque de predadores, fornecer uma maior estabilidade das ligações cruzadas da parede celular, porque alguns intermediários fenólicos podem estar ligados as pectinas presentes na parede celular, atuar como sinal molecular regulando a divisão e expansão celular e atuar como antioxidantes naturais (TAMAGNONE et al., 1998). Com base nisto, o efeito do nim isolado ou em associação com AS sobre a produção de compostos fenólicos foi avaliado tanto para a fração extracelular (Figura 15 A e B) como para a fração intracelular (Figura 18 e 19), com a finalidade de avaliar se o nim e o AS interferem na produção de compostos fenólicos em células de *Rubus fruticosus*.

Como detectado neste trabalho o nim possui uma grande quantidade de compostos fenólicos, e estes fenólicos podem atuar como antioxidantes. Em virtude disso, experimentos controles utilizando o nim nas concentrações utilizadas nos ensaios biológicos, porém sem a presença de células, foram realizados com a finalidade de verificar se a quantidade de compostos fenólicos extracelulares presentes nas amostras são provenientes do nim ou se estes compostos fenólicos

foram produzidos e liberados pelas células. Os resultados são apresentados na Figura 15 $\bf A$ e $\bf B$.



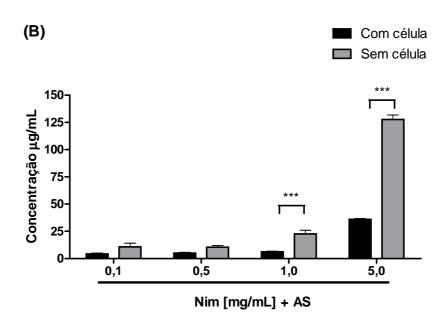


Figura 15 Concentrações de compostos fenólicos extracelulares em amostras elicitadas com nim isolado **(A)** ou em associação com AS **(B)** em comparação com experimentos controle.

As células foram mantidas em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5,9, contendo 2 % de sacarose. 1,08 g de células foram colocadas em 15 mL de tampão, 2 horas após 1 mL dos elicitores nas concentrações indicadas foram adicionados nas suspensões, estas suspensões foram lavadas com tampão tris-HCL 50 mmol/L, pH 7,2. Após decantaram o sobrenadante foi retirado para a análise de fenólicos totais no meio extracelular. Para os experimentos controle o EB e AS nas concentrações indicadas acima foram adicionados em 15 mL de tampão tris-HCL 50 mmol/L. A quantidade de compostos fenólicos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteau e os resultados são representativos de 6 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO-WAY ANOVA e pós teste Bonferroni onde comparou a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras elicitadas com EB e AS versus os experimentos controle onde não se utilizou células, sendo *** refere-se P < 0, 001 e * refere-se a P < 0,05.

Como podemos observar na Figura 15 **A** e **B** uma quantidade considerável de compostos fenólicos foi encontrada nos experimentos controle onde não se utilizou células.

Quando comparamos a quantidade de compostos fenólicos presentes nos experimentos controle (sem células) onde se utilizou nim na concentração de 5 mg/mL isolado ou em associação com AS, com as amostras que foram submetidas a elicitação, nós podemos observar que a quantidade de fenólicos encontrada nos experimentos controle (sem célula) foi superior a quantidade encontrada nas frações extracelulares. Efeito semelhante também foi observado para os experimentos utilizando nim em associação com AS nas concentrações de 1; 0,5 e 0,1 mg/mL.

Já para o EB isolado nas concentrações de 1; 0,5 e 0,1 mg/mL a quantidade de compostos fenólicos encontrada nas amostras elicitadas foram muito semelhantes aos experimentos controle.

A literatura nós mostra que a produção de compostos fenólicos está associada a condições de estresses e podem também atuar como antioxidantes neutralizando as espécies reativas de oxigênio (GOULD, 2004). Diante disso, e com os experimentos que comprovam a diminuição na concentração de compostos fenólicos na fração extracelular, nós podemos sugerir a principio que estes compostos podem estar sendo internalizados pelas células.

A capacidade do EB e do AS em estimular a produção de compostos fenólicos dentro das células também foi determinada através da análise das frações intracelulares, e os resultados são apresentados na Figura 16 e 17.

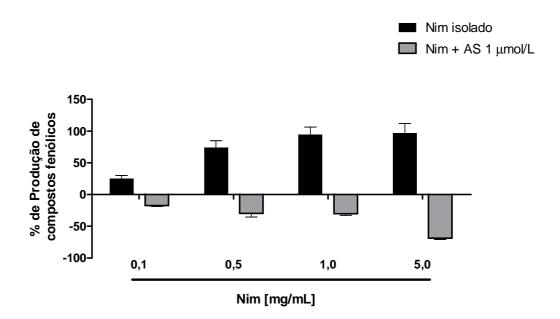


Figura 16 Porcentagem de produção de compostos fenólicos intracelulares das amostras elicitadas com EB isolado ou em associação com AS.

As células foram mantidas em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5,9, contendo 2 % de sacarose. 1,08 g de células foram colocadas em 15 mL de tampão, 2 horas após 1 mL dos elicitores AS 1 µmol/L e EB isolado e em associação com AS nas concentrações indicadas acima foram adicionados nas suspensões. As amostras foram sonicadas e centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteau. Os resultados são representativos de 6 experimentos independentes.

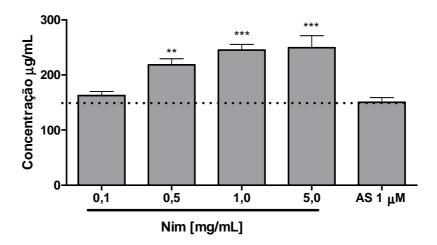
De acordo com os resultados apresentados na Figura 16, nós podemos verificar que o EB isolado em todas as concentrações foi capaz de aumentar a liberação de compostos fenólicos quando comparada as células que foram elicitadas com água deionizada. A quantidade de compostos fenólicos encontrada foi de 249, 245 e 218 µg/mL o que representa um aumento de 96, 94 e 74 % para as concentrações de EB 5; 1 e 0,5 mg/mL respectivamente. Já as amostras elicitadas com EB 0,1 mg/mL a concentração de fenólicos encontrada não apresentou diferença significativa em relação as células que foram elicitadas com água deionizada.

Para as amostras elicitadas com EB em associação com AS em todas as concentrações foi possível observar uma diminuição da produção de compostos fenólicos em relação as células que foram elicitadas com água deionizada. Sendo que o nim 5 mg/mL em associação com AS foi capaz diminuir a concentração de fenólicos em 68 %. As demais concentrações também foram capazes de diminuir a

liberação de compostos de fenólicos em 30, 29 e 17 % para as concentrações de 1; 0,5 e 0,1 mg/mL respectivamente.

Quando comparamos o efeito do EB isolado com AS isolado é possível observar que o EB apresentou uma quantidade de compostos fenólicos superior em relação ao AS, sendo está diferença mais significativa para as células elicitadas com nim nas concentrações de 5 e 1 mg/mL (Figura 17 A). Já as amostras que foram elicitadas com EB em associação com AS somente o nim na concentração de 5,0 mg/mL foi capaz de diminuir a concentração de compostos quando comparada as células que foram elicitadas com AS isolado, as demais concentrações 1; 0,5 e 0,1 mg/mL causaram um aumento da produção de compostos fenólicos porém este aumento só foi significativo para a concentração de 0,1 mg/mL (Figura 17 B).

(A)



(B)

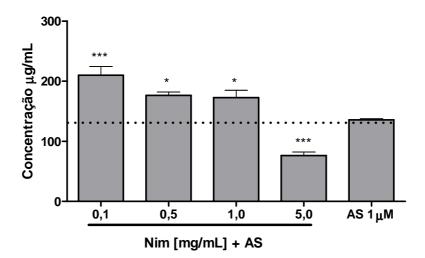


Figura 17 Concentração de compostos fenólicos encontrados no meio intracelular. **(A)** – EB isolado e **(B)** – EB em associação com AS.

As condições experimentais estão descritas na Figura 16. Os resultados são representados como média de 6 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós teste Dunnet onde comparou-se as amostras versus AS (*) sendo que *** refere-se a P < 0,001, ** refere-se a P < 0,01 e * refere-se a P < 0,05.

Em experimentos realizados por De Souza 2007, foi possível observar que o AS é capaz de causar um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *Rubus fruticosus*. Como os compostos fenólicos são capazes de atuar como antioxidantes devido as suas propriedades de óxido-redução as quais desempenham um importante papel na neutralização e capitação dos radicais livres e com base em nossos experimentos acredita-se que, quando EB é administrado juntamente com AS os fenólicos liberados podem estarem sendo utilizados para captação das espécies reativas de oxigênio geradas pelo AS, ocorrendo uma diminuição dos compostos fenólicos nas células.

4.3.3 Determinação da produção de EROs em células intactas de Rubus fruticosus na presença de EB e AS

A determinação da produção das espécies reativas de oxigênio em células intactas foi realizada por análise fluorimétrica utilizando EB isolado ou em associação com AS 1 μmol/L e H₂DCFDA como sonda fluorescente, seguindo a padronização realizada anteriormente por De Souza (2007).

Neste trabalho, foi observado que o extrato bruto também causou uma diminuição da produção das espécies reativas de oxigênio. Pois as amostras que foram elicitadas com EB isolado nas concentrações de 5; 1; 0,5 e 0,1 mg/mL uma inibição de 64, 40, 27 e 24 % foi observada respectivamente (Figura 18 **A**).

Embora seja bem relatado na literatura que o AS é capaz de aumentar a produção de EROS, quando avaliamos o efeito do EB em associação com AS (Figura 18 B), podemos observar que o EB e AS causaram uma diminuição da produção de EROs de maneira dose dependente e representado estes resultados em porcentagem podemos dizer que o EB na concentração de 5 mg/mL em associação com AS 1 µmol/L foi capaz de causar uma inibição da produção de EROs de cerca de 63 %. As demais concentrações causaram uma diminuição da produção de EROs de 37, 24 e 17 % para as concentrações de 1; 0,5 e 0,1 mg/mL respectivamente.

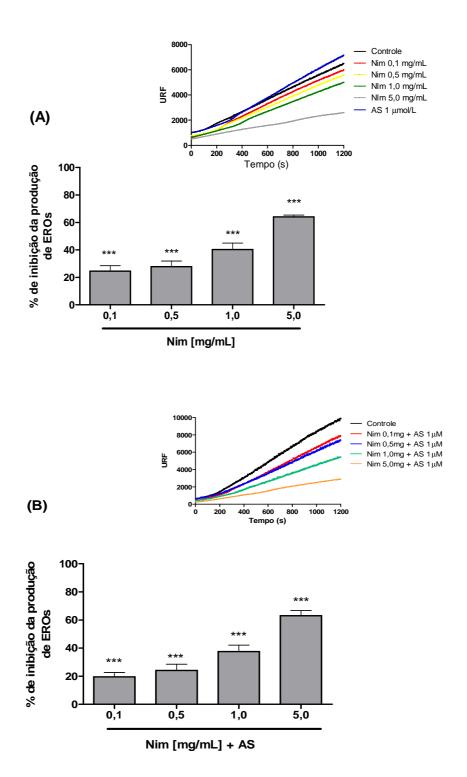


Figura 18 Efeitos do EB isolado **(A)** e do EB em associação com AS **(B)** sobre a produção de EROs em células intactas de *Rubus fruticosus*.

28,8 mg de células foram colocadas em 2 mL de tampão citrato de sódio 2 % de sacarose, pH 5,9. H_2DCF -DA na concentração de 2 μ mol/L foi utilizado como sonda fluorescente. A produção de EROs foi monitorada por espectrofluorescencia no λ excitação de 503 e emissão 529, fendas de 5 e 10 (excitação/emissão). Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós teste Dunnet onde comparou-se as amostras versus controle (*), sendo *** refere-se a P < 0,001.

Em células intactas de *Rubus fruticosus* já foi avaliada a produção de EROs na presença de diferentes tipos de elicitores (DE SOUZA, 2007). Em seus experimentos foi observado que os elicitores AS, metil jasmonato e F-1 estimularam a produção de EROs sendo que o AS na concentração de 1 µmol/L se mostrou mais eficiente pois este foi responsável por um aumento de 30 % na produção das EROs.

Na literatura dados revelam que este aumento da produção de EROs causado pelo AS pode ser proveniente da capacidade do AS em inibir enzimas que causam a degradação das espécies reativas de oxigênio.

O efeito do EB em células intactas de Rubus fruticosus foi avaliado primeiramente por Gumiero (2008), onde em seus estudos foi realizado o fracionamento do EB em três diferentes frações, uma contendo somente o princípio ativo azadiractina (AZA), outra contento grande quantidade de açúcares e fenólicos (L2 inicial) e uma última contendo grande quantidade de lipídeos e outras substâncias. Com seus resultados foi verificado que os efeitos biológicos em células intactas de Rubus fruticosus foram diferenciados e estes se devem principalmente a fração rica em compostos fenólicos e açúcares (L2 inicial) sendo que a azadiractina principal composto ativo encontrado no nim não foi responsável pelos efeitos em células de Rubus fruticosus. Tanto as frações L2 e L2 inicial foram responsáveis pelo aumento da liberação de compostos fenólicos intracelulares, aumento da liberação de açúcares redutores para o meio extracelular e uma diminuição da produção das espécies reativas de oxigênio com aumento da concentração do extrato, com isso foi sugerido que o EB pode atuar sinergicamente como antioxidante e protetor das células e cause liberação de fragmentos de parede celular como mecanismo de defesa celular.

Com a alta taxa de liberação de compostos fenólicos observada, bem como a alta capacidade de inibição da produção de EROs que nim apresentou, podemos dizer que este efeito protetor do nim pode ser proveniente da sua alta concentração de compostos fenólicos, bem como a sua alta capacidade de liberação e de internalização de compostos fenólicos pelas células os quais podem ser responsáveis pela inibição da produção de EROs conferindo um efeito protetor a célula.

4.3.4 Determinação de viabilidade e morte celular em células de Rubus fruticosus elicitadas com AS e EB

A morte celular programa é uma forma bem caracterizada de morte celular que vem sendo muito estudada. Ela é essencial tanto para o desenvolvimento como para indução de respostas de defesa. Diversas substâncias são conhecidas como indutores de morte celular em plantas tais como: fitoalexinas, poliaminas, arpina (elicitor bacteriano) e ácido salicílico (KUC, 1995; KRAUSE & DURNER, 2004; SHI & SHUN, 2008; YODA et al., 2009).

O efeito do extrato EB e do ácido salicílico isolado ou em associação com AS sobre a viabilidade celular foi avaliado em células intactas de *Rubus fruticosus* em diferentes tempos de elicitação (Figura 19). As concentrações de EB foram de 5,0 e 0,1 mg/mL e o AS foi utilizado na concentração de 1 µmol/L. Estas concentrações foram escolhidas devido ao fato de observarmos grandes diferenças nas respostas biológicas em células elicitadas com nim 5 mg/mL e 0,1 mg/mL.

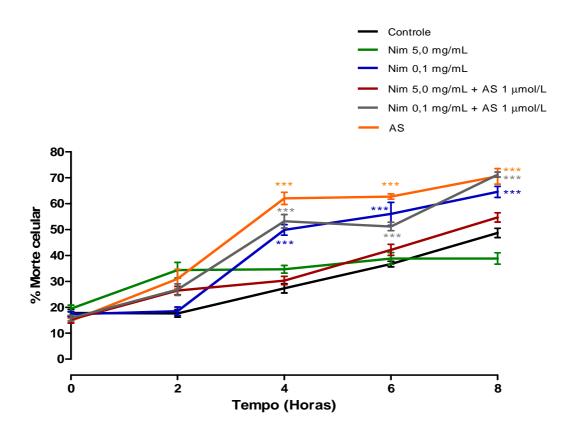


Figura 19 Determinação da morte celular mediada por EB e AS em células de *Rubus fruticosus*. As células foram mantidas em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5,9, contendo 2 % de sacarose. 1 g de células foram colocadas em 10 mL de tampão, 2 horas após 1 mL dos elicitores AS 1 μmol/L, EB 5 e 0,1 mg/mL isolado e em associação com AS foram adicionados nas suspensões. Água deionizada foi utilizada como controle. Os resultados são representativos de 6 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO-WAY ANOVA e pós teste Bonferroni onde comparou-se as amostras versus controle, sendo que *** referese a P < 0,001.

O tratamento das células com os elicitores, nim e AS, no tempo inicial de 0 a 2 horas não apresentaram mudanças significativas na porcentagem de morte celular quando comparado ao controle, porém a partir desse tempo a porcentagem de morte celular aumentou de forma acentuada para as amostras que foram elicitadas com AS 1 µmol/L e nim 0,1 mg/mL em associação ou não com AS 1 µmol/L.

Como pode ser observado no tempo de 4 horas a porcentagem de células mortas na presença de nim 0,1 mg/mL isolado ou em associação com AS e AS 1 µmol/L foi de aproximadamente 49, 53 e 62 %, respectivamente, mantendo-se esta porcentagem no tempo de 6 horas. No tempo de 8 horas a viabilidade das células na presença de EB 0,1 mg/mL, EB 0,1 mg/mL em associação com AS e AS caiu significativamente e a porcentagem de morte celular alcançou 64 % para células

elicitadas com nim 0,1 mg/mL e 71 % para as células elicitadas com nim 0,1 mg/mL em associação com AS e AS 1 µmol/L. Com estes resultados observamos que o EB na concentração de 0,1 mg/mL isolado ou em associação com AS e o AS 1 µmol/L com o passar do tempo pode levar a morte celular.

As células elicitadas com nim 5 mg/mL isolado ou em associação com AS, a porcentagem de morte celular caiu de 48 % para 38 % em relação ao controle, podendo sugerir que o nim isolado em sua maior concentração exerce um efeito protetor para o sistema em estudo (Figura 19). Nós acreditamos que este efeito protetor pode ser proveniente da alta concentração de compostos fenólicos presentes no extrato e pela capacidade do mesmo em aumentar a produção de compostos fenólicos intracelular e diminuir a concentração de AS endógeno diminuindo também o estresse oxidativo causado pela produção de EROs.

É bem conhecido que o ácido salicílico pratica um papel central na resistência sistêmica adquirida, um tipo de morte celular que envolve a expressão de genes de defesa que podem proteger as plantas durante semanas ou até meses. Um dos mecanismos pelo qual o AS induz resposta de defesa em plantas esta relacionado com a capacidade do AS em aumentar a expressão de proteínas relacionadas a defesa e de diminuir a atividade de algumas enzimas responsáveis pela degradação do H₂O₂, podendo levar a um aumento deste composto na célula (CORINA VLOT, 2009). Estudos realizados com cultura de células de *Arabidopsis* revelam que o ácido salicílico foi capaz de induzir a morte celular em células tratadas com ácido salicílico (GARCIA-HEREDIA et al., 2008).

Com base neste estudo podemos sugerir que nossos resultados estão de acordo com os resultados observados na literatura, pois o ácido salicílico foi capaz de causar morte celular em nosso sistema biológico, porém quando o mesmo foi associado com nim na concentração de 5 mg/mL seu efeito indutor de morte celular não pode ser observado, isto reforça a idéia que o nim em sua maior concentração protege as células do efeito do ácido salicílico.

4.4 Ensaios em mitocôndrias isoladas de células de Rubus fruticosus

A padronização do isolamento das mitocôndrias de células de *Rubus* fruticosus bem como a caracterização das funções mitocondriais das mesmas foi realizada por De Souza (2009).

Os resultados obtidos a partir da caracterização das funções mitocondriais são de extrema importância para dar continuidade aos estudos dos efeitos de determinadas substâncias sobre as mitocôndrias de *Rubus fruticosus* bem como para compreender alguns mecanismos relacionados a morte celular e a resposta de hipersensibilidade em plantas.

Foi evidenciado neste trabalho que o nim e o AS desempenham diferentes respostas biológicas em células intactas de *Rubus fruticosus* que podem estimular alguns mecanismos que culminam na morte celular, no caso do AS, bem como prevenir o desenvolvimento de mecanismos que levem à morte celular conferindo assim um efeito protetor as células (no caso do nim). Observou-se também que embora o AS seja um potente indutor de morte celular, seu efeito pode ser atenuado ou até mesmo inibido quando as células são submetidas ao tratamento com nim e AS. Com base nestes resultados e tendo também como base os estudos da literatura que nos mostram que a mitocôndria pode estar envolvida nos mecanismos que levam a morte celular e o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade em plantas, é que está segunda parte de nosso trabalho vislumbrou analisar se, o nim e o AS podem exercer seus efeitos a nível mitocondrial, principalmente no que diz respeito a produção de EROs pois estas são produzidas essencialmente pelas mitocôndrias e cloroplastos e são moléculas chaves que podem contribuir para o desenvolvimento da morte celular.

4.4.1 Determinação do consumo de oxigênio

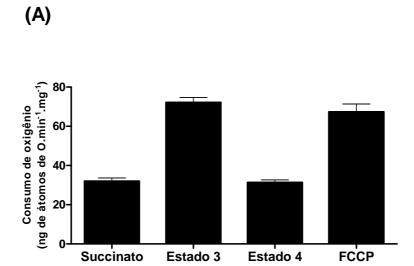
A compreensão das funções mitocondriais foi impulsionada a partir do momento em que houve a possibilidade de avaliar de maneira continua as variações do consumo de oxigênio em um meio contendo mitocôndrias isoladas (BRACHT & IWAMOTO, 2003).

Quando mitocôndrias isoladas são colocadas em uma solução isosmótica adequada (meio de reação) numa câmara de incubação acoplada a um eletrodo de oxigênio é possível monitorar a concentração de oxigênio e o fluxo de elétrons presente neste meio de maneira proporcional a corrente elétrica gerada em um polarógrafo.

Quando um substrato é adicionado inicia-se a passagem de elétrons pela cadeia respiratória e isso impulsiona a saída de prótons para o espaço

intermembranas criando um gradiente eletroquímico que torna a matriz mitocondrial negativa e o espaço intermembranas positivo. Na presença de Pi e um substrato oxidável, por exemplo succinato, inicia-se um lento consumo de oxigênio (estado de repouso). Quando o ADP é adicionado tem-se a síntese de ATP pela ATP sintase acoplada ao retorno de prótons para matriz mitocondrial fato que provoca um aumento na velocidade de consumo de oxigênio (estado 3). Assim que todo ADP adicionado tiver sido consumido a respiração volta ao estado basal (estado 4). Porém quando um agente desacoplador (FCCP) é adicionado este atua como um carregador de prótons através da membrana mitocondrial interna, dissipando o gradiente de prótons e estimulando respiração.

Estes estados respiratórios acima foram observados em mitocôndrias isoladas de células de *Rubus fruticosus* e estão representados na Figura 20. A velocidade de consumo de oxigênio está representada em ng átomos de O.min⁻¹.mg⁻¹. de proteína mitocondrial (Figura 20 **A**) e a Figura 20 **B** representa a média da velocidade de consumo de oxigênio representativo de 6 experimentos independentes.





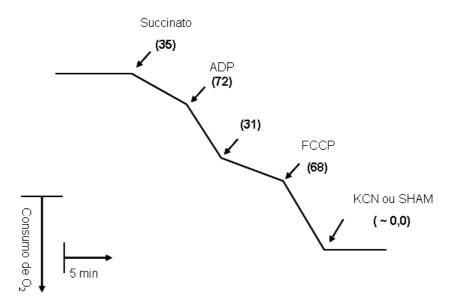


Figura 20 Consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de células de *Rubus fruticosus* em diferentes estados respiratórios.

O meio de reação continha sacarose 250 mmol/L, KCl 2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), BSA livre de ácidos graxos 0,2 g %, GTP 1 μmol/L, EGTA 500 μmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L e 1 mg/mL de proteína mitocondrial. A câmara de reação continha um volume de 1,8 mL e a reação foi procedida a 25°C. FCCP 1 μmol/L, KCN e SHAM 1 mmol/L e ADP 400 nmol/L foram adicionados ao meio. Os gráficos são representativos de 6 experimentos independentes.

A energização por succinato da fosforilação oxidativa e o efeito de diferentes inibidores e desacopladores foram testados na respiração de mitocôndrias de

células de *Rubus fruticosus* antes de avaliar o efeito do EB e do AS sobre estas, com a finalidade de verificar se a cadeia transportadora de elétrons estava apresentando um bom funcionamento. Células de *Rubus fruticosus* cultivadas em meio sólido também foram utilizadas para a obtenção das mitocôndrias isoladas e posterior análise dos parâmetros mitocondriais sendo possível observar que não houve diferenças significativas quando comparada com testes realizados no qual utilizou-se células de *Rubus fruticosus* em suspensão para o isolamento das mitocôndrias.

A adição de ADP na concentração de 400 nmol/L permitiu o cálculo do controle respiratório (RCR), determinado pela razão entre as velocidades de consumo de oxigênio no estado 3 e no estado 4. A Tabela 4 nos mostra os valores de RCR na presença de succinato como substrato oxidável.

Tabela 4 Efeito do substrato succinato sob as mitocôndrias isoladas.

Substrato	Estado 3	Estado 4	RCR
Succinato	72,0	31,0	2,32

De acordo com a Tabela, podemos observar que a razão do controle respiratório (RCR) foi de 2,32.

O isolamento e caracterização de mitocôndrias vegetais com bom grau de acoplamento enérgico é complexo devido ao fato das células vegetais possuírem vacúolos os quais possuem uma grande variedade de metabólitos que podem ser prejudiciais a estas organelas. Além disso, a presença de uma parede celular rígida exige procedimentos mais drásticos para romper as células, com isso a probabilidade de danos a membrana mitocondrial aumenta. Portanto, torna-se de extrema importância calcular o RCR, pois este representa quão funcionais e integras estão as mitocôndrias (BRACHT & IWAMOTO, 2003).

O complexo I (NADH-ubiquinona oxidorredutase) é responsável pela transferência de elétrons do NADH proveniente do ciclo do ácido cítrico. Sua presença foi demonstrada em experimentos anteriores realizados por De Souza (2009) através da oxidação de glutamato/malato/piruvato que são substratos que produzem NADH.

De acordo com a Figura 20, com a adição de succinato, um substrato oxidável especifico para o complexo II, podemos observar um aumento na velocidade de consumo de oxigênio demonstrando assim a presença do complexo II mitocondrial.

A presença dos complexos III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorredutase) e complexo IV (citocromo *c* oxidase) foi demonstrada pela inibição parcial da respiração por antimicina A e cianeto de potássio em experimentos realizados por De Souza (2009) com mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*.

Diferentemente das mitocôndrias de mamíferos, mitocôndrias de plantas possuem vias adicionais para o transporte de elétrons. A enzima responsável por esta via alternativa de transporte de elétrons é denominada oxidase alternativa (AOX). Através desta via os elétrons passam da ubiquinona para a oxidase alternativa sem passar pelos complexos III e IV, assim dois locais de bombeamento de prótons são contornados, e a energia livre que deveria ser conserva é dissipada como calor (JUSZCZUK & RYCHTER, 2003; TAIZ & ZEIGE, 2003).

A presença da oxidase alternativa (AOX) em mitocôndrias de *Rubus* fruticosus já havia sido sugerida de acordo com experimentos anteriores realizados em nosso laboratório por De Souza (2009) e foi também observada no presente estudo, pois como podemos observar na Figura 20 com adição do ácido salicilidroxinâmo (SHAM) ocorreu uma inibição parcial do consumo de oxigênio quando as mitocôndrias foram colocadas em contato com o SHAM inibidor da AOX.

A função da oxidase alternativa em plantas ainda não é totalmente conhecida, mais alguns estudos sugerem que esta enzima atua como uma via de "escoamento energético" oxidando os substratos que estão em excesso na cadeia respiratória (TAIZ & ZEIGE, 2003). Alguns estudos apontam que a AOX ajudaria na diminuição da formação de EROs evitando a superredução dos componentes da cadeia transportadora de elétrons. Isso foi demonstrado quando células de plantas que tinham uma superexpressão dos genes da AOX apresentaram níveis de EROs menores do que as células controle (MAXWELL et al., 1999; MOLLER, 2001).

A presença da proteína desacopladora (UCP) em mitocôndrias de *Rubus* fruticosus também foi demonstrada em estudos realizados por De Souza (2009), através da adição de BSA e GTP em sistemas contendo as mitocôndrias isoladas produzindo um aumento do potencial eletroquímico de membrana.

4.4.2 Efeito do extrato EB em diferentes concentrações e do AS sobre a respiração celular

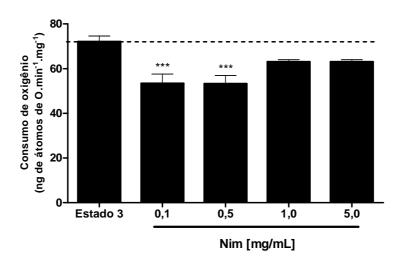
Alterações na velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória podem estar envolvidas nos processos de morte celular principalmente por causarem mudanças nos estados redox destas células (PANDA et al., 2008). Diante disso diferentes concentrações de nim foram testadas sobre as mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*.

Devido ao fato do AS ser uma importante molécula envolvida na morte celular associada a resposta de hipersensibilidade, consideramos também importante avaliar o efeito do AS em associação com EB sobre a respiração celular.

Segundo De Souza (2009) o AS em concentrações de 0,5 a 5 mmol/L foi capaz de diminuir ou aumentar a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória dependendo do substrato utilizado (succinato ou NADH) e acredita-se que a diminuição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeira respiratória na presença de succinato, se deve a capacidade do AS em interagir com complexos II e III por intermédio da ubiquinona (DE SOUZA, 2009). Com base em seus experimentos a concentração intermediaria de AS 1 mmol/L foi utilizada em nossos experimentos

A velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória na presença do extrato EB isolado ou em associação com AS 1 mmol/L foi avaliada no estado 3 da respiração (Figura 21 **A** e **B**) e no estado 4 (Figura 23 **A** e **B**) utilizando succinato como substrato oxidável, com a finalidade de verificar se o extrato de nim e o AS afetam a respiração mitocondrial.

(A)



(B)

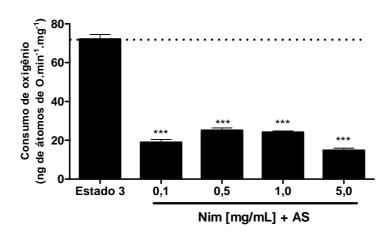


Figura 21 Efeito do EB e AS sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas no estado 3 da respiração, **(A)** EB isolado, **(B)** EB em associação com AS 1 mmol/L. O meio de reação está descrito na Figura 20. A velocidade de consumo de O_2 foi representada em ng átomos de O.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial. A figura é representativa de 6 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós teste Dunnet onde comparou-se as amostras versus controle, sendo *** refere-se a P < 0,001.

Para o extrato bruto isolado na concentração de 5 e 1 mg/mL a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeira respiratória foi inibida em 12 e 13 % respectivamente e para as menores concentrações (0,5 e 0,1 mg/mL) a inibição da

velocidade de consumo de oxigênio foi mais acentuada cerca de 28 %, diante destes resultados nós podemos observar que o nim em suas menores concentrações tiveram um efeito mais acentuado do que o nim em suas maiores concentrações.

Para o nim associado com AS na concentração de 5 mg/mL no estado 3 da respiração nós observamos uma inibição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeira respiratória de cerca de 79 %, este feito foi semelhante para a concentração de 0,1 mg/mL. Já as concentrações intermediarias de 1,0 e 0,5 mg/mL a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória foi inibida porém de forma menos acentuada aproximadamente 65 %.

Como observamos na Figura 22 tanto o nim isolado como o nim em associação com AS foram capazes de inibir a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória no estado 3 da respiração e uma grande diferença de inibição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória foi observada para as mitocôndrias que foram submetidas ao efeito do nim isolado e ao efeito do nim em associação com AS, pois o nim quando administrado juntamente com AS foi capaz de causar uma inibição mais acentuada da velocidade de consumo de oxigênio do que o nim isolado.

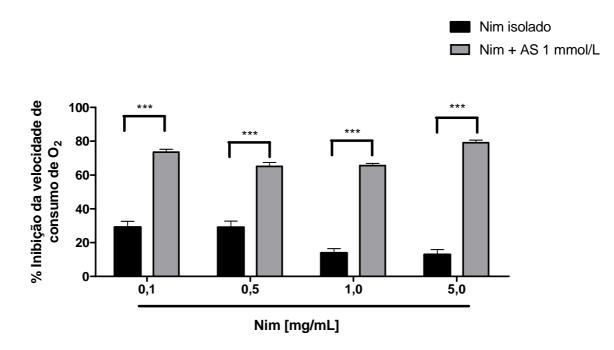


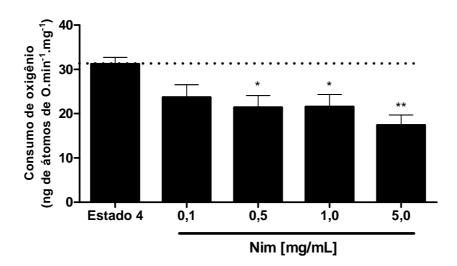
Figura 22 Porcentagem de inibição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória na presença de nim isolado versus nim em associação com AS 1 mmol/L no estado 3.

O meio de respiração foi o mesmo descrito na Figura 20. Os resultados são representativos de 6 experimentos independentes, e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO WAY-ANOVA e pós teste de Bonferroni onde avaliou-se o efeito do nim isolado versus nim em associação com AS, sendo *** P < 0,001.

Tanto o nim isolado quanto o nim em associação com AS causaram uma diminuição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeira respiratória no estado 4 (Figura 23).

O nim isolado na concentração de 5 mg/mL foi capaz de causar uma inibição na velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória de aproximadamente 48 %. Para as concentrações de 1; 0,5 e 0,1 mg/mL esta inibição foi menos acentuada, cerca de 34 % para concentrações de 1, e 0,5 mg/mL e 25 % para a concentração de 0,1 mg/mL, indicando que o nim em sua maior concentração foi capaz de causar um efeito mais acentuado que o nim em suas menores concentrações (Figura 23 A).

(A)



(B)

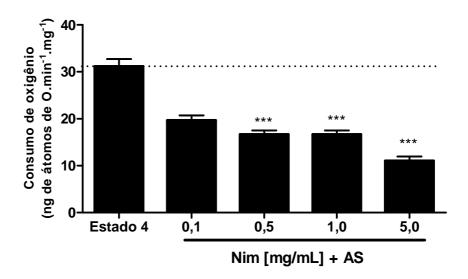


Figura 23 Efeito da concentração EB e AS sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas no estado 4 da respiração, **(A)** EB isolado, **(B)** EB em associação com AS 1 mmol/L. O meio de reação está descrito na Figura 20. A velocidade de consumo de O_2 foi representada em ng átomos de O.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial. A figura é representativa de 6 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós teste Dunnet onde comparou-se as amostras versus controle (*), sendo *** refere-se a P < 0,001, ** refere-se a P < 0,01 e * refere-se a P < 0,05.

Para o nim em associação com AS a porcentagem de inibição da velocidade de consumo de oxigênio no estado 4, também foi mais acentuada do que o efeito do nim isolado. Nós observamos que o nim na concentração de 5 mg/mL juntamente com AS causou uma inibição de 62 % e as concentrações de 1; 0,5 e 0,1 mg/mL a velocidade de consumo de oxigênio foi inibida em cerca de 43, 38 e 23 % respectivamente (Figura 23 **B**).

Comparando-se o efeito do nim isolado com o efeito do nim em associação com AS sobre o estado 4 da respiração nós também observamos que o nim quando administrado juntamente com AS causaram uma inibição mais acentuada do que o nim isolado (Figura 24) porém as analises estatísticas revelaram que está diferença não foi significativa.

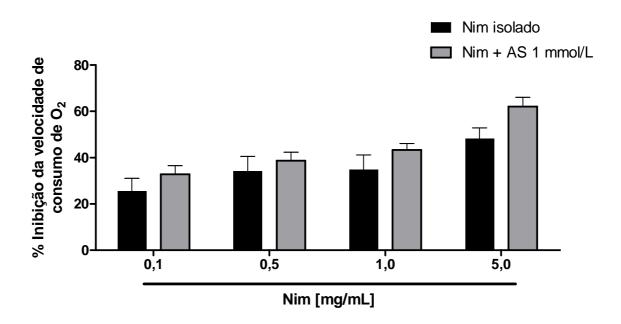


Figura 24 Porcentagem de inibição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória na presença de nim isolado versus nim em associação com AS 1 mmol/L no estado 4. O meio de respiração foi o mesmo descrito na Figura 20. Os resultados são representativos de 6 experimentos independentes, e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO WAY-ANOVA e pós teste de Bonferroni onde avaliou-se o efeito do nim isolado versus nim em associação com AS.

Comparando os efeitos do EB isolado ou em associação com AS sobre o estado 3 e o estado 4 da respiração foi possível verificar que o nim isolado possui um efeito mais acentuado sobre o estado 4 da respiração ou seja quando as mitocôndrias não estão fosforilando o ADP e o nim em associação com o AS foi capaz de causar uma inibição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia

respiratória de forma mais acentuada no estado 3 da respiração ou quando as mitocôndrias estão sintetizando o ATP.

De acordo com os estudos realizados por Panda e colaboradores (2008) foi verificado que uma inibição da cadeia respiratória pode levar a uma disfunção do estado redox, que pode finalmente causar a morte celular nas células de tabaco.

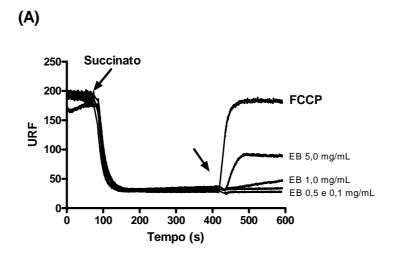
Com os nossos experimentos não foi possível estabelecer mecanismos exatos que expliquem o porquê o nim e o AS são capazes de diminuir a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória. Mais de acordo com estudos prévios realizados por Vandameri (2008), em que foi avaliado o efeito da flavona nas funções mitocondriais hepáticas, a diminuição da velocidade de consumo de oxigênio se deve a alguns mecanismos como: a restrição parcial do fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons que pode ser gerado pela inibição parcial de algumas enzimas envolvidas, alteração da fluidez da membrana mitocondrial e inibição da síntese de ATP.

4.4.3 Efeito do extrato bruto (EB) e do AS sobre o potencial de membrana mitocondrial

Quando um agente desacoplador como o FCCP é adicionado em uma suspensão contendo mitocôndrias, devido as suas características hidrofóbicas, ele atravessa a membrana mitocondrial, liberando um próton na matriz mitocondrial e dissipando desta forma o gradiente de prótons (NELSON & COX, 2002).

Nos experimentos apresentados no item 4.5.2 o nim isolado ou em associação com AS diminuíram a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória. Pode-se observar aqui também o comprometimento da manutenção do Δμ_{H+} (Figura 25). Se o fluxo de elétrons por meio da cadeia respiratória é reduzido, o mesmo ocorre com bombeamento de prótons através da membrana. comprometendo a formação do gradiente eletroquímico de prótons. A Figura 25 mostra que com a adição de succinato é gerado um potencial elétrico que pode ser verificado pela captação da safranina pelas mitocôndrias com diminuição da fluorescência da safranina O livre. Porém quando o FCCP é adicionado ocorre um colapso total do potencial de membrana, com a liberação da safranina e consequente aumento da fluorescência. Com estes resultados pode-se sugerir o acoplamento das mitocôndrias (Figura 25).

Para avaliar o efeito do nim sobre o potencial de membrana mitocondrial foi utilizado EB nas concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 5 mg/mL isolado ou em associação com AS e os resultados estão apresentados nas Figuras 25 **A** e **B**. Com o EB isolado nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL não foi possível observar diferença nas respostas. Já as concentrações de 1 e 5 mg/mL pode-se evidenciar uma diminuição do potencial de membrana, porém de forma pouco acentuada, quando comparado com FCCP (Figura 25 **A**). Já quando comparamos o efeito do nim em associação com AS com o FCCP é possível observar em todas as concentrações uma diminuição do potencial de membrana, porém está diminuição foi mais lenta do que a diminuição causada por EB isolado (Figura 25 **B**).



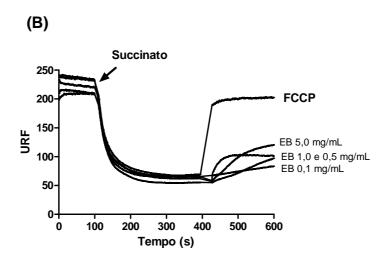


Figura 25 Efeito do nim sobre o potencial de membrana mitocondrial. (A) - EB isolado (B) - EB associação com AS.

Cerca de 1 mg/mL de proteína mitocondrial foram incubadas a 25°C em 2 mL do mesmo meio reacional composto de sacarose 250 mmol/L, EGTA 500 μmol/L, KCl 2 mmol/L, NaH₂PO₄ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), BSA 0,1 g %, rotenona 5 μmol/L e safranina O 5 μmol/L. O potencial de membrana foi gerado pela oxidação do succinato 5 mmol/L. O FCCP 1 μmol/L, AS 1 mmol/L e o nim nas concentrações indicadas foram colocados 400 segundos após a estabilização do potencial. E os traçados são representativos de 4 experimentos independentes.

Estudos realizados por De Souza (2009) nos mostram que o AS e o Ca²⁺, diminuem o potencial de membrana mitocondrial de maneira dose-dependente. Sendo que para o AS o potencial foi mais sensível, pois na concentração de AS 1 mmol/L o potencial foi quase que totalmente desfeito.

Porém quando o AS foi colocado em contato com nim nós não observamos diferenças significativas em relação ao FCCP. Dessa forma podemos sugerir que o potencial de membrana foi mais sensível ao EB isolado do que quando o mesmo foi colocado em associação com AS.

Em células animais já foi relatado que a diminuição do potencial eletroquímico de membrana está associada a morte celular. Estudos realizados por Krause & Durner (2004) demonstram que a arpina, um elicitor bacteriano pode levar a morte celular associada com disfunções dos parâmetros mitocondriais. A arpina diminuiu o potencial eletroquímico de membrana e a síntese de ATP e aumentou a porcentagem de células mortas, sugerindo assim a participação da mitocôndria no processo de morte celular em plantas, porém muitos estudos precisam ser realizados para confirmar o papel da mitocôndria na morte celular em plantas.

Certamente existe uma associação entre a queda do potencial de membrana causada pelo extrato de nim e a diminuição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória. Os resultados mostram que o nim exerce um efeito inibidor da respiração em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus* e causa uma queda do potencial de membrana quando administrado isoladamente, na presença de succinato como substrato oxidável.

É bem relatado que o AS diminui a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória devido ao fato deste ser uma molécula apolar e ter a capacidade de penetrar na MMI e interagir com o radical semiquinona, doando seu próton a este intermediário. A protonação deste radical pode impedir o fluxo normal de elétrons e o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas dissipando o potencial e impedindo a redução monoeletrônica do oxigênio a água (DE SOUZA, 2009).

Como já foi verificado que o nim possui a capacidade de doar um próton ao radical DPPH reduzindo este radical, pode ser possível que o nim também, como o AS tenha a capacidade de doar um próton ao radical semiquinona impedindo o fluxo normal de elétrons pela cadeia respiratória, porém estes resultados são meramente especulativos.

Embora o presente estudo não possibilite concluir sobre mecanismos, eles são relevantes a medida que a inibição da cadeia respiratória, juntamente com outros fatores, pode estar relacionada com a morte celular em plantas.

4.4.4 Efeito do extrato EB e do AS na produção de EROs em mitocôndrias de Rubus fruticosus

A literatura apresenta vários estudos onde é demonstrado o forte poder antioxidante dos extratos de nim (SITHISAM, et al., 2005; SITHISARN et al., 2007; MANIKANDA et al., 2008). Estudos mostram que o nim possui atividade quimiopreventiva e antioxidante contra várias linhagens de células cancerígenas (BALASENTHIL et al., 1999; MANIKANDA et al., 2008).

Conforme mencionado anteriormente a alta produção de EROs pode comprometer as funções mitocondriais e celulares, o que está diretamente relacionado com os mecanismos envolvidos na morte celular programada e ativação de sistemas antioxidantes (JONES, 2000; FLEURY et al., 2002). Para avaliar a atividade antioxidante do extrato de nim em mitocôndrias isoladas de células de *Rubus fruticosus* foram realizadas análises na presença de cálcio (2 mmol/L) para estimular a produção de EROs, visto que a produção basal de EROs por estas mitocôndrias é muito baixa.

Em nossos experimentos foi observado que tanto a rotenona quanto antimicina A foram capazes de estimular a produção de EROs significativamente. No entanto esta produção foi mais alta na presença de antimicina A. Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados por De Souza (2009) onde em seus resultados foi observado que a antimicina A estimulou fortemente a produção de EROs sugerindo dessa forma que as EROs formadas em mitocôndrias de *Rubus fruticosus* podem ser produzidas pelo complexo III, principalmente pelo radical semiquinona.

O efeito do extrato de nim sobre a produção de EROs foi verificado utilizandose várias concentrações de extrato EB (0,1, 0,5, 1 e 5 mg/mL) isolado ou em associação com AS 1 mmol/L. Os resultados apresentados nos mostram o efeito do nim isolado sobre a produção de EROs na presença de rotenona (Figura 26 **A**) e antimicina A (Figura 26 **B**). Nestas condições o nim foi capaz de diminuir a produção de EROs de maneira-dose dependente.

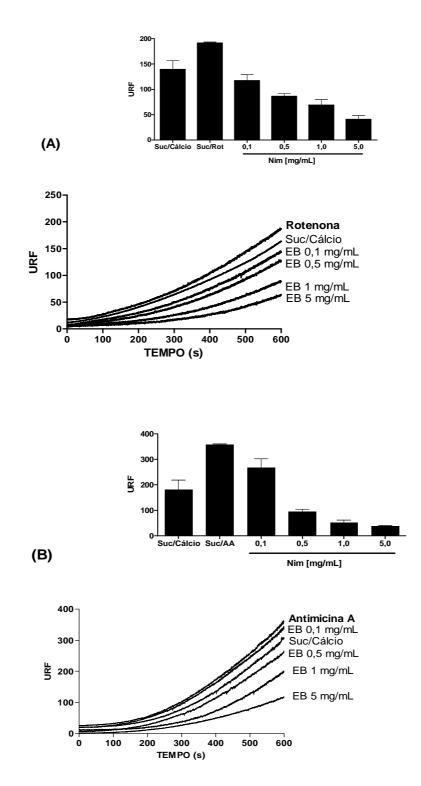
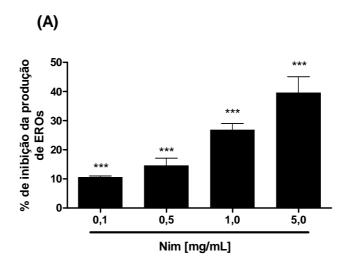


Figura 26 Efeito do extrato bruto e do AS sobre a produção de EROs induzida por cálcio e inibidores da cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias isoladas. (A) – Rotenona e (B) – Antimicina A. O meio de incubação foi composto por cerca de 1 mg/mL de proteína mitocondrial que foram incubadas a 25°C em 1,8 mL do mesmo meio reacional composto de sacarose 250 mmol/L, KCl 2 mmol/L, NaH $_2$ PO $_4$ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), succinato 5 mmol/L e H $_2$ DCFDA 2 μmol/L. Rotenona 5 μmol/L ou antimicina A 1 μmol/L foram adicionados.

Quando calculamos a porcentagem de inibição da produção de EROs é possível verificar que o nim isolado foi capaz de inibir a produção de EROs na presença de antimicina A de forma mais acentuada do que na presença de rotenona (Figura 27 **A** e **B**).

Na presença de antimicina A o EB 5 mg/mL foi capaz de causar uma inibição da produção de EROs de 55 %. Sendo que o EB nas concentrações de 1; 0,5 e 0,1 mg/mL esta inibição foi de 43, 34 e 20 % em relação controle (antimicina A + succinato) (Figura 27 **B**).

Já na presença de succinato e rotenona observamos que o EB na concentração de 5 mg/mL inibiu a produção de EROs em 39 %, o EB nas concentrações de 1,0 e 0,5 mg/mL inibiram a produção de EROs em 26 e 14 % respectivamente. E para a concentração de 0,1 mg/mL o nim foi capaz de inibir a produção de EROs em apenas 10 %, resultado este pouco significativo em relação ao controle onde utilizou-se succinato mais rotenona.



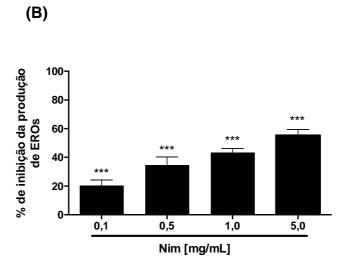
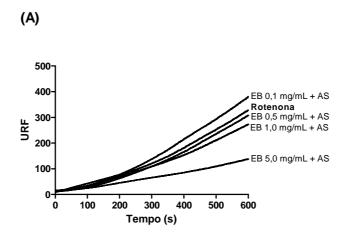


Figura 27 Porcentagem de inibição da produção de EROs em mitocôndrias isoladas utilizando EB isolado. **(A)** – Rotenona e **(B)** – Antimicina A.

O sistema de incubação foi o mesmo descrito na Figura 26. E os resultados são representativos de 6 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós teste Dunnet onde comparou-se as amostras versus controle (*), sendo *** refere-se a P < 0,001 e * refere-se a P < 0,05.

Tem sido relatado em estudos realizados anteriormente em nosso laboratório (DE SOUZA, 2009) que o AS é capaz de diminuir a produção de EROs devido ao fato do AS interagir com o radical semiquinona e doar um próton a este radical, sendo este fenômeno responsável pela desativação do radical e conseqüente diminuição da produção de EROs.

Em nossos estudos foi observado que o EB em associação com AS tanto na presença de rotenona como na presença de Antimicina A, foi capaz de diminuir a produção de EROs para as concentrações de 5; 1 e 0,5 mg/mL. Para a concentração de 0,1 mg/mL nós observamos que o nim foi capaz de aumentar a produção de EROs, porém este efeito não muito significativo (Figura 28 A e B).



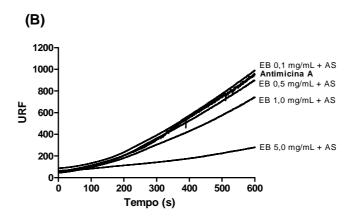
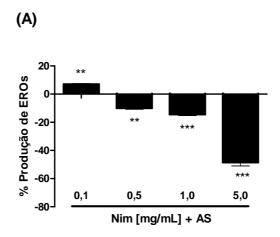


Figura 28 Efeito do nim em associação com AS sobre a produção de EROs em mitocôndrias isoladas. (**A**) – Rotenona e (**B**) – Antimicina A.

O meio de incubação foi composto por cerca de 1 mg/mL de proteína mitocondrial foram incubadas a 25°C em 1,8 mL do mesmo meio reacional composto de sacarose 250 mmol/L, KCl 2 mmol/L, NaH $_2$ PO $_4$ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), succinato 5 mmol/L e H $_2$ DCFDA 2 µmol/L. Rotenona 5 µmol/L ou antimicina A 1 µmol/L, EB nas concentrações indicadas acima e AS 1 mmol/L foram adicionados.



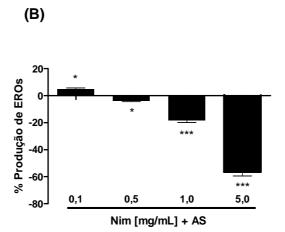


Figura 29 Porcentagem de produção de EROs em mitocôndrias isoladas na presença de nim em associação com AS 1 mmol/L. (**A**) – Rotenona e (**B**) – Antimicina A. O meio de incubação esta representado na Figura 28. Os resultados são representativos de 6 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós teste Dunnet onde comparou-se as amostras versus controle (*), sendo *** refere-se a P < 0,001, ** refere-se P < 0,01 e * refere-se a P < 0,05.

Na presença de nim na concentração de 5 mg/mL juntamente com AS 1 mmol/L, quando utilizamos rotenona observamos que a porcentagem de inibição foi de aproximadamente 48 % e para concentração de nim 1 mg/mL observamos uma taxa de inibição menor cerca de 14%. Já o nim na concentração de 0,5 mg/mL juntamente com AS observamos que seu efeito foi pouco significativo cerca de 10 %. No entanto observamos que o nim 0,1 mg/mL em associação com AS um aumento da produção de EROs 7 % foi observado (Figura 29 **A**).

Com antimicina A observamos que a porcentagem de produção de EROs para as mitocôndrias que foram submetidas ao tratamento com nim juntamente com

AS foi muito semelhante com os resultados onde se utilizou rotenona. O nim em sua maior concentração causou uma inibição da produção de EROs de cerca de 56 %. Na presença de nim em associação com AS nas concentrações de 1,0 e 0,5 mg/mL esta inibição foi menos significativa cerca de 18 e 6 % respectivamente. E o nim 0,1 mg/mL em associação com AS causou um aumento da produção de EROs porém de forma pouco acentuada cerca de 4 % (Figura 29 **B**).

Em estudos realizados por Hua Wu e colaboradores (2009) onde foi avaliado a produção de espécies reativas de oxigênio e o papel das enzimas antioxidantes em embriões de milho mostraram que, a produção de EROs pode estar associada a mudanças do metabolismo energético, pois foi observado que uma diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes estava associada a diminuição dos níveis metabólicos. Foi descoberto ainda que altas taxas de velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória podem levar a um aumento da produção das espécies reativas de oxigênio pela cadeia respiratória.

Com os resultados obtidos neste trabalho ainda não foi possível definir qual o mecanismo exato pelo qual o nim e o AS diminuem a produção de EROs por mitocôndrias isoladas. É possível que exista uma relação entre a diminuição da velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória e a diminuição da produção de EROs. Além do mais, devido ao nim possuir uma grande quantidade de compostos fenólicos, acredita-se que estes sejam responsáveis pela forte atividade antioxidante deste extrato. Foi possível concluir também se o nim exerce um efeito protetor a nível celular, pois nim foi capaz de diminuir as EROs produzidas tanto pelas mitocôndrias isoladas como pelas células intactas, além de inibir a porcentagem de morte celular quando as células intactas foram tratadas com o nim em sua maior concentração.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados neste trabalho nós podemos concluir a principio que:

- De acordo com a caracterização bioquímica foi possível verificar que o extrato de nim possui um alto conteúdo de mono e dissacarídeos em função dos valores de açúcares totais e açúcares redutores que foi de aproximadamente 20 mg/mL e 16 mg/mL, respectivamente;
- O extrato das sementes de nim também apresentou uma forte atividade antioxidante o qual tem um comportamento dose-dependente, sendo que esta função antioxidante, provavelmente, está relacionada a quantidade alta de compostos fenólicos (9,859 mg/mL) encontrada no extrato de nim;
- Em células intactas foi possível observar que o nim em baixas concentrações e o AS possuem a capacidade de causar morte celular em células de Rubus fruticosus em longos tempos de elicitação, sendo este efeito mais acentuado quando o extrato é administrado em associação com AS. Em contrapartida foi possível observar que o nim em sua maior concentração gerou um efeito protetor as células, pois foi observado uma diminuição na porcentagem de morte celular quando comparado ao controle;
- Produção de AS endógeno para as células que foram elicitadas com o nim diminuiu com o aumento da concentração de extrato de nim, entretanto quando o extrato foi administrado com AS observamos um aumento da produção de AS com a diminuição da concentração do extrato;
- O EB isolado também foi capaz de aumentar a produção de compostos fenólicos intracelulares porém quando o mesmo foi administrado em associação com AS foi observado uma diminuição da concentração de compostos fenólicos;
- Sobre a produção de EROs em células intactas foi possível observar que tanto o nim isolado como o nim em associação com AS foi capaz de diminuir a produção das espécies reativas de oxigênio de maneira dose-dependente;

- Sobre os parâmetros mitocondriais, o nim em todas as concentrações isolado ou em associação com AS 1 mmol/L diminuiu a velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória;
- O potencial de membrana mitocondrial foi diminuído na presença de EB isolado ou em associação com AS, porém, quando o mesmo foi administrado com AS 1 mmol/L esta diminuição ocorreu de forma mais lenta;
- A geração de espécies reativas de oxigênio pelas mitocôndrias foi inibida pelo extrato de nim isolado, de maneira dose-dependente, porém quando o nim foi administrado com AS observarmos uma diminuição da produção de EROs para as concentrações de 5 ; 1 e 0,5 mg/mL.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Pesticide use and application: An Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**. India, v. 165, p. 1-12, 2009.

AKERMAN, K. E.; WIKSTRÖN, M. K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Letters**. Finland, v. 68, n. 2, p. 191-197, 1976.

ALVAREZ, M. E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. **Plant Molecular Biology**. Argentina, v. 44, p. 429-442, 2000.

ARSHAD, M.; ZAFAR, M. N.; YOUNIS, S.; NADEEM, R. The use of Neem biomass for biosorption of zinc from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**. Pakistan, p. 1-6, 2008.

BACIC, G.; SPASOJEVIC, I.; SECEROV, B.; MOJOVIC, M. Spin-trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: New traps, radicals and possibilities. **Spectrochimica Acta Part A.** Serbia, v. 69, p. 1354-1366, 2008.

BALASENTHIL, S.; ARIVAZHAGAN, S.; RAMACHANDRAN, C. R.; RAMACHANDRAN V.; NAGINI S. Chemopreventive potential of neem (*Azadirachta indica*) on 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induces hamster buccal pouch carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**. India, v. 67, p. 189-195, 1999.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers ?. **Biochemical pharmacology**. Poland, v. 77, p. 1303–1315, 2009.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azarirachta indica*). **Current Science**. India, v. 82, p. 1336-1345, 2002.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**. Finland, v. 91, p. 179-194, 2003.

BONNEAU, L.; GE, Y.; DRURY, G.E.; GALLOIS, P. What happened to plant caspases?. **Journal of Experimental Botany**, France, v. 59, n.3, p. 491–499, 2008.

BONNER, W.D; VOSS, D.O. Some Characteristics of mitochondria extracted from higher plants. **Nature**. v. 191, n. 478, p. 682–689, 1961.

BRACHT, A.; IWAMOTO, E. L. I. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. **In: Métodos de laboratório em bioquímica**. 1ed: Manole, São Paulo, 2003, cap. 9, p. 227-246, 2003.

BRACHT, A.; IWAMOTO, E. L. I. Técnicas de centrifugação e fracionamento celular. **In: Métodos de laboratório em bioquímica**. 1ed: Manole, São Paulo, 2003, cap. 4, p. 77-99.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUGGER, A. G.; LAMOTTE, O.; VANDELLE, E.; BOURQUE, S.; LECOURIEUX, D.; POINSSOT, B.; WENDEHENNE, D.; PUGIN, A. Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. **The American Phytopathological Society**. France, v. 19, p. 711-724, 2006.

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

CHIVASA, S.; CARR, J. Cyanide restores N gene mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. **Plant Cell**. Cambridge, v. 10, p. 1489-1498, 1998.

CLEMENTS, M.; SAFFREY, J. Cell communication. In: Saffrey, J. The Core of Life, Milton Keynes: The Open University. 2001, v. 2, 2001.

DE SOUZA, F.A.M. Estudo do efeito de respostas de hipersensibilidade sobre a parede celular em cultura de células de amora preta (*Rubus fruticosus*). 2007. 144 p. **Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas** – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

DE SOUZA, W.; CURTI, C.; VARGAS-RECHIA, C.G. Effects of calcium on mitochondria isolated from Blackberry (*Rubus fruticosus*) cell suspension culture. **In: Annual Meeting of SBBq**, 38., 2009. Águas de Lindóia. São Paulo, The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society – SBBq, 2009.

DE SOUZA, W.R. Estudo do efeito elicitor do ácido salicílico e do polissacarídeo extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) em cultura de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*). 2005. 97 p. **Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas** – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

DE SOUZA, W.R. Expressão e caracterização de metacaspases e estudos mitocondriais em plantas superiores. 2009. 170 p. **Dissertação de Doutorado apresentada para obtenção do título de doutor em ciências farmacêuticas** – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEL POZO, O.; LAM, E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. **Current Biology**. New Jersey, v. 8, p. 1129-1132, 1998.

DELLA MEA M.; FRACASSINI, S.; DUCA DEL, S. Programmed cell death: similarities and differences in animals and plants. A flower paradigm. **Amino Acids**. Italy, v. 33, p. 395-404, 2007.

DHONDT, S.; GOUZARH, G.; MULLER, A.; LEGRAND, M.; HEITZ, T. Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. **The Plant Journal**. France, v. 32, p. 749-762, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Agricultural Research Service**. Sta. Paul, v. 3, p. 350-356, 1956.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**. North Carolina, v. 42, p. 185–209, 2004.

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

FERRI, K. F.; KROEMER, G. Mitochondria – the suicide organelles. **Bioessays**. France, v. 23, p. 111-115, 2001.

- FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**. France, v. 84, p. 131–141, 2002.
- FLOR, H. H. Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. **Phytopathology**. St. Paul, v. 45, p. 680-685, 1955.
- GANGULY, S.; BHATTACHARYA, S.; MANDI, S.; TARAFDAR, J. Biological detection and analysis of toxicity of organophosphate- and azadirachtin-based insecticides in *Lathyrus sativus* L. **Ecotoxicology**. India, v. 19, p. 85-95, 2010.
- GERSHENZON, J. Secondary Metabolities and Plant Defense. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. 3 ed. **Sunderland: Sinauer Associates Inc**. 2002. Chapter 13, p. 283-308.
- GOULD, K.S. Nature's swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Akron, v. 5, n.1, p. 314 320, 2004.
- GRACE, S.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**. USA, v. 355, p. 1499-1510, 2000.
- GUMIERO, V. C. Estudo do efeito de respostas de hipersensibilidade do extrato de nim (*Azadirachta indica*) sobre cultura de células de *Rubus fruticosus*. 2008. 123 p. **Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas** Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- GUNAWARDENA, A. H. L. A. N.; GREENWOOD, J. S.; DENGLER, N. G. Programmed Cell Death Remodels Lace Plant Leaf Shape during Development. **The plant cell**. Canada, v. 16, p. 60-73, 2004.
- GUNTER, E. T.; SHEU, S. S. Review Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca₂₊ transport mechanisms. **Biochimica at Biophysica Acta**. USA, p. 1-18, 2009.
- GUO, B.; LIANG, Y.; ZHUE, Y. Does salicylic acid regulate antioxidant defense system, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice?. **Journal of Plant Physiology**, China, v. 166, p. 20-31, 2009.

HAMMERSCHIMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review. Phytopatology**. Palo Alto-CA, v. 37, p. 285-306, 1999.

HAYWARD, A.P.; TSAO, J.; KUMAR, S.P.D. Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, USA, v. 20 p.1041–1047, 2009.

HEATH, M. Hypersensitive response-related death. **Plant molecular Biologic**. Canada, v. 44, p. 321-334, 2000.

HELLER, R. Recherches sur la nutrition miné rale des tissus végétaux cultivés in vitro. **Annuaire des Sciences Naturelles et Biologie Végétale**. Paris, v. 14, p. 1-233, 1953.

HELMY, W. A.; AMER, H.; SHAYEB, M. A. Biological and Anti-microbial Activities of Aqueous Extracts from Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). **Journal of Applied Sciences Research**. Egypt, v. 3, n. 10, p. 1050-1055, 2007.

HEREDIA, J. M. G.; HÉRVAS, M.; DE LA ROSA, M. A.; NAVARRO, J. A. Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. **Planta**. Spain, v. 228, p. 89-97, 2008.

HIR, H.; APEL, K. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**. Switzerland, v. 55, p. 373-399, 2004.

HOFIUS, D.; TSITSIGIANNIS, D. I.; JONES, J. D. G.; MUNDY, J. Inducible cell death in plant immunity. **Seminars in Cancer biology**. United Kingdom, v. 17, p. 166-187, 2007.

HUA WU. J.; WANG, W.Q.; SONG, S.Q.; CHENG, H.Y. Reactive Oxygen Species Scavenging Enzymes and Down-Adjustment of Metabolism Level in Mitochondria Associated with Desiccation-Tolerance Acquisition of Maize Embryo. **Journal of Integrative Plant Biology**. China, v. 51, n.7, p. 638–645, 2009.

HUSTACHE, G.; MOLLARD, A.; BARNOUD, F. Culture illimitée d'une souche anergiée de *Rosa glauca* par la technique des suspensions cellulaires. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**. Paris, v. 281, p. 1381-1384, 1975.

- IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J.J. Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. New Hampshire, v. 51, p. 1811-1815, 2003.
- IQBAL, M.; MORAWIEC, J.J.; MAHMOODUZZAFAR, W.W. Foliar characteristics, cambial activity and wood formation in *Azadirachta indica* A. Juss as effected by coal-smoke pollution. **Flora**. India, n.205, p.61-71, 2010.
- JONES A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death?. **Trends in plant Science Perspectives**. Lancaster, v. 5, n. 5, p. 225-230, 2000.
- JUSZCZUK, I. M.; RYCHTER, A. M. Alternative oxidase in higher plants. **Acta Bioquimica Polonica**. Poland, v. 50, n. 4, p. 1257-1271, 2003.
- KANAI, R.; EDWARDS, G. E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C3, C4 and <u>Crassulacean</u> acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. **Plant Physiology**. Lancaster, v. 52, p. 484-490, 1973.
- KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**. Turkey, v. 2, p. 41-60, 2009.
- KAWANO, T. MUTO, S. Mechamisn of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**. Japan, v. 51, n. 345, p. 685-693, 2000.
- KIDBY, D. K.; DAVIDISON, D. J. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. **Analytical Biochemistry**. Canada, v. 55, n. 1, p. 321-325, 1973.
- KING, P.; ANURADHA, K.; LAHARI, B.; KUMAR, Y. P.; PRASAD, V. S. R. K. Biosorption of zinc from aqueous solution using *Azadirachta indica* bark: Equilibrium and Kinect studies. **Journal Hazardous Materials**. India, v. 152, p. 324-329, 2008.
- KORSHUNOV, S. S.; KORKINA, O. V.; RUUGE, E. K.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A. A. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O_2^- and H_2O_2 by mitochondria in the resting state. **FEBS Letters**. Russia, v. 435, p. 215-218, 1998.

- KOUL, A.; MUKHERJEE, N.; GANGAR, S. C. Inhibitory effects of *Azadirachta indica* on DMBA-induced skin carcinogenesis in Balb/c mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**. India, v. 283, p. 47-55, 2006.
- KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactives oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**. **In Press, Accepted Manuscript**. p. 1-25, 2009.
- KRAUSE, M. DURNER, J. Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. **The American phytopathological society**. Germany, v. 2, p. 131-139, 2004.
- KROL, W.; CZUBAA, A.; SCHELLERA, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANITB J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **Journal of Ethnopharmacology**. Israel, v. 41 p.121-126, 1994.
- KUMAR, G.H.; MOHAN, K.V.P.C.; RAO, A.J.; NAGINI, S. Nimbolide a limonoid from *Azadirachta indica* inhibits proliferation and induces aopotosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells. **Invest New drugs**. India, n. 27, p. 246-252, 2009.
- KUMAR, S. S. R.; SRINIVAS, M.; YAKKUNDI, S. Limonoids from the seeds of *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**. India, v. 43, p. 451-455, 1996.
- LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Molecular Cell Biology**. New Jersey, v. 5, p. 305-315, 2004.
- LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Insight Review Articles**. Canada, v. 411, p. 848-853, 2001.
- LEE, H. I.; LEON, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America**. Washington, v. 92, n. 10, p. 4076-4079, 1995.
- LEE, S.; CHOI, H.; SUH, S.; DOO, I.; OH, K.; CHOI, E.J.; TAYLOE, A.N.S.; LOW, P.S.; LEE, Y. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**. Lancaster, v. 121, n. 1, p.147-152, 1999.

- LEVINE, A.; PENNELL, R. I.; ALVAREZ, M. A.; PALMER, R.; LAMB, C. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. **Current Biology**. USA. v. 6, n. 4, p. 427–437, 1996.
- LEY, S. V. Synthesis and chemistry of the insect antifeedant azadirachtin. **Pure & Applied Chemistry**. Cambridge, v. 66, p. 2099-2102, 1994.
- LEY, S. V.; DENHOLM, A. A.; WOOD, A. The chemistry of Azadirachtin. **Natural Product Reports**. London, p. 109-157, 1993.
- MAITY, P.; BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Review article: The use of neem for controlling gastric hyperacidity and ulcer. **Phytotherapy research**. India, n. 23, p. 747-755, 2009.
- MANDAL, S.; MALLICK, N.; MITRA, A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum f.* sp. *Lycopersici* in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**. India, v. 47 p. 642–649, 2009.
- MANIKANDAN P.; LETCHOUMY, V.; GOPALAKRISHNAN, M.; NAGINI, S. Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for in vitro antioxidant potential and in vivo modulation of biomarkers of chemoprevention in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. **Food and Chemical Toxicology**. India, v. 46, p. 2332-2343, 2008.
- MANIKANDAN, P.; ANANDAN, R.; NAGINI, S. Evaluation of Azadirachta indica leaf fractions for in vitro antioxidant potential and protective effects against H_2O_2 Induced oxidative damage to pBR322 DNA and red blood cells. **Journal of Agricultural and food chemistry**. India v. 57, p. 6990-6996, 2009.
- MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra doenças. **Ciência Hoje**. Brasil, n. 147, 1999.
- MARIANO, A. B.; VALENTE, C.; CADENA, S. M. S. C.; ROCHA, M. E. M.; De OLIVEIRA, M. B. M.; CARNIERI, E. G. S. Sensitivities of the alternative respiratory components of potato tuber mitochondria to thiol reagents and Ca²⁺. **Plant Physiology Biochemistry**. Paraná, v. 43, p. 61-67, 2005.
- MARTINEZ, S. S. O nim *Azadirachta indica* Natureza, usos múltiplos, produção. **IAPAR**. Londrina, p. 127, 2002.

MATHIEU, Y.; KURKDJIAN, A.; XIA, H.; GUERN, J.; KOLLER, A.; SPIRO, M. D.; O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. **The Plant Journal**. Oxford, v. 1, p. 333-343, 1991.

MATSUKAWA, K.; TAKASHI KAMATA, T.; KIKUKATSU ITO, K. Functional expression of plant alternative oxidase decreases antimycin A-induced reactive oxygen species production in human cells. **FEBS Letters**. Japan, v. 583 p.148–152, 2009.

MAXWELL D. P.; WANG Y.; MCINTOSH L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America**. USA, v. 96, p. 8271-8276, 1999.

MCCABE, P.F.; EAPE, T.J. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. **Apoptosis**. Dublin, p. 1-8, 2010.

MEDVEDEV, S. S.; Calcium Signaling System in Plants. **Russian Journal of Plant Physiology**. Russia, v. 52, n. 2, p. 249–270, 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**. USA, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS in Plant Science**. USA, v. 9 n. 10, p. 490-498, 2004.

MOHANTY, S.; PATRA, A. K. P; CHHONKAR, P.K. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel powder retards urease and nitrification activities in different soils at contrasting moisture and temperature regimes. **Bioresourse technology**. India, v. 99, p. 894-899, 2008.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: Eletrons transport, NAPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Roskilde, v. 52, p. 561-591, 2001.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal Science Technology**. U.K, v. 26, n. 2, p. 211 – 219, 2004.

MORGAN, E. D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & medicinal Chemistry**. United Kingdom, p. 1-10, 2008.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. Londrina, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005.

MUR, L. A. J.; KENTON, P.; LLOYD, A. J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. **Journal of Experimental Botany Advance Access Published**. Spain, p. 1-20, 2007.

MURATA, Y.; PEI, Z-M.; MORI, I.C.; SCHOROEDER, J.I. Absicisic and activation of plasma membrane Ca⁺² channels in guard cell requires NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in the *abi* 1-1 and *abi* 2 protein phosphatase 2 c mutants. **The plant cell**. Rockville, v. 13, n. 11, p. 2513-2523, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação **In: Lehninger Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002, p. 515-561.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. **In: Lehninger Principles of Biochemistry**. 5 ed. New York: W. H Freeman and Company, 2008, p.707-762.

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, T. P.; NOGUEIRA, J. C. M. Cultivo e utilização do Nim indiano. **EMBRAPA**. Brasil, Circular técnica 62, 2003.

NOGUCHI, K.; YOSHIDA K.; Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. **Mitochondrion**. Japan, v. 8 p. 87–99, 2008.

NUNES, M. Avaliação da qualidade da pasta de microalgas produzidas em laboratório de larvicultura de molusculos no sul do Brasil. 2005. 46 p. **Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de mestre em Aqüicultura.** Universidade Federal de Santa Catarina, São Catarina, 2005.

ODAGIRI, K.; KATOH, H.; KAWASHIMA, H.; TANAKA, T.; OHTANI, H.; SAOTOME, M.; URUSHIDA, T.; SATOH, H.; HAYASHI, H. Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. Japan, v. 46, p. 989–997, 2009.

OLIVIER VAN AKEN, O.; GIRAUD, E.; CLIFTON, R.; WHELAN, J. Review: Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. **Physiologia Plantarum**. Australia, v.137, p. 354–361, 2009.

OLSON, D. M.; CORTESERO, A. M.; RAINS G. C. POTTER, T.; JOE LEWIS, W. Nitrogen and water affect direct and indirect plant systemic induced defense in cotton. **Biological Control**. USA, v. 49, p. 239-244, 2009.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; ABU-ASAKER, M.; S_ENOL, S.; YILMAZ, G.; S_ENER, B. Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. **Food Chemistry**, Turkey, v. 114, p. 276-281, 2009.

PANDA, S. K.; YAMAMOTO, Y.; KONDO, H.; MATSUMOTO, H. Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tabacco cells under aluminium stress. **Pharmacology and toxicologic**. India, v. 331, p. 597-610, 2008.

PARK, J. M. The Hypersensitive Response. A Cell Death during Disease Resistance. **The plant pathologic Journal**. Korea, v. 21, n. 2, p. 99-101, 2005.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**, v.1-**Princípios e conceitos**. 3 ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 22, p. 417-452.

PETROSILLO, G.; RUGGIERO, F. M.; PISTOLÉESE, M.; PARADIES, G. Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome *c* release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and independent mechanisms. Role of cardiolipin. **Journal of Biological Chemistry**. Italy, v. 279, p. 53103-53108, 2004.

PRAKASH, G.; SRIVASTAVA, A. K.; Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, India, v. 40, p. 218-226, 2008.

PUNTARULO, S.; SANCHEZ, R. A.; BOVERIS, A. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. **Plant Physiology**. Buenos Aires, v. 86, p. 626-630, 1988.

PURVIS, A. C. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. **Physiology Plantarum**. Georgia, v. 100, p. 165-170, 1997.

- RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 43, p.439–63, 1992.
- RASMUSSON, A. G.; SOOLE, K. L.; ELTHON T. E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. **Annual Review of Plant Biology**. Astralia, v. 55, p. 23-39, 2004.
- REAPE, J. T.; MOLONY, E. M.; MCCABE, F. P. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. **Journal of Experimental Botany**. Republic of Ireland, v. 59, p. 435-444, 2008.
- RENEW, S.; HEYNO, E.; SCHOPFER, P.; LISZKAY, A. Sensitive detection and localization of hydroxyl radical production in cucumber roots and Arabidopsis seedlings by spin trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy. **The Plant Journal**. Germany, v. 44, p. 342-347, 2005.
- RIBEIRO, S. M. R; QUEIROZ, J. H.; PELÚZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Biosciences**. Brasil, v. 21, p. 133-149, 2005.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**. Oxoford, v. 2, p. 152-159, 1999.
- ROBERTS, T. H.; FREDLUND, K. M.; MOLLER, I. M. Direct evidence for the presence of two external NAD(P)H dehydrogenases coupled to the electron transport chain in plant mitochondria. **FEBS Letters**. Sweden, v. 373, p. 307-309, 1995.
- SAITO, M. L. As plantas praguicidas: Alternativa para o controle de pragas na agricultura. **EMBRAPA**. Brasil, 2004.
- SARAIS, G.; ANGIONI, A.; LAI, F.; CABRAS, P.; CABONI, P. Persistence of two neem formulations on peach leaves and fruit: effect of the distribution. **Journal of Agricultural and food chemistry**. Italy, v. 57, p. 2457-2461, 2009.
- SCHOCH, G.A.; NIKOV, G.N.; ALWORTH, W.L.; WERCK-REICHHART, D. Chemical inactivation of the cinnamate 4-hidroxylase allows for the accumulation of salycilic acid in elicited cells. **Plant physiology**. Lancaster, v. 130, p. 1022-1031, 2002.
- SHAO HONG-BO, S.; LI-YE, C.; MING-AN, S.; JALEEL, A.C.; HONG-MEI, M. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. **Physiology /Physiologie**. India, v. 331, p. 433-441, 2008.

SHI, Q.; ZHU, Z. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. **Environmental and Experimental Botany**. China, v. 63, p. 317–326, 2008.

SHIRASU, K.; NAKAJIMA, H.; RAJASEKHAR, K. V. DIXON, R. A.; LAMBAS, C. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. **The Plant Cell**. California, v. 9, p. 261-270, 1997.

SHUMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the Neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual review of Entomology**. Giessen, v. 35, p. 271-290, 1990.

SIDDIQUI, B. S.; AFSHAN, F.; GULZAR, T.; HANIF, M. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**. Pakistan, v. 65, p. 2363-2367, 2004.

SIDHU, O. P.; KUMAR, V.; BEHI, H. M. Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with respect to Azadirachtin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. India, v. 51, p. 910-915, 2003.

SINGH, U. P.; MAURYA, S.; SINGH, D. P. Phenolic acids in neem (*Azadirachta indica*): a major pre-existing secondary metabolites. **Journal of Herbal Pharmacoteraphy**. Binghmton, v. 5, n. 1, p. 35-43, 2005.

SITHISARN, P.; CARLSEN, C. U.; ANDERSEN, M. L.; GRITSANAPAN, W.; SKIBSTED, L.H. Antioxidative effects of leaves from *Azadirachta* species of different provenience. **Food Chemistry**. Thailand, v. 104, p. 1539-1549, 2007.

SITHISARN, P.; SUPABPHOL, P.; GRITSANAPAN, W. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). **Journal of Ethnopharmacology**. Thailand, v. 99, p. 109–112, 2005.

SLINKARD, K. & SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology Viticulture**. Japan, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SMITH, J.L.; MORAES, C.; MESCHER, C. A. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. **Society of Chemical Industry**, p.1-7, 2008.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto-CA, v. 35, p. 235-270, 1997.

STOWE, D. F.; CAMARA, A. K. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. **Antioxidants & Redox Signaling**. Wisconsin, v. 11, n. 6, p. 1374-1396, 2009.

SUN, Y. L.; ZHAO, Y.; HONG, X.; ZHAI, Z, H. Cytochrome *c* release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. **FEBS Letters**. China, v. 462 p. 317-321, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Respiração e metabolismo de lipídeos **In: Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. Cap. 11, p. 251-284.

TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. A peroxide/phenolics/ascorbate system can scenge hydrogen peroxide in plant cells. **Plant Physiology**. Yugoslavia, v. 101, p. 845-852, 1997.

TAMAGNONE, L.; MERIDA, A.; STACEY, N.; PLASKITT, K.; PARR, A.; CHANG, C.; LYNN, A.; DOW, M.; ROBERTS, K.; MARTIN, C. Inhibition of Phenolic Acid Metabolism Results in Precocious Cell Death and Altered Cell Morphology in Leaves of Transgenic Tobacco Plants. **The Plant Cell**. United Kingdom, v. 10, p. 1801–1816, 1998.

TSANKO S.; GECHEV, T.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **The Journal of Cell Biology**. Netherlands, v. 168, n.1, p. 17–20, 2005.

VALDAMERI, G. Efeito da flavona sobre o metabolismo mitocondrial. 2008. 75 p. **Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de mestre em ciências-Bioquímica** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VAN DAM, N.M. How plants cope with biotic interactions. **Plant Biology**. The Nertherlands, v. 11, p. 1-5, 2009.

VAN DER NAT, J. M.; VAN DER SLUIS, W. G.; DE SILVA, K. T. D.; LABADIE, R.P. Ethnopharmacognostical survey of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. Ireland, v. 35, p. 1-24, 1991.

VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; HEYRAUD, A.; DRIGEZ, H.; LIENART, Y. Xuloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of Hymenaea courbaril acts as a signaling molecule. **Plant Physiology**. v. 116, n. 3, p. 1013-1021, 1998.

VARGHESE, B.; NAITHANI, S. C. Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. **Journal of plant physiology**. India, v. 165, p. 755-765, 2008.

VERCAMMEN, D.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P.; VAN BREUSEGEM, F. Are metacaspases caspases?. **The Journal of Cell Biology**. Belgium, v. 179, n.3, p.375–380, 2007.

WALTERS, D. R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**. United Kingdom, v. 28, p. 459-465, 2009.

WILDERMUTH, M. C.; DEWNEY, J.; AUSUBEL, W. U. G.; AUSUBEL, F. M. Isocorismate sintase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. **Nature**. London, v. 414, n. 1, p. 562-565, 2001.

YAKKUNDI, S. R.; THEJAVATHI, R.; RAVINDRANATH, B. Variation of Azadirachtin content during growth and storage of Neem (*Azadirachta indica*) seeds. **Journal Agriculture Food chemistry**. India, v.43, p. 2517-2519, 1995.